



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0045085

(51)<sup>2020.01</sup> C12P 7/16; C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2020-02896

(22) 30/04/2010

(62) 1-2011-03322

(86) PCT/US2010/033300 30/04/2010

(87) WO/2010/127319 04/11/2010

(30) 61/174,473 30/04/2009 US

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/08/2020 389A

(71) GENOMATICA, INC. (US)

10520 Wateridge Circle San Diego, CA 92121, United States of America

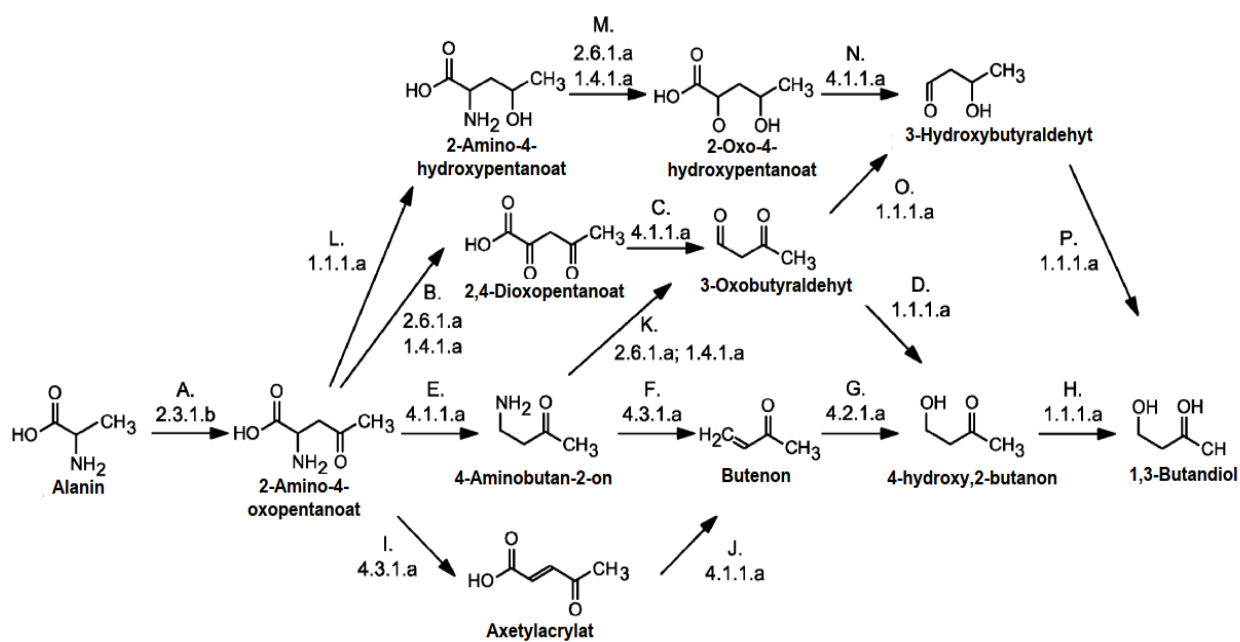
(72) BURGARD, Anthony, P. (US); BURK, Mark, J. (US); OSTERHOUT, Robin, E. (US); PHARKYA, Priti (IN).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) VI SINH VẬT KHÔNG CÓ TRONG TỰ NHIÊN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT  
1,3-BUTANDIOL SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(21) 1-2020-02896

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật không có trong tự nhiên bao gồm vi sinh vật có con đường 1,3-butandiol (1,3-BDO) có ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho các enzym của con đường 1,3- BDO được biểu hiện ở lượng vừa đủ để sản xuất 1,3-BDO. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất 1,3-BDO, bao gồm việc nuôi cấy các vi sinh vật này trong các điều kiện và khoảng thời gian đủ để sản xuất 1,3-BDO.



**FIG. 1**

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến quá trình sinh tổng hợp và các sinh vật có khả năng sản xuất các hợp chất hữu cơ. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các sinh vật không có trong tự nhiên có khả năng tạo ra hóa chất thương phẩm 1,3-butandiol.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

1,3-butandiol (1,3-BDO) là diol có 4 cacbon được sản xuất theo cách truyền thống nhờ quá trình hydrat hóa axetylen. Sau đó, axetaldehyt được tạo ra được chuyển hóa thành 3-hydroxybutyraldehyt, chất này sau đó được khử để tạo ra 1,3-BDO. Trong những năm gần đây, axetylen đã được thay thế bằng etylen có giá thành thấp hơn làm nguồn sản xuất axetaldehyt. 1,3-BDO thường được sử dụng làm dung môi hữu cơ cho các chất điều vị thực phẩm. Chất này còn được sử dụng làm co-monomer để tổng hợp nhựa polyuretan và polyester và còn được sử dụng rộng rãi làm thuốc giảm gluco huyết. Hợp chất 1,3-BDO quang hoạt là nguyên liệu hữu dụng để tổng hợp các hợp chất và tinh thể lỏng có hoạt tính sinh học. Một ứng dụng thương mại chủ yếu của 1,3-butandiol là quá trình loại nước theo sau để tạo ra 1,3-butadien (Ichikawa et al., J. of Molecular Catalysis A-Chemical, 256:106-112 (2006); Ichikawa et al., J. of Molecular Catalysis A-Chemical, 231 :181-189 (2005)), 11,25 tỷ kg/năm hóa chất dầu mỏ được sử dụng để sản xuất cao su tổng hợp (ví dụ, lốp xe), latec, và nhựa. Việc dựa vào nguồn nguyên liệu dầu mỏ để sản xuất axetylen hoặc etylen đảm bảo cho sự phát triển của quy trình sản xuất 1,3-butandiol và butadien dựa trên nguồn nguyên liệu tái tạo được.

Do đó, có nhu cầu cải tiến các vi sinh vật và phương pháp sử dụng các vi sinh vật này để sản xuất 1,3-BDO. Giải pháp kỹ thuật của sáng chế đáp ứng được nhu cầu này và cũng đề xuất những ưu điểm liên quan.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm vi khuẩn có con đường tổng hợp 1,3-butandiol (1,3-BDO) có ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào con đường tổng hợp 1,3-BDO được biểu hiện ở lượng đủ để sản xuất 1,3-BDO. Con đường tổng hợp 1,3-BDO bao gồm một enzym được chọn từ nhóm bao gồm 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza, AKP dehydrogenaza, 2-amino-4-hydroxypentanoat aminotransferaza, 2-amino-4-hydroxypentanoat oxidoreductaza (khử amin), 2-oxo-4-hydroxypentanoat decarboxylaza, 3-hydroxybutyraldehyt reductaza, AKP aminotransferaza, AKP oxidoreductaza (khử amin), 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza, 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton), 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt), 4-hydroxy-2-butanon reductaza, AKP decarboxylaza, 4-aminobutan-2-on aminotransferaza, 4-aminobutan-2-on oxidoreductaza (khử amin), 4-aminobutan-2-on amoniacylaza, butenon hydrataza, AKP amoniacylaza, axetylacrylat decarboxylaza, axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo aldehyt), axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo rượu), axetoaxetyl-CoA reductaza (khử keton), 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt), 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu), 4-hydroxybutyryl-CoA hydrataza, và crotonaza.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất 1,3-BDO bao gồm nuôi cấy vi khuẩn không có trong tự nhiên này trong các điều kiện và thời gian đủ để tạo ra 1,3-BDO.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện con đường tổng hợp 1,3-BDO từ alanin. Các enzym là: A) AKP thiolaza, B) AKP aminotransferaza hoặc AKP oxidoreductaza (khử amin), C) 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza, D) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt), E) AKP decarboxylaza, F) 4-aminobutan-2-on amoniacylaza, G) Butenon hydrataza, H) 4-hydroxy, 2-butanon reductaza, I) AKP amoniacylaza, J) axetylacrylat decarboxylaza, K) 4-aminobutan-2-on aminotransferaza hoặc 4-aminobutan-2-on oxidoreductaza (khử amin), L) AKP dehydrogenaza, M) 2-amino-4-hydroxypentanoat aminotransferaza hoặc 2-amino-4-hydroxypentanoat oxidoreductaza (khử amin), N) 2-oxo-4-hydroxypentanoat decarboxylaza, O) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton), và P) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza.

Fig.2 thể hiện con đường từ axetoaxetyl-CoA đến 1,3-butandiol. Các enzym là: A) axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo aldehyt), B) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton), C) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza, D) axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo rượu), E) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt), F) 4-hydroxy,2-butanon reductaza, G) axetoaxetyl-CoA reductaza (khử keton), H) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt), và I) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu).

Fig.3 thể hiện con đường từ 4-hydroxybutyryl-CoA đến 1,3-butandiol. Các enzym là: A) 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza, B) crotonaza, C) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt), D) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza, và E) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu).

Fig.4 thể hiện aldehyt dehydrogenaza có hoạt tính đáng kể trên 3-hydroxybutyl-CoA.

Fig.5 thể hiện hoạt tính đặc hiệu của *bld* từ *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* trên 3-hydroxybutyryl-CoA trước và sau khi thâm tách.

Fig.6 thể hiện các nồng độ 1,3-BDO khi bổ sung 3-hydroxybutyraldehyt làm cơ chất và trong mẫu đối chứng không có cơ chất. Các số GI đối với rượu dehydrogenaza được thể hiện.

Fig.7 thể hiện các nồng độ 1,3-BDO khi bổ sung 3-hydroxybutyryl-CoA làm cơ chất và trong mẫu đối chứng không có cơ chất. Các số GI đối với rượu dehydrogenaza được thể hiện. Số GI đối với aldehyt dehydrogenaza được thử nghiệm là 163762382.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các vi sinh vật không có trong tự nhiên biểu hiện gen mã hóa cho các enzym xúc tác cho quá trình tổng hợp 1,3-butandiol (1,3-BDO). Các con đường tổng hợp 1,3-butandiol được bộc lộ trong trong bản mô tả này dựa trên ba phân tử tiền chất là: (i) D-alanin, (ii) axetoaxetyl-CoA, và (iii) 4-hydroxybutyryl-CoA. Việc thiết lập thành công các con đường này đòi hỏi việc xác định tập hợp các enzym thích hợp có hoạt tính và tính đặc hiệu đủ, tách dòng các gen mã hóa tương ứng cho các enzym này vào vật chủ sản

xuất, tối ưu hóa các điều kiện lên men và phân tích quá trình tạo sản phẩm sau quá trình lên men.

Sự chuyển hóa alanin thành 1,3-BDO có thể được thực hiện bằng một số con đường gồm 5 bước có sự tham gia của enzym như được thể hiện trên Fig.1. Trong bước đầu tiên ở tất cả các con đường (bước A), alanin và axetyl-CoA được kết hợp với nhau nhờ enzym 2-amino-4-ketopentanoat thiolaza, là enzym có tính chọn lọc cao. Sau đó, sản phẩm của phản ứng này, là 2-amino-4-oxopentanoat (AKP), có thể bị chuyển nhóm amin, khử, loại nhóm carboxyl hoặc khử amin như được thể hiện trên Fig.1. Các bước tổng hợp tiếp theo để tạo ra 1,3-BDO được mô tả chi tiết dưới đây. Hiệu suất 1,3-BDO lý thuyết từ mỗi con đường này được tính là khoảng 1,09 mol/mol glucoza tiêu thụ.

Fig.2 thể hiện nhiều đường tạo ra 1,3-BDO từ axetoaxetyl-CoA. Mỗi con đường từ axetoaxetyl-CoA đến 1,3-BDO này sử dụng ba đương lượng khử và tạo ra hiệu suất theo lý thuyết là 1 mol 1,3-BDO trên mỗi mol glucoza tiêu thụ. Các cơ chất cacbon khác như khí tổng hợp cũng có thể được sử dụng để sản xuất axetoaxetyl-CoA. Việc khí hóa glucoza để tạo ra khí tổng hợp sẽ đưa đến kết quả là hiệu suất theo lý thuyết tối đa là 1,09 mol 1,3-BDO trên mỗi mol glucoza tiêu thụ, giả sử rằng thu được 6 mol CO và 6 mol H<sub>2</sub> từ glucoza



4-Hydroxybutyryl-CoA là một chất chuyển hóa khởi đầu quan trọng, từ chất này có thể tạo ra nhiều hợp chất hữu dụng trong công nghiệp, bao gồm 1,3-BDO như được thể hiện trên Fig.3. Mặc dù 4-hydroxybutyryl-CoA không phải là chất chuyển hóa trung tâm phổ biến ở mức độ cao, nhưng các phương pháp tạo ra các chủng tổng hợp 4-hydroxybutyryl-CoA đã được mô tả trước đây bởi người nộp đơn của đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 2009/0075351. Con đường từ 4-hydroxybutyryl-CoA đến 1,3-butandiol có hiệu suất theo lý thuyết là 1,09 mol/mol sản phẩm, giả sử sử dụng glucoza làm nguồn hydrat cacbon.

Theo một khía cạnh, sáng chế còn đề xuất các phương pháp sản xuất 1,3-BDO bằng cách nuôi cấy các vi khuẩn không có trong tự nhiên này. Việc loại nước của 1,3-BDO được tạo ra bởi các sinh vật này và các phương pháp được mô tả, tạo ra cơ hội sản xuất butadien tái tạo

được trong các thiết bị tạo sản phẩm đầu cuối nhỏ, tránh được yêu cầu phải vận chuyển hóa chất phản ứng và dễ cháy này.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “không có trong tự nhiên” khi được sử dụng để đề cập đến vi khuẩn hoặc vi sinh vật của sáng chế nhằm chỉ vi khuẩn đó có ít nhất một sự biến đổi trong gen không được tìm thấy một cách bình thường ở các chủng có trong tự nhiên của các loài được đề cập, bao gồm các chủng kiểu dại của các loài này. Các biến đổi di truyền bao gồm, ví dụ, các cải biến đưa vào các axit nucleic có thể biểu hiện mã hóa cho các polypeptit tham gia chuyển hóa, các dạng bổ sung axit nucleic khác, mất axit nucleic và/hoặc sự phá hỏng chức năng vật liệu di truyền của vi khuẩn. Các cải biến này bao gồm, ví dụ, các vùng mã hóa và các đoạn chức năng của nó, đối với các polypeptit tương đồng, khác loại hoặc cả tương đồng và khác loại, đối với các loài này. Các cải biến khác bao gồm, ví dụ, các vùng điều hòa không mã hóa mà trong đó sự cải biến làm thay đổi sự biểu hiện của gen hoặc operon. Ví dụ về các polypeptit tham gia chuyển hóa bao gồm các enzym hoặc protein trong con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol.

Sự cải biến trong quá trình chuyển hóa đề cập đến phản ứng sinh hóa được làm thay đổi so với trạng thái của nó trong tự nhiên. Do đó, các vi sinh vật không có trong tự nhiên có thể có sự cải biến di truyền đối với axit nucleic mã hóa cho polypeptit tham gia chuyển hóa hoặc các đoạn chức năng của nó. Ví dụ về sự cải biến trong chuyển hóa được bộc lộ trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được phân lập”, khi được sử dụng có liên quan đến vi khuẩn, chỉ sinh vật về cơ bản là không chứa ít nhất một thành phần như có ở vi khuẩn được đề cập đó được tìm thấy trong tự nhiên. Thuật ngữ này bao gồm vi khuẩn đã bị loại đi một số hoặc toàn bộ các thành phần khi nó được tìm thấy trong môi trường tự nhiên. Thuật ngữ này cũng bao gồm vi khuẩn đã bị loại đi một số hoặc toàn bộ các thành phần khi nó được tìm thấy trong môi trường không có trong tự nhiên. Đó đó, vi khuẩn được phân lập được tách ra hoàn toàn hoặc một phần từ các chất khác khi nó được tìm thấy trong tự nhiên hoặc khi nó được nuôi cấy, lưu giữ hoặc tồn tại trong môi trường không có trong tự nhiên. Ví dụ cụ thể về

các vi khuẩn phân lập bao gồm các chủng vi khuẩn sạch một phần, các chủng vi khuẩn cơ bản là sạch và các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường không có trong tự nhiên.

Như được sử dụng trong bản mô tả, các thuật ngữ “vi khuẩn” hoặc “vi sinh vật” chỉ sinh vật bất kỳ tồn tại dưới dạng tế bào cực nhỏ, sinh vật này thuộc nhóm cổ khuẩn, vi khuẩn hoặc sinh vật nhân thật. Vì vậy, thuật ngữ này dự định bao hàm các tế bào nhân sơ hoặc các tế bào nhân thật hoặc các sinh vật có kích cỡ hiển vi và bao gồm vi khuẩn, cổ khuẩn và vi khuẩn thật gồm tất cả các loài cũng như các vi sinh vật nhân thật như nấm men và nấm. Thuật ngữ này còn bao gồm các chủng tế bào của loài bất kỳ mà có thể được nuôi cấy để sản xuất các chất hóa sinh học.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “CoA” hoặc “coenzym A” chỉ một đồng yếu tố hữu cơ hoặc nhóm prostetic (phần không phải protein của một enzym) mà sự có mặt của nó là cần thiết cho hoạt tính của nhiều enzym (apoenzym) để tạo ra hệ enzym có hoạt tính. Coenzym A hoạt động trong một số enzym ngưng kết, hoạt động trong quá trình chuyển nhóm axetyl hoặc nhóm axyl khác và trong quá trình tổng hợp và oxi hóa axit béo, oxi hóa pyruvat và trong quá trình axetyl hóa khác.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “cơ bản là kỵ khí” khi được sử dụng để đề cập đến điều kiện nuôi cấy hoặc sinh trưởng chỉ lượng oxy ít hơn khoảng 10% nồng độ bão hòa đối với oxy hòa tan trong môi trường lỏng. Thuật ngữ này còn bao gồm các ngăn kín chứa môi trường lỏng hoặc rắn được duy trì không khí với lượng ít hơn khoảng 1% oxy.

“Ngoại sinh” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ phân tử hoặc hoạt tính được đề cập được đưa vào vi khuẩn chủ. Phân tử này có thể được đưa vào, ví dụ, bằng cách đưa axit nucleic mã hóa vào vật liệu di truyền của vật chủ như bằng cách chèn vào nhiễm sắc thể vật chủ hoặc dưới dạng vật liệu di truyền không phải nhiễm sắc thể như plasmit. Do đó, thuật ngữ này, khi được sử dụng có liên quan đến sự biểu hiện của axit nucleic mã hóa, chỉ việc đưa axit nucleic mã hóa ở dạng biểu hiện được vào tế bào vi khuẩn. Khi được sử dụng có liên quan đến hoạt tính sinh tổng hợp, thuật ngữ này chỉ hoạt tính được đưa vào sinh vật chủ được đề cập. Nguồn “ngoại sinh” này có thể là, ví dụ, axit nucleic mã hóa tương đồng hoặc khác loại biểu hiện hoạt tính được đề cập sau khi được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ. Do đó, thuật ngữ “nội

sinh” chỉ phân tử hoặc hoạt tính được đề cập có trong vật chủ. Tương tự, thuật ngữ này, khi được sử dụng có liên quan đến sự biểu hiện của axit nucleic mã hóa, chỉ sự biểu hiện của axit nucleic mã hóa được chứa trong tế bào vi khuẩn. Thuật ngữ “khác loại” chỉ phân tử hoặc hoạt tính có nguồn gốc khác với các loài được đề cập, ngược lại thuật ngữ “tương đồng” chỉ phân tử hoặc hoạt tính có nguồn gốc từ tế bào vi khuẩn chủ. Theo đó, sự biểu hiện ngoại sinh của axit nucleic mã hóa theo sáng chế có thể sử dụng một trong hai hoặc sử dụng cả hai loại axit nucleic mã hóa khác loại hoặc tương đồng.

Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể có các biến đổi di truyền ổn định, thuật ngữ này chỉ các vi sinh vật có thể được nuôi cấy nhiều hơn 5 thế hệ mà không mất đi biến đổi di truyền đó. Nhìn chung, biến đổi di truyền ổn định bao gồm các cải biến tồn tại bền vững qua hơn 10 thế hệ, đặc biệt là các cải biến ổn định sẽ tồn tại bền vững qua hơn 25 thế hệ, đặc biệt hơn, các cải biến di truyền ổn định sẽ tồn tại qua hơn 50 thế hệ, thậm chí vô thời hạn.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các biến đổi di truyền, bao gồm các cải biến về trao đổi chất được lấy làm ví dụ trong bản mô tả này, được mô tả với sự viện dẫn đến sinh vật chủ thích hợp như *E. coli* và các phản ứng trao đổi chất tương ứng của chúng hoặc nguồn sinh vật thích hợp cho vật liệu di truyền mong muốn như các gen tham gia vào con đường trao đổi chất mong muốn. Tuy nhiên, dựa vào trình tự bộ gen hoàn chỉnh của nhiều sinh vật khác nhau và kỹ thuật cao trong lĩnh vực giải mã hệ gen, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng có thể áp dụng các đề xuất và chỉ dẫn được đề cập trong bản mô tả này cho hầu hết tất cả các sinh vật khác. Ví dụ, các biến đổi trong trao đổi chất của *E. coli* được lấy làm ví dụ trong bản mô tả này có thể dễ dàng được áp dụng cho các loài khác bằng cách kết hợp axit nucleic mã hóa tương tự hoặc tương đồng từ các loài khác với loài được đề cập. Các biến đổi di truyền như vậy bao gồm, ví dụ, biến đổi di truyền của các gen tương đồng của loài, nói chung và cụ thể là, các gen đồng đẳng, các gen bản sao hoặc các hoán vị gen không đồng đẳng.

Gen đồng đẳng là một hoặc nhiều gen có quan hệ do sự di truyền thẳng và chịu trách nhiệm về các chức năng cơ bản là giống nhau hoặc tương tự trong các sinh vật khác nhau. Ví dụ, epoxit hydrolaza của chuột và epoxit hydrolaza của người có thể được xem là các gen đồng

đẳng về mặt chức năng thủy phân sinh học các epoxit. Các gen có quan hệ do sự di truyền thẳng nếu, ví dụ, chúng có độ giống nhau về trình tự ở mức đủ để cho thấy chúng là tương đồng, hoặc có quan hệ do sự tiến hóa từ một tổ tiên chung. Các gen cũng có thể được xem là gen đồng đẳng nếu chúng có cùng cấu trúc ba chiều, nhưng không nhất thiết có độ giống nhau về trình tự, ở mức đủ để chỉ ra rằng chúng được tiến hóa từ một tổ tiên chung, cho đến mức không thể nhận thấy có sự giống nhau về trình tự chính. Các gen đồng đẳng có thể mã hóa cho các protein có sự giống nhau về trình tự với mức độ tương đồng của trình tự axit amin là khoảng 25% đến 100%. Các gen mã hóa cho các protein có độ tương đồng axit amin ít hơn 25% có thể được xem là có sự phát sinh do di truyền thẳng nếu cấu trúc ba chiều của chúng cũng cho thấy có nhiều sự giống nhau. Một số loại thuộc họ enzym serin proteaza, bao gồm chất hoạt hóa plasminogen của mô và elastaza, được xem là có sự phát sinh do di truyền thẳng từ một tổ tiên chung.

Các gen đồng đẳng bao gồm các gen hoặc các sản phẩm do gen mã hóa mà qua, ví dụ, quá trình tiến hóa, có sự khác nhau về cấu trúc hoặc hoạt tính toàn phần. Ví dụ, nếu một loài mã hóa sản phẩm gen biểu hiện hai chức năng và nếu các chức năng này được tách thành các gen khác nhau ở loài thứ hai, ba gen này và các sản phẩm tương ứng của chúng được xem là các đồng đẳng. Đối với việc sản xuất sản phẩm sinh hóa học, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các gen đồng đẳng có hoạt tính trao đổi chất, sẽ được đưa vào hoặc phá hỏng, được chọn để tạo ra vi sinh vật không có trong tự nhiên. Ví dụ về các gen đồng đẳng biểu hiện các hoạt tính tách rời được là trường hợp các hoạt tính khác nhau được tách thành các sản phẩm gen khác nhau giữa hai hoặc nhiều loài hoặc trong cùng một loài. Ví dụ cụ thể là sự tách hoạt tính thủy phân protein elastaza và thủy phân protein plasminogen, hai loại có hoạt tính serin proteaza, thành các phân tử khác nhau là yếu tố hoạt hóa plasminogen và elastaza. Ví dụ thứ hai là sự tách hoạt tính của 5'-3' exonucleaza của mycoplasma và ADN polymeraza III của ruồi giấm. ADN polymeraza từ loài thứ nhất có thể được xem là đồng đẳng với một trong hai hoặc cả hai exonucleaza hoặc polymeraza từ loài thứ hai và ngược lại.

Trái lại, các gen bản sao là các đoạn trình tự giống nhau có quan hệ là do, ví dụ, sự sao chép sau đó phân hướng trong quá trình tiến hóa và có các chức năng tương tự hoặc chung nhưng không giống hệt nhau. Các gen bản sao có thể bắt nguồn hoặc có nguồn gốc từ, ví dụ,

cùng một loài hoặc từ loài khác. Ví dụ, epoxit hydrolaza của vi lập thể (epoxit hydrolaza I) và epoxit hydrolaza tan được (epoxit hydrolaza II) có thể được xem là các gen bản sao bởi vì chúng đại diện cho hai enzym khác nhau, được tiến hóa đồng thời từ một tổ tiên chung, và xúc tác cho các phản ứng khác nhau và có chức năng khác nhau trong cùng một loài. Các bản sao là các protein từ cùng một loài có mức độ tương đồng về trình tự đáng kể với protein còn lại đề xuất rằng chúng là tương đồng, hoặc có quan hệ do quá trình tiến hóa đồng thời từ một tổ tiên chung. Các nhóm họ protein bản sao bao gồm các dạng tương đồng HipA, các gen luxiferaza, các peptidaza, và các protein khác.

Sự hoán vị gen không đồng đẳng là các gen không đồng đẳng từ một loài có thể thay thế cho chức năng của gen được đề cập ở một loài khác. Sự thay thế này bao gồm, ví dụ, có khả năng thực hiện chức năng tương tự hoặc cơ bản là giống nhau ở loài ban đầu so với chức năng được đề cập ở loài khác. Mặc dù nhìn chung, sự hoán vị gen không đồng đẳng sẽ được xem là có liên quan về cấp trúc với gen đã biết mã hóa cho chức năng được đề cập, tuy nhiên, các gen ít liên quan về cấu trúc nhưng tương tự về chức năng và các Sản phẩm gen tương ứng sẽ vẫn nằm trong phạm vi của thuật ngữ này khi được sử dụng trong bản mô tả này. Sự giống nhau về chức năng đòi hỏi, ví dụ, ít nhất một số sự giống nhau về cấu trúc ở vị trí hoạt động hoặc vùng liên kết của các Sản phẩm gen không đồng đẳng so với gen mã hóa cho chức năng cần được thay thế. Do đó, gen không đồng đẳng bao gồm, ví dụ, gen bản sao hoặc gen không có quan hệ họ hàng.

Do đó, khi nhận biết và tạo ra các vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế có khả năng sinh tổng hợp 1,3-BDO, bằng cách áp dụng đề xuất và hướng dẫn của sáng chế cho loài cụ thể, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng việc nhận biết các cải biến về trao đổi chất có thể bao gồm việc nhận biết và việc bao gồm hoặc việc làm bất hoạt các gen đồng đẳng. Chừng nào mà các gen bản sao và/hoặc các hoán vị gen không đồng đẳng có mặt trong vi sinh vật chủ được đề cập mà mã hóa cho enzym xúc tác cho phản ứng trao đổi chất tương tự hoặc cơ bản là tương tự, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đều có thể sử dụng các gen có liên quan do quá trình tiến hóa này.

Các gen đồng đẳng, các gen bản sao và các hoán vị gen không đồng đẳng có thể được xác định bằng các phương pháp được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, việc kiểm tra trình tự axit nucleic hoặc axit amin đối với hai polypeptit sẽ phản ánh độ tương đồng và giống nhau về trình tự giữa các trình tự được so sánh. Dựa trên sự giống nhau này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định liệu sự giống nhau này có đủ cao để chỉ ra rằng các protein này có quan hệ do quá trình tiến hóa từ một tổ tiên chung. Các thuật toán được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như Align, BLAST, Clustal W và các phương pháp khác sẽ so sánh và xác định mức độ tương đồng hoặc giống nhau về trình tự thô, và còn xác định sự có mặt hoặc ý nghĩa của các khoảng trống trong trình tự, chúng có thể được gán trọng số hoặc điểm số. Các thuật toán này cũng được biết trong lĩnh vực này và có thể áp dụng một cách tương tự để xác định sự giống nhau hoặc tương đồng về trình tự nucleotit. Các thông số về sự giống nhau đủ để xác định mối quan hệ họ hàng được tính toán dựa trên các phương pháp được biết rõ để tính mức độ giống nhau theo thống kê, hoặc xác suất phát hiện ra sự so khớp tương tự ở polypeptit ngẫu nhiên, và ý nghĩa của sự so khớp được xác định này. Nếu cần, sự so sánh bằng máy tính giữa hai hoặc nhiều trình tự có thể còn được tối ưu hóa một cách trực quan bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các sản phẩm hoặc protein của gen có quan hệ họ hàng có thể được mong đợi là có mức độ tương đồng cao, ví dụ, độ đồng nhất về trình tự từ 25% đến 100%. Các protein mà không có quan hệ họ hàng có thể có độ đồng nhất mà về cơ bản là giống như mức được mong đợi xảy ra một cách ngẫu nhiên, nếu quét dữ liệu có quy mô đủ (khoảng 5%). Các trình tự nằm trong khoảng từ 5% đến 24% có thể hoặc không thể hiện sự tương đồng đủ để kết luận rằng các trình tự được so sánh là có quan hệ. Phân tích thống kê bổ sung để xác định ý nghĩa của các so khớp này dựa vào quy mô của tập hợp dữ liệu có thể được tiến hành xác định sự có liên quan của các trình tự này.

Các thông số được lấy làm ví dụ để xác định mối liên quan của hai hoặc nhiều trình tự bằng cách sử dụng thuật toán BLAST chẳng hạn, được nói đến dưới đây. Nói ngắn gọn là, có thể thực hiện sự căn trình tự axit amin bằng cách sử dụng BLASTP phiên bản 2.0.8 (05/01/1999) và các thông số sau đây: Ma trận: 0 BLOSUM 62; khoảng trống đầu: 11; khoảng trống kéo dài: 1; x\_dropoff: 50; ngưỡng mong đợi: 10,0; kích thước từ (wordsize): 3; bộ lọc:

bật. Có thể thực hiện sự căn chỉnh tự axit nucleic bằng cách sử dụng BLASTN phiên bản 2.0.6 (Sept-16-1998) và các thông số sau đây: khớp: 1; không khớp: -2; khoảng trống đầu: 5; khoảng trống kéo dài: 2; x\_dropoff: 50; ngưỡng mong đợi: 10,0; kích thước từ: 11; bộ lọc: tắt. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết các cải biến nào có thể được tạo ra với các thông số nêu trên để tăng hoặc giảm tính nghiêm ngặt của phép so sánh chẳng hạn và xác định mối quan hệ họ hàng của hai hoặc nhiều trình tự.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm vi khuẩn có con đường 1,3-butandiol (1,3-BDO) có ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho enzym tham gia vào con đường tổng hợp 1,3-BDO được biểu hiện ở lượng đủ để sản xuất 1,3-BDO. Con đường tổng hợp 1,3-BDO bao gồm enzym được chọn từ nhóm bao gồm 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza, AKP dehydrogenaza, 2-amino-4-hydroxypentanoat aminotransferaza, 2-amino-4-hydroxypentanoat oxidoreductaza (khử amin), 2-oxo-4-hydroxypentanoat decarboxylaza, 3-hydroxybutyraldehyt reductaza, AKP aminotransferaza, AKP oxidoreductaza (khử amin), 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza, 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton), 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt), 4-hydroxy-2-butanon reductaza, AKP decarboxylaza, 4-aminobutan-2-on aminotransferaza, 4-aminobutan-2-on oxidoreductaza (khử amin), 4-aminobutan-2-on amoniacylaza, butenon hydrataza, AKP amoniacylaza, axetylacrylat decarboxylaza, axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo aldehyt), axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo rượu), axetoaxetyl-CoA reductaza (khử keton), 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt), 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu), 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza, và crotonaza.

Tổ hợp bất kỳ và số lượng bất kỳ của các enzym nêu trên có thể được đưa vào vi khuẩn chủ để hoàn thành con đường 1,3-BDO, như được minh họa trên các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.3. Ví dụ, vi khuẩn không có trong tự nhiên có thể gồm từ một, hai, ba, bốn, năm, đến tất cả các axit nucleic trong con đường 1,3-BDO, mỗi axit nucleic mã hóa cho một enzym của con đường 1,3-BDO. Các axit nucleic này có thể bao gồm các axit nucleic khác loại, các bản sao bổ sung của các gen đang tồn tại, và các yếu tố điều hòa gen, như được giải thích trong phần dưới đây. Các con đường này của các vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế cũng được

thiết kế một cách thích hợp để vi khuẩn có thể được nuôi cấy được trong môi trường cơ bản là kỵ khí.

Theo một số phương án, các vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO gồm tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO. Tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO đại diện cho một nhóm enzym có thể chuyển hóa alanin, axetoaxetyl-CoA, hoặc 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,3-BDO, như được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.3. Các tập hợp enzym của con đường 1,3-BDO chuyển hóa alanin thành 1,3-BDO được lấy làm ví dụ theo Fig.1 gồm (a) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP dehydrogenaza; (3) 2-amino-4-hydroxypentanoat aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (4) 2-oxo-4-hydroxypentanoat decarboxylaza; và (5) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza; (b) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (3) 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza; (4) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton); và (5) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza; (c) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (3) 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza; (4) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt); và (5) 4-hydroxy-2-butanon reductaza; (d) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP decarboxylaza; (3) 4-aminobutan-2-on aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (4) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton); và (5) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza; (e) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP decarboxylaza; (3) 4-aminobutan-2-on aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (4) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt); và (5) 4-hydroxy-2-butanon reductaza; (f) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP decarboxylaza; (3) 4-aminobutan-2-on amoniacylaza; (4) butenon hydrataza; và (5) 4-hydroxy-2-butanon reductaza; và (g) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP amoniacylaza; (3) axetylacrylat decarboxylaza; (4) butenon hydrataza; và (5) 4-hydroxy-2-butanon reductaza;

Các tập hợp enzym của con đường 1,3-BDO chuyển hóa axetoaxetyl-CoA thành 1,3-BDO được lấy làm ví dụ theo Fig.2 gồm (h) (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo aldehyt); (2) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton); và (3) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza; (i) (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (Phụ thuộc CoA, tạo rượu) và (2) 4-hydroxy-2-butanon reductaza; (j) (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo aldehyt); (2) 3-

oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt); và (3) 4-hydroxy-2-butanon reductaza; (k) (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (khử keton) và (2) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu); và (1) (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (khử keton); (2) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt); và (3) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza;

Các tập hợp enzym của con đường 1,3-BDO chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,3-BDO được lấy làm ví dụ theo Fig.3 gồm (m) (1) 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza; (2) crotonaza; và (3) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu); và (n) (1) 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza; (2) crotonaza; (3) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt); và (4) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza.

Sự chuyển hóa alanin thành 1,3-BDO có thể được thực hiện bằng một số con đường bao gồm năm bước có sự tham gia của enzym như được thể hiện trên Fig.1. Trong bước đầu tiên ở tất cả các con đường (bước A), alanin và axetyl-CoA được kết hợp bởi 2-amino-4-ketopentanoat thiolaza, là enzym có tính chọn lọc cao. Sau đó, sản phẩm của phản ứng này, 2-amino-4-oxopentanoat (AKP) có thể trải qua các phản ứng chuyển nhóm amin, khử, loại nhóm carboxyl hoặc khử amin như được thể hiện trên Fig.1.

Theo một đường, AKP được chuyển hóa thành 2,4-dioxopentanoat, axit 2-keto có cấu trúc tương tự như alpha-ketoglutarat, nhờ enzym aminotransferaza hoặc oxidoreductaza khử nhóm amin (bước B). Sau đó, 2,4-dioxopentanoat được chuyển hóa thành 3-oxobutyraldehyt nhờ enzym axit 2-keto decarboxylaza (bước C). Quá trình khử các nhóm keton và aldehyt thành các rượu tương ứng của nó tạo ra 1,3-butandiol. Các phản ứng khử này có thể xảy ra để tạo ra các chất trung gian 3-hydroxybutyraldehyt (bước O và P) hoặc 4-hydroxy, 2-butanon (bước D và H).

Theo một đường khác, đầu tiên, nhóm 4-oxo của AKP bị khử thành rượu bậc hai nhờ enzym AKP dehydrogenaza (bước L). Sau đó, sản phẩm 2-amino-4-hydroxypentanoat được chuyển hóa thành 2-oxo-4-hydroxypentanoat (bước M). Axit 2-keto được tạo ra bị khử nhóm carboxyl thành 3-hydroxybutyraldehyt (bước N). Trong bước cuối cùng của con đường này, nhóm aldehyt của 3-hydroxybutyraldehyt bị khử thành rượu bậc một nhờ enzym 3-hydroxybutyraldehyt reductaza, tạo ra 1,3-butandiol (bước P).

Một con đường khác bao gồm phản ứng khử nhóm carboxyl của AKP nhờ enzym decarboxylaza của axit amin (bước E). Sản phẩm của phản ứng khử nhóm carboxyl, 4-aminobutan-2-on, có thể được chuyển nhóm amin hoặc khử nhóm amin thành 3-oxobutyraldehyt (bước K) hoặc khử amin thành butenon (bước F). Nếu 3-oxobutyraldehyt được tạo ra, thì hai bước khử tạo ra rượu được sử dụng để tạo ra 1,3-butandiol, như được mô tả trước (bước O và P, hoặc bước D và H). Sản phẩm của phản ứng khử amin, butenon, sau đó được thủy phân thành 4-hydroxy,2-butanon (bước G), chất này được khử thành 1,3-butandiol nhờ enzym 4-hydroxy-2-butanon reductaza (bước H).

Một con đường khác bao gồm phản ứng khử nhóm amin của AKP thành axetylacrylat (bước I). Axetylacrylat bị khử nhóm carboxyl tạo ra butenon (bước J), sau đó chất này được chuyển hóa thành 1,3-butandiol nhờ các enzym butenon hydrataza (bước G) và 4-hydroxy,2-butanon reductaza (bước H).

Dựa trên các đường sản xuất 1,3-BDO từ alanin nêu trên, theo một số phương án, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP dehydrogenaza; (3) 2-amino-4-hydroxypentanoat aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (4) 2-oxo-4-hydroxypentanoat decarboxylaza; và (5) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza. Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm từ một, hai, ba, bốn, đến tất cả năm axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một, hai, ba, hoặc bốn axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, các axit nucleic này có thể là sự hoán vị bất kỳ trong năm axit nucleic.

Theo các phương án khác vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (3) 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza; (4) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton); và (5) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza. Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một, hai, ba, bốn, đến tất cả năm axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một, hai,

ba, hoặc bốn axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, các axit nucleic này có thể là sự hoán vị bất kỳ trong năm axit nucleic.

Theo các phương án khác nữa, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (3) 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza; (4) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt); và (5) 4-hydroxy-2-butanon reductaza. Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một, hai, ba, bốn, đến tất cả năm axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một, hai, ba, hoặc bốn axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, các axit nucleic này có thể là sự hoán vị bất kỳ trong năm axit nucleic.

Theo các phương án khác nữa, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP decarboxylaza; (3) 4-aminobutan-2-on aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (4) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton); và (5) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza. Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một, hai, ba, bốn, đến tất cả năm axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một, hai, ba, hoặc bốn axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, các axit nucleic này có thể là sự hoán vị bất kỳ trong năm axit nucleic.

Theo các phương án khác nữa, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP decarboxylaza; (3) 4-aminobutan-2-on aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (4) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt); và (5) 4-hydroxy-2-butanon reductaza. Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một, hai, ba, bốn, đến tất cả năm axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một, hai, ba, hoặc bốn axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, các axit nucleic này có thể là sự hoán vị bất kỳ trong năm axit nucleic.

Theo các phương án khác nữa, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP

decarboxylaza; (3) 4-aminobutan-2-on amoniacylaza; (4) butenon hydratasa; và (5) 4-hydroxy-2-butanon reductaza. Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một, hai, ba, bốn, đến tất cả năm axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một, hai, ba, hoặc bốn axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, các axit nucleic này có thể là sự hoán vị bất kỳ trong năm axit nucleic.

Theo các phương án khác nữa, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP amoniacylaza; (3) axetylacrylat decarboxylaza; (4) butenon hydratasa; và (5) 4-hydroxy-2-butanon reductaza. Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một, hai, ba, bốn, đến tất cả năm axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một, hai, ba, hoặc bốn axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, các axit nucleic này có thể là sự hoán vị bất kỳ trong năm axit nucleic.

Fig.2 mô tả nhiều đường để sản xuất 1,3-butandiol từ axetoaxetyl-CoA. Một đường bao gồm các bước A, B và C (i) Axetoaxetyl-CoA reductaza phụ thuộc CoA tạo aldehyt chuyển hóa axetoaxetyl-CoA thành 3-oxobutyraldehyt (Fig.2, bước A), (ii) 3-oxobutyraldehyt reductaza khử 3-oxobutyraldehyt thành 3-hydroxybutyraldehyt (Fig.2, bước B), và (iii) cuối cùng, 3-hydroxybutyraldehyt reductaza tạo ra 1,3-butandiol (Fig.2, bước C).

Theo cách khác, axetoaxetyl-CoA có thể bị khử nhờ axetoaxetyl-CoA reductaza tạo aldehyt để tạo ra 4-hydroxy,2-butanon (Fig.2, bước D). 4-hydroxy,2-butanon cũng có thể được tạo ra bằng phản ứng khử 3-oxobutyraldehyt nhờ enzym 3-oxobutyraldehyt reductaza khử aldehyt (Fig.2, bước E). Cuối cùng là, 4-hydroxy,2-butanon có thể bị khử tạo ra 1,3-BDO nhờ 4-hydroxy-2-butanon reductaza (Fig.2, bước F).

Tập hợp các con đường tạo ra 1,3-BDO khác dựa vào phản ứng khử axetoaxetyl-CoA thành 3-hydroxybutyryl-CoA nhờ enzym khử keton axetoaxetyl-CoA reductaza (Fig.2, bước G). Enzym này khử nhóm chức keton trong axetoaxetyl-CoA thành nhóm hydroxyl. 3-Hydroxybutyryl-CoA có thể bị khử nhờ enzym 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza - tạo rượu hai chức để tạo ra 1,3-butandiol (Fig.2, bước I). Theo cách khác, đầu tiên nó có thể bị khử thành 3-

hydroxybutyraldehyt nhờ enzym 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo aldehyt (bước H) và 3-hydroxybutyraldehyt sau đó có thể bị khử như được thể hiện trong bước C.

Dựa trên các đường sản xuất 1,3-BDO từ axetoaxetyl-CoA được nêu trên, theo một số phương án, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo aldehyt); (2) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton); và (3) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza. Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một, hai đến tất cả ba axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một hoặc hai axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, các axit nucleic này có thể là sự hoán vị bất kỳ trong ba axit nucleic.

Theo các phương án khác, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo rượu) và (2) 4-hydroxy-2-butanon reductaza. Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một hoặc cả hai axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, axit nucleic này có thể là một trong hai axit nucleic.

Theo các phương án khác, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo aldehyt); (2) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt); và (3) 4-hydroxy-2-butanon reductaza. Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một, hai đến tất cả ba axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một hoặc hai axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, các axit nucleic này có thể là sự hoán vị bất kỳ trong ba axit nucleic.

Theo các phương án khác nữa, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (khử keton) và (2) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu). Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một hoặc cả hai axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, axit nucleic này có thể là một trong hai axit nucleic.

Theo các phương án khác nữa, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (khử keton); (2) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt); và (3) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza. Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một, hai đến tất cả ba axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một hoặc hai axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, các axit nucleic này có thể là sự hoán vị bất kỳ trong ba axit nucleic.

4-Hydroxybutyryl-CoA là một chất chuyển hóa khởi đầu quan trọng, từ chất này có thể tạo ra một số hợp chất hữu dụng trong công nghiệp. Mặc dù 4-hydroxybutyryl-CoA không phải là một chất chuyển hóa trung tâm phổ biến ở mức độ cao, các phương pháp tạo ra các chủng tổng hợp 4-hydroxybutyryl-CoA đã được mô tả trong tài liệu của Burk và các đồng tác giả (US 20090075351). Phương pháp được lấy làm ví dụ bao gồm bước tổng hợp 4-hydroxybutyryl-CoA từ succinyl-CoA nhờ các gen mã hóa cho enzym succinic semialdehyt dehydrogenaza (phụ thuộc CoA), 4-hydroxybutyrat dehydrogenaza, 4-hydroxybutyrat kinaza, và phosphotransButyrylaza.

Bước thứ nhất trong con đường này bao gồm phản ứng loại nước của 4-hydroxybutyryl-CoA (bước A, Fig.3) sau đó là phản ứng hydrat hóa của crotonoyl-CoA tạo ra 3-hydroxybutyryl-CoA (bước B). 3-hydroxybutyryl-CoA sau đó trải qua hai bước phản ứng tạo ra 1,3-butandiol được thực hiện nhờ hoặc là hai enzym (các bước C và D) hoặc nhờ một enzym có chức năng kép (bước E).

Do đó, theo một số phương án, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza; (2) crotonaza; và (3) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu). Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một, hai đến tất cả ba axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một hoặc hai axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, các axit nucleic này có thể là sự hoán vị bất kỳ trong ba axit nucleic.

Theo các phương án khác, vi khuẩn không có trong tự nhiên có tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO bao gồm (1) 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza; (2) crotonaza; (3) 3-

hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt); và (4) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza. Số lượng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho các enzym này có thể được đưa vào tế bào vi khuẩn chủ bao gồm một, hai, ba đến tất cả bốn of the axit nucleic mã hóa cho các enzym này. Trong đó một, hai, hoặc ba axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, các axit nucleic này có thể là sự hoán vị bất kỳ trong bốn axit nucleic.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm alanin thành 2-amino-4-oxopentanoat, 2-amino-4-oxopentanoat to 2-amino-4-hydroxypentanoat, 2-amino-4-hydroxypentanoat thành 2-oxo-4-hydroxypentanoat, 2-oxo-4-hydroxypentanoat thành 3-hydroxybutyraldehyt, và 3-hydroxybutyraldehyt thành 1,3-BDO.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm alanin thành 2-amino-4-oxopentanoat, 2-amino-4-oxopentanoat thành 2,4-dioxopentanoat, 2,4-dioxopentanoat to 3-oxobutyraldehyt, 3-oxobutyraldehyt thành 3-hydroxybutyraldehyt, và 3-hydroxybutyraldehyt thành 1,3-BDO.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm alanin thành 2-amino-4-oxopentanoat, 2-amino-4-oxopentanoat thành 2,4-dioxopentanoat, 2,4-dioxopentanoat thành 3-oxobutyraldehyt, 3-oxobutyraldehyt thành 4-hydroxy-2-butanon, và 4-hydroxy-2-butanon thành 1,3-BDO.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm alanin thành 2-amino-4-oxopentanoat, 2-amino-4-oxopentanoat thành 4-

aminobutan-2-on, 4-aminobutan-2-on thành 3-oxobutyraldehyt, 3-oxobutyraldehyt thành 3-hydroxybutyraldehyt, và 3-hydroxybutyraldehyt thành 1,3-BDO.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm alanin thành 2-amino-4-oxopentanoat, 2-amino-4-oxopentanoat thành 4-aminobutan-2-on, 4-aminobutan-2-on thành 3-oxobutyraldehyt, 3-oxobutyraldehyt thành 4-hydroxy-2-butanon, và 4-hydroxy-2-butanon thành 1,3-BDO.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm alanin thành 2-amino-4-oxopentanoat, 2-amino-4-oxopentanoat thành 4-aminobutan-2-on, 4-aminobutan-2-on thành butenon, butenon thành 4-hydroxy-2-butanon, và 4-hydroxy-2-butanon thành 1,3-BDO.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm alanin thành 2-amino-4-oxopentanoat, 2-amino-4-oxopentanoat thành axetylacrylat, axetylacrylat thành butenon, butenon thành 4-hydroxy-2-butanon, và 4-hydroxy-2-butanon thành 1,3-BDO.

Do đó, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có chứa ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein, trong đó enzym hoặc protein này chuyển hóa các cơ chất và sản phẩm của con đường 1,3-BDO chuyển hóa alanin thành 1,3-BDO, như được lấy làm ví dụ bởi các con đường được thể hiện trên Fig.1.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn

từ nhóm bao gồm axetoaxetyl-CoA thành 4-hydroxy-2-butanon, và 4-hydroxy-2-butanon thành 1,3-BDO.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm axetoaxetyl-CoA thành 3-oxobutyraldehyt, 3-oxobutyraldehyt thành 4-hydroxy-2-butanon, và 4-hydroxy-2-butanon thành 1,3-BDO.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm axetoaxetyl-CoA thành 3-oxobutyraldehyt, 3-oxobutyraldehyt thành 3-hydroxybutyraldehyt, và 3-hydroxybutyraldehyt thành 1,3-BDO.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm axetoaxetyl-CoA thành 3-hydroxybutyryl-CoA, 3-hydroxybutyryl-CoA thành 3-hydroxybutyraldehyt, và 3-hydroxybutyraldehyt thành 1,3-BDO.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm axetoaxetyl-CoA thành 3-hydroxybutyryl-CoA, và 3-hydroxybutyryl-CoA thành 1,3-BDO.

Do đó, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein, trong đó enzym hoặc protein này chuyển hóa cơ chất và sản phẩm của con đường 1,3-BDO chuyển hóa axetoaxetyl-CoA thành 1,3-BDO, như được lấy làm ví dụ bởi các con đường được thể hiện trên Fig.2.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm 4-hydroxybutyryl-CoA thành crotonoyl-CoA, crotonoyl-CoA thành 3-hydroxybutyryl-CoA, 3-hydroxybutyryl-CoA thành 3-hydroxybutyraldehyt, và 3-hydroxybutyraldehyt thành 1,3-BDO.

Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường 1,3-BDO, trong đó vi khuẩn không có trong tự nhiên bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm 4-hydroxybutyryl-CoA thành crotonoyl-CoA, crotonoyl-CoA thành 3-hydroxybutyryl-CoA, và 3-hydroxybutyryl-CoA thành 1,3-BDO.

Do đó, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên có ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho một enzym hoặc protein, trong đó enzym hoặc protein này chuyển hóa cơ chất và sản phẩm của con đường 1,3-BDO, con đường này chuyển hóa 4-hydroxybutyryl-CoA thành 1,3-BDO, như được lấy làm ví dụ bởi các con đường được thể hiện trên Fig.3.

Việc thiết kế thành công của bất kỳ một trong số các con đường này đòi hỏi việc xác định tập hợp các enzym thích hợp có hoạt tính và tính đặc hiệu đủ, tách dòng các gen tương ứng của chúng đưa vào cơ thể vật chủ sản xuất, tối ưu hóa các điều kiện lên men và phân tích quá trình tạo sản phẩm sau quá trình lên men. Để tạo ra được vật chủ sản xuất để sản xuất các sản phẩm bất kỳ trong số các sản phẩm nêu trên, một hoặc nhiều trình tự ADN ngoại sinh có thể được biểu hiện trong các vi sinh vật. Ngoài ra, các vi sinh vật này có thể có các gen nội sinh bị mất chức năng. Những cải biến này sẽ cho phép tạo ra 1,3-BDO bằng cách sử dụng các nguồn nguyên liệu tái tạo được.

Sau đây, các tác giả sáng chế mô tả một số gen có đặc trưng về mặt sinh hóa có khả năng mã hóa cho các enzym xúc tác cho mỗi bước được thể hiện trên các hình vẽ Fig.1, Fig.2 và Fig.3. Mặc dù tác giả sáng chế mô tả phương pháp này đối với *E. coli*, nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể áp dụng các chỉ dẫn này đối với hầu hết sinh vật bất kỳ khác. Cụ thể, các gen được liệt kê là các gen có tự nhiên của *E. coli* bên cạnh các gen có

trong các sinh vật khác có thể được sử dụng để xúc tác cho các quá trình biến đổi thích hợp khi được tách dòng và biểu hiện một cách thích hợp.

Sáng chế được mô tả bằng việc viện dẫn chung đến phản ứng trao đổi chất, chất phản ứng và sản phẩm của nó, hoặc bằng việc viện dẫn cụ thể đến một hoặc nhiều axit nucleic hoặc gen mã hóa cho một enzym có liên quan đến hoặc xúc tác, hoặc một protein có liên quan đến, phản ứng trao đổi chất, chất phản ứng hoặc sản phẩm được đề cập. Trừ khi được chỉ định cụ thể khác, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng việc đề cập đến phản ứng cũng bao gồm việc đề cập đến các chất phản ứng và sản phẩm của phản ứng đó. Tương tự, trừ khi được chỉ định cụ thể khác, việc đề cập đến chất phản ứng hoặc sản phẩm cũng đề cập đến phản ứng, và việc đề cập đến bất kỳ trong số các yếu tố thành phần của quá trình trao đổi chất cũng đề cập đến gen hoặc các gen mã hóa cho các enzym xúc tác hoặc các protein tham gia vào phản ứng, chất phản ứng và sản phẩm được đề cập. Tương tự, dựa vào các lĩnh vực đã biến thuộc hóa sinh học, miễn dịch học, và giải mã hệ gen liên quan đến quá trình trao đổi chất, việc đề cập đến gen hoặc axit nucleic mã hóa cũng bao gồm việc đề cập đến các enzym mà nó mã hóa tương ứng và phản ứng mà enzym đó xúc tác hoặc protein đi kèm với phản ứng đó cũng như các chất phản ứng và các sản phẩm của phản ứng đó.

Tất cả các biến đổi được mô tả trong các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.3 thuộc vào 8 nhóm biến đổi chung được thể hiện trong bảng 1. Sau đây là phần mô tả một số gen có đặc trưng về mặt sinh hóa trong mỗi nhóm. Các gen được liệt kê cụ thể là các gen có thể được ứng dụng để xúc tác cho các biến đổi thích hợp được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.3 khi được tách dòng và biểu hiện một cách thích hợp. Ví dụ về các gen cho mỗi bước trong các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.3 được đưa ra dưới đây trong các bảng từ 35 đến 37.

Bảng 1 thể hiện các loại enzym hữu dụng để chuyển hóa các chất trung gian trao đổi chất trung tâm phổ biến thành 1,3-butandiol. Ba chữ số đầu tiên của mỗi mã tương ứng với ba enzym đầu tiên. Các chữ số quy ước biểu hiện loại phản ứng biến đổi chung không phụ thuộc vào tính đặc hiệu cơ chất.

Bảng 1

| Mã       | Chức năng                                                             |
|----------|-----------------------------------------------------------------------|
| 1.1.1.a  | Oxidoreductaza (chuyển keton thành hydroxyl hoặc aldehyt thành rượu ) |
| 1.1.1.b  | Oxidoreductaza (bước 2, chuyển axyl-CoA thành rượu)                   |
| 1.2.1.b  | Oxidoreductaza (chuyển axyl-CoA thành aldehyt)                        |
| 1.4.1.a  | Oxidoreductaza (khử amin)                                             |
| 2.3.1.b  | Axyltransferaza                                                       |
| 2.6.1.a  | Aminotransferaza                                                      |
| 4.1.1.a  | Carboxy-lyaza                                                         |
| 4.2.1..a | Hydro-lyaza                                                           |
| 4.3.1.a  | Amoniac-lyaza                                                         |

Một số biến đổi trên Fig.1, 2 và 3 thuộc nhóm oxidoreductaza khử aldehyt thành rượu. Ví dụ, các bước D và P trên Fig.1 được xúc tác bởi enzym 3-oxobutyaldehyt reductaza (khử aldehyt) và 3-hydroxybutyaldehyt reductaza tương ứng thuộc nhóm này. Tương tự, các bước C và E trên Fig.2 được xúc tác bởi enzym 3-hydroxybutyaldehyt reductaza và 3-oxobutyaldehyt reductaza (khử aldehyt) tương ứng cũng là oxidoreductaza chuyển hóa nhóm chức aldehyt thành rượu.

Các con đường trên Fig.3 bao gồm oxidoreductaza như 3-hydroxybutyaldehyt reductaza trong bước D.

Ví dụ về các gen mã hóa cho các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa aldehyt thành rượu (tức là, rượu dehydrogenaza hoặc aldehyt reductaza tương đương) bao gồm *alrA* mã hóa cho dehydrogenaza cho rượu có mạch trung bình từ C2 đến C14 (Tani et al., Appl. Environ. Microbiol., 66:5231-5235 (2000)), ADH2 từ *Saccharomyces cerevisiae* (Atsumi et al., Nature, 451 :86-89 (2008)), *yqhD* từ *E. coli* gen này có sự ưu tiên đối phân tử có mạch dài hơn C3 (Sulzenbacher et al., J. of Molecular Biology, 342:489-502 (2004)), và *bdh I* và *bdh II* từ *C. acetobutylicum* chuyển hóa butyaldehyt thành butanol (Walter et al., J. of Bacteriology, 174:7149-7158 (1992)). Sản phẩm gen *yqhD* xúc tác cho phản ứng khử của axetaldehyt, malondialdehyt, propionaldehyt, butyaldehyt, và acrolein bằng cách sử dụng NADPH làm

đồng yếu tố (Perez et al., J. Biol. Chem., 283 :7346-7353 (2008)). Sản phẩm gen *adhA* từ *Zymomonas mobilis* đã được chứng minh là có hoạt tính trên một số aldehyt bao gồm formaldehyt, axetaldehyt, propionaldehyt, butyraldehyt, và acrolein (Kinoshita et al., Appl. Microbiol. Biotechnol, 22:249-254 (1985)). Ngoài ra, aldehyt reductaza được mã hóa bởi *bdh* ở *C. saccharoperbutylacetonicum* và *Cbei\_1722*, *Cbei\_2181* và *Cbei\_2421* ở *C. beijerinckii*.

Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên ngân hàng gen (GenBank) được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

| Protein          | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                                      |
|------------------|---------------|-----------|-----------------------------------------------|
| <i>alrA</i>      | BAB12273.1    | 9967138   | <i>Acinetobacter</i> sp. chủng M-1            |
| <i>ADH2</i>      | NP_014032.1   | 6323961   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>               |
| <i>yqhD</i>      | NP_417484.1   | 16130909  | <i>Escherichia coli</i>                       |
| <i>bdh I</i>     | NP_349892.1   | 15896543  | <i>Clostridium acetobutylicum</i>             |
| <i>bdh II</i>    | NP_349891.1   | 15896542  | <i>Clostridium acetobutylicum</i>             |
| <i>adhA</i>      | YP_162971.1   | 56552132  | <i>Zymomonas mobilis</i>                      |
| <i>bdh</i>       | BAF45463.1    | 124221917 | <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> |
| <i>Cbei_1722</i> | YP_001308850  | 150016596 | <i>Clostridium beijerinckii</i>               |
| <i>Cbei_2181</i> | YP_001309304  | 150017050 | <i>Clostridium beijerinckii</i>               |
| <i>Cbei_2421</i> | YP-001309535  | 150017281 | <i>Clostridium beijerinckii</i>               |

Các enzym biểu hiện hoạt tính 3-hydroxybutyraldehyt reductaza (EC 1.1.1.61) cũng được xếp vào nhóm này. Các enzym này đã được xác định đặc điểm ở các loài *Ralstonia eutropha* (Bravo et al., J. Forensic Sci., 49:379-387 (2004)), *Clostridium kluyveri* (Wolff et al., Protein Expr. Purif., 6:206-212 (1995)) và *Arabidopsis thaliana* (Breitkreuz et al., J. Biol. Chem., 278:41552-41556 (2003)). Một gen khác là *adhI* mã hóa cho rượu dehydrogenaza từ *Geobacillus thermoglucosidasius* (Jeon et al., J. Biotechnol., 135: 127-133 (2008)). Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

| Protein     | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                                      |
|-------------|---------------|-----------|-----------------------------------------------|
| <i>4hbd</i> | YP_726053.1   | 113867564 | <i>Ralstonia eutropha</i> H16                 |
| <i>4hbd</i> | L21902.1      | 146348486 | <i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555           |
| <i>4hbd</i> | Q94B07        | 75249805  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   |
| <i>adhI</i> | AAR91477.1    | 40795502  | <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> M10EXG |

Một ví dụ khác về enzym là 3-hydroxyisobutyrat dehydrogenaza xúc tác cho quá trình oxi hóa thuận nghịch của 3-hydroxyisobutyrat thành metylmalonat semialdehyt. Enzym này tham gia vào quá trình phân hủy valin, leuxin và isoleuxin và đã được phát hiện trong vi khuẩn, sinh vật có nhân thực, và động vật có vú. Enzym này được mã hóa bởi *P84067* từ *Thermus thermophilus* HB8 đã được xác định đặc điểm về cấu trúc (Lokanath et al., J. Mol. Biol., 352:905-917 (2005)). Tính thuận nghịch của enzym 3-hydroxyisobutyrat dehydrogenaza ở người đã được chứng minh bằng cách sử dụng cơ chất được đánh dấu đồng vị phóng xạ (Manning et al., Biochem J., 231 :481-484 (1985)). Các gen khác mã hóa cho enzym này bao gồm *3hidh* ở người hiện đại (Hawes et al., Methods Enzymol, 324:218-228 (2000)) và *Oryctolagus cuniculus* (Hawes et al., như trên; Chowdhury et al., Biosci. Biotechnol Biochem., 60:2043-2047 (1996)), *mmsB* ở *Pseudomonas aeruginosa* và *Pseudomonas putida* (Liao et al., patent Mỹ 20050221466), và *dhat* trong *Pseudomonas putida* (Aberhart et al., J. Chem. Soc., 6:1404-1406 (1979); Chowdhury et al., như trên; Chowdhury et al., Biosci. Biotechnol Biochem., 67:438-441 (2003)). Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

| Protein       | Mã số GenBank | Số GI    | Sinh vật                     |
|---------------|---------------|----------|------------------------------|
| <i>P84067</i> | P84067        | 75345323 | <i>Thermus thermophilus</i>  |
| <i>3hidh</i>  | P31937.2      | 12643395 | <i>Homo sapiens</i>          |
| <i>3hidh</i>  | P32185.1      | 416872   | <i>Oryctolagus cuniculus</i> |

|             |             |          |                               |
|-------------|-------------|----------|-------------------------------|
| <i>mmsB</i> | P28811.1    | 127211   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| <i>mmsB</i> | NP_746775.1 | 26991350 | <i>Pseudomonas putida</i>     |
| <i>dhat</i> | Q59477.1    | 2842618  | <i>Pseudomonas putida</i>     |

Oxidoreductaza chuyển nhóm chức keton thành nhóm hydroxyl tương ứng cũng là các bước tổng hợp trong các con đường được bộc lộ. Đáng chú ý là, các phản ứng L, O và H trên Fig.1 được xúc tác bởi enzym AKP dehydrogenaza, 3-oxobutyradehyt reductaza (khử keton), 4-hydroxy-2-butanon reductaza tương ứng là các biến đổi của nhóm này. Hai biến đổi sau cũng được thấy trong Các bước B và F tương ứng trên Fig.2. Tương tự, axetoaxetyl-CoA reductaza trong bước G trên Fig.2 khử axetoaxetyl-CoA thành 3-hydroxybutyryl-CoA.

Phản ứng khử nhóm 4-oxo của 2-amino-4-oxopentanoat (AKP) bằng dehydrogenaza tạo ra 2-amino-4-hydroxypentanoat (Fig.1, bước L). Phản ứng này rất giống với phản ứng khử aspartat semialdehyt, phụ thuộc NAD(P)H, thành homoserin được xúc tác bởi enzym homoserin dehydrogenaza (EC 1.1.13). Ở nhiều sinh vật, bao gồm *E. coli*, homoserin dehydrogenaza là một enzym có hai chức năng còn xúc tác cho phản ứng chuyển hóa aspartat, phụ thuộc ATP, thành aspartyl-4-phosphat (Starnes et al., Biochemistry, 11 :677-687 (1973)). Các vùng chức năng là độc lập về mặt xúc tác và được kết nối bằng vùng liên kết (Sibilli et al., J. Biol. Chem., 256: 10228-10230 (1981)) và cả hai vùng này đều chịu sự ức chế chuyển hoạt tính enzym bởi threonin. Vùng homoserin dehydrogenaza của enzym của *E. coli*, được mã hóa bởi *thrA*, được tách từ vùng aspartat kinaza, được xác định đặc điểm, và được phát hiện là biểu hiện hoạt tính xúc tác cao và sự ức chế giảm bởi threonin (James et al., Biochemistry, 41 :3720-3725 (2002)). Điều này cũng áp dụng đối với các threonin kinaza hai chức năng khác bao gồm, ví dụ, *hom1* của *Lactobacillus Plantarum* (Cahyanto et al., Microbiology, 152:205-112 (2006)) và *Arabidopsis thaliana*. Homoserin dehydrogenaza một chức năng được mã hóa bởi *hom6* trong *S. cerevisiae* (Jacques et al., Biochem. Biophys. Acta, 1544:28-41 (2001)) và *hom2* của *Lactobacillus Plantarum* (Cahyanto et al., như trên) được biểu hiện và xác định đặc điểm chức năng ở *E. coli*. Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5

| Protein       | Mã số GenBank | Số GI    | Sinh vật                        |
|---------------|---------------|----------|---------------------------------|
| <i>thrA</i>   | AAC73113.1    | 1786183  | <i>Escherichia coli</i> K12     |
| <i>akthr2</i> | O81852        | 75100442 | <i>Arabidopsis thaliana</i>     |
| <i>hom6</i>   | CAA89671      | 1015880  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| <i>hom1</i>   | CAD64819      | 28271914 | <i>Lactobacillus Plantarum</i>  |
| <i>hom2</i>   | CAD63186      | 28270285 | <i>Lactobacillus Plantarum</i>  |

Axetoaxetyl-CoA reductaza (bước G, Fig.2) xúc tác cho phản ứng khử axetoaxetyl-CoA thành 3-hydroxybutyryl-CoA tham gia vào con đường lên men axetyl-CoA thành butyrat ở một số loài *Clostridia* và đã được nghiên cứu chi tiết (Jones et al., Microbiol. Rev., 50:484-524 (1986)). Enzym từ *Clostridium acetobutylicum*, được mã hóa bởi *hbd*, được tách dòng và biểu hiện chức năng ở *E. coli* (Youngleson et al., J. Bacteriol., 171:6800-6807 (1989)). Ngoài ra, các tiểu đơn vị của hai phức hợp oxi hóa axit béo ở *E. coli*, được mã hóa bởi *fadB* và *fadJ*, hoạt động như 3-hydroxyaxyl-CoA dehydrogenaza (Binstock et al., Methods Enzymol, 71C:403-411 (1981)). Các gen khác đã được chứng minh là khử axetoaxetyl-CoA thành 3-hydroxybutyryl-CoA là *phbB* từ *Zoogloea ramigera* (Ploux et al., Eur. J. Biochem., 174: 177-182 (1988)) và *phaB* từ *Rhodobacter sphaeroides* (Alber et al., Mol. Microbiol, 61 :297-309 (2006)). Gen trước đó là phụ thuộc NADPH, trình tự nucleotit của gen này đã được xác định (Peoples et al., Mol. Microbiol. 3:349-357 (1989)) và gen này đã được biểu hiện ở *E. coli*. Các nghiên cứu về tính đặc hiệu cơ chất trên gen này đã dẫn đến kết luận rằng, nó có thể chấp nhận 3-oxopropionyl-CoA làm cơ chất ngoài axetoaxetyl-CoA (Ploux et al., như trên). Các gen khác bao gồm *Hbd1* (vùng đầu tận cùng C) và *Hbd2* (vùng đầu tận cùng N) ở *Clostridium kluyveri* (Hillmer và Gottschalk, Biochim. Biophys. Acta 3334: 12-23 (1974)) và *HSD17B10* ở *Bos taurus* (Wakil et al., J. Biol. Chem., 207:631-638 (1954)). Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6

| Protein     | Mã số GenBank | Số GI  | Sinh vật                |
|-------------|---------------|--------|-------------------------|
| <i>fadB</i> | P21177.2      | 119811 | <i>Escherichia coli</i> |

|                 |             |           |                                   |
|-----------------|-------------|-----------|-----------------------------------|
| <i>fadJ</i>     | P77399.1    | 3334437   | <i>Escherichia coli</i>           |
| <i>Hbd2</i>     | EDK34807.1  | 146348271 | <i>Clostridium kluyveri</i>       |
| <i>Hbd1</i>     | EDK32512.1  | 146345976 | <i>Clostridium kluyveri</i>       |
| <i>hbd</i>      | P52041.2    |           | <i>Clostridium acetobutylicum</i> |
| <i>HSD17B10</i> | O02691.3    | 3183024   | <i>Bos Taurus</i>                 |
| <i>phdB</i>     | P23238.1    | 130017    | <i>Zoogloea ramigera</i>          |
| <i>phaB</i>     | YP_353825.1 | 77464321  | <i>Rhodobacter sphaeroides</i>    |

Một số enzym tương tự đã được tìm thấy ở các loài *Clostridia* khác và ở *Metallosphaera sedula* (Berg et al., Archaea. Science, 318:1782-1786 (2007)) như được thể hiện trên Bảng 7.

Bảng 7

| Protein          | Mã số GenBank | Số GI        | Sinh vật                          |
|------------------|---------------|--------------|-----------------------------------|
| <i>Hbd</i>       | NP_349314.1   | NP_349314.1  | <i>Clostridium acetobutylicum</i> |
| <i>Hbd</i>       | AAM14586.1    | AAM14586.1   | <i>Clostridium beijerinckii</i>   |
| <i>Msed_1423</i> | YP_001191505  | YP_001191505 | <i>Metallosphaera sedula</i>      |
| <i>Msed_0399</i> | YP_001190500  | YP_001190500 | <i>Metallosphaera sedula</i>      |
| <i>Msed_0389</i> | YP_001190490  | YP_001190490 | <i>Metallosphaera sedula</i>      |
| <i>Msed_1993</i> | YP_001192057  | YP_001192057 | <i>Metallosphaera sedula</i>      |

Ví dụ về rượu dehydrogenaza chuyển hóa keton thành nhóm hydroxyl là rượu bậc hai dehydrogenaza được cho thấy là chuyển hóa axeton thành isopropanol ở loài *C. beijerinckii* (Ismaiel et al., J. Bacteriol., 175:5097-5105 (1993)) và *T. brockii* (Lamed et al., Biochem. J., 195: 183-190 (1981); Peretz et al., Biochemistry, 28:6549-6555 (1989)). Sản phẩm gen của *adhA* từ *Pyrococcus furiosus*, biểu hiện hoạt tính cao nhất trên 2-pentanol và pyruvaldehyt, được cho thấy là có tính đặc hiệu rất rộng bao gồm isopropanol và axeton (Van der et al., Eur. J. Biochem., 268:3062-3068 (2001)). Một enzym dehydrogenaza đối với rượu bậc hai khác có hoạt tính trên isopropanol và axeton được mã hóa bởi Sản phẩm gen của *adh-A* từ *Rhodococcus ruber* (Edegger et al., Chem. Commun. (Camb), 2402-2404 (2006); Kosjek et al., Biotechnol.

Bioeng., 86:55-62 (2004)). Các gen này cùng với các gen khác được liệt kê trong bảng 8 dưới đây:

Bảng 8

| Protein      | Mã số GenBank | Số GI    | Sinh vật                                  |
|--------------|---------------|----------|-------------------------------------------|
| <i>adh</i>   | AAA23199.2    | 60592974 | <i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B593 |
| <i>adh</i>   | P14941.1      | 113443   | <i>Thermoanaerobacter brockii</i> HTD4    |
| <i>adhA</i>  | AAC25556      | 3288810  | <i>Pyrococcus furiosus</i>                |
| <i>Adh-A</i> | CAD36475      | 21615553 | <i>Rhodococcus ruber</i>                  |

Theo cách khác, có tồn tại một vài enzym dehydrogenaza đối với rượu mà chuyển hóa keton thành nhóm chức hydroxyl. Hai enzym như vậy từ *E. coli* được mã hóa bởi malat dehydrogenaza (*mdh*) và lactat dehydrogenaza (*ldhA*). Ngoài ra, lactat dehydrogenaza từ *Ralstonia eutropha* đã chứng tỏ có hoạt tính cao trên các cơ chất có chiều dài mạch khác nhau như lactat, 2-oxobutytrat, 2-oxopentanoat và 2-oxoglutarat (Steinbuchel et al., Eur. J. Biochem., 130:329-334 (1983)). Sự chuyển hóa nhóm chức oxo thành nhóm hydroxyl cũng có thể được xúc tác bởi enzym 2-keto-1,3-butandiol reductaza, là enzym được thông báo là được tìm thấy ở chuột và nhau thai người (Suda et al., Arch. Biochem. Biophys., 176:610-620 (1976); Suda et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 77:586-591 (1977)). Tất cả các enzym này có thể tạo ra 3-oxobutyraldehyt reductaza, và 4-hydroxy-2-butanon reductaza. Một enzym nữa tham gia vào các bước này là 3-hydroxybutytrat dehydrogenaza (*bdh*) ở ti lập thể từ tim người đã được tách dòng và xác định đặc tính (Marks et al., J. Biol. Chem. 267: 15459-15463 (1992)). Enzym này là dehydrogenaza hoạt động trên cơ chất axit 3-hydroxy. Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9

| Protein    | Mã số GenBank | Số GI   | Sinh vật                |
|------------|---------------|---------|-------------------------|
| <i>mdh</i> | AAC76268.1    | 1789632 | <i>Escherichia coli</i> |

|             |             |           |                           |
|-------------|-------------|-----------|---------------------------|
| <i>ldhA</i> | NP_415898.1 | 16129341  | <i>Escherichia coli</i>   |
| <i>ldh</i>  | YP_725182.1 | 113866693 | <i>Ralstonia eutropha</i> |
| <i>bdh</i>  | AAA58352.1  | 177198    | <i>Homo sapiens</i>       |

Một số sinh vật có thể xúc tác cho phản ứng khử 4-hydroxy-2-butanon thành 1,3-butandiol, bao gồm các sinh vật thuộc chi *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Candida*, và *Klebsiella* và các chi khác, như được mô tả bởi Matsuyama và các đồng tác giả (1995).

Một số biến đổi ở Fig.2 và Fig.3 dựa trên phản ứng khử hai bước khử axyl-CoA thành rượu tương ứng. Ví dụ, các bước D và I trên Fig.2, bao gồm axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo rượu) và 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu), và bước E trên Fig.3 bao gồm 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu), thể hiện biến đổi như vậy.

Ví dụ về oxidoreductaza hai bước chuyển hóa axyl-CoA thành rượu bao gồm các enzym biến đổi các cơ chất như axetyl-CoA thành etanol (ví dụ, *adhE* từ *E. coli* (Kessler et al., *FEBS. Lett.*, 281 :59-63 (1991)) và butyryl-CoA thành butanol (ví dụ *adhE2* từ *C. acetobutylicum* (Fontaine et al., *J. Bacteriol.*, 184:821-830 (2002))). Ngoài phản ứng khử axetyl-CoA thành etanol, enzym này được mã hóa bởi *adhE* ở *Leuconostoc mesenteroides* cho thấy oxi hóa hợp chất mạch nhánh isobutyraldehyt thành isobutyryl-CoA (Kazahaya et al., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18:43-55 (1972); Koo et al., *Biotechnol Lett*, 27:505-510 (2005)). Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 10.

Bảng 10

| Protein      | Mã số GenBank | Số GI    | Sinh vật                          |
|--------------|---------------|----------|-----------------------------------|
| <i>adhE</i>  | NP_415757.1   | 16129202 | <i>Escherichia coli</i>           |
| <i>adhE2</i> | AAK09379.1    | 12958626 | <i>Clostridium acetobutylicum</i> |
| <i>adhE</i>  | AAV66076.1    | 55818563 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>  |

Một ví dụ về enzym khác có thể chuyển hóa malonyl-CoA thành 3-HP. Enzym phụ thuộc NADPH có hoạt tính này đã được xác định đặc điểm ở *Chloroflexus aurantiacus*, ở đó

enzym này tham gia vào con đường 3-hydroxypropionat (Hugler et al., J. Bacteriol., 184:2404-2410 (2002); Strauss et al., Eur. J. Biochem., 215:633-643 (1993)). Enzym này, có khối lượng phân tử là 300kDa, có tính đặc hiệu cơ chất cao và thể hiện độ tương đồng về trình tự thấp so với các oxidoreductaza đã biết khác (Hugler et al., như trên). Không có enzym nào ở các sinh vật khác được cho thấy là xúc tác cho phản ứng đặc hiệu này; tuy nhiên có bằng chứng tin sinh học cho thấy rằng các sinh vật khác có thể có các con đường tương tự (Klatt et al., Environ. Microbiol., 9:2067-2078 (2007)). Các enzym ở các sinh vật khác bao gồm *Roseiflexus castenholzii*, *Erythrobacter* sp. NAP1 và *gamma proteobacterium* HTCC2080 ở biển có thể được suy ra nhờ sự tương đồng về trình tự. Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 11.

Bảng 11

| Protein              | Mã số GenBank  | Số GI     | Sinh vật                                     |
|----------------------|----------------|-----------|----------------------------------------------|
| <i>mcr</i>           | AAS20429.1     | 42561982  | <i>Chloroflexus aurantiacus</i>              |
| <i>Rcas_2929</i>     | YP_001433009.1 | 156742880 | <i>Roseiflexus castenholzii</i>              |
| <i>NAP1_02720</i>    | ZP_01039179.1  | 85708113  | <i>Erythrobacter</i> sp. NAP1                |
| <i>MGP2080_00535</i> | ZP_01626393.1  | 119504313 | <i>gamma proteobacterium</i> HTCC2080 ở biển |

Các phân tử axyl-CoA mạch dài hơn có thể bị khử bởi các enzym như FAR ở cây jojoba (*Simmondsia chinensis*) mã hóa cho axyl-CoA béo reductaza tạo ra rượu. Sự biểu hiện quá mức của nó ở *E. coli* dẫn đến hoạt tính FAR và sự tích lũy rượu béo (Metz et al., Plant Physiology, 122:635-644 (2000)) (FAR, AAD38039.1, 5020215, *Simmondsia chinensis*).

Các con đường được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm nhiều dạng biến đổi loại oxidoreductaza mà chuyển hóa axyl-CoA thành aldehyt. Cụ thể là, các bước A và H trên Fig.2 được xúc tác bởi enzym axetoaxetyl-CoA reductaza (tạo aldehyt) và 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt), và bước C từ Fig.3 thể hiện biến đổi được xúc tác bởi enzym 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza.

Một số axyl-CoA dehydrogenaza có khả năng khử axyl-CoA thành aldehyt tương ứng của nó. Ví dụ về các gen mã hóa cho các enzym này bao gồm *acr1* của *Acinetobacter calcoaceticus* mã hóa cho axyl-CoA béo reductaza (Reiser et al., J. of Bacteriology, 179:2969-2975 (1997)), axyl-CoA béo reductaza của *Acinetobacter sp. M-1* (Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol., 68:1192-1195 (2002)), và CoA- và succinat semialdehyt dehydrogenaza phụ thuộc NADP được mã hóa bởi gen *sucD* của *Clostridium kluyveri* (Sohling et al., J. Bacteriol., 178:871-880 (1996)). *SucD* của *P. gingivalis* là một enzym succinat semialdehyt dehydrogenaza khác (Takahashi et al., J. Bacteriol., 182:4704-4710 (2000)). Enzym axyl hóa axetaldehyt dehydrogenaza của *Pseudomonas sp.*, được mã hóa bởi *bphG*, là một enzym khác nữa được chứng minh là oxi hóa và axyl hóa axetaldehyt, propionaldehyt, butyraldehyt, isobutyraldehyt và formaldehyt (Powlowski et al., J. Bacteriol., 175:377-385 (1993)). Ngoài việc khử axetyl-CoA thành etanol, enzym được mã hóa bởi *adhE* của *Leuconostoc mesenteroides* này được cho thấy là oxi hóa hợp chất mạch nhánh isobutyraldehyt thành isobutyryl-CoA (Kazahaya et al., như trên; Koo et al., như trên). Butyraldehyt dehydrogenaza xúc tác cho phản ứng tương tự, là phản ứng chuyển hóa butyryl-CoA thành butyraldehyt, ở các sinh vật sinh dung môi như *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka et al., Biosci. Biotechnol Biochem., 71 :58-61 (2007)). Các enzym aldehyt dehydrogenaza khác được tìm thấy ở *Desulfatibacillum alkenivorans*, *Citrobacter koseri*, *Salmonella enterica*, *Lactobacillus brevis* và *Bacillus selenitireducens*. Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 12.

Bảng 12

| Protein     | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                            |
|-------------|---------------|-----------|-------------------------------------|
| <i>acr1</i> | YP_047869.1   | 50086359  | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>  |
| <i>acr1</i> | AAC45217      | 1684886   | <i>Acinetobacter baylyi</i>         |
| <i>acr1</i> | BAB85476.1    | 18857901  | <i>Acinetobacter sp. Strain M-1</i> |
| <i>sucD</i> | P38947.1      | 172046062 | <i>Clostridium kluyveri</i>         |
| <i>sucD</i> | NP_904963.1   | 34540484  | <i>Porphyromonas gingivalis</i>     |

|                |              |           |                                                         |
|----------------|--------------|-----------|---------------------------------------------------------|
| <i>bphG</i>    | BAA03892.1   | 425213    | <i>Pseudomonas sp</i>                                   |
| <i>adhE</i>    | AAV66076.1   | 55818563  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>                        |
| <i>bld</i>     | AAP42563.1   | 31075383  | <i>Clostridium</i><br><i>saccharoperbutylacetonicum</i> |
| <i>ald</i>     | ACL06658.1   | 218764192 | <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i><br><i>AK-01</i>   |
| <i>ald</i>     | YP_001452373 | 157145054 | <i>Citrobacter koseri ATCC BAA-895</i>                  |
| <i>pduP</i>    | NP_460996.1  | 16765381  | <i>Salmonella enterica Typhimurium</i>                  |
| <i>pduP</i>    | ABJ64680.1   | 116099531 | <i>Lactobacillus brevis ATCC 367</i>                    |
| Bse1DRAFT_1651 | ZP_02169447  | 163762382 | <i>Bacillus selenitireducens MLS10</i>                  |

Một loại enzym khác chuyển hóa axyl-CoA thành aldehyt tương ứng của nó là malonyl-CoA reductaza, enzym này biến đổi malonyl-CoA thành malonic semialdehyt. Malonyl-CoA reductaza là enzym quan trọng trong quá trình cố định cacbon ở sinh vật tự dưỡng nhờ con đường 3-hydroxypropionat ở vi khuẩn cổ ưa axit và ưa nhiệt (Berg et al., như trên; Thauer, R.K., Science, 318:1732-1733 (2007)). Enzym này sử dụng NADPH dưới dạng một đồng yếu tố và được xác định đặc điểm ở *Metallosphaera* và *Sulfolobus spp* (Alber et al., J. Bacteriol., 188:8551-8559 (2006); Hugler et al., như trên). Enzym này được mã hóa bởi *Msed\_0709* của *Metallosphaera sedula* (Alber et al., như trên; Berg et al., như trên). Gen mã hóa cho malonyl-CoA reductaza từ *Sulfolobus tokodaii* được tách dòng và được biểu hiện trên loài khác ở *E. coli* (Alber et al., như trên). Enzym này được cho thấy là xúc tác cho phản ứng chuyển hóa metylmalonyl-CoA thành aldehyt tương ứng của nó (2007). Mặc dù nhóm chức aldehyt dehydrogenaza của các enzym này là giống với dehydrogenaza hai chức năng từ *Chloroflexus aurantiacus*, chúng có sự tương đồng về trình tự thấp. Cả hai enzym malonyl-CoA reductaza đều có mức độ tương đồng về trình tự cao với aspartat-semialdehyt dehydrogenaza, một enzym xúc tác cho phản ứng khử và quá trình khử phospho hóa đồng thời aspartyl-4-phosphat thành aspartat semialdehyt. Các gen khác có thể được phát hiện nhờ sự tương đồng về trình tự với các protein ở các sinh vật khác bao gồm *Sulfolobus solfataricus* và *Sulfolobus acidocaldarius* và đã được liệt kê dưới đây. Một enzym khác CoA-axyl hóa aldehyt dehydrogenaza là gen hỗ trợ từ *Clostridium beijerinckii* (Toth et al., Appl. Environ. Microbiol., 65:4973-4980 (1999)). Enzym

này đã được thông báo là khử axetyl-CoA và butyryl-CoA thành các aldehyt tương ứng của chúng. Gen này rất giống với *eutE* mã hóa cho axetaldehyt dehydrogenaza của *Salmonella typhimurium* và *E. coli* (Toth et al., như trên). Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 13.

Bảng 13

| Protein          | Mã số GenBank  | Số GI     | Sinh vật                         |
|------------------|----------------|-----------|----------------------------------|
| <i>MSED_0709</i> | YP_001190808.1 | 146303492 | <i>Metallosphaera sedula</i>     |
| <i>mcr</i>       | NP_378167.1    | 15922498  | <i>Sulfolobus tokodaii</i>       |
| <i>asd-2</i>     | NP-343563.1    | 15898958  | <i>Sulfolobus solfataricus</i>   |
| <i>Saci_2370</i> | YP_256941.1    | 70608071  | <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> |
| <i>Ald</i>       | AAT66436       | 9473535   | <i>Clostridium beijerinckii</i>  |
| <i>eutE</i>      | AAA80209       | 687645    | <i>Salmonella typhimurium</i>    |
| <i>eutE</i>      | P77445         | 2498347   | <i>Escherichia coli</i>          |

Phản ứng oxi hóa khử nhóm amin của nhóm amino thành nhóm oxo tương ứng của nó được xúc tác bởi enzym oxidoreductaza khử nhóm amin thuộc lớp phân loại EC 1.4.1. Các enzym này sử dụng  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  hoặc  $\text{FAD}^+$  làm chất nhận. Các enzym trong lớp này có thể chuyển hóa 2-amino-4-oxopentanoat thành 2,4- dioxopentanoat (Fig.1, bước B), 2-amino-4-hydroxypentanoat thành 2-oxo-4- hydroxypentanoat (Fig.1, bước M) và 4-aminobutan-2-on thành 3-oxobutylaldehyt (Fig.1, bước K). Ví dụ về oxidoreductaza hoạt động trên các cơ chất trong tự nhiên bao gồm glutamat dehydrogenaza (khử amin), được mã hóa bởi *gdhA*, leuxin dehydrogenaza (khử amin), được mã hóa bởi *ldh*, và aspartat dehydrogenaza (khử amin), được mã hóa bởi *nadX*. Sản phẩm gen *gdhA* từ *Escherichia coli* (McPherson et al, Nucleic.Acids Res. 11 :5257-5266 (1983); Korber et al., J.Mol.Biol. 234: 1270-1273 (1993)), *gdh* từ *Thermotoga maritima* (Kort et al., Extremophiles 1 :52-60 (1997); Lebbink et al., J.Mol.Biol. 280:287-296 (1998); Lebbink et al., J.Mol.Biol. 289:357-369 (1999)), và *gdhA1* từ *Halobacterium salinarum* (Ingoldsby et al., Gene. 349:237-244 (2005)) xúc tác cho phản ứng chuyển hóa thuận nghịch lẫn nhau chuyển hóa glutamat thành 2-oxoglutarat và amoniac, trong khi đó thứ tự ưu tiên lần

lượt là NADP(H), NAD(H), hoặc cả hai. Các gen glutamat dehydrogenaza khác được tìm thấy ở *Bacillus subtilis* (Khan et al., Biosci.Biotechnol Biochem. 69:1861-1870 (2005)), *Nicotiana tabacum* (Purnell et al., Planta 222:167-180 (2005)), *Oryza sativa* (Abiko et al., Plant Cell Physiol 46:1724-1734 (2005)), *Haloferax mediterranei* (Diaz et al., Extremophiles. 10: 105-115 (2006)), *Halobacterium salinarum* (Hayden et al., FEMS Microbiol Lett. 211 :37-41 (2002)) và nấm men (Roca et al., Appl Environ. Microbiol 69:4732-4736 (2003)). Enzym của *Nicotiana tabacum* được cấu tạo từ các tiểu đơn vị alpha và beta được mã hóa bởi *gdh1* và *gdh2* (Purnell et al., Planta 222:167-180 (2005)). Gen *ldh* của *Bacillus cereus* mã hóa cho protein LeuDH, enzym này chấp nhận phổ cơ chất rộng bao gồm leuxin, isoleuxin, valin, và 2-aminobutanoat (Stoyan et al., J.Biotechnol 54:77-80 (1997); Ansorge et al., Biotechnol Bioeng. 68:557-562 (2000)). Gen *nadX* từ *Thermotoga maritima* mã hóa cho aspartat dehydrogenaza tham gia vào quá trình sinh tổng hợp của NAD (Yang et al., J.BiolChem. 278:8804-8808 (2003)). Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên ngân hàng gen được thể hiện trong bảng 14 dưới đây.

Bảng 14

| Protein      | Mã số GenBank | Số GI    | Sinh vật                        |
|--------------|---------------|----------|---------------------------------|
| <i>gdhA</i>  | P00370        | 118547   | <i>Escherichia coli</i>         |
| <i>gdh</i>   | P96110.4      | 6226595  | <i>Thermotoga maritima</i>      |
| <i>gdhA1</i> | NP_279651.1   | 15789827 | <i>Halobacterium salinarum</i>  |
| <i>rocG</i>  | NP_391659.1   | 16080831 | <i>Bacillus subtilis</i>        |
| <i>gdh1</i>  | AAR11534.1    | 38146335 | <i>Nicotiana tabacum</i>        |
| <i>gdh2</i>  | AAR11535.1    | 38146337 | <i>Nicotiana tabacum</i>        |
| <i>GDH</i>   | Q852M0        | 75243660 | <i>Oryza sativa</i>             |
| <i>GDH</i>   | Q977U6        | 74499858 | <i>Haloferax mediterranei</i>   |
| <i>GDH</i>   | P29051        | 118549   | <i>Halobacterium salinarum</i>  |
| <i>GDH2</i>  | NP_010066.1   | 6319986  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| <i>ldh</i>   | P0A393        | 61222614 | <i>Bacillus cereus</i>          |
| <i>nadX</i>  | NP_229443.1   | 15644391 | <i>Thermotoga maritima</i>      |

Cần có enzym có hoạt tính 4-aminobutan-2-on oxidoreductaza (khử amin) để chuyển hóa 4-aminobutan-2-on thành aldehyt tương ứng của nó (Fig.1, bước K). Ví dụ về enzym loại này bao gồm 3,5-diaminohexanoat dehydrogenaza (EC 1.4.1.11) và lysin 6-dehydrogenaza (EC 1.4.1.18). 3,5-Diaminohexanoat dehydrogenaza chuyển hóa 3-amino axit và 3-oxoaxit lẫn nhau và đã được xác định đặc điểm ở các sinh vật lên men lysin. Gần đây, gen mã hóa cho 3,5-diaminohexanoat dehydrogenaza, *kdd*, đã được phát hiện ở *Fusobacterium nucleatum* (Kreimeyer et al., J Biol.Chem. 282:7191-7197 (2007)). Enzym này đã được tinh sạch và xác định đặc điểm ở các sinh vật khác (Baker et al., J. Biol.Chem. 247:7724-7734 (1972); Baker et al., Biochemistry 13:292-299 (1974)) nhưng các gen liên quan đến các enzym này vẫn chưa được biết đến. Các enzym ở các sinh vật có trình tự khác có thể được suy ra nhờ trình tự tương đồng. Lysin 6-dehydrogenaza, được mã hóa bởi gen *lysDH*, xúc tác cho phản ứng chuyển hóa các amin bậc một thành các aldehyt tương ứng của chúng. Enzym này xúc tác một cách tự nhiên cho phản ứng oxi hóa khử nhóm amin thuận nghịch nhóm 6-amino của L-lysin thành 2-aminoadipat-6-semialdehyt (Misono et al., J Bacteriol. 150:398-401 (1982)). Các enzym được lấy làm ví dụ được tìm thấy ở *Geobacillus stearothermophilus* (Heydari et al., Appl Environ.Microbiol 70:937-942 (2004)), *Agrobacterium tumefaciens* (Hashimoto et al., J Biochem. 106:76-80 (1989); Misono and Nagasaki, J Bacteriol. 150:398-401 (1982)), và *Achromobacter denitrificans* (Ruldeekulthamrong et al., BMB.Rep. 41 :790-795 (2008)). Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 15.

Bảng 15

| Protein      | Mã số GenBank | Số GI    | Sinh vật                              |
|--------------|---------------|----------|---------------------------------------|
| <i>kdd</i>   | AAL93966.1    | 19713113 | <i>Fusobacterium nucleatum</i>        |
| <i>lysDH</i> | BAB39707      | 13429872 | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> |
| <i>lysDH</i> | NP_353966     | 15888285 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i>      |
| <i>lysDH</i> | AAZ94428      | 74026644 | <i>Achromobacter denitrificans</i>    |

2-Amino-4-oxopentanoat (AKP) thiolaza hoặc AKP thiolaza (AKPT) (bước 1, Fig.1) là enzym phụ thuộc pyridoxal phosphat tham gia vào quá trình phân hủy ornithin ở *Clostridium*

*sticklandii* (Jeng et al., *A. Biochemistry*, 13:2898-2903 (1974); Kenkies et al., *Microbiology*, 145:819-826 (1999)). Gần đây, cụm gen mã hóa cho các tiểu đơn vị alpha và beta của AKPT (*or-2 (ortA)* và *or-3 (ortB)*) đã được xác định và các đặc tính sinh hóa của enzym này đã được xác định (Fonknechten et al., *J. Bacteriol.*, In Press (2009)). Enzym này có khả năng hoạt động ở cả hai chiều và phản ứng với đồng phân D của alanin. Có thể thực hiện việc thiết kế gen này để tối ưu hóa hoạt động với L-alanin làm cơ chất. AKPT từ *Clostridium sticklandii* đã được xác định đặc điểm nhưng trình tự protein của nó vẫn chưa được công bố. Các enzym có mức độ tương đồng về trình tự cao được tìm thấy ở *Clostridium difficile*, *Alkaliphilus metalliredigenes* QYF, *Thermoanaerobacter* sp. X514, và *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 (Fonknechten et al, như trên). Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 16.

Bảng 16

| Protein                 | Mã số GenBank  | Số GI     | Sinh vật                                    |
|-------------------------|----------------|-----------|---------------------------------------------|
| <i>ortA (A)</i>         | YP_001086914.1 | 126698017 | <i>Clostridium difficile</i> 630            |
| <i>ortB (B)</i>         | YP_001086915.1 | 126698018 | <i>Clostridium difficile</i> 630            |
| <i>Amet_2368 (α)</i>    | YP_001320181.1 | 150390132 | <i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYF    |
| <i>Amet_2369 (β)</i>    | YP_001320182.1 | 150390133 | <i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYF    |
| <i>Teth514_1478 (α)</i> | YP_001663101.1 | 167040116 | <i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514          |
| <i>Teth514-1479 (β)</i> | YP_001663102.1 | 167040117 | <i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514          |
| <i>TTE1235 (α)</i>      | NP_622858.1    | 20807687  | <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4 |
| <i>thrC (β)</i>         | NP_622859.1    | 20807688  | <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4 |

Phản ứng chuyển hóa 2-amino-4-oxopentanoat (AKP) thành 2,4-dioxopentanoat (bước B, Fig.1) được thực hiện nhờ 2-amino-4-oxopentanoat aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin). Việc chọn enzym thích hợp cho biến đổi này phụ thuộc vào hóa học lập thể của cơ chất. Ví dụ, nếu cơ chất ở dạng cấu hình D, thì axit amin D aminotransferaza của (EC 2.6.1.21)

có thể được sử dụng, trong khi đối với dạng đồng phân lập thể L có thể sử dụng L-aminotransferaza như aspartat aminotransferaza (EC 2.6.1.1).

Aspartat aminotransferaza chuyển nhóm amino từ aspartat sang alpha-ketoglutarat, tạo ra glutamat và oxaloacetat. Aspartat có cấu trúc tương tự với 2-amino-4-oxopentanoat. Phản ứng chuyển hóa này được xúc tác bởi, ví dụ, sản phẩm gen của *aspC* từ *Escherichia coli* (Yagi et al., FEBS Lett, 100:81-84 (1979); Yagi et al., Methods Enzymol, 133:83-89 (1985)), *AAT2* từ *Saccharomyces cerevisiae* (Yagi et al., J. Biochem., 92:35-43 (1982)) và *ASP5* từ *Arabidopsis thaliana* (Kwok et al., J. Exp. Bot., 55:595-604 (2004); De Ia et al., Plant J., 46:414-425 (2006); Wilkie et al., Protein Expr. Purif., 12:381-389 (1998)). Enzym từ *Rattus norvegicus* này được cho thấy là chuyển nhóm amin lần lượt các cơ chất như axit 2-aminohexandioic và axit 2,4-diaminobutyric (Recasens et al., Biochemistry, 19:4583-4589 (1980)). Aminotransferaza hoạt động trên các cơ chất tương tự axit amin khác cũng có thể xúc tác cho phản ứng biến đổi này. Valin aminotransferaza xúc tác cho phản ứng chuyển hóa valin và pyruvat thành 2-ketoisovalerat và alanin. Gen của *E. coli*, *avtA*, mã hóa cho enzym này (Whalen et al., J. Bacteriol., 150:739-746 (1982)). Sản phẩm gen này cũng xúc tác cho phản ứng amin hóa  $\alpha$ -ketobutytrat thành  $\alpha$ -aminobutytrat, mặc dù chất cho amin trong phản ứng này chưa được xác định (Whalen et al., J. Bacteriol., 158:571-574 (1984)). Một enzym khác là alpha-aminoacidat transaminaza (EC 2.6.1.39), enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp và phân hủy lysin và ở một số sinh vật. Enzym này từ *Thermus thermophilus*, được mã hóa bởi *lysN*, được hoạt hóa bởi các cơ chất khác nhau bao gồm oxaloacetat, 2-oxoisocaproat, 2-oxoisovalerat, và 2-oxo-3-metyl valerat (Miyazaki et al., Microbiol. 150:2327-2334 (2004)). Một enzym tương tự của *Homo sapiens* đã được xác định đặc điểm (Okuno et al., LyEnz. Prot. 47:136-148 (1993)). Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 17.

Bảng 17

| Protein     | Mã số GenBank | Số GI    | Sinh vật                |
|-------------|---------------|----------|-------------------------|
| <i>aspC</i> | NP_415448.1   | 16128895 | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>AAT2</i> | P23542.3      | 1703040  | <i>Saccharomyces</i>    |

|                 |             |          |                             |
|-----------------|-------------|----------|-----------------------------|
|                 |             |          | <i>cerevisiae</i>           |
| <i>ASP5</i>     | P46248.2    | 20532373 | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| <i>got2</i>     | P00507      | 112987   | <i>Rattus norvegicus</i>    |
| <i>avtA</i>     | YP_026231.1 | 49176374 | <i>Escherichia coli</i>     |
| <i>lysN</i>     | BAC76939.1  | 31096548 | <i>Thermus thermophilus</i> |
| <i>AadAT-II</i> | Q8N5Z0.2    | 46395904 | <i>Homo sapiens</i>         |

Khi cơ chất có mặt dưới dạng đồng phân D, phản ứng chuyển nhóm amin có thể được xúc tác bởi enzym D-aminotransferaza (EC 2.6.1.21), còn được gọi là D-axit amin aminotransferaza và D-alanin aminotransferaza (DAAT). Lớp enzym này được chú ý vì tính đặc hiệu cơ chất rộng của nó, các enzym này có tính đặc hiệu loài. D-aminotransferaza từ *Bacillus* species YM-1, được mã hóa bởi *dat*, đã được tách dòng và xác định trình tự (Tanizawa et al., J. Biol. Chem., 264:2450-2454 (1989)) và cấu trúc tinh thể của nó đã được phân giải (Peisach et al., Biochemistry, 37:4958-4967 (1998)). Enzym này cũng là mục tiêu của các nghiên cứu thiết kế protein để làm thay đổi tính đặc hiệu cơ chất (Gutierrez et al., Eur. J. Biochem., 267:7218-7223 (2000); Gutierrez et al., Protein Eng., 11 :53-58 (1998)). Các gen khác được tìm thấy ở *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 (Taylor et al., Biochim. Biophys. Acta., 1350:38-40 (1997)), *Staphylococcus haemolyticus* (Pucci et al., J. Bacterial., 177:336-342 (1995)) và *Bacillus subtilis* (Martinez-Carrion et al., J. Biol. Chem., 240:3538-3546 (1965)). Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 18.

Bảng 18

| Protein    | Mã số GenBank | Số GI   | Sinh vật                                 |
|------------|---------------|---------|------------------------------------------|
| <i>dat</i> | P19938        | 118222  | <i>Bacillus</i> sp. YM-1                 |
| <i>dat</i> | P54692        | 1706292 | <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 10716 |
| <i>dat</i> | P54694        | 1706294 | <i>Staphylococcus haemolyticus</i>       |
| <i>dat</i> | O07597.1      | 3121979 | <i>Bacillus subtilis</i>                 |

Trong phản ứng K trên Fig.1, 4-aminobutan-2-on được chuyển nhóm amin để tạo ra 3-oxobutanal. Phản ứng biến đổi này có thể có khả năng được xúc tác bởi enzym aminotransferaza chuyển hóa các amin và aldehyt đầu cuối lẫn nhau. Ví dụ về các enzym này là beta-alanin/alpha-ketoglutarat aminotransferaza, GABA aminotransferaza, 3-amino-2-metylpropionat transaminaza, lysin-6-aminotransferaza, 2,4-diaminobutanoat transaminaza, putresxin aminotransferaza và diamin aminotransferaza.

Cargill đã phát triển và được cấp bằng độc quyền sáng chế cho enzym beta-alanin/alpha-ketoglutarat aminotransferaza để sản xuất 3-HP từ beta-alanin thông qua malonyl-semialdehyt (Chandra et al, Arch. Microbiol, 176:443-451 (2001)). Sản phẩm gen của SkPYD4 ở *Saccharomyces kluyveri* cũng đã được cho thấy là ưu tiên sử dụng beta-alanin làm chất cho nhóm amin (Aberhart et al., J. Chem. Soc.. 6: 1404-1406 (1979)). *SkUGA1* mã hóa cho dạng đồng đẳng của aminotransferaza của *Saccharomyces cerevisiae* GABA, UGA1 (Ichikawa et al., J. Mol Catalysis A-Chem., 256:106-112 (2006)), trong khi SkPYD4 mã hóa cho enzym tham gia vào quá trình chuyển amin của cả  $\beta$ -alanin và GABA (Aberthart et al., như trên). 3-Amino-2-metylpropionat transaminaza xúc tác cho phản ứng biến đổi từ metylmalonat semialdehyt thành 3-amino-2-metylpropionat. Enzym này đã được xác định đặc điểm ở *Rattus norvegicus* và *Sus scrofa* và được mã hóa bởi *Abat* (Chopra et al., Protein Expr. Purif., 25:533-540 (2002), Kuznetsova et al., FEMS Microbiol. Rev., 29:263-279 (2005)). Các enzym ở các sinh vật khác có mức độ tương đồng về trình tự cao với 3-amino-2-metylpropionat transaminaza bao gồm *Gta-1* ở *C. elegans* và *gabT* ở *Bacillus subtilis*.

Ngoài ra, một trong số các GABA aminotransferaza tự nhiên của *E. coli*, được mã hóa bởi gen *gabT*, đã được cho thấy là có tính đặc hiệu cơ chất rộng (Fontaine et al., J. Bacteriol., 184:821-830 (2002), Kanamasa et al., Appl. Microbiol Biotechnol, 80:223-229 (2008)). Gen *puuE* mã hóa cho 4-aminobutyrat transaminaza khác ở *E. coli* (Drummond et al., J. Biol. Chem., 235:318-325 (1960)).

Lysin-6-aminotransferaza chuyển hóa lysin thành alpha-aminoadipat semialdehyt. Các enzym này đã được xác định đặc điểm ở *Candida utilis* (Hammer et al., J Basic Microbiol 32:21-27 (1992)), *Flavobacterium lutescens* (Fujii et al., J Biochem. 128:391-397 (2000)) và

*Streptomyces clavuligenus* (Romero et al., J Ind. Microbiol Biotechnol 18:241-246 (1997)). Lysin-6-aminotransferaza tái tổ hợp từ *S. clavuligenus* đã được biểu hiện chức năng ở *E. coli* (Tobin et al., J Bacteriol. 173:6223-6229 (1991)). Enzym của *F. lutescens* đặc hiệu với alpha-ketoglutarat là chất nhận nhóm amino (Soda et al., Biochemistry 7:4110-4119 (1968)). Enzym có hoạt tính diaminobutanoat transaminaza được mã hóa bởi gen *dat* ở *Acinetobacter baumannii* (Ikai et al., J Bacteriol. 179:5118-5125 (1997)). Ngoài cơ chất tự nhiên của nó là 2,4-diaminobutyrate, DAT còn chuyển nhóm amin của các amin đầu cuối của lysin, A-aminobutyrate và ornithin. Các enzym putresxin aminotransferaza được mã hóa bởi *ygjG* của *E. coli* và *spuC* của *Pseudomonas aeruginosa* (Lu et al., J Bacteriol. 184:3765-3773 (2002)). Sản phẩm gen của *ygjG* phản ứng với các cơ chất thay đổi cadaverin, spermidin và 1,7-diaminoheptanoat (Samsonova et al., BMC.Microbiol 3:2 (2003); Kim, J Biol.Chem. 239:783-786 (1964)).

Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 19.

Bảng 19

| Protein        | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                         |
|----------------|---------------|-----------|----------------------------------|
| <i>SkyPYD4</i> | ABF58893.1    | 98626772  | <i>Saccharomyces kluyveri</i>    |
| <i>SkUGA1</i>  | ABF58894.1    | 98626792  | <i>Saccharomyces kluyveri</i>    |
| <i>UGA1</i>    | NP_011533.1   | 6321456   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  |
| <i>Abat</i>    | P50554.3      | 122065191 | <i>Rattus norvegicus</i>         |
| <i>Abat</i>    | P80147.2      | 120968    | <i>Sus scrofa</i>                |
| <i>Gta-1</i>   | Q21217.1      | 6016091   | <i>Caenorhabditis elegans</i>    |
| <i>gabT</i>    | P94427.1      | 6016090   | <i>Bacillus subtilis</i>         |
| <i>gabT</i>    | P22256.1      | 16130576  | <i>Escherichia coli K12</i>      |
| <i>puuE</i>    | NP_415818.1   | 16129263  | <i>Escherichia coli K12</i>      |
| <i>lat</i>     | BAB13756.1    | 10336502  | <i>Flavobacterium lutescens</i>  |
| <i>lat</i>     | AAA26777.1    | 153343    | <i>Streptomyces clavuligenus</i> |
| <i>dat</i>     | P56744.1      | 6685373   | <i>Acinetobacter baumannii</i>   |
| <i>ygjG</i>    | NP_417544     | 145698310 | <i>Escherichia coli</i>          |

|             |          |         |                               |
|-------------|----------|---------|-------------------------------|
| <i>spuG</i> | AAG03688 | 9946143 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
|-------------|----------|---------|-------------------------------|

Trên Fig.1, bước C, 2,4-dioxopentanoat được khử nhóm carboxyl để tạo ra 3-oxobutyraldehyt nhờ 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza. 2,4-dioxopentanoat tương tự với cơ chất tự nhiên của pyruvat decarboxylaza (EC 4.1.1.1) và benzoylformat decarboxylaza (EC 4.1.1.7). Pyruvat decarboxylaza (*PDC*), còn được gọi là keto-axit decarboxylaza, là enzym quan trọng trong quá trình lên men rượu, xúc tác cho phản ứng loại nhóm carboxyl của pyruvat thành axetaldehyt. Enzym từ *Saccharomyces cerevisiae* này có phổ cơ chất cho các axit 2-keto béo rộng bao gồm 2-ketobutytrat, 2-keto valerat, 3-hydroxypyruvat và 2-phenylpyruvat (Li et al., Biochemistry, 38:10004-10012 (1999)). Enzym này đã được nghiên cứu sâu, được thiết kế để thay đổi hoạt tính, và được biểu hiện chức năng ở *E. coli* (Killenberg-Jabs et al., Eur. J. Biochem., 268: 1698-1704 (2001); Li et al., như trên; Schure et al., Appl. Environ. Microbiol., 64:1303-1307 (1998)). *PDC* từ *Zymomonas mobilis*, được mã hóa bởi *pdh*, cũng có phổ cơ chất rộng và là mục tiêu của các nghiên cứu thiết kế được định hướng để làm thay đổi ái lực với các cơ chất khác nhau (Siegert et al., Protein Eng. Des. Sel., 18:345-357 (2005)). Cấu trúc tinh thể của enzym này đã được biết (Killenberg-Jabs, như trên). Các enzym *PDC* được xác định đặc điểm rõ ràng khác bao gồm các enzym từ *Acetobacter pasteurians* (Chandra et al., Arch. Microbiol. 176:443-451 (2001)) và *Kluyveromyces lactis* (Krieger et al., Eur. J. Biochem., 269:3256-3263 (2002)). Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 20.

Bảng 20

| Protein     | Mã số GenBank | Số GI    | Sinh vật                        |
|-------------|---------------|----------|---------------------------------|
| <i>pdh</i>  | P06672.1      | 118391   | <i>Zymomonas mobilis</i>        |
| <i>pdh1</i> | P06169        | 30923172 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| <i>pdh</i>  | Q8L388        | 20385191 | <i>Acetobacter pasteurians</i>  |
| <i>pdh1</i> | Q12629        | 52788279 | <i>Kluyveromyces lactis</i>     |

Tương tự như PDC, benzoylformat decarboxylaza (EC 4.1.1.7) có phổ cơ chất rộng và cũng là đích của các nghiên cứu thiết kế enzym. Enzym từ *Pseudomonas putida* này đã được nghiên cứu sâu và cấu trúc tinh thể của enzym này là đã biết (Polovnikova et al., Biochemistry 42: 1820-1830 (2003); Hasson et al., Biochemistry, 37:9918-9930 (1998)). Việc gây đột biến điểm định hướng ở hai gốc ở vị trí hoạt động của enzym của *Pseudomonas putida* làm thay đổi ái lực (Km) với cơ chất tự nhiên và không có trong tự nhiên (Siegert et al., như trên). Đặc tính của enzym này được cải biến thêm bằng kỹ thuật định hướng (Lingen et al., Chembiochem, 4:721-726 (2003); Lingen et al., Protein Eng., 15:585-593 (2002)). Enzym từ *Pseudomonas aeruginosa* này, được mã hóa bởi *mdlC*, cũng đã được xác định đặc điểm qua các thử nghiệm (Barrowman et al., FEMS Microbiology Letters, 34:57-60 (1986)). Các gen khác từ *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* và các sinh vật khác có thể được suy ra nhờ tính tương đồng về trình tự hoặc được xác định bằng cách sử dụng hệ chọn lọc sinh trường được tạo ra ở *Pseudomonas putida* (Henning et al., Appl. Environ. Microbiol., 72:7510-7517 (2006)). Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 21.

Bảng 21

| Protein       | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                       |
|---------------|---------------|-----------|--------------------------------|
| <i>mdlC</i>   | P20906.2      | 3915757   | <i>Pseudomonas putida</i>      |
| <i>mdlC</i>   | Q9HUR2.1      | 81539678  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  |
| <i>dpgB</i>   | ABN80423.1    | 126202187 | <i>Pseudomonas stutzeri</i>    |
| <i>ilvB-1</i> | YP_260581.1   | 70730840  | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |

Enzym thứ ba có khả năng loại nhóm carboxyl của 2-oxoaxit là alpha-ketoglutarat decarboxylaza (KGD). Cho đến nay, phổ cơ chất của lớp enzym này vẫn chưa được nghiên cứu. KDC từ *Mycobacterium tuberculosis* (Tian et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 102: 10670-10675 (2005)) đã được tách dòng và được biểu hiện chức năng ở *E. coli* tại trung tâm nghiên cứu Genomatica. Hoạt tính enzym KDC đã được phát hiện ở một số loài thuộc chủng *Rhizobia* bao gồm *Bradyrhizobium japonicum* và *Mesorhizobium loti* (Green et al., J. Bacteriol., 182:2838-2844 (2000)). Mặc dù các gen mã hóa KDC vẫn chưa được phân lập ở các sinh vật

này, trình tự bộ gen là đã biết và một số gen trong mỗi bộ gen được chú thích là các KDC giả định. KDC từ *Euglena gracilis* cũng đã được xác định đặc điểm nhưng gen có liên quan đến hoạt tính này vẫn chưa được nhận biết cho đến ngày nay (Shigeoka et al., Arch. Biochem. Biophys., 288:22-28 (1991)). Hai mươi axit amin đầu tiên bắt đầu từ đầu tận cùng N đã được giải trình tự là MTYKAPVKDVKFLLDKVFKV (Shigeoka et al., như trên). Gen này có thể được nhận biết bằng cách thử nghiệm các gen có chứa trình tự đầu tận cùng N về hoạt tính KDC. Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 22.

Bảng 22

| Protein    | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                                |
|------------|---------------|-----------|-----------------------------------------|
| <i>kgd</i> | O50463.4      | 160395583 | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>       |
| <i>kgd</i> | NP_767092.1   | 27375563  | <i>Bradyrhizobium japonicum USDA110</i> |
| <i>kgd</i> | NP_105204.1   | 13473636  | <i>Mesorhizobium loti</i>               |

Enzym thứ tư để xúc tác cho bước này là axit alpha-keto mạch nhánh decarboxylaza (BCKA). Lớp enzym này đã được cho thấy là hoạt động trên nhiều hợp chất khác nhau có chiều dài mạch thay đổi từ 3 đến 6 nguyên tử cacbon (Oku et al., J. Biol. Chem., 263 :18386-18396 (1988); Smit et al., Appl. Environ. Microbiol., 71 :303-311 (2005)). Enzym ở *Lactococcus lactis* này đã được xác định đặc điểm trên nhiều cơ chất mạch nhánh và mạch thẳng khác nhau bao gồm 2-oxobutanoat, 2-oxohexanoat, 2-oxopentanoat, 3-metyl-2-oxobutanoat, 4-metyl-2-oxobutanoat và isocaproat (Smit et al., như trên). Enzym này đã được xác định đặc điểm cấu trúc (Berthold et al., D. Biol. Crystallogr., 63 :1217-1224 (2007)). Phương pháp căn trình tự giữa enzym của *Lactococcus lactis* và pyruvat decarboxylaza của *Zymomonas mobilis* chỉ ra rằng các gốc xúc tác và nhận diện cơ chất gần như giống nhau hoàn toàn (Siegert et al., như trên), vì vậy enzym này dễ dàng chịu sự cải biến có định hướng. Các gen BCKA khác có thể được nhận biết nhờ sự tương đồng với trình tự protein của *Lactococcus lactis* (*kdcA*, AAS49166.1, 44921617, *Lactococcus lactis*). Nhiều trong số các hit BLASTp có điểm số cao đối với enzym này được chú thích là indolepyruvat decarboxylaza (EC 4.1.1.74).

Indolepyruvat decarboxylaza (IPDA) là một enzym xúc tác cho phản ứng loại nhóm carboxyl của indolepyruvat thành indoleacetaldehyt ở thực vật và vi khuẩn ở thực vật.

2-amino-4-ketopentanoat được khử nhóm carboxyl để tạo ra 4-aminobutan-2-on nhờ AKP decarboxylaza trong bước E trên Fig.1. Phản ứng biến đổi này có thể được xúc tác bởi enzym axit amin decarboxylaza. Việc chọn lọc decarboxylaza thích hợp phụ thuộc vào cấu hình hóa học lập thể của 4-amino-4-oxopentanoat. Nếu hợp chất này ở dạng cấu hình D, thì D-axit amin decarboxylaza có thể được sử dụng. Một D-axit amin decarboxylaza như vậy là diaminopimelat decarboxylaza (DDC, EC 4.1.1.20). Enzym này loại nhóm carboxyl cho tâm lập thể cấu hình D của meso-diaminopimelat, xúc tác cho bước cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp lysin. DDC đã được nghiên cứu ở nhiều sinh vật bao gồm *E. coli* (Momany et al., D. Biol. Crystallogr., 58:549- 552 (2002)), *Mycobacterium tuberculosis* (Kefala et al., Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun., 61 :782-784 (2005); Gokulan et al., J. Biol. Chem., 278: 18588-18596 (2003); Andersen et al., *Gene*, 124:105-109 (1993)), *Methylophilus methylotrophus* (Tsujimoto et al., J. Biotechnol, 124:327-337 (2006)), và *Helicobacter pylori* (Hu et al., J. Biol. Chem., 283 :21284-21293 (2008)). Theo cách khác, ornithin decarboxylaza (EC 4.1.1.17) của *Homo sapiens* có hoạt tính yếu trên đồng phân D của ornithin (Qu et al., Biochem. J., 375:465-470 (2003); Fitzgerald et al., DNA, 8:623-634 (1989)) và có thể được sử dụng để loại nhóm carboxyl trong bước E.

Dữ liệu về trình tự của mỗi Sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 23.

Bảng 23

| Protein     | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                            |
|-------------|---------------|-----------|-------------------------------------|
| <i>lysA</i> | NP_417315.1   | 16130742  | <i>Escherichia coli</i>             |
| <i>lysA</i> | AAA25361.1    | 149964    | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>   |
| <i>lysA</i> | BAC92756.1    | 37196770  | <i>Methylophilus methylotrophus</i> |
| <i>lysA</i> | ABW70801.1    | 158523325 | <i>Helicobacter pylori</i>          |

|             |           |        |                     |
|-------------|-----------|--------|---------------------|
| <i>odcI</i> | AA59969.1 | 386989 | <i>Homo sapiens</i> |
|-------------|-----------|--------|---------------------|

Nếu 2-amino-4-ketopentanoat biểu hiện cấu hình hóa học lập thể L, axit amin decarboxylaza như aspartat decarboxylaza (EC 4.1.1.11), ornithin decarboxylaza (EC 4.1.1.17) hoặc lysin decarboxylaza (EC 4.1.1.18) có thể được sử dụng. Ví dụ về enzym là aspartat decarboxylaza (EC 4.1.1.11). 2-Amino-4-ketopentanoat có cấu trúc tương tự với aspartat, cơ chất tự nhiên của enzym này. Aspartat decarboxylaza tham gia vào quá trình sinh tổng hợp pantothenat và được mã hóa bởi *panD* ở *Escherichia coli* (Dusch et al., Appl. Environ. Microbiol., 65:1530-1539 (1999); Ramjee et al., Biochem. J., 323:661-669 (1997); Merkel et al., FEMS Microbiol. Lett., 143:247-252 (1996); Schmitzberger et al., EMBOJ., 22:6193-6204 (2003)). Các enzym từ *Mycobacterium tuberculosis* (Chopra et al., Protein Expr. Purif., 25:533-540 (2002)) và *Corynebacterium glutanicum* (Dusch et al., như trên) đã được biểu hiện và được xác định đặc điểm ở *E. coli*. Các enzym lysin decarboxylaza được mã hóa trong bộ gen của *E. coli* bởi các gen *cadA* và *ldcC*. Gần đây, lysin decarboxylaza tương tự với *CadA* đã được nhận biết ở *Vibrio parahaemolyticus* (Tanaka et al., J. Appl. Microbiol. 104:1283-1293 (2008)). Lysin decarboxylaza từ *Selenomonas ruminantium*, được mã hóa bởi *ldc*, có trình tự tương tự với ornithin decarboxylaza của sinh vật nhân chuẩn, và nhận cả L-lysin và L-ornithin làm cơ chất (Takatsuka et al., Biosci. Biotechnol Biochem. 63:1843-1846 (1999)). Enzym ornithin decarboxylaza được tìm thấy ở *Nicotiana glutinosa* (Lee et al., Biochem. J. 360:657-665 (2001)), *Lactobacillus sp. 30a* (Guirard et al., J Biol.Chem. 255:5960-5964 (1980)) và *Vibrio vulnificus* (Lee et al., J Biol. Chem. 282:27115-27125 (2007)). Các gốc có liên quan đến tính đặc hiệu cơ chất *Vibrio vulnificus* này đã được làm sáng tỏ (Lee et al., như trên).

Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 24.

Bảng 24

| Protein     | Mã số GenBank | Số GI    | Sinh vật                          |
|-------------|---------------|----------|-----------------------------------|
| <i>panD</i> | P0A790        | 67470411 | <i>Escherichia coli</i>           |
| <i>panD</i> | Q9X4N0        | 18203593 | <i>Corynebacterium glutanicum</i> |

|                           |             |          |                                   |
|---------------------------|-------------|----------|-----------------------------------|
| <i>panD</i>               | P65660.1    | 54041701 | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| <i>cadA</i>               | AAA23536.   | 145458   | <i>Escherichia coli</i>           |
| <i>ldcC</i>               | AAC73297.1  | 1786384  | <i>Escherichia coli</i>           |
| <i>ldc</i>                | O50657.1    | 13124043 | <i>Selenomonas ruminantium</i>    |
| <i>cadA</i>               | AB124819.1  | 44886078 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>    |
| <i>AF323910.1:1..1299</i> | AAG45222.1  | 12007488 | <i>Nicotiana glutinosa</i>        |
| <i>odc1</i>               | P43099.2    | 1169251  | <i>Lactobacillus sp. 30a</i>      |
| <i>VV2_1235</i>           | NP_763142.1 | 27367615 | <i>Vibrio vulnificus</i>          |

Trong phản ứng J (Fig.1), axetylacrylat bị khử nhóm carboxyl thành 2-oxobuten nhờ axetoacrylat decarboxylaza. Cho đến nay, enzym xúc tác cho phản ứng biến đổi này chưa được xác định, nhưng các phản ứng tương tự được xác định là được xúc tác bởi các enzym aconitat decarboxylaza, 4-oxalocrotonat decarboxylaza và xinamat decarboxylaza.

Aconitat decarboxylaza xúc tác cho bước cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp itaconat ở một chủng *Candida* và còn ở nấm sợi *Aspergillus terreus* (Bonnarme et al., J. Bacteriol., 177:3573-3578 (1995); Willke et al., Appl. Microbiol. Biotechnol, 56:289-295 (2001)). Cis-aconitat decarboxylaza (CAD) (EC 4.1.16), được mã hóa bởi *ATEG\_09971*, đã được xác định và nghiên cứu sâu ở *Aspergillus terreus* và nấm có liên quan khác. Gần đây, gen này đã được tách dòng và xác định đặc điểm về chức năng (Kanamasa et al., Appl. Microbiol. Biotechnol, 80:223-229 (2008)) và (WO/2009/014437).

4-oxalocrotonat decarboxylaza được phân lập từ một số sinh vật và đã được xác định đặc điểm. Các gen mã hóa cho enzym này bao gồm *dmpH* và *dmpE* ở *Pseudomonas sp.* (chủng 600) (Shingler et al., J. Bacteriol., 174:711-724 (1992)), *xyIII* và *xyIII* từ *Pseudomonas putida* (Kato et al., Arch. Microbiol, 168:457-463 (1997); Stanley et al., Biochemistry, 39:3514 (2000); Lian et al., J. Am. Chem. Soc, 116:10403-10411 (1994)) và *Reut\_B5691* và *Reut\_B5692* từ *Ralstonia eutropha* JMP134 (Hughes et al., J. Bacteriol., 158:79-83 (1984)). Các gen mã hóa cho enzym này từ *Pseudomonas sp.* (chủng 600) đã được tách dòng và biểu hiện ở *E. coli* (Shingler et al., như trên). Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm

ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 25.

Bảng 25

| Protein           | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                         |
|-------------------|---------------|-----------|----------------------------------|
| <i>dmpH</i>       | CAA43228.1    | 45685     | <i>Pseudomonas sp. CF600</i>     |
| <i>dmpE</i>       | CAA43225.1    | 45682     | <i>Pseudomonas sp. CF600</i>     |
| <i>xylII</i>      | YP_709328.1   | 111116444 | <i>Pseudomonas putida</i>        |
| <i>xylIII</i>     | YP_709353.1   | 111116469 | <i>Pseudomonas putida</i>        |
| <i>Reut_B5691</i> | YP_299880.1   | 73539513  | <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 |
| <i>Reut_B5692</i> | YP_299881.1   | 73539514  | <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 |
| <i>ATEG_09971</i> | EAU29420.1    | 114187720 | <i>Aspergillus terreus</i>       |

Một lớp decarboxylaza khác đã được xác định đặc điểm là xúc tác cho phản ứng chuyển hóa xinamat (phenylacrylat) và các dẫn xuất xinamat được thể thành dẫn xuất styren tương ứng. Các enzym này là giống nhau ở nhiều sinh vật khác nhau và các gen cụ thể mã hóa cho các enzym này đã được tách dòng và biểu hiện ở *E. coli* là: *pad 1* từ *Saccharomyces cerevisiae* (Clausen et al., Gene, 142:107-112 (1994)), *pdc* từ *Lactobacillus plantarum* (Barthelmebs et al., Appl Environ. Microbiol, 67:1063-1069 (2001); Rodriguez et al., J. Agric. Food Chem., 56:3068-3072 (2008); Qi et al., Biochem. J, 375:465-470 (2007)), *pofK (pad)* từ *Klebsiella oxytoca* (Uchiyama et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 72: 116-123 (2008); Hashidoko et al., Biosci. Biotech. Biochem., 58:217-218 (1994)), *Pedicoccus pentosaceus* (Barthelmebs et al., như trên) và *padC* từ *Bacillus subtilis* và *Bacillus pumilus* (Cavin et al., Appl. Environ. Microbiol., 64: 1466-1471 (1998)). Enzym axit ferulic decarboxylaza từ *Pseudomonas fluorescens* cũng đã được tinh sạch và xác định đặc điểm (Huang et al., J. Bacteriol., 176:5912-5918 (1994)). Một điều quan trọng là, lớp enzym này đã được cho thấy là ổn định và không yêu cầu các đồng yếu tố ngoại sinh hoặc được liên kết bên trong, do đó làm cho các enzym này thích hợp lý tưởng cho các phản ứng chuyển hóa sinh học (Sariaslani, F. S., Annu. Rev. Microbiol, 61 :51-69 (2007)). Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này

có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 26.

Bảng 26

| Protein     | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                        |
|-------------|---------------|-----------|---------------------------------|
| <i>pad1</i> | AAB64980.1    | 1165293   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| <i>pdC</i>  | AAC45282.1    | 1762616   | <i>Lactobacillus plantarum</i>  |
| <i>pad</i>  | BAF65031.1    | 149941608 | <i>Klebsiella oxytoca</i>       |
| <i>padC</i> | NP_391320.1   | 16080493  | <i>Bacillus subtilis</i>        |
| <i>pad</i>  | YP_804027.1   | 116492292 | <i>Pedococcus pentosaceus</i>   |
| <i>pad</i>  | CAC18719.1    | 11691810  | <i>Bacillus pumilus</i>         |

Một enzym khác để loại nhóm carboxyl là axetoaxetat decarboxylaza (EC 4.1.1.4), là enzym loại nhóm carboxyl cho axetoaxetat thành axeton và do đó đã được nghiên cứu về vai trò của nó trong quá trình sinh dung môi ở vi khuẩn. Các enzym vi khuẩn được lấy làm ví dụ đã được xác định đặc điểm từ *Clostridium acetobutylicum* (Benner et al., J. Am. Chem. Soc. 103:993-994 (1981); Highbarger et al., Biochemistry 35:41-46 (1996); Petersen et al., Appl. Environ. Microbiol. 56:3491-3498 (1990); Rozzel et al. J. Am. Chem. Soc. 106:4937-4941 (1984)) *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 71 :58-68 (2007)) và *Clostridium beijerinckii* (Ravagnani et al. Mol. Microbiol. 37:1172-1185 (2000)). Cho đến nay, hoạt tính của axetoaxetat decarboxylaza đã được chứng minh ở *Pseudomonas putida* và *Bacillus polymyxa* nhưng các gen không liên quan đến hoạt tính này chưa được nhận biết (Matiassek et al., Curr. Microbiol. 42: 276-281 (2001)). Các gen từ vi khuẩn ở các sinh vật khác như *Clostridium botulinum* và *Bacillus amyloliquefaciens* có thể được nhận biết nhờ sự tương đồng về trình tự. Ở người và động vật có vú khác, axetoaxetat decarboxylaza xúc tác cho bước cuối cùng của con đường của thể keton (Kalapos, Biochim. Biophys. Acta 1621 :122-139 (2003)), nhưng cho đến nay các gen có liên quan đến hoạt tính này chưa được xác định cho đến ngày nay. Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 27.

Bảng 27

| Protein            | Mã số GenBank  | Số GI     | Sinh vật                                      |
|--------------------|----------------|-----------|-----------------------------------------------|
| <i>adc</i>         | NP_149328.1    | 15004868  | <i>Clostridium acetobutylicum</i>             |
| <i>adc</i>         | AAP42566.1     | 31075386  | <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> |
| <i>cbei_3835</i>   | YP_001310906.1 | 150018652 | <i>Clostridium beijerinckii</i>               |
| <i>CLL_A2135</i>   | YP_001886324.1 | 187933144 | <i>Clostridium botulinum</i>                  |
| <i>RBAM_030030</i> | YP_001422565.1 | 154687404 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>             |

Tất cả các gen nêu trên cũng có thể được sử dụng để xúc tác cho phản ứng loại nhóm carboxyl cho 2-oxo-4-hydroxypentanoat thành 3-hydroxybutyraldehyt trong bước N trên Fig.1.

Butenon hydrataza (bước G, Fig.1), 4-hydroxybutyryl-CoA hydrataza (bước A, Fig.3) và crotonaza (bước A, Fig.3) là các dạng biến đổi dạng thủy phân. Cụ thể là, phản ứng hydrat hóa butenon thành 4-hydroxy-2-butanon (bước G, Fig.1) có thể được thực hiện nhờ một enzym trong họ enzym hydrataza. Các enzym có thể thực hiện phản ứng biến đổi này bao gồm fumarat hydrataza (EC 4.2.1.2), 2-(hydroxymetyl)glutarat hydrataza (EC 4.2.1.-), dimethylmaleat hydrataza (EC 4.2.1.85) và xitramalat hydrolyaza (EC 4.2.1.34).

Các enzym fumarat hydrataza xúc tác tự nhiên cho phản ứng hydrat hóa thuận nghịch fumarat thành malat. Mặc dù khả năng phản ứng của fumarat hydrataza với cơ chất butanon vẫn chưa được mô tả trong các tài liệu, nhưng đã có rất nhiều thông tin về cấu trúc của enzym này và các nghiên cứu khác đã cải biến thành công enzym này để làm thay đổi hoạt tính, sự ức chế và định vị (Weaver, T., B. Biol. Crystallogr., 61 : 1395-1401 (2005)). *E. coli* có ba loại fumaraza: FumA, FumB, và FumC được điều hòa bởi các điều kiện sinh trưởng. FumB nhạy với oxy và chỉ hoạt động ở các điều kiện kỵ khí. FumA hoạt động ở các điều kiện vi kỵ khí, và FumC là enzym chỉ hoạt động ở môi trường hiếu khí (Tseng et al., J. Bacteriol., 183:461-467 (2001); Woods et al., Biochem. Biophys. Acta., 954: 14-26 (1988); Guest et al., J. Gen. Microbiol., 131 :2971-2984 (1985)). Các enzym khác được tìm thấy ở *Campylobacter jejuni* (Smith et al., Int. J. Biochem. Cell Biol, 31 :961-975 (1999)), *Thermus thermophilus* (Mizobata

et al., Arch. Biochem. Biophys., 355:49-55 (1998)) và *Rattus norvegicus* (Kobayashi et al., J. Biochem., 89:1923-1931 (1981)). Các enzym tương tự có mức độ tương đồng về trình tự cao bao gồm *fumI* từ *Arabidopsis thaliana* và *fumC* từ *Corynebacterium glutamicum*. *MmcBC* fumaraza từ *Pelotomaculum thermopropionicum* là một lớp fumaraza khác có hai tiểu đơn vị (Shimoyama et al., FEMS Microbiol. Lett, 270:207-213 (2007)). Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 28.

Bảng 28

| Protein     | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                               |
|-------------|---------------|-----------|----------------------------------------|
| <i>fumA</i> | NP_416129.1   | 16129570  | <i>Escherichia coli</i>                |
| <i>fumB</i> | NP_418546.1   | 16131948  | <i>Escherichia coli</i>                |
| <i>fumC</i> | NP_416128.1   | 16129569  | <i>Escherichia coli</i>                |
| <i>fumC</i> | O69294        | 9789756   | <i>Campylobacter jejuni</i>            |
| <i>fumC</i> | P84127        | 75427690  | <i>Thermus thermophilus</i>            |
| <i>fumH</i> | P14408        | 120605    | <i>Rattus norvegicus</i>               |
| <i>fumI</i> | P93033        | 39931311  | <i>Arabidopsis thaliana</i>            |
| <i>fumC</i> | Q8NRN8        | 39931596  | <i>Corynebacterium glutamicum</i>      |
| <i>MmcB</i> | YP_001211906  | 147677691 | <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> |
| <i>MmcC</i> | YP_001211907  | 147677692 | <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> |

Hai enzym hydrataza khác là 2-(hydroxymetyl)glutaratdehydrataza và dimetylmaleat hydrataza, các enzym này được nghiên cứu về vai trò của chúng trong quá trình phân giải niconatinat ở *Eubacterium barkeri* (trước đây được gọi là *Clostridium barkeri*) (Alhapel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 12341-12346 (2006)). 2-(Hydroxymetyl)glutarat dehydrataza là enzym có chứa [4Fe-4S] khử nước cho 2-(hydroxymetyl)glutarat thành 2 -metylen-glutarat. Enzym này được mã hóa bởi *hmd* của *Eubacterium barkeri* (Alhapel et al., như trên). Các enzym tương tự có mức độ tương đồng về trình tự được tìm thấy ở *Bacteroides capillosus*,

*Anaerotruncus colihominis*, và *Natranaerobius thermophilus*. Các enzym này là tương đồng với các tiểu đơn vị alpha và beta của serin dehydrataza của vi khuẩn có chứa [4Fe-4S] (ví dụ, các enzym của *E. coli* được mã hóa bởi *tdcG*, *sdhB*, và *sdaA*). Dimethylmaleat hydratataza (EC 4.2.1.85) là enzym thuận nghịch nhạy với oxy, phụ thuộc  $\text{Fe}^{2+}$  thuộc họ aconitaza, hydrat hóa dimethylmaleat để tạo ra (2R,3S)-2,3-dimethylmalat. Enzym này được mã hóa bởi *dmdAB* của *Eubacterium barkeri* (Alhapel, et al., như trên; Kollmann-Koch et al., *Physiol. Chem.*, 365:847-857 (1984)). Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 29.

Bảng 29

| Protein                | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                                       |
|------------------------|---------------|-----------|------------------------------------------------|
| <i>hmd</i>             | ABC88407.1    | 86278275  | <i>Eubacterium barkeri</i>                     |
| <i>BACCAP_02294</i>    | ZP_02036683.1 | 154498305 | <i>Bacteroides capillosus</i> ATCC 29799       |
| <i>ANACOL_02527</i>    | ZP_02443222.1 | 167771169 | <i>Anaerotruncus colihominis</i> DSM 17241     |
| <i>NtherDRAFT_2368</i> | ZP_02852366.1 | 169192667 | <i>Natranaerobius thermophilus</i> JW/NM-WN-LF |
| <i>dmdA</i>            | ABC88408      | 86278276  | <i>Eubacterium barkeri</i>                     |
| <i>dmdB</i>            | ABC88409.1    | 86278277  | <i>Eubacterium barkeri</i>                     |

Một enzym khác là 2-methylmalat dehydrataza, còn được gọi là xitramalat hydrolyaza, là enzym hydrolyaza thuận nghịch xúc tác cho sự khử alpha, beta của nước từ xitramalat để tạo ra mesaconat. Enzym này đã được tinh chế và xác định đặc điểm ở *Clostridium tetanomorphum* (Wang et al., *J. Biol. Chem.*, 244:2516-2526 (1969)). Hoạt tính của enzym này cũng đã được phát hiện ở một số loài vi khuẩn thuộc các chi *Citrobacter* và *Morganella* về con đường VI phân hủy glutamat (Kato et al., như trên). Cho đến nay các gen mã hóa cho enzym này chưa được nhận biết ở bất kỳ sinh vật nào.

Quá trình hydrat hóa crotonyl-CoA để tạo ra 3-hydroxybutyryl-CoA (bước B, Fig.3) được xúc tác bởi enzym crotonaza (EC 4.2.1.55). Các enzym này là cần thiết để tạo ra n-butanol ở một số sinh vật, cụ thể là loài *Clostridia*, và cũng bao gồm một bước của con đường 3-hydroxypropionat/4-hydroxybutyrat ở cổ khuẩn ưa nhiệt và ưa axit thuộc chi *Sulfolobus*, *Acidianus*, và *Metallosphaera*. Các gen được lấy làm ví dụ mã hóa cho enzym crotonaza có thể được tìm thấy ở *C. acetobutylicum* (Boynton et al., J. Bacteriol., 178:3015-3024 (1996)), *C. kluyveri* (Hillmer et al., FEBS Lett, 21 :351-354 (1972)), và *Metallosphaera sedula* (Berg et al., như trên). Enoyl-CoA hydrataza, tham gia vào phản ứng oxi hóa beta axit béo và/hoặc sự chuyển hóa của nhiều axit amin khác nhau, cũng có thể xúc tác cho phản ứng hydrat hóa của crotonyl-CoA để tạo ra 3-hydroxybutyryl-CoA (Roberts et al, Arch. Microbiol, 117:99-108 (1978); Agnihotri et al., Bioorg. Med. Chem., 11 :9-20 (2003); Conrad et al., J. Bacteriol., 118:103-111 (1974)). Enoyl-CoA hydrataza được lấy làm ví dụ là sản phẩm gen *ech* từ *Pseudomonas putida* (Roberts et al., như trên). Enoyl-CoA hydrataza, *phaA* và *phaB*, của *P. putida* đã được cho thấy là thực hiện phản ứng hydroxyl hóa các liên kết đôi trong quá trình dị hóa phenylaxetat (Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95:6419-6424 (1998)). *PaaA* và *paaB* từ *P. fluorescens* xúc tác cho các biến đổi tương tự (Olivera et al., như trên). Cuối cùng, một số gen của *Escherichia coli* đã được cho thấy chứng minh chức năng của enoyl-CoA hydrataza bao gồm *maoC* (Park et al., J. Bacteriol., 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail et al., Eur. J. Biochem., 270:3047-3054 (2003); Park et al., Appl Biochem. Biotechnol, 113-116:335-346 (2004); Park et al., Biotechnol Bioeng., 86:681-686 (2004)) và *paaG* (Ismail et al., như trên; Park et al., như trên; Park et al., như trên). Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 30.

Bảng 30

| Protein     | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                            |
|-------------|---------------|-----------|-------------------------------------|
| <i>crt</i>  | NP_349318.1   | 15895969  | <i>Clostridium acetobutylicum</i>   |
| <i>crtI</i> | YP_001393856  | 153953091 | <i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555 |
| <i>ech</i>  | NP_745498.1   | 26990073  | <i>Pseudomonas putida</i>           |

|             |             |           |                                |
|-------------|-------------|-----------|--------------------------------|
| <i>phaA</i> | ABF82233.1  | 26990002  | <i>Pseudomonas putida</i>      |
| <i>phaB</i> | ABF82234.1  | 26990001  | <i>Pseudomonas putida</i>      |
| <i>paaA</i> | NP_745427.1 | 106636093 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| <i>paaB</i> | NP_745426.1 | 106636094 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| <i>maoC</i> | NP_415905.1 | 16129348  | <i>Escherichia coli</i>        |
| <i>paaF</i> | NP_415911.1 | 16129354  | <i>Escherichia coli</i>        |
| <i>paaG</i> | NP_415912.1 | 16129355  | <i>Escherichia coli</i>        |

Theo cách khác, các sản phẩm gen của *fadA* và *fadB* của *E. coli* mã hóa cho phức hợp nhiều enzym tham gia vào quá trình oxi hóa axit béo mà thể hiện hoạt tính enoyl-CoA hydratase (Haller et al., Biochemistry 39:4622-4629 (2000); Martinez-Carrion et al., J. Biol. Chem. 240:3538-3546 (1965); Matthies et al., Appl Environ. Microbiol. 58:1435-1439 (1992)). Việc loại yếu tố điều hòa âm được mã hóa bởi *fadR* có thể được ứng dụng để hoạt hóa sản phẩm gen của *fadB* (Jeng et al. A. Biochemistry 13:2898-2903 (1974)). Các gen *fadI* và *fadJ* mã hóa cho các chức năng tương tự và được biểu hiện tự nhiên ở các điều kiện kỵ khí (Atsumi et al., Nature 451:86-89 (2008)). Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 31.

Bảng 31

| Protein     | Mã số GenBank | Số GI    | Sinh vật                |
|-------------|---------------|----------|-------------------------|
| <i>fadA</i> | YP_026272.1   | 49176430 | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>fadB</i> | NP_418288.1   | 16131692 | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>fadI</i> | NP_416844.1   | 16130275 | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>fadJ</i> | NP_416843.1   | 16130274 | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>fadR</i> | NP_415705.1   | 16129150 | <i>Escherichia coli</i> |

Phản ứng trùng ngưng thuận nghịch của 4-hydroxybutyryl-CoA thành crotonyl-CoA (bước A, Fig.3) được xúc tác bởi enzym hai chức năng 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/vinylacetyl-CoA  $\Delta$ -isomerase. Enzym này đầu tiên loại nước cho 4-

hydroxybutyryl-CoA thành vinylaxetyl-CoA, sau đó sắp xếp lại để tạo ra crotonoyl-CoA. Các enzym từ *Clostridium kluyveri* và *C. aminobutyrium* được tinh chế, xác định đặc điểm, và xác định trình tự ở vùng đầu tận cùng N (Scherf et al., Eur. J. Biochem., 215:421-429 (1993); Scherf et al., Arch. Microbiol, 161:239-245 (1994)). Gen *abfD* từ *C. aminobutyrium* và *C. kluyveri* khớp một cách chính xác với các trình tự axit amin đầu tận cùng N này, và đã được cho thấy là mã hóa cho 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza/vinylaxetyl-CoA  $\Delta$ -isomeraza. Các gen tương tự được nhận biết thông qua tính tương đồng từ dự án bản đồ gen, bao gồm *abfD* từ *Porphyromonas gingivalis* và *Msed\_1220* từ *Metallosphaera sedula*. Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 32.

Bảng 32

| Protein          | Mã số GenBank  | Số GI     | Sinh vật                          |
|------------------|----------------|-----------|-----------------------------------|
| <i>abfD</i>      | YP_001396399.1 | 153955634 | <i>Clostridium kluyveri</i>       |
| <i>abfD</i>      | P55792         | 84028213  | <i>Clostridium aminobutyricum</i> |
| <i>abfD</i>      | YP_001928843   | 188994591 | <i>Porphyromonas gingivalis</i>   |
| <i>Msed_1220</i> | YP_001191305.1 | 146303989 | <i>Metallosphaera sedula</i>      |

Phản ứng khử nhóm amin của 2-amino-4-ketopentanoat (Fig.1, phản ứng I) và của 4-aminobutan-2-on (bước F, Fig.1) có thể được thực hiện nhờ AKP amoniacylaza và 4-aminobutan-2-on amoniacylaza tương ứng. Các phản ứng khử nhóm amin này rất giống với phản ứng khử nhóm amin aspartat thành fumarat nhờ aspartaza. Enzym này đã được nghiên cứu sâu và đã tìm ra một số cấu trúc tinh thể của nó. Enzym từ *E. coli* đã được cho thấy là hoạt động trên nhiều cơ chất khác nhau như aspartatphenylmetyeste, asparagin, benzyl-aspartat và malat (Ma et al., Ann. N. Y. Acad. Sci, 672:60-65 (1992)). Trong một nghiên cứu khác, sự cải biến định hướng được thực hiện trên enzym này để làm thay đổi tính đặc hiệu cơ chất (Asano et al., Biomol. Eng., 22:95-101 (2005)). Các enzym có hoạt tính aspartaza cũng đã được xác định đặc điểm ở *Haemophilus influenzae* (Sjostrom et al., Biochem. Biophys. Acta., 1324:182-190 (1997)), *Pseudomonas fluorescens* (Takagi et al., J. Biochem., 96:545-552 (1984)), *Bacillus subtilis* (Sjostrom et al., như trên) và *Serratia marcescens* (Takagi et al., J. Bacteriol., 161 : 1-6

(1985)). Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 33.

Bảng 33

| Protein     | Mã số GenBank | Số GI     | Sinh vật                       |
|-------------|---------------|-----------|--------------------------------|
| <i>aspA</i> | NP_418562     | 90111690  | <i>Escherichia coli</i>        |
| <i>aspA</i> | P44324.1      | 1168534   | <i>Haemophilus influenzae</i>  |
| <i>aspA</i> | P07346.1      | 114273    | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| <i>ansB</i> | P26899.1      | 251757243 | <i>Bacillus subtilis</i>       |
| <i>aspA</i> | P33109.1      | 416661    | <i>Serratia marcescens</i>     |

Phản ứng amoniacylaza tương tự được xúc tác bởi enzym metylaspartaza (EC 4.3.1.2), là enzym tham gia vào con đường lên men glutamat qua mesaconat (Kato et al., như trên). Enzym này, còn được gọi là beta-metylaspataza và 3-metylaspataat amoniacylaza, xúc tác tự nhiên cho phản ứng khử nhóm amin threo-3-metylaspataat thành mesaconat. 3-Metylaspataza từ *Clostridium tetanomorphum* đã được tách dòng, biểu hiện chức năng ở *E. coli*, và được kết tinh (Asuncion et al., 57:731-733 (2001); Asuncion et al., J Biol Chem. 277:8306-8311 (2002); Botting et al., 27:2953-2955 (1988); Goda et al., 31 :10747-10756 (1992)). Ở *Citrobacter amalonaticus*, enzym này được mã hóa bởi BAA28709 (Kato et al., Arch. Microbiol 168:457-463 (1997)). 3-Metylaspataza cũng được kết tinh từ *E. coli* YG1002 (Asano et al., FEMS Microbiol Lett. 118:255-258 (1994)) mặc dù trình tự protein không được liệt kê trong các cơ sở dữ liệu công khai như GenBank. Dữ liệu về trình tự của mỗi sản phẩm gen được lấy làm ví dụ này có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các số đăng ký trên GenBank được thể hiện trong bảng 34.

Bảng 34

| Protein         | Mã số GenBank | Số GI   | Sinh vật                         |
|-----------------|---------------|---------|----------------------------------|
| <i>mal</i>      | AAB24070.1    | 259429  | <i>Clostridium tetanomorphum</i> |
| <i>BAA28709</i> | BAA28709.1    | 3184397 | <i>Citrobacter amalonaticus</i>  |

Theo một số phương án, 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *ortA* ( $\alpha$ ), *ortB* ( $\beta$ ), *Amet\_2368* ( $\alpha$ ), *Amet\_2369* ( $\beta$ ), *Teth514\_1478* ( $\alpha$ ), *Teth514\_1479* ( $\beta$ ), *TTE1235* ( $\alpha$ ), và *thrC* ( $\beta$ ).

Theo một số phương án, AKP dehydrogenaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed\_1423*, *Msed\_0399*, *Msed\_0389*, *Msed\_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh*, và *bdh*.

Theo một số phương án, 2-amino-4-hydroxypentanoat aminotransferaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *aspC*, *AAT2*, *ASP5*, *got2*, *avtA*, *lysN*, *AadAT-II*, *dat*, *lat*, *ygjG*, *spuC*, *SkyPYD4*, *SkUGA1*, *UGA1*, *Abat*, *Abat*, *Gta-1*, *gabT*, và *puuE*.

Theo một số phương án, 2-amino-4-hydroxypentanoat oxidoreductaza (khử amin) được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *gdhA*, *gdh*, *gdhA1*, *rocG*, *gdh1*, *gdh2*, *GDH*, *GDH2*, *ldh* và *nadX*.

Theo một số phương án, 2-oxo-4-hydroxypentanoat decarboxylaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *pdC*, *pdC1*, *mdlC*, *dpgB*, *ilvB-1*, *kgd*, *kdcA*, *lysA*, *panD*, *cadA*, *ldc*, *ldcC*, *AF323910.1:1...1299*, *odc1*, *VV2\_1235*, *dmpH*, *dmpE*, *xylIII*, *xylIII*, *Reut\_B5691*, *Reut\_B5692*, *CAD*, *pad1*, *pojK* (*pad*), *padC*, *pad*, *adc*, *cbei\_3835*, *CLL\_A2135*, *RBAM\_030030*.

Theo một số phương án, 3-hydroxybutyraldehyt reductaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdh I*, *bdh II*, *adhA*, *4hbd*, *adhI*, *P84067*, *mmsB*, *dhat*, và *3hidh*.

Theo một số phương án, AKP aminotransferaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *aspC*, *AAT2*, *ASP5*, *got2*, *avtA*, *lysN*, *AadAT-II*, *dat*, *lat*, *ygjG*, *spuC*, *SkyPYD4*, *SkUGA1*, *UGA1*, *Abat*, *Gta-1*, *gabT*, và *puuE*.

Theo một số phương án, AKP oxidoreductaza (khử amin) được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *gdhA*, *gdh*, *gdhA1*, *rocG*, *gdh1*, *gdh2*, *GDH*, *GDH2*, *ldh*

và *nadX*. Theo một số phương án, 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *pdC*, *pdC1*, *mdlC*, *dpgB*, *ilvB-1*, *kgd*, *kdcA*, *lysA*, *panD*, *cadA*, *ldc*, *ldcC*, *AF323910.1:1...1299*, *odc1*, *VV2\_1235*, *dmpH*, *dmpE*, *xylIII*, *xylIII*, *Reut\_B5691*, *Reut\_B5692*, *CAD*, *pad1*, *padC*, và *pad*, *adc*, *cbei\_3835*, *CLL\_A2135*, *RBAM\_030030*.

Theo một số phương án, 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton) được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed\_1423*, *Msed\_0399*, *Msed\_0389*, *Msed\_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh*, và *bdh*.

Theo một số phương án, 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt) được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdh I*, *bdh II*, *adhA*, *4hbd*, *adhI*, *P84067*, *mmsB*, *dhat*, và *3hidh*.

Theo một số phương án, 4-hydroxy-2-butanon reductaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed\_1423*, *Msed\_0399*, *Msed\_0389*, *Msed\_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh*, và *bdh*.

Theo một số phương án, AKP decarboxylaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *pdC*, *pdC1*, *mdlC*, *dpgB*, *ilvB-1*, *kgd*, *kdcA*, *lysA*, *panD*, *cadA*, *Ldc*, *ldcC*, *AF323910.1:1...1299*, *odc1*, *VV2\_1235*, *dmpH*, *dmpE*, *xylIII*, *xylIII*, *Reut\_B5691*, *Reut\_B5692*, *CAD*, *pad1*, *pofK(pad)*, *padC*, *pad*.

Theo một số phương án, 4-aminobutan-2-on aminotransferaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *aspC*, *AAT2*, *ASP5*, *got2*, *avtA*, *lysN*, *AadAT-II*, *dat*, *lat*, *ygjG*, *spuC*, *SkyPYD4*, *SkUGA1*, *UGA1*, *Abat*, *Gta-1*, *gabT*, và *puuE*.

Theo một số phương án, 4-aminobutan-2-on oxidoreductaza (khử amin) được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *gdhA*, *gdh*, *gdhA1*, *rocG*, *gdh1*, *gdh2*, *GDH*, *GDH2*, *ldh*, *nadX*, *kdd* và *lysDH*.

Theo một số phương án, 4-aminobutan-2-on amoniac-lyaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *aspA*, *ansB*, *mal* và *BAA28709*.

Theo một số phương án, butenon hydrataza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crtI*, *ech*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD*, *Msed\_1220*, *fadA*, *fadB*, *fadI*, *fadJ*, và *fadR*.

Theo một số phương án, AKP amoniac-lyaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *aspA*, *ansB*, *mal* và *BAA28709*.

Theo một số phương án, axetylacrylat decarboxylaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *pdC*, *pdC1*, *mdlC*, *dpgB*, *ilvB-1*, *kgd*, *kdcA*, *lysA*, *panD*, *cadA*, *ldc*, *ldcC*, *AF323910.1:1...1299*, *odc1*, *VV2\_1235*, *dmpH*, *dmpE*, *xylII*, *xylIII*, *Reut\_B5691*, *Reut\_B5692*, *CAD*, *padI*, *pofK (pad)*, *padC*, *pad*, *adc*, *cbei\_3835*, *CLL\_A2135*, *RBAM 030030*.

Theo một số phương án, axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo aldehyt) được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *acr1*, *sucD*, *bphG*, *bld*, *adhE*, *Msed\_0709*, *mcr*, *asd-2*, *Saci\_2370*, *Ald*, và *eutE*.

Theo một số phương án, axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo rượu) được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *adhE*, *adhE2*, *mcr*, *Rcas\_2929*, *NAP1\_02720*, *MGP2080\_00535*, và *FAR*.

Theo một số phương án, axetoaxetyl-CoA reductaza (khử keton) được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed\_1423*, *Msed\_0399*, *Msed\_0389*, *Msed\_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh*, và *bdh*.

Theo một số phương án, 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt) được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *acr1*, *sucD*, *bphG*, *bld*, *adhE*, *Msed\_0709*, *mcr*, *asd-2*, *Saci\_2370*, *Ald*, và *eutE*.

Theo một số phương án, 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu) được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *adhE*, *adhE2*, *mcr*, *Rcas\_2929*, *NAP1\_02720*, *MGP2080\_00535*, và *FAR*.

Theo một số phương án, 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crtI*, *ech*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD*, *Msed\_1220*, *fadA*, *fadB*, *fadI*, *fadJ*, và *fadR*.

Theo một số phương án, crotonaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crtI*, *ech*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD*, *Msed\_1220*, *fadA*, *fadB*, *fadI*, *fadJ* và *fadR*.

Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách đưa các axit nucleic có thể biểu hiện được mã hóa cho một hoặc nhiều enzym hoặc protein tham gia vào một hoặc nhiều con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol. Tùy thuộc vào vi sinh vật chủ được chọn để thực hiện quá trình sinh tổng hợp, axit nucleic thích hợp cho một số hoặc tất cả các con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol cụ thể có thể được biểu hiện. Ví dụ, nếu vật chủ được chọn bị khuyết một hoặc nhiều enzym hoặc protein cho con đường sinh tổng hợp mong muốn, thì axit nucleic có thể biểu hiện được cho enzym hoặc protein bị thiếu được đưa vào vật chủ để biểu hiện ngoại sinh sau đó. Theo cách khác, nếu vật chủ được chọn có biểu hiện nội sinh của một số gen của con đường này, nhưng bị thiếu ở một số khác, thì axit nucleic mã hóa cần thiết cho các enzym hoặc protein bị thiếu để thu được quá trình sinh tổng hợp 1,3-butandiol. Do đó, vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách đưa vào hoạt tính của enzym hoặc protein ngoại sinh để thu được con đường sinh tổng hợp mong muốn hoặc con đường sinh tổng hợp mong muốn có thể đạt được bằng cách đưa vào một hoặc nhiều hoạt tính của enzym hoặc protein ngoại sinh mà, cùng với một hoặc nhiều enzym hoặc protein nội sinh, tạo ra các sản phẩm mong muốn như 1,3-butandiol.

Tùy thuộc vào các yếu tố của con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol của các vi sinh vật chủ được chọn lọc, vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế sẽ bao gồm ít nhất một axit

nucleic mã hóa con đường 1,3-butandiol được biểu hiện ngoại sinh và đến tất cả các axit nucleic mã hóa cho một hoặc nhiều con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol. Ví dụ, quá trình sinh tổng hợp 1,3-butandiol có thể được thiết lập ở vật chủ thiếu enzym hoặc protein của con đường thông qua sự biểu hiện ngoại sinh của axit nucleic mã hóa tương ứng. Ở vật chủ thiếu tất cả các enzym hoặc protein của con đường 1,3-butandiol, sự biểu hiện ngoại sinh của tất cả enzym hoặc protein trong con đường này có thể được bao gồm, mặc dù hiểu rằng tất cả các enzym hoặc protein của con đường có thể được biểu hiện ngay cả khi vật chủ có chứa ít nhất một trong số các enzym hoặc protein của con đường này. Ví dụ, sự biểu hiện ngoại sinh của tất cả các enzym hoặc protein trong con đường sản xuất 1,3-butandiol có thể được bao gồm.

Dựa vào các đề xuất và hướng dẫn được đề cập trong bản mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng số lượng axit nucleic mã hóa để đưa vào dạng biểu hiện được sẽ, ít nhất là, tương đương với số lượng khiếm khuyết ở con đường 1,3-butandiol của vi sinh vật chủ được chọn. Do đó, vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể có một, hai, ba, bốn, năm, đến tất cả axit nucleic mã hóa cho các enzym hoặc protein tham gia vào con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol được bộc lộ trong sáng chế. Theo một số phương án, vi khuẩn không có trong tự nhiên cũng có thể bao gồm các cải biến di truyền khác để tạo điều kiện thuận lợi hoặc tối ưu quá trình sinh tổng hợp 1,3-butandiol hoặc tạo ra các chức năng hữu ích khác trên vi sinh vật chủ. Một chức năng khác có thể bao gồm, ví dụ, làm tăng quá trình tổng hợp của một hoặc nhiều tiền chất của con đường 1,3-butandiol như axetyl-CoA.

Nhìn chung, vi sinh vật chủ được chọn lọc sao cho nó tạo ra các tiền chất của con đường 1,3-butandiol, hoặc là phân tử được sản xuất ra một cách tự nhiên hoặc là sản phẩm được cải biến mà tạo ra quá trình sản xuất de novo các tiền chất mong muốn hoặc tăng sản xuất tiền chất được tạo ra một cách tự nhiên bởi vi sinh vật chủ. Ví dụ, axetyl-CoA được sản xuất tự nhiên ở sinh vật chủ như *E. coli*. Sinh vật chủ cũng được cải biến để làm tăng sự sản xuất tiền chất, như được bộc lộ trong sáng chế. Ngoài ra, vi khuẩn được cải biến để sản xuất ra tiền chất mong muốn có thể được sử dụng làm sinh vật chủ và được cải biến thêm để biểu hiện các enzym hoặc protein của con đường 1, 3 -butandiol.

Theo một số phương án, vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế được tạo ra từ vật chủ có hoạt tính enzym để tổng hợp 1,3-butandiol. Theo phương án cụ thể nó có thể được sử dụng để làm tăng quá trình tổng hợp hoặc tích lũy các sản phẩm của con đường 1,3-butandiol để, ví dụ, điều khiển các phản ứng của con đường 1,3-butandiol theo hướng sản xuất 1,3-butandiol. Việc tăng tổng hợp hoặc tích lũy có thể được thực hiện nhờ, ví dụ, sự biểu hiện quá mức của axit nucleic mã hóa cho một hoặc nhiều enzym hoặc protein của con đường 1,3-butandiol được mô tả trên đây. Sự biểu hiện quá mức của enzym này hoặc các enzym và/hoặc protein hoặc các protein của con đường 1,3-butandiol có thể xảy ra, ví dụ, thông qua sự biểu hiện ngoại sinh của gen hoặc các gen nội sinh, hoặc thông qua sự biểu hiện ngoại sinh của gen hoặc các gen khác loại. Do đó, sinh vật có trong tự nhiên có thể dễ dàng được tạo ra là vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế, ví dụ, sản xuất 1,3-butandiol, thông qua sự biểu hiện quá mức của một, hai, ba, bốn, năm, đó là, hết tất cả axit nucleic mã hóa cho các enzym hoặc protein của con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol. Ngoài ra, sinh vật không có trong tự nhiên có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến một gen nội sinh dẫn đến sự tăng hoạt tính của enzym trong con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol.

Trong các phương án hữu dụng cụ thể, sự biểu hiện ngoại sinh của axit nucleic mã hóa được sử dụng. Sự biểu hiện ngoại sinh dẫn đến khả năng thích ứng theo yêu cầu sự biểu hiện này và/hoặc các yếu tố điều hòa đối với vật chủ và áp dụng để đạt được mức độ biểu hiện mong muốn mà được kiểm soát bởi người sử dụng. Tuy nhiên, sự biểu hiện nội sinh cũng có thể được sử dụng theo các phương án khác như bằng cách loại bỏ yếu tố tác động điều hòa âm hoặc cảm ứng promotor của gen khi được liên kết với promotor cảm ứng được hoặc yếu tố điều hòa khác. Do đó, gen nội sinh có promotor tự nhiên cảm ứng được có thể được điều hòa lên bằng cách cung cấp một tác nhân gây cảm ứng thích hợp, hoặc vùng điều hòa của gen nội sinh có thể được cải biến để kết hợp một yếu tố điều hòa cảm ứng được, do đó cho phép điều hòa tăng sự biểu hiện của gen nội sinh tại thời điểm mong muốn. Tương tự, promotor cảm ứng được có thể được bao gồm là một yếu tố điều hòa cho gen ngoại sinh được đưa vào vi khuẩn không có trong tự nhiên.

Cần hiểu rằng, trong các phương pháp theo sáng chế, bất kỳ trong số một hoặc nhiều axit nucleic ngoại sinh có thể được đưa vào vi khuẩn để tạo ra vi khuẩn không có trong tự nhiên

nhiên theo sáng chế. Axit nucleic có thể được đưa vào sao cho tạo ra, ví dụ, con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol trong vi khuẩn này. Theo cách khác, các axit nucleic mã hóa có thể được đưa vào để tạo ra vi khuẩn trung gian có khả năng sinh tổng hợp để xúc tác cho một số trong các phản ứng cần thiết để tạo ra khả năng sinh tổng hợp 1,3-butandiol. Ví dụ, vi khuẩn không có trong tự nhiên có con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol có thể bao gồm ít nhất hai axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho các enzym hoặc protein mong muốn. Do đó, cần hiểu rằng sự kết hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều enzym hoặc protein của con đường sinh tổng hợp có thể được bao gồm trong vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế. Tương tự, cần hiểu rằng sự kết hợp bất kỳ của ba hoặc nhiều enzym hoặc protein của con đường sinh tổng hợp có thể được bao gồm trong vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế và v.v., như mong muốn, miễn là sự kết hợp của các enzym và/hoặc protein của con đường sinh tổng hợp này dẫn đến sự sản xuất sản phẩm mong muốn tương ứng. Tương tự, sự kết hợp bất kỳ của bốn, hoặc nhiều enzym hoặc protein của con đường sinh tổng hợp như được bộc lộ trong sáng chế có thể được bao gồm trong vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế, như mong muốn, miễn là sự kết hợp bất kỳ của các enzym và/hoặc protein của con đường sinh tổng hợp mong muốn dẫn đến sự sản xuất sản phẩm mong muốn tương ứng.

Ngoài quá trình sinh tổng hợp 1,3-butandiol như mô tả trong sáng chế, vi khuẩn không có trong tự nhiên và các phương pháp theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong nhiều dạng kết hợp khác nhau với mỗi vi khuẩn khác và với các vi khuẩn khác và các phương pháp được biết rõ trong lĩnh vực này để thu được quá trình sinh tổng hợp sản phẩm bằng các con đường khác. Ví dụ, một cách khác để tạo ra 1,3-butandiol ngoài việc sử dụng các chất sản xuất 1,3-butandiol thông qua việc bổ sung thêm vi khuẩn khác có khả năng chuyển hóa chất trung gian của con đường 1,3-butandiol thành 1,3-butandiol. Quy trình như vậy bao gồm, ví dụ, quá trình lên men của vi khuẩn sản xuất các chất trung gian của con đường 1,3-butandiol. Chất trung gian của con đường 1,3-butandiol sau đó có thể được sử dụng làm cơ chất cho vi khuẩn thứ hai chuyển hóa chất trung gian của con đường 1,3-butandiol thành 1,3-butandiol. Chất trung gian của con đường 1,3-butandiol có thể được bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi cấy của sinh vật thứ hai hoặc môi trường nuôi cấy ban đầu chứa chất trung gian của các chất tạo ra con đường 1,3-butandiol có thể bị làm suy yếu các vi khuẩn này, ví dụ, bằng việc tách tế bào,

và sau đó bổ sung sinh vật thứ hai vào canh trường lên men có thể được sử dụng để tạo ra sản phẩm cuối cùng mà không cần các bước tinh chế chất trung gian.

Theo các phương án khác, vi khuẩn không có trong tự nhiên và các phương pháp theo sáng chế có thể được tổ hợp trong nhiều con đường phụ khác nhau để đạt được quá trình sinh tổng hợp, ví dụ, 1,3-butandiol. Theo các phương án này, con đường sinh tổng hợp đối với sản phẩm mong muốn theo sáng chế có thể tách với các vi khuẩn khác, và vi khuẩn khác này có thể được nuôi cấy cùng nhau để tạo ra sản phẩm cuối cùng. Trong sơ đồ sinh tổng hợp này, sản phẩm của một vi khuẩn là cơ chất cho vi khuẩn thứ hai cho đến khi sản phẩm cuối cùng được tổng hợp. Ví dụ, quá trình sinh tổng hợp 1,3-butandiol có thể được thực hiện nhờ thiết kế vi khuẩn có chứa con đường sinh tổng hợp đối với phản ứng chuyển hóa một chất trung gian của con đường thành chất trung gian hoặc sản phẩm của con đường khác. Theo cách khác, 1,3-butandiol cũng có thể được tạo ra bằng cách sinh tổng hợp từ các vi khuẩn thông qua việc đồng nuôi cấy hoặc đồng lên men bằng cách sử dụng hai sinh vật trong cùng một bình, trong đó vi khuẩn thứ nhất sản xuất chất trung gian 1,3-butandiol và vi khuẩn thứ hai chuyển hóa chất trung gian này thành 1,3-butandiol.

Những giải thích và chỉ dẫn được đưa ra trong sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng có nhiều sự kết hợp và sắp xếp đối với các vi khuẩn không có trong tự nhiên và các phương pháp theo sáng chế cùng nhau với các vi khuẩn khác, với việc đồng nuôi cấy vi khuẩn không có trong tự nhiên có các con đường phụ và với việc kết hợp các quy trình hóa học và/hoặc sinh hóa khác được biết rõ trong lĩnh vực này để sản xuất 1,3-butandiol.

Nguồn các axit nucleic mã hóa cho enzym hoặc protein của con đường 1,3-butandiol có thể bao gồm, ví dụ, loài bất kỳ trong đó sản phẩm gen được mã hóa có khả năng xúc tác cho phản ứng quan tâm. Các loài này bao gồm cả sinh vật có nhân thực và sinh vật chưa có nhân điển hình bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vi khuẩn, bao gồm cổ khuẩn và vi khuẩn thật, và sinh vật có nhân thực, bao gồm nấm men, thực vật, côn trùng, động vật, và động vật có vú, bao gồm con người. Ví dụ về các loài cung cấp nguồn axit nucleic này bao gồm, ví dụ, *Escherichia coli*, cũng như các loài khác được bộc lộ trong sáng chế hoặc có sẵn dưới dạng nguồn các sinh

vật cho gen tương ứng. Tuy nhiên, với việc đã có dữ liệu về trình tự bộ gen đầy đủ đối với hơn 550 loài hiện nay (với hơn nửa trong số này đã được công bố trên cơ sở dữ liệu như NCBI), bao gồm 395 bộ gen vi sinh vật và nhiều bộ gen của nấm men, nấm, thực vật và động vật có vú khác, việc xác định các gen mã hóa cho hoạt tính sinh tổng hợp 1,3-butandiol đối với một hoặc nhiều gen ở các loài họ xa hoặc loài có quan hệ, bao gồm ví dụ, sự hoán vị của gen tương đồng, gen đồng đẳng, các gen bản sao và các gen không đồng đẳng đã biết, và sự trao đổi các thay đổi trong gen giữa các sinh vật là thông thường và được biết rõ trong lĩnh vực này. Theo đó, những biến đổi về trao đổi chất cho phép quá trình sinh tổng hợp 1,3-butandiol được mô tả trong bản mô tả này với việc đề cập đến một sinh vật cụ thể như *E. coli* có thể dễ dàng được ứng dụng cho các vi sinh vật khác, bao gồm các sinh vật chưa có nhân điển hình và sinh vật có nhân thực tương tự. Những giải thích và chỉ dẫn được đưa ra trong sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rằng sự biến đổi về trao đổi chất được minh họa ở một sinh vật có thể được ứng dụng tương đương với các sinh vật khác.

Trong một số trường hợp, như nếu có con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol bị cải biến ở loài không có quan hệ, quá trình sinh tổng hợp 1,3-butandiol có thể được tạo ra trong các loài vật chủ, ví dụ, sự biểu hiện ngoại sinh của các đoạn trình tự giống nhau hoặc các gen bản sao từ các loài không có quan hệ xúc tác cho phản ứng trao đổi chất tương tự; không hoàn toàn giống hệt để thay thế cho phản ứng liên quan. Bởi vì có một số khác biệt trong mạng lưới trao đổi chất giữa các sinh vật khác nhau, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng cách sử dụng gen trong thực tế giữa các loài khác nhau có thể khác nhau. Tuy nhiên, những giải thích và chỉ dẫn được đưa ra trong sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ hiểu rằng các dấu hiệu và các phương pháp theo sáng chế có thể được ứng dụng đối với tất cả các vi khuẩn sử dụng những cải biến về trao đổi chất cùng nguồn gốc với vi khuẩn được minh họa trong bản mô tả để thiết kế vi khuẩn thuộc các loài quan tâm mà tổng hợp 1,3-butandiol.

Các vi sinh vật chủ có thể được chọn từ, và vi khuẩn không có trong tự nhiên được tạo ra trong, ví dụ, vi khuẩn, nấm men, nấm hoặc loài bất kỳ trong số các vi sinh vật khác có khả năng thực hiện quá trình lên men. Ví dụ về vi khuẩn bao gồm các loài được chọn từ *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus*

*succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Rhizobium etli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Gluconobacter oxydans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus Plantarum*, *Streptomyces coelicolor*, *Clostridium acetobutylicum*, *Pseudomonas fluorescens*, và *Pseudomonas putida*. Ví dụ về nấm men hoặc nấm bao gồm loài được chọn từ *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* và *Pichiapastoris*. *E. coli* là vi sinh vật chủ hữu ích đặc biệt bởi vì nó là vi khuẩn đã được xác định đặc tính rõ ràng thích hợp cho kỹ thuật di truyền. Các sinh vật chủ hữu dụng đặc biệt khác bao gồm nấm men như *Saccharomyces cerevisiae*.

Các phương pháp để thiết kế và thử nghiệm mức độ biểu hiện của sinh vật chủ không có trong tự nhiên sản xuất 1,3-butandiol có thể được thực hiện, ví dụ, bằng phương pháp tái tổ hợp và các phương pháp dò được biết rõ trong lĩnh vực này. Các phương pháp này có thể được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); và Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).

Trình tự axit nucleic ngoại sinh tham gia vào con đường sản xuất 1,3-butandiol có thể được đưa một cách lâu bền hoặc tạm thời vào tế bào chủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật được biết rõ trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiếp hợp, xung điện, biến nạp bằng hóa chất, tải nạp, chuyển nhiễm, và biến nạp bằng sóng siêu âm. Để biểu hiện ngoại sinh ở *E. coli* hoặc các tế bào nhân sơ khác, một số trình tự axit nucleic trong gen hoặc ADN bổ sung của axit nucleic của sinh vật nhân thực có thể mã hóa cho các tín hiệu đích như tín hiệu đích của ti lạp thể đầu tận cùng N hoặc tín hiệu đích khác, mà có thể bị loại bỏ trước khi biến nạp vào tế bào chủ nhân sơ, nếu muốn. Ví dụ, việc loại bỏ trình tự dẫn đầu ti lạp thể dẫn đến sự tăng biểu hiện ở *E. coli* (Hoffmeister et al., *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005)). Để biểu hiện ngoại sinh ở nấm men hoặc tế bào nhân thực khác, gen có thể được biểu hiện ở phần bào tan mà không có sự bổ sung trình tự dẫn đầu, hoặc có thể được hướng đích đến ti lạp thể hoặc các cơ quan tế bào khác, hoặc hướng đích cho quá trình tiết, bằng cách bổ sung trình tự đích thích hợp như tín hiệu đích ti lạp thể hoặc tín hiệu tiết thích hợp với tế bào chủ. Do đó, cần hiểu rằng các cải biến thích hợp với trình tự axit nucleic để loại bỏ hoặc thêm trình tự đích có thể

được kết hợp vào trình tự axit nucleic ngoại sinh để thu được đặc tính mong muốn. Hơn thế nữa, các gen có thể được tối ưu hóa bộ ba mã hóa bằng các kỹ thuật được biết rõ trong lĩnh vực này để đạt được sự biểu hiện tối ưu hóa của protein.

Vector hoặc các vector biểu hiện có thể được thiết kế để bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa thuộc con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol như được lấy làm ví dụ trong bản mô tả này được liên kết một cách hoạt động được vào các trình tự kiểm soát biểu hiện có chức năng ở sinh vật chủ. Các vector biểu hiện có khả năng ứng dụng để sử dụng trong các sinh vật chủ là vi khuẩn theo sáng chế bao gồm, ví dụ, plasmit, vector thực khuẩn thể, vector virus, thể bổ sung và nhiễm sắc thể nhân tạo, bao gồm các vector và trình tự chọn lọc hoặc gen đánh dấu có thể hoạt động để hợp nhất ổn định vào nhiễm sắc thể vật chủ. Ngoài ra, các vector biểu hiện có thể bao gồm một hoặc nhiều gen đánh dấu chọn lọc được và các trình tự kiểm soát biểu hiện thích hợp. Có thể có cả các gen đánh dấu chọn lọc được mà, ví dụ, tạo ra tính kháng với kháng sinh hoặc độc tố, bổ sung cho sự thiếu dinh dưỡng thụ động, hoặc bổ sung các chất dinh dưỡng thiết yếu không có trong môi trường nuôi cấy. Các trình tự kiểm soát biểu hiện có thể bao gồm các gen khởi đầu cấu trúc và cảm ứng, các gen tăng cường phiên mã, các gen kết thúc phiên mã, và các gen tương tự được biết rõ trong lĩnh vực này. Khi hai hoặc nhiều axit nucleic mã hóa ngoại sinh được biểu hiện đồng thời, cả hai axit nucleic có thể được chèn, ví dụ, vào vector biểu hiện đơn hoặc trong các vector biểu hiện riêng. Để biểu hiện một vector, các axit nucleic mã hóa có thể được nối một cách hoạt động được vào trình tự kiểm soát biểu hiện chung hoặc được liên kết vào các trình tự kiểm soát biểu hiện khác nhau, như một gen khởi đầu cảm ứng và một gen khởi đầu cấu trúc. Quá trình biến đổi trình tự axit nucleic ngoại sinh tham gia vào con đường tổng hợp hoặc trao đổi chất có thể được khẳng định bằng cách sử dụng các phương pháp được biết rõ trong lĩnh vực này. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ, phân tích axit nucleic như Northern blot hoặc khuếch đại mARN bằng phản ứng chuỗi trùng hợp (polymerase chain reaction-PCR), hoặc thẩm tách miễn dịch để biến hện các sản phẩm gen, hoặc các phương pháp phân tích thích hợp khác để kiểm tra sự biểu hiện của trình tự axit nucleic được đưa vào hoặc sản phẩm gen tương ứng của nó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần hiểu rằng axit nucleic ngoại sinh được biểu hiện ở lượng đủ để tạo ra sản phẩm mong muốn, và cũng

hiều rằng mức độ biểu hiện có thể được tối ưu hóa để đạt được sự biểu hiện cần thiết bằng cách sử dụng các phương pháp được biết rõ trong lĩnh vực này và như được bộc lộ trong sáng chế.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất 1,3-BDO bao gồm nuôi cấy vi khuẩn không có trong tự nhiên được bộc lộ trong sáng chế, trong các điều kiện và trong thời gian đủ để tạo ra 1,3-BDO, bao gồm các sinh vật kết hợp một, hai, ba, bốn, năm, đến tất cả axit nucleic ngoại sinh mã hóa cho các enzym bổ sung đầy đủ cho con đường 1,3-BDO. Con đường tổng hợp 1,3-BDO bao gồm tập hợp các enzym của con đường 1,3-BDO, trong đó tập hợp gồm các enzym của con đường 1,3-BDO như được xác định trên đây, cụ thể là: (a) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP dehydrogenaza; (3) 2-amino-4-hydroxypentanoat aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (4) 2-oxo-4-hydroxypentanoat decarboxylaza; và (5) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza; (b) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (3) 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza; (4) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton); và (5) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza; (c) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (3) 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza; (4) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt); và (5) 4-hydroxy-2-butanon reductaza; (d) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP decarboxylaza; (3) 4-aminobutan-2-on aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (4) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton); và (5) 3-hydroxybutyr aldehyt reductaza; (e) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP decarboxylaza; (3) 4-aminobutan-2-on aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin); (4) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt); và (5) 4-hydroxy-2-butanon reductaza; (f) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP decarboxylaza; (3) 4-aminobutan-2-on amoniacylaza; (4) butanon hydrataza; và (5) 4-hydroxy-2-butanon reductaza; (g) (1) 2-amino-4-ketopentanoat (AKP) thiolaza; (2) AKP amoniacylaza; (3) axetylacrylat decarboxylaza; (4) butanon hydrataza; và (5) 4-hydroxy-2-butanon reductaza; (h) (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo aldehyt); (2) 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton); và (3) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza; (i) (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (Phụ thuộc CoA, tạo rượu) và (2) 4-hydroxy-2-butanon reductaza; (j) (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (phụ thuộc CoA, tạo aldehyt); (2) 3-oxobutyraldehyt reductaza

(khử aldehyt); và (3) 4-hydroxy-2-butanon reductaza; (k) (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (khử keton) và (2) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu); (l) (1) axetoaxetyl-CoA reductaza (khử keton); (2) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt); và (3) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza; (m) (1) 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza; (2) crotonaza; và (3) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu); và (n) (1) 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza; (2) crotonaza; (3) 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt); và (4) 3-hydroxybutyraldehyt reductaza.

Phương pháp tinh chế và/hoặc các thử nghiệm thích hợp để kiểm tra việc sản xuất 1,3-butandiol có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết. Các bản sao thích hợp như các giống nuôi lần ba có thể được nuôi cấy đối với mỗi chủng được cải biến cần được kiểm tra. Ví dụ, có thể theo dõi quá trình tạo sản phẩm và sản phẩm phụ trong vật chủ sản xuất được cải biến. Sản phẩm cuối cùng và các chất trung gian, và các hợp chất hữu cơ khác, có thể được phân tích bằng các phương pháp như sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-High Performance Liquid Chromatography), sắc ký khí - khối phổ (GC-MS-Gas Chromatography-Mass Spectroscopy) và sắc ký lỏng - khối phổ (LC-MS-Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy) hoặc các phương pháp thích hợp khác bằng cách sử dụng các quy trình thông thường được biết rõ trong lĩnh vực này. Sự giải phóng sản phẩm trong canh trường lên men cũng có thể được kiểm tra với dịch nổi nuôi cấy. Các sản phẩm phụ và đường glucoza còn lại có thể được định lượng bằng HPLC bằng cách sử dụng, ví dụ, bộ dò chỉ số khúc xạ đối với glucoza và rượu, và bộ dò UV đối với axit hữu cơ (Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.* 90:775-779 (2005)), hoặc các phương pháp thử nghiệm và thăm dò thích hợp khác được biết rõ trong lĩnh vực này. Hoạt tính riêng của enzym hoặc protein từ trình tự ADN ngoại sinh cũng có thể được phân tích bằng cách sử dụng các phương pháp được biết rõ trong lĩnh vực này (tham khảo, ví dụ, WO/2008/115840 và Hanai et al., *Appl Environ. Microbiol.* 73 :7814-7818 (2007)).

1,3-Butandiol có thể được tách từ các thành phần khác trong dịch nuôi cấy bằng các phương pháp được biết rõ trong lĩnh vực này. Các phương pháp tách này bao gồm, ví dụ, các quy trình chiết cũng như các phương pháp bao gồm chiết lỏng-lỏng liên tục, bay hơi qua màng, lọc qua màng, tách bằng màng, thẩm thấu ngược, điện thẩm tách, chưng cất, kết tinh, ly tâm, lọc chiết, sắc ký trao đổi ion, sắc ký rây phân tử, sắc ký hấp phụ, và siêu lọc. Tất cả các phương pháp nêu trên là được biết rõ trong lĩnh vực này.

Bất kỳ trong số các vi khuẩn không có trong tự nhiên này được mô tả trong bản mô tả này có thể được nuôi cấy để tạo ra và/hoặc tiết ra các sản phẩm sinh tổng hợp theo sáng chế. Ví dụ, quy trình 1,3-butandiol có thể được nuôi cấy để sản xuất 1,3-butandiol theo cách sinh tổng hợp.

Để sản xuất 1,3-butandiol, các chủng tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường có nguồn cacbon và các chất dinh dưỡng cần thiết khác. Cần thiết duy trì điều kiện kỵ khí trong nồi lên men để giảm chi phí sản xuất cho toàn bộ quá trình. Có thể tạo được các điều kiện này, ví dụ, bằng cách sục khí nitơ vào môi trường và sau đó bao kín bình bằng màng ngăn và nắp lượn sóng. Đối với các chủng mà không quan sát thấy sự sinh trưởng kỵ khí, có thể áp dụng các điều kiện vi hiếu khí bằng cách khoét một lỗ nhỏ ở màng ngăn để thông khí giới hạn. Ví dụ về các điều kiện vi hiếu khí đã được mô tả và được biết rõ trong lĩnh vực. Ví dụ về các điều kiện hiếu khí và kỵ khí được mô tả, ví dụ, trong công bố đơn Mỹ số 2009/0047719, nộp ngày 10 tháng 8 năm 2007. Quá trình lên men có thể được thực hiện theo cách lên men theo mẻ, lên men theo mẻ bổ sung cơ chất hoặc lên men liên tục như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Nếu muốn, độ pH của môi trường có thể được duy trì ở độ pH mong muốn, cụ thể là pH trung tính, như pH khoảng 7 bằng cách bổ sung bazơ, như NaOH hoặc các bazơ khác, hoặc axit, khi cần để duy trì môi trường nuôi cấy ở pH mong muốn. Có thể xác định tốc độ sinh trưởng bằng cách đo mật độ quang bằng máy đo quang phổ (ở bước sóng 600nm), và tốc độ tiêu thụ glucoza bằng cách theo dõi quá trình sự cạn kiệt nguồn cacbon theo thời gian.

Ngoài ra nguồn nguyên liệu có thể tái tạo được như các nguồn nguyên liệu được lấy làm ví dụ nêu trên, các vi khuẩn sản xuất 1,3-butandiol theo sáng chế cũng có thể được cải biến để sinh trưởng trên khí tổng hợp làm nguồn cacbon. Theo phương án cụ thể, một hoặc nhiều protein hoặc enzym được biểu hiện ở các sinh vật sản xuất 1,3-butandiol để tạo ra con đường trao đổi chất để sử dụng khí tổng hợp hoặc nguồn cacbon dạng khí khác.

Sinh vật theo sáng chế có thể sử dụng, ví dụ, nguồn hydrat cacbon mà có thể cung cấp nguồn cacbon cho vi sinh vật không có trong tự nhiên. Các nguồn này bao gồm, ví dụ, các loại đường như glucoza, xyloza, arabinoza, galactoza, mannoza, fructoza và tinh bột. Các nguồn hydrat cacbon khác bao gồm, ví dụ, nguyên liệu tái tạo được và sinh khối.

Ví dụ về các loại sinh khối có thể được sử dụng làm nguồn nguyên liệu trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm sinh khối xenluloza, sinh khối hemixenluloza và nguồn nguyên liệu lignin hoặc một phần của nguyên liệu. Nguyên liệu là sinh khối này có chứa, ví dụ, hợp chất hydrat cacbon hữu dụng làm nguồn cacbon như glucoza, xyloza, arabinoza, galactoza, manozơ, fructoza và tinh bột. Dựa vào các đề xuất và hướng dẫn được đề xuất trong bản mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các nguyên liệu tái tạo được và sinh khối khác ngoài các loại được lấy làm ví dụ nêu trên cũng có thể được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn theo sáng chế để sản xuất 1,3-butandiol.

Do đó, dựa vào các đề xuất và hướng dẫn được đề xuất trong bản mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng vi khuẩn không có trong tự nhiên có thể được tạo ra mà các vi khuẩn này tiết ra các hợp chất được sinh tổng hợp theo sáng chế khi được nuôi cấy trên nguồn cacbon như , khí tổng hợp, CO và/hoặc CO<sub>2</sub>. Các hợp chất này bao gồm, ví dụ, 1,3-butandiol và các chất chuyển hóa trung gian bất kỳ trong con đường 1,3-butandiol. Tất cả các hợp chất cần thiết này là để thiết kế trong một hoặc nhiều hoạt tính enzym hoặc protein cần thiết để đạt sự sinh tổng hợp hợp chất hoặc chất trung gian mong muốn bao gồm, ví dụ, bao gồm một số hoặc tất cả con đường sinh tổng hợp 1,3-butandiol. Theo đó, sáng chế đề xuất vi khuẩn không có trong tự nhiên sản xuất và/hoặc tiết ra 1,3-butandiol khi sinh trưởng trên hydrat cacbon hoặc nguồn cacbon khác và sản xuất và/hoặc tiết ra chất chuyển hóa trung gian bất kỳ được thể hiện trong con đường 1,3-butandiol khi sinh trưởng trên hydrat cacbon hoặc nguồn cacbon khác. Vi khuẩn sản xuất 1,3-butandiol theo sáng chế có thể bắt đầu quá trình tổng hợp từ chất trung gian, ví dụ, axetyl-CoA.

Vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp được biết rõ trong lĩnh vực này như được lấy làm ví dụ trong bản mô tả để biểu hiện ngoại sinh ít nhất một axit nucleic mã hóa cho enzym hoặc protein của con đường 1,3-butandiol với lượng đủ để tạo ra 1,3-butandiol. Cần hiểu rằng vi khuẩn theo sáng chế được nuôi cấy trong các điều kiện đủ để tạo ra 1,3-butandiol. Dựa vào các đề xuất và hướng dẫn được đề xuất trong bản mô tả này, vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể đạt được quá trình sinh tổng hợp 1,3-butandiol dẫn đến nồng độ trong tế bào nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2000mM hoặc nhiều hơn. Nhìn chung, nồng độ trong tế bào của 1,3-butandiol nằm trong

khoảng từ 3 đến 1800mM, cụ thể là nằm trong khoảng từ 5 đến 1700mM và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 8 đến 1600mM, bao gồm 100mM, 200mM, 500mM, 800mM, hoặc nhiều hơn. Nồng độ trong tế bào nằm trong và trên mỗi khoảng được lấy làm ví dụ này cũng có thể đạt được từ vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế.

Theo một số phương án, các điều kiện nuôi cấy bao gồm điều kiện duy trì hoặc sinh trưởng kỵ khí hoặc cơ bản là kỵ khí. Ví dụ về các điều kiện kỵ khí đã được mô tả trước đây và được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ về các điều kiện kỵ khí cho các quá trình lên men được mô tả trong bản mô tả này và được mô tả trong, ví dụ, đơn patent Mỹ số 2009/0047719, nộp ngày 10 tháng 8 năm 2007. Bất kỳ điều kiện nào trong số các điều kiện này đều có thể được sử dụng với vi khuẩn không có trong tự nhiên cũng như các điều kiện kỵ khí khác được biết trong lĩnh vực này. Trong các điều kiện kỵ khí này, các sinh vật sản xuất 1,3-butandiol có thể tổng hợp 1,3-butandiol ở nồng độ trong tế bào là từ 5 đến 10mM hoặc nhiều hơn cũng như tất cả các nồng độ khác được lấy làm ví dụ trong bản mô tả này. Cần hiểu rằng, mặc dù phần mô tả trên đây đề cập đến nồng độ trong tế bào, vi khuẩn sản xuất 1,3-butandiol có thể sản xuất 1,3-butandiol nội bào và/hoặc tiết ra sản phẩm này vào môi trường nuôi cấy.

Các điều kiện nuôi cấy có thể bao gồm, ví dụ, quy trình nuôi cấy lỏng cũng như lên men và các quy trình nuôi cấy quy mô lớn khác. Như được mô tả trong bản mô tả này, cụ thể là có thể đạt được năng suất hữu dụng đặc biệt của các sản phẩm sinh tổng hợp theo sáng chế ở các điều kiện nuôi cấy kỵ khí hoặc cơ bản là kỵ khí.

Như được mô tả trong bản mô tả này, một điều kiện sinh trưởng để thu được quá trình sinh tổng hợp 1,3-butandiol được lấy làm ví dụ bao gồm các điều kiện nuôi cấy hoặc lên men kỵ khí. Theo một số phương án, các vi khuẩn không có trong tự nhiên theo sáng chế này có thể được duy trì, nuôi cấy hoặc lên men được trong điều kiện kỵ khí hoặc cơ bản là kỵ khí. Nói ngắn gọn, các điều kiện kỵ khí chỉ môi trường không có oxy. Các điều kiện cơ bản là kỵ khí bao gồm, ví dụ, nuôi cấy, lên men theo mẻ hoặc lên men liên tục sao cho nồng độ oxy hòa tan trong môi trường duy trì trong khoảng từ 0 đến 10% nồng độ bão hòa. Các điều kiện cơ bản là kỵ khí còn bao gồm các tế bào đang sinh trưởng hoặc các tế bào nghỉ trong môi trường lỏng hoặc trên thạch rắn bên trong bình được bao kín được duy trì trong bầu khí quyển có nồng độ oxy ít hơn

1%. Nồng độ phần trăm này của oxy có thể được duy trì bằng cách, ví dụ, sục hỗn hợp khí  $N_2/CO_2$  hoặc khí hoặc các khí không phải oxy thích hợp khác vào môi trường nuôi cấy.

Các điều kiện nuôi cấy được mô tả trong bản mô tả này có thể được mở rộng và nuôi cấy liên tục để sản xuất 1,3-butandiol. Ví dụ về các quy trình nuôi cấy bao gồm, ví dụ, lên men theo mẻ có bổ sung cơ chất và tách sản phẩm theo mẻ; lên men theo mẻ có bổ sung cơ chất và tách sản phẩm liên tục, hoặc lên men liên tục và tách sản phẩm liên tục. Tất cả các quy trình này là được biết rõ trong lĩnh vực này. Các quy trình lên men đặc biệt hữu dụng để sản xuất sinh tổng hợp lượng 1,3-butandiol thương mại. Nhìn chung, và như với các quy trình nuôi cấy không liên tục, quá trình sản xuất liên tục và/hoặc gần liên tục của 1,3-butandiol sẽ bao gồm việc nuôi cấy sinh vật không có trong tự nhiên sản xuất 1,3-butandiol theo sáng chế trong môi trường và các chất dinh dưỡng đủ để duy trì và/hoặc gần như duy trì sự sinh trưởng trong pha sinh trưởng tăng theo hàm số mũ. Việc nuôi cấy liên tục trong các điều kiện này có thể là, ví dụ, 1 ngày, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7 ngày hoặc nhiều hơn. Ngoài ra, nuôi cấy liên tục có thể là 1 tuần, 2, 3, 4 hoặc 5 hoặc nhiều hơn 5 tuần và đến vài tháng. Theo cách khác, các sinh vật theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong vài giờ, nếu thích hợp cho ứng dụng cụ thể. Cần hiểu rằng các điều kiện nuôi cấy liên tục và/hoặc gần liên tục cũng có thể bao gồm tất cả các khoảng thời gian nằm giữa các khoảng thời gian được lấy làm ví dụ này. Ngoài ra, cũng cần hiểu rằng thời gian nuôi cấy vi khuẩn theo sáng chế là khoảng thời gian đủ để sản xuất ra lượng sản phẩm đủ cho mục đích mong muốn.

Các quy trình lên men được biết rõ trong lĩnh vực này. Nói ngắn gọn là, quy trình lên men để sản xuất 1,3-butandiol sinh tổng hợp có thể dưới dạng, ví dụ, lên men theo mẻ có bổ sung cơ chất và tách sản phẩm theo mẻ; lên men theo mẻ có bổ sung cơ chất và tách sản phẩm liên tục, hoặc lên men liên tục và tách sản phẩm liên tục. Ví dụ về các quy trình lên men theo mẻ và liên tục được biết rõ trong lĩnh vực này.

Ngoài các quy trình lên men nêu trên sử dụng các sinh vật sản xuất 1,3-butandiol theo sáng chế để sản xuất liên tục lượng chủ yếu 1,3-butandiol, các sinh vật sản xuất 1,3-butandiol cũng có thể được, ví dụ, đồng thời được đưa vào các quy trình tổng hợp hóa học để chuyển hóa sản phẩm này thành các hợp chất khác hoặc sản phẩm có thể được tách từ dịch nuôi cấy lên

men và sau đó được đưa vào quá trình chuyển hóa hóa học để chuyển hóa sản phẩm này thành các hợp chất khác, nếu muốn.

Theo một số phương án, khí tổng hợp có thể có thể được sử dụng làm nguồn cacbon. Điều quan trọng đối với quy trình lên men khí tổng hợp là nồng độ sinh khối cao và sự chuyển khối khí-lỏng tốt (Bredwell et al, *Biotechnol Prog.*, 15:834-844 (1999)). Độ hòa tan của CO trong nước thấp hơn một chút so với độ hòa tan của oxy. Có thể thực hiện quá trình lên men có sục khí liên tục trong các nồi lên men được kiểm soát có phân tích khí thoát ra không đổi bằng phép đo khối phổ và lấy mẫu lỏng định kỳ và phân tích bằng GC và HPLC. Pha lỏng có thể hoạt động trong hình thức nuôi cấy mẻ. Các sản phẩm lên men như rượu, axit hữu cơ, và glucoza còn lại cùng với metanol dư được xác định bằng HPLC (Shimadzu, Columbia MD), ví dụ, sử dụng loại cột HPLC của hãng Aminex® (ví dụ, loại HPX-87) (BioRad, Hercules CA), sử dụng đầu dò chỉ số khúc xạ đối với glucoza và rượu, và đầu dò UV đối với axit hữu cơ. Xác định tốc độ sinh trưởng bằng cách đo mật độ quang bằng cách sử dụng máy đo quang phổ (600 nm). Tất cả ống dẫn trong hệ thống này bằng thủy tinh hoặc kim loại để duy trì các điều kiện kỵ khí. Việc sục khí được thực hiện với nguyên liệu thủy tinh để làm giảm kích cỡ bọt khí và tăng cường sự chuyển khối. Tiến hành thử nghiệm sục khí ở nhiều tốc độ khác nhau, trong khoảng từ 0,1 đến 1wm (thể tích hơi trong mỗi phút). Để thu được số đo chính xác về tốc độ hấp thụ khí, các thử thách theo chu kỳ được tiến hành, trong đó dòng khí bị chặn lại tạm thời, và thành phần pha khí được theo dõi như một hàm theo thời gian.

Để đạt được hiệu suất đích tổng, sử dụng các phương pháp duy trì hoặc quay vòng tế bào. Một phương pháp làm tăng nồng độ vi khuẩn là quay vòng tế bào nhờ màng ngăn dòng chảy tiếp tuyến từ dòng chảy bên. Các chủng nuôi cấy theo mẻ lặp lại cũng có thể được sử dụng, như được mô tả trên đây để sản xuất axetat bởi *Moorella* (Sakai et al., *J Biosci.Bioeng* 99:252-258 (2005)). Nhiều phương pháp khác nhau cũng có thể được sử dụng (Bredwell et al., *Biotechnol Prog.* 15:834-844 (1999); Datar et al., *Biotechnol Bioeng* 86:587-594 (2004)). Việc tối ưu hóa thêm có thể được thử nghiệm như sự quá áp ở 1,5 atm để tăng cường sự vận chuyển khối (Najafpour and Younesi, *Enzyme and Microbial Technology* 38[1-2], 223-228 (2006)).

Một khi đạt được hiệu suất mong muốn bằng cách sử dụng nguồn cấp H<sub>2</sub>/CO tinh khiết, hỗn hợp khí tổng hợp được tạo ra chứa các chất ức chế có thể có mặt trong khí tổng hợp có trên thị trường. Ví dụ, thông thường thành phần tạp chất là 4,5% CH<sub>4</sub>, 0,1% C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, 0,35% C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, 1,4% C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, và 150 ppm oxit nitric (Datar et al., Biotechnol Bioeng 86:587-594 (2004)). Hắc ín, điển hình là các hợp chất như benzen, toluen, etylbenzen, p-xylene, o-xylene, và naphtalen, được bổ sung ở các mức ppm để kiểm tra tác động bất kỳ lên quy trình sản xuất. Ví dụ, đã chứng minh rằng 40ppm NO ức chế *C. carboxidivorans* (Ahmed and Lewis, Biotechnol Bioeng 97:1080-1086 (2007)). Các chủng nuôi cấy được thử nghiệm trong bình thốt cổ được lắc trước khi chuyển vào thùng lên men. Ngoài ra, các mức khác nhau của các hợp chất có khả năng ức chế này cũng được thử nghiệm để định lượng tác dụng của chúng lên quá trình sinh trưởng của tế bào. Điều này được sử dụng để cải tiến các đặc tính kỹ thuật đối với độ tinh khiết của khí tổng hợp, được sử dụng cho các nghiên cứu quy mô lớn và sản xuất. Nếu thành phần cụ thể bất kỳ được phát hiện là khó giảm hoặc khó loại khỏi khí tổng hợp được sử dụng cho quy mô lớn, quy trình cải tiến thích nghi được sử dụng để giúp các tế bào dung nạp một hoặc nhiều tạp chất.

Nhờ các tiến bộ trong lĩnh vực cải biến protein, có thể thay đổi các enzym bất kỳ được bộc lộ trong sáng chế để hoạt động một cách hiệu quả trên các cơ chất không được biết là tự nhiên với chúng. Dưới đây là một số ví dụ về các enzym đặc hiệu rộng từ các lớp được quan tâm khác nhau và các phương pháp được sử dụng để cải biến các enzym này để hoạt động trên cơ chất không có trong tự nhiên.

Một lớp enzym trong các con đường này được bộc lộ trong bản mô tả này là oxidoreductaza chuyển hóa qua lại keton hoặc aldehyt thành rượu (1.1.1). Các enzym trong lớp này có thể hoạt động trên phổ cơ chất rộng. Rượu dehydrogenaza (1.1.1.1) được tinh chế từ vi khuẩn trong đất *Brevibacterium* sp KU 1309 (Hirano et al., J. Biosci. Bioeng. 100:318-322 (2005)) được cho thấy là hoạt động trên nhiều hợp chất béo khác nhau cũng như các rượu thơm với hoạt tính cao. Bảng 33 thể hiện hoạt tính của enzym này và hằng số K<sub>m</sub> của nó trên các rượu khác nhau. Enzym này có tích thuận nghịch và có hoạt tính rất cao trên một số aldehyt như được thể hiện trên Bảng 34.

Bảng 33

| Cơ chất              | Hoạt tính tương đối (%) | K <sub>M</sub> (MM) |
|----------------------|-------------------------|---------------------|
| 2-Phenyletanol       | 100                     | 0,025               |
| (S)-2-Phenylpropanol | 156                     | 0,157               |
| (R)-2-Phenylpropanol | 63                      | 0,020               |
| Rượu benzyl          | 199                     | 0,012               |
| 3-Phenylpropanol     | 135                     | 0,033               |
| Etanol               | 76                      |                     |
| 1-Butanol            | 111                     |                     |
| 1-Octanol            | 101                     |                     |
| 1-Dodecanol          | 68                      |                     |
| 1-Phenyletanol       | 46                      |                     |
| 2-Propanol           | 54                      |                     |

Trong bảng này, hoạt tính của 2-phenyletanol, tương đương với 19,2 U/mg, được lấy là 100%.

Bảng 34

| Cơ chất                | Hoạt tính tương đối (%) | K <sub>M</sub> (MM) |
|------------------------|-------------------------|---------------------|
| Phenylaxetaldehyt      | 100                     | 0,261               |
| 2-Phenylpropionaldehyt | 188                     | 0,864               |
| 1-Octylaldehyt         | 87                      |                     |
| Axetophenon            | 0                       |                     |

Lactat dehydrogenaza (1.1.1.27) từ *Ralstonia eutropha* là một enzym khác đã được chứng minh là có hoạt tính cao trên một số axit 2-oxo như 2-oxobutyrat, 2-oxopentanoat và 2-oxoglutarat (hợp chất C5 đồng đẳng với 2-oxoadipat) (Steinbuchel et al., như trên). Cột 2 trong bảng 35 chứng minh hoạt tính của *ldhA* từ *R. eutropha* (tên cũ là *A. eutrophus*) trên các cơ chất khác nhau (Steinbuchel et al., như trên).

Bảng 35

| Cơ chất                | Hoạt tính của                                   |                                      |                                                  |
|------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|
|                        | L(+)-                                           | L(+)-                                | D(-)-                                            |
|                        | Lactat<br>dehydrogenaza từ <i>A. eustrophus</i> | Lactat<br>dehydrogenaza từ cơ<br>thỏ | Lactat<br>dehydrogenaza từ <i>L. leischmanii</i> |
|                        | %                                               |                                      |                                                  |
| Glyoxylat              | 8,7                                             | 23,9                                 | 5,0                                              |
| Pyruvat                | 100,0                                           | 100,0                                | 100,0                                            |
| 2-Oxobutytrat          | 107,0                                           | 18,6                                 | 1,1                                              |
| 2-Oxovalerat           | 125,0                                           | 0,7                                  | 0,0                                              |
| 3-Metyl-2-oxobutytrat  | 28,5                                            | 0,0                                  | 0,0                                              |
| 3-Metyl-2-oxovalerat   | 5,3                                             | 0,0                                  | 0,0                                              |
| 4-Metyl-2-oxopentanoat | 39,0                                            | 1,4                                  | 1,1                                              |
| Oxaloaxetat            | 0,0                                             | 33,1                                 | 23,1                                             |
| 2-Oxoglutarat          | 79,6                                            | 0,0                                  | 0,0                                              |
| 3-Flopyruvat           | 33,6                                            | 74,3                                 | 40,0                                             |

Oxidoreductaza có thể chuyển hóa axit 2-oxo thành axyl-CoA tương ứng của chúng (1.2.1) đã được chứng minh là cũng chấp nhận nhiều cơ chất khác nhau. Ví dụ, phức hợp 2-keto-axit mạch nhánh dehydrogenaza (BCKAD), còn được gọi là 2-oxoisovalerat dehydrogenaza (1.2.1.25), tham gia vào các con đường phân giải axit amin mạch nhánh, chuyển hóa các chất dẫn xuất axit 2-keto của valin, leuxin và isoleuxin thành dẫn xuất axyl-CoA của nó và CO<sub>2</sub>. Ở một số sinh vật bao gồm *Rattus norvegicus* (Paxton et al., Biochem. J. 234:295-303 (1986)) và *Saccharomyces cerevisiae* (Sinclair et al., Biochem. Mol. Biol. Int. 31:911-922 (1993)), phức hợp này đã được chứng minh là có phổ cơ chất rộng bao gồm các axit oxo mạch thẳng như 2-oxobutanoat và alpha-ketoglutarat, ngoài các tiền chất axit amin mạch nhánh.

Các thành viên của một lớp enzym khác, cụ thể là aminotransferaza (2.6.1), đã được thông báo là hoạt động trên nhiều cơ chất. Aspartat aminotransferaza (*aspAT*) từ *Pyrococcus fursiosus* đã được xác định, biểu hiện ở *E. coli* và protein tái tổ hợp được xác định đặc điểm để chứng tỏ rằng enzym này có hoạt tính cao nhất trên aspartat và alpha-ketoglutarat, nhưng có hoạt tính thấp hơn, nhưng vẫn đáng kể trên alanin, glutamat và các axit amin thơm (Ward et al., *Archaea*. 1 :133-141 (2002)). Trong một trường hợp khác, aminotransferaza được nhận biết từ *Leishmania mexicana* và được biểu hiện ở *E. coli* (Vernal et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 229:217- 222 (2003)) được thông báo là có tính đặc hiệu cơ chất rộng trên tyrosin (hoạt tính được xem là 100% trên tyrosin), phenylalanin (90%), tryptophan (85%), aspartat (30%), leuxin (25%) và methionin (25%) tương ứng (Vernal et al., *Mol. Biochem. Parasitol.* 96:83-92 (1998)). Tính đặc hiệu rộng tương tự đã được thông báo đối với tyrosin aminotransferaza từ *Trypanosoma cruzi*, mặc dù hai enzym này có sự tương đồng về trình tự chỉ 6%. Lưu ý rằng enzym tyrosin aminotransferaza có thể chấp nhận leuxin, methionin cũng như tyrosin, phenylalanin, tryptophan và alanin làm chất cho nhóm amino hiệu quả (Nowicki et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1546: 268-281 (2001)).

Ngược lại với các ví dụ này trong đó các enzym có tính đặc hiệu cơ chất rộng tự nhiên, một số các enzym đã được cải biến nhờ sự cải tiến có định hướng để mở rộng tính đặc hiệu của chúng trên các cơ chất không tự nhiên của chúng. Theo cách khác, cơ chất thích hợp của một enzym cũng được cải biến nhờ sự tiến hóa có định hướng. Ví dụ, đã được thông báo rằng tính chọn lọc đối kháng của lipaza từ *Pseudomonas aeruginosa* đã được cải thiện đáng kể. Enzym này thủy phân p-nitrophenyl 2-metyldecanoat với chỉ 2% lượng dư đối quang (enantiomeric excess-ee) thích hợp là dạng cấu hình (S)-axit. Tuy nhiên, sau bốn chu kỳ gây đột biến có sai sót và sàng lọc liên tiếp, thế đột biến được tạo ra xúc tác cho phản ứng cần thiết với 81% ee (Reetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 36:2830-2832 (1997)).

Các phương pháp cải tiến định hướng có thể tạo ra sự cải biến cho enzym để hoạt động trên nhiều cơ chất không có trong tự nhiên. Tính đặc hiệu cơ chất của lipaza ở *P. aeruginosa* được mở rộng bằng cách ngẫu nhiên hóa các gốc axit amin gần vị trí hoạt động. Điều này cho phép enzyme này chấp nhận các este của axit carboxylic được thế ở vị trí alpha (Reetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 44:4192-4196 (2005)). Trong một nỗ lực thành công khác, sự

dụng sự xáo trộn ADN để tạo ra aminotransferaza của *Escherichia coli* mà chấp nhận các cơ chất mạch nhánh  $\beta$ , cơ chất này thường ít được chấp nhận bởi enzym kiểu đại (Yano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 95:5511-5515 (1998)). Đặc biệt, ở cuối bốn chu kỳ xáo trộn, hoạt tính của aspartat aminotransferaza đối với valin và 2-oxovalin tăng lên đến năm cấp cường độ, trong khi đó giảm hoạt tính đối với cơ chất tự nhiên, aspartat, đến 30 lần. Gần đây, thuật toán đã được sử dụng để thiết kế retro-aldolaza có thể được sử dụng để xúc tác cho việc cắt liên kết cacbon-cacbon ở cơ chất không có trong tự nhiên và cơ chất không có nguồn gốc sinh học, 4-hydroxy-4-(6-metoxi-2-naphtyl)-2-butanon. Các thuật toán này sử dụng sự kết hợp khác nhau của bốn motif xúc tác khác nhau để thiết kế các enzym mới và 20 trong số các enzym được chọn để mô tả đặc điểm thử nghiệm có tốc độ được cải thiện bốn lần so với phản ứng không được xúc tác (Jiang et al., Science 319:1387-1391 (2008)). Do đó, các hướng nghiên cứu cải biến này không chỉ có khả năng mở rộng phổ cơ chất mà enzym có thể hoạt động, mà còn cho phép việc thiết kế và tạo ra các enzym có hiệu lực cao. Ví dụ, phương pháp xáo trộn ADN (gây đột biến thể khảm ngẫu nhiên trên các khuôn tạm thời hoặc RACHITT) được thông báo là tạo ra monooxyaza được cải biến mà có tốc độ khử lưu huỳnh được cải thiện trên cơ chất phức hợp cũng như phản ứng chuyển hóa nhanh hơn 20 lần trên cơ chất không tự nhiên (Coco et al. Nat. Biotechnol. 19:354-359 (2001)). Tương tự, hoạt tính đặc hiệu của enzym triosephosphat isomeraza đột biến chậm được cải thiện lên đến 19 lần từ 1,3 lần (Hermes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 87:696-700 (1990)). Việc tăng cường hoạt tính đặc hiệu này được hoàn thành bằng cách sử dụng phương pháp gây đột biến ngẫu nhiên trên toàn bộ chiều dài của phân tử protein và sự cải thiện này có thể được truy nguyên đến các đột biến ở sáu gốc axit amin.

Hiệu quả của hướng nghiên cứu cải biến protein để thay đổi tính đặc hiệu cơ chất của một enzym đối với cơ chất mong muốn cũng đã được chứng minh. Isopropylmalat dehydrogenaza từ *Thermus thermophilus* được cải biến bằng cách thay đổi các gốc cạnh vị trí hoạt động để bây giờ nó có thể hoạt động trên cơ chất malat và D-lactat (Fujita et al., Biosci. Biotechnol Biochem., 65:2695-2700 (2001)). Trong nghiên cứu này cũng như các nghiên cứu khác, đã chỉ ra rằng một hoặc một vài gốc có thể được cải biến để thay đổi tính đặc hiệu cơ chất. Một ví dụ là dihydroflavonol 4-reductaza trong đó một axit amin đã bị thay đổi ở vùng được cho là liên kết với cơ chất có khả năng ưu tiên khử dihydrokaempferol (Johnson et al.,

Plant J. 25:325-333 (2001)). Tính đặc hiệu cơ chất của isoxitrat dehydrogenaza rất đặc hiệu từ *Escherichia coli* bị thay đổi từ isoxitrat thành isopropylmalat bằng cách thay đổi một gốc trong vị trí hoạt động (Doyle et al., Biochemistry 40:4234-4241 (2001)). Tương tự, tính đặc hiệu đồng nhân tố của 1,5-hydroxyprostaglandin dehydrogenaza phụ thuộc NAD<sup>+</sup> bị thay đổi thành NADP<sup>+</sup> bằng cách thay đổi một số gốc gần đầu tận cùng N (Cho et al., Arch. Biochem. Biophys. 419:139-146 (2003)). Phân tích trình tự và phân tích mô hình phân tử được sử dụng để xác định các gốc quan trọng để cải biến, các gốc này còn được nghiên cứu thêm bằng phương pháp tạo đột biến điểm định hướng.

Fucosidaza có được cải tiến từ galactosidaza của *E. coli* bằng cách xáo trộn và sàng lọc ADN (Zhang et al., Proc Natl Acad Sci USA 94:4504-4509 (1997)). Tương tự, aspartat aminotransferaza từ *E. coli* được chuyển hóa thành tyrosin aminotransferaza bằng cách sử dụng mô hình tương đồng và gây đột biến điểm định hướng (Onuffer et al., Protein Sci. 4:1750-1757 (1995)). Gây đột biến điểm định hướng ở hai gốc ở vị trí hoạt động của benzoylformat decarboxylaza từ *P. putida* được thông báo là làm thay đổi ái lực ( $K_m$ ) trên các cơ chất tự nhiên và không tự nhiên (Siegert et al., Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005)). Xytocrom C peroxidaza (CCP) từ *Saccharomyces cerevisiae* được trải qua quá trình cải tiến phân tử có định hướng để tạo ra các thể đột biến có hoạt tính tăng đối với cơ chất cổ điển của peroxidaza là guaiacol, do đó làm thay đổi tính đặc hiệu cơ chất của CCP từ protein xytocrom c thành phân tử hữu cơ nhỏ. Sau ba chu kỳ xáo trộn và sàng lọc ADN, các thể đột biến được phân lập có hoạt tính tăng lên gấp 300 lần đối với guaiacol và tính đặc hiệu với cơ chất này tăng lên tới 1000 lần so với tính đặc hiệu với cơ chất tự nhiên (Iffland et al., Biochemistry 39:10790-10798 (2000)).

Trong một số trường hợp, đã thu được các enzym có các ưu tiên với cơ chất khác so với cả hai enzym gốc. Ví dụ, sự phân giải các polyclorinat biphenyl nhờ biphenyl-dioxyaza được cải thiện nhờ sự xáo trộn gen từ hai vi khuẩn, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* và *Burkholderia cepacia* (Kumamaru et al., Nat. Biotechnol 16, 663-666 (1998)). Các biphenyl oxyaza thể khả năng thu được cho thấy sự ưu tiên cơ chất khác so với cả hai enzym gốc và tăng cường hoạt tính phân giải đối với các hợp chất biphenyl liên quan và các hydrocarbon thơm một vòng như toluen và benzen vốn là các cơ chất yếu đối với enzym này.

Không chỉ có thể thay đổi tính đặc hiệu của enzym này mà còn tăng cường được hoạt tính trên các cơ chất mà các enzym này có hoạt tính thấp trong tự nhiên. Một nghiên cứu đã chứng minh rằng axit amin raxemaza từ *P. putida* có tính đặc hiệu cơ chất rộng (trên lysin, arginin, alanin, serin, methionin, xystein, leuxin và histidin và các axit amin khác) nhưng có hoạt tính thấp trên tryptophan có thể được cải thiện đáng kể bằng cách tạo đột biến ngẫu nhiên (Kino et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 73 :1299-1305 (2007)). Tương tự, vị trí hoạt động của BCKAD ở bò đã được cải biến để thay đổi cơ chất thích hợp axetyl-CoA (Meng et al. Biochemistry 33 :12879-12885 (1994)). Một điều thú vị của nghiên cứu này là ngay cả khi các phương pháp ngẫu nhiên được ứng dụng để tạo ra các enzym bị đột biến có hoạt tính hiệu quả này, thì các đột biến hoặc biến đổi về cấu trúc chính xác mà dẫn đến sự cải thiện về hoạt tính có thể được xác định. Ví dụ, trong nghiên cứu nêu trên, các đột biến giúp cải thiện hoạt tính trên tryptophan có thể được truy nguyên đến hai vị trí khác nhau.

Cải tiến định hướng cũng được sử dụng để biểu hiện protein khó biểu hiện. Ví dụ, bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên và tái tổ hợp gen cho peroxidaza của cây cải ngựa, có thể tách được các thể đột biến có hoạt tính cao hơn 14 lần so với kiểu dại (Lin et al., Biotechnol. Prog. 15:467-471 (1999)).

Ví dụ cuối cùng về sự cải tiến định hướng thể hiện phương pháp cải biến mở rộng mà một enzym có thể trải qua để đạt được phạm vi hoạt động mong muốn. Enzym, lactat dehydrogenaza từ *Bacillus stearothermophilus* được gây đột biến điểm định hướng, và thay thế ba axit amin ở các vị trí mà được xác định là quyết định đến tính đặc hiệu đối với các hydroxyaxit khác nhau (Clarke et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 148:15-23 (1987)). Sau khi gây các đột biến này, tính đặc hiệu đối với oxaloaxetat so với pyruvat đã tăng lên 500 trái ngược với enzym kiểu dại có tính đặc hiệu xúc tác đối với pyruvat so với oxaloaxetat là 1000. Enzym này được cải biến thêm bằng cách gây đột biến điểm định hướng để có hoạt tính đối với pyruvat mạch nhánh được thể (Wilks et al., Biochemistry 29:8587-8591 (1990)). Cụ thể là, enzym này có sự cải thiện  $K_{cat}$  55 lần đối với alpha-ketoisocaproat. Ba cải biến về cấu trúc được tạo ra trong cùng một enzym để thay đổi tính đặc hiệu cơ chất của nó từ lactat thành malat. Enzym này có hoạt tính cao và đặc hiệu trên malat (Wilks et al., Science 242:1541-1544 (1988)). Enzym tương tự từ *B. stearothermophilus* được tiếp tục cải biến để có hoạt tính xúc

tác cao đối với axit alpha-keto có chuỗi bên tích điện dương, như các hợp chất chứa nhóm amoni (Hogan et al., *Biochemistry* 34:4225-4230 (1995)). Các thể đột biến có axit amin có tính axit được đưa vào ở vị trí 102 của enzym này ưu tiên việc liên kết các nhóm amoni chuỗi bên như vậy. Kết quả thu được chứng tỏ rằng các thể đột biến cho thấy sự cải thiện giá trị  $k_{cat}/K_m$  lên đến 25 lần đối với cơ chất axit omega-amino-alpha-keto. Enzym này cũng được cải biến cấu trúc để hoạt động như phenyllactat dehydrogenaza thay vì lactat dehydrogenaza (Wilks et al., *Biochemistry* 31 :7802-7806 (1992)). Các vị trí giới hạn được đưa vào gen mã hóa cho enzym này để cho phép cắt bỏ vùng gen này. Vùng gen này mã hóa cấu trúc vòng bề mặt di động của polypeptit (các gốc 98-110) cấu trúc này thường bao kín hốc vị trí hoạt động khỏi vùng dung môi đi qua được và là nhân tố quyết định chính của tính đặc hiệu cơ chất. Các vòng có chiều dài và trình tự thay đổi được chèn vào gen bị cắt và được sử dụng để tổng hợp hydroxyaxit dehydrogenaza với tính đặc hiệu cơ chất đã bị thay đổi. Với cấu trúc vòng dài hơn, hoạt tính với pyruvat bị giảm một triệu lần nhưng hoạt tính với phenylpyruvat không thay đổi nhiều. Đã đạt được sự thay đổi ở tính đặc hiệu ( $k_{cat}/K_m$ ) lên 390,000. Tỉ lệ chọn lọc 1700:1 của enzym này là đối với phenylpyruvat so với pyruvat là mức độ đòi hỏi đối với phenyllactat dehydrogenaza.

Như được đề cập ở trên, cải tiến có định hướng là hướng nghiên cứu mạnh bao gồm việc đưa vào các đột biến được hướng đích đến gen cụ thể nhằm cải thiện và/hoặc thay đổi các đặc tính của enzym. Các enzym được cải thiện và/hoặc được biến đổi có thể được nhận biết qua sự phát triển và thực hiện các thử nghiệm sàng lọc lưu lượng cao nhạy cho phép sàng lọc tự động nhiều biến thể enzym khác nhau (ví dụ,  $>10^4$ ). Chu kỳ lặp lại của việc gây đột biến và sàng lọc thông thường được thực hiện để thu được enzym với các đặc tính được tối ưu hóa. Các thuật toán điện toán có thể giúp cho việc nhận diện các vùng của gen để gây đột biến cũng được phát triển và có thể làm giảm đáng kể số lượng các biến thể enzym cần được tạo ra và sàng lọc.

Nhiều công nghệ cải tiến định hướng được phát triển (tham khảo Hibbert, E. G., F. Baganz, H. C. Hailes, J. M. Ward, G. J. Lye, J. M. Woodley, and P. A. Dalby, 2005, Directed evolution of biocatalytic processes. *Biomol.Eng* 22:11-19; Huisman, G. W. and J. J. Lalonde, 2007, Enzyme evolution for chemical process Applications, p. 717-742. In R. N. Patel (ed.), *Biocatalysis in the pharmaceutical và Biotechnology industries*. CRC Press; Otten, L. G. và W.

J. Quax. 2005. Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol.Eng* 22:1-9; và Sen, S., D. Venkata, V, và B. Mandal, 2007, Developments in directed evolution for improving enzyme functions. *Appl Biochem. Biotechnol* 143:212-223.) có hiệu quả trong việc tạo ra thư viện biến thể đa dạng và các phương pháp này được ứng dụng thành công để cải thiện phạm vi đặc tính rộng trong nhiều lớp enzym.

Các đặc tính enzym đã được cải thiện và/hoặc biến đổi nhờ công nghệ cải tiến có định hướng bao gồm, ví dụ, tính chọn lọc/tính đặc hiệu – để việc chuyển hóa các cơ chất không có trong tự nhiên; tính ổn định nhiệt – để xử lý ở nhiệt độ cao; tính ổn định với pH - để xử lý sinh học dưới các điều kiện pH thấp hoặc cao; dung nạp cơ chất hoặc sản phẩm – để có thể đạt được độ chuẩn sản phẩm cao; liên kết ( $K_m$ ) – mở rộng liên kết cơ chất để bao gồm các cơ chất không tự nhiên; ức chế ( $K_i$ ) – để loại bỏ sự ức chế do các sản phẩm, các cơ chất, hoặc các chất trung gian chính; hoạt tính ( $k_{cat}$ ) – làm tăng tốc độ phản ứng do enzym xúc tác để đạt được dòng sản phẩm ra mong muốn; mức biểu hiện – làm tăng hiệu suất protein và tổng dòng sản phẩm ra của quá trình; tính ổn định oxy – để các enzym nhạy không khí hoạt động trong các điều kiện hiếu khí; và hoạt tính kỵ khí - để enzym hiếu khí hoạt động khi không có mặt oxy.

Các phương pháp được lấy làm ví dụ sau đây đã được phát triển để gây đột biến và đa dạng hóa các gen hướng đến các đặc tính mong muốn của các enzym đặc hiệu. Phương pháp bất kỳ có thể được sử dụng để làm thay đổi/tối ưu hoạt tính của enzym decarboxylaza.

EpPCR (Pritchard, L., D. Corne, D. Keil, J. Rowland, and M. Winson, 2005, A general model of error-prone PCR. *J Theor. Biol* 234:497-509.) đưa vào các đột biến điểm ngẫu nhiên bằng cách làm giảm độ chính xác của enzym ADN polymeraza trong các phản ứng PCR bằng cách bổ sung các ion  $Mn^{+}$ , bằng cách thay đổi nồng độ dNTP, hoặc bằng những biến đổi về điều kiện khác. Quy trình tách dòng năm bước để giới hạn việc tạo đột biến trong các gen đích quan tâm bao gồm: 1) khuếch đại gen quan tâm bằng PCR có thể có sai sót (EpPCR); 2) phân cắt bằng enzym giới hạn; 3) tinh chế các đoạn ADN mong muốn trên gel; 4) gắn vào vector; 5) biến nạp các thể đột biến vào vật chủ thích hợp và sàng lọc thư viện đối với các enzyme có hiệu suất được cải thiện. Phương pháp này có thể tạo ra nhiều đột biến trong một gen một cách đồng thời, mà các đột biến này có thể hữu dụng. Một số lượng lớn các thể đột biến có thể được tạo ra

bằng EpPCR, vì vậy thử nghiệm sàng lọc lưu lượng cao hoặc phương pháp sàng lọc (đặc biệt là sử dụng robot) là hữu ích để nhận biết các thể đột biến mang các đặc tính mong muốn.

Phương pháp khuếch đại vòng cuộn có thể có sai sót (error-prone rolling circle amplification - epRCA) (Fujii, R., M. Kitaoka, and K. Hayashi, 2004, One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res* 32:e145; và Fujii, R., M. Kitaoka, và K. Hayashi, 2006, Error-prone rolling circle amplification: the simplest random mutagenesis protocol. *Nat. Protoc.* 1 :2493-2497.) có nhiều yếu tố giống với epPCR ngoại trừ sử dụng toàn bộ plasmit vòng làm khuôn và 6-tiểu phần ngẫu nhiên có các liên kết thiophosphat kháng exonuclease trên 2 nucleotit cuối được sử dụng để khuếch đại plasmit, tiếp đó biến nạp vào tế bào mà trong đó plasmit này được tạo vòng lại ở các vị trí lắp trước sau. Việc điều chỉnh nồng độ  $Mn^{+}$  có thể làm thay đổi tỷ lệ đột biến một chút. Kỹ thuật này sử dụng phương pháp một bước, có thể tạo sai sót đơn giản để tạo ra bản sao đầy đủ của plasmit này có 3 - 4 đột biến/kbp. Không cần cắt bằng enzym giới hạn hoặc các môi đặc hiệu. Ngoài ra, phương pháp này thường được cung cấp sẵn dưới dạng kit.

Phương pháp xáo trộn ADN hoặc Họ (Stemmer, W. P. 1994, DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S.A* 91 :10747-10751; và Stemmer, W. P. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370:389-391.) thường bao gồm việc cắt 2 hoặc nhiều gen đột biến bằng nucleaza như Dnaza I hoặc EndoV để tạo ra các đoạn ngẫu nhiên mà được ghép lại nhờ các chu kỳ gắn môi và kéo dài với sự có mặt của ADN polymeraza để tạo ra thư viện gồm các gen lai. Các đoạn làm môi cho nhau và sự tái tổ hợp xảy ra nếu một bản sau làm môi cho bản sao khác (chuyển khuôn). Phương pháp này có thể được sử dụng với các trình tự ADN > 1kbp. Ngoài các thể tái tổ hợp mang đột biến được tạo ra nhờ sự ghép các đoạn, phương pháp này còn đưa vào các đột biến điểm ở các bước kéo dài ở tỷ lệ tương tự với phương pháp PCR có thể có sai sót. Phương pháp này có thể được sử dụng để loại bỏ các đột biến trung tính có hại ngẫu nhiên có thể dẫn đến sự tạo kháng nguyên.

Phương pháp kéo dài so le (staggered extension\_StEP) (Zhao, H., L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter, và F. H. Arnold, 1998, Molecular evolution by staggered extension process

(StEP) in vitro recombination. *Nat. Biotechnol* 16:258-261.) đòi hỏi gắn mỗi vào khuôn tiếp đó là các chu kỳ lặp lại của PCR gồm 2 bước với bước làm biến tính và khoảng thời gian gắn mỗi/kéo dài rất ngắn (chỉ 5 giây). Các đoạn kéo dài gắn vào các khuôn khác nhau và tiếp tục kéo dài, bước này được lặp lại cho đến khi tạo ra trình tự có chiều dài đầy đủ. Phương pháp đổi khuôn nghĩa là hầu hết các đoạn được tạo ra có nhiều đoạn gốc. Sự kết hợp của polymeraza có độ chính xác thấp (Taq và Mutazyme) làm giảm xu hướng tạo ra sai sót bởi vì phổ đột biến trái ngược nhau.

Trong phương pháp tái tổ hợp gắn mỗi ngẫu nhiên (Random Priming Recombination RPR) các mỗi có trình tự ngẫu nhiên được sử dụng để tạo ra nhiều đoạn ADN ngắn bổ sung với các đoạn khác nhau của khuôn. (Shao, Z., H. Zhao, L. Giver, and F. H. Arnold, 1998, Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Res* 26:681-683.) Sự kết hợp bazơ sai và sự gắn mỗi sai do epPCR tạo ra các đột biến điểm. Các đoạn ADN ngắn làm mỗi cho một đoạn khác dựa trên sự tương đồng và được tái tổ hợp và ghép thành chiều dài đầy đủ nhờ việc tạo chu kỳ nhiệt lặp lại. Việc loại bỏ khuôn trước bước này đảm bảo có ít thể tái tổ hợp bố mẹ. Phương pháp này, giống như hầu hết các phương pháp khác, có thể được thực hiện qua nhiều lần lặp lại để cải tiến các đặc tính riêng biệt. Công nghệ này tránh được sai lệch về trình tự, không phụ thuộc vào chiều dài của gen, và cần rất ít ADN bố mẹ để áp dụng.

Trong phương pháp tái tổ hợp dị hợp kép, ADN plasmit được chuyển thành mạch thẳng được sử dụng để tạo ra các dị hợp kép loại được sửa sai nhờ cơ chế sửa chữa bắt cặp sai. (Volkov, A. A., Z. Shao, and F. H. Arnold. 1999. Recombination and chimeragenesis by in vitro heteroduplex formation and in vivo repair. *Nucleic Acids Res* 27:e18; và Volkov, A. A., Z. Shao, and F. H. Arnold. 2000. Random chimeragenesis by heteroduplex recombination. *Methods Enzymol.* 328:456-463.) Bước sửa chữa bắt cặp sai này gây đột biến một chút. Các thể dị hợp kép biến đổi hiệu quả hơn các phức đôi bắt cặp tương đồng mạch thẳng. Phương pháp này thích hợp với các gen lớn và toàn bộ các operon.

Phương pháp gây đột biến thể khả ngẫu nhiên trên các khuôn tạm thời (Random Chimeragenesis on Transient Templates - RACHITT) (Coco, W. M., W. E. Levinson, M. J.

Crist, H. J. Hektor, A. Darzins, P. T. Pienkos, C. H. Squires, and D. J. Monticello, 2001, DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nat. Biotechnol* 19:354-359.) sử dụng phương pháp cắt đoạn nhờ Dnaza I và phân đoạn ADN sợi đơn theo kích cỡ. Các đoạn tương đồng được lai, khi không có mặt polymeraza, với cấu trúc giàn ADN sợi đơn bổ sung. Các đầu của đoạn không được lai gộp lên nhau bất kỳ được cắt bỏ nhờ exonucleaza. Các khoảng trống giữa các đoạn được bổ sung, và sau đó được nối để tạo ra các sợi có chiều dài đủ khác nhau được lai với giàn (giàn này có cấu trúc chữ U để ngăn ngừa sự khuếch đại). Sau đó giàn này được phá hủy và được thay thế bởi sợi mới bổ sung với sợi khác bằng phản ứng khuếch đại PCR. Phương pháp này bao gồm một sợi (giàn) bắt nguồn chỉ từ một bố mẹ trong khi đó các đoạn làm mẫu có nguồn gốc từ nhiều gen khác; giàn bố mẹ được chọn ngược. Do đó, không xảy ra sự gắn mẫu lại với các đoạn bố mẹ. Các đoạn gộp lên nhau được cắt bỏ bằng exonucleaza. Cách khác, phương pháp này tương tự về mặt khái niệm với phương pháp xáo trộn ADN và StEP. Do đó, không có các bản sao từ cùng bố mẹ, ít bất hoạt, và không có bố mẹ không được xáo trộn. Phương pháp này có ưu điểm ở chỗ chỉ một vài hoặc không có gen bố mẹ được tạo ra và nhiều trao đổi chéo có thể tạo ra so với phương pháp xáo trộn ADN chuẩn.

Phương pháp kéo dài tái tổ hợp trên khuôn bị cắt (Recombined Extension on Truncated templates RETT) đòi hỏi sự chuyển khuôn của sợi đang được kéo dài theo một hướng từ các mẫu với sự có mặt của các đoạn ADN sợi đơn theo một hướng duy nhất được sử dụng làm khuôn. (Lee, S. H., E. J. Ryu, M. J. Kang, E.-S. Wang, Z. C. Y. Piao, K. J. J. Jung, and Y. Shin, 2003, A new approach to directed gene evolution by recombined extension on truncated templates (RETT). *J. Molec. Catalysis* 26:119-129.) Không sử dụng ADN endonucleaza. ADN sợi đơn theo một hướng duy nhất được tạo ra nhờ ADN polymeraza với các mẫu ngẫu nhiên hoặc sự cắt theo thứ tự bằng exonucleaza. ADN sợi đơn theo một hướng duy nhất chỉ làm khuôn mà không làm mẫu. Sự gắn mẫu ngẫu nhiên và exonucleaza không tạo ra sự sai lệch trình tự như việc cắt bằng enzyme theo phương pháp xáo trộn ADN/RACHITT. Có thể dễ dàng tối ưu hóa RETT hơn so với StEP bởi vì nó sử dụng các điều kiện PCR thông thường thay vì khoảng thời gian kéo dài rất ngắn. Sự tái tổ hợp xảy ra là sự kết hợp của các bước PCR - không

có sự sắp xếp trực tiếp. Phương pháp này cũng có thể là ngẫu nhiên hơn so với StEP do không có điểm tạm dừng.

Trong phương pháp xáo trộn gen oligonucleotit thoái biến (Degenerate Oligonucleotit Gene Shuffling - DOGS) các môi thoái biến được sử dụng để kiểm soát sự tái tổ hợp giữa các phân tử; (Bergquist, P. L. and M. D. Gibbs, 2007, Degenerate oligonucleotit gene shuffling. *Methods Mol.Biol* 352: 191-204; Bergquist, P. L., R. A. Reeves, and M. D. Gibbs, 2005, Degenerate oligonucleotit gene shuffling (DOGS) and random drift mutagenesis (RNDM): two complementary techniques for enzyme evolution. *Biomol.Eng* 22:63-72; Gibbs, M. D., K. M. Nevalainen, and P. L. Bergquist, 2001, Degenerate oligonucleotit gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. *Gene* 271 : 13-20.) Phương pháp này có thể được sử dụng để kiểm soát xu hướng của các phương pháp khác như phương pháp xáo trộn ADN để tạo lại các gen bố mẹ. Phương pháp này có thể được kết hợp với phương pháp gây đột biến ngẫu nhiên (epPCR) đối với các đoạn gen được chọn. Phương pháp này có thể là một phương pháp tốt để phong bế sự sửa đổi của các trình tự bố mẹ. Không cần sử dụng endonucleaza. Bằng cách điều chỉnh nồng độ đầu vào của các đoạn được tạo ra, chuyên gia có thể dịch chuyển theo hướng mong muốn. Phương pháp này cho phép xáo trộn ADN từ các bố mẹ không liên quan mà không cần cắt bằng enzym giới hạn và cho phép chọn các phương pháp gây đột biến ngẫu nhiên.

Phương pháp cắt phần gia tăng để tạo các enzym lai (Incremental Truncation for the Creation of Hybrid enzymes (ITCHY) tạo ra thư viện tổ hợp với các đoạn cắt 1 cặp bazơ của gen hoặc đoạn gen quan tâm. (Ostermeier et al., *Proc Natl Acad Sci US.A.* 96:3562-3567 (1999); Ostermeier et al., 1999 *Nat.Biotechnol* 17: 1205-1209 (1999)) Phần cắt được đưa vào theo hướng đối diện trên một phần của 2 gen khác nhau. Chúng được nối với nhau và thể dung hợp được tách dòng. Phương pháp này không yêu cầu tính tương đồng giữa 2 gen bố mẹ. Nếu ITCHY được kết hợp với xáo trộn ADN, hệ thống này được gọi là SCRATCHY (xem dưới đây). Ưu điểm chính của cả hai là không cần tính tương đồng giữa các bố mẹ; ví dụ, các thể dung hợp chức năng giữa gen của *E. coli* và người được tạo ra nhờ ITCHY. Nếu tạo ra thư viện ITCHY, sẽ bắt được tất cả các trao đổi chéo có thể.

Phương pháp cắt phân thừa- Thio để tạo các enzym lai (Thio-Incremental Truncation for the Creation of Hybrid enzymes-THIO-ITCHY) gần giống với phương pháp ITCHY ngoại trừ việc các phosphothioat dNTP được sử dụng để tạo ra phân cắt. (Lutz, S., M. Ostermeier, and S. J. Benkovic, 2001, Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using alpha-phosphothioate nucleotides. *Nucleic Acids Res* 29:E16.) So với ITCHY, phương pháp THIO-ITCHY có thể dễ tối ưu hơn, có nhiều khả năng tái tạo và điều chỉnh hơn.

Phương pháp SCRATCHY - ITCHY kết hợp với phương pháp xáo trộn ADN là sự kết hợp của phương pháp xáo trộn ADN và ITCHY; do đó, cho phép nhiều trao đổi chéo. (Lutz et al., *Proc Natl Acad Sci U S.A.* 98:11248-11253 (2001). Phương pháp SCRATCHY kết hợp các đặc tính tốt nhất của phương pháp ITCHY và xáo trộn ADN. Các dự đoán bằng máy tính có thể được sử dụng để tối ưu hóa. Phương pháp SCRATCHY có hiệu quả hơn phương pháp xáo trộn ADN nếu sự tương đồng về trình tự là dưới 80%.

Trong phương pháp gây đột biến chuyển dịch ngẫu nhiên (Random Drift Mutagenesis - RNDM) các đột biến được tạo ra nhờ epPCR tiếp đó được sàng lọc/chọn lọc về hoạt tính ứng dụng được còn lại của chúng. (Bergquist et al., *Biomol.Eng.* 22:63-72 (2005).) Sau đó, chúng được sử dụng trong phương pháp DOGS để tạo ra các thể tái tổ hợp với các thể dung hợp giữa nhiều thể đột biến hoạt động hoặc giữa các thể đột biến hoạt động và một số bố mẹ mong muốn khác. Được thiết kế để thúc đẩy sự phân lập các đột biến trung tính; mục đích của phương pháp này là để sàng lọc về hoạt tính xúc tác được giữ lại cho dù hoạt tính này là cao hay thấp hơn trong gen ban đầu. Phương pháp RNDM có thể được sử dụng trong các thử nghiệm lưu lượng cao nếu việc sàng lọc có khả năng phát hiện hoạt tính trên mức nền. Phương pháp RNDM được sử dụng làm phương pháp đi trước phương pháp DOGS trong việc tạo tính đa dạng. Kỹ thuật này đặt ra yêu cầu về hoạt tính trước khi xáo trộn hoặc các bước tiếp theo khác; thư viện sai lệch trung tính được chứng minh là dẫn đến sự cải thiện cao hơn /nhanh hơn về hoạt tính từ các thư viện nhỏ hơn. Mặc dù việc sử dụng epPCR đã được công bố, phương pháp này có thể được áp dụng cho các phương pháp gây đột biến trên qui mô lớn khác.

Phương pháp gây đột biến bão hòa trình tự (Sequence Saturation Mutagenesis - SeSaM) là phương pháp gây đột biến ngẫu nhiên: 1) tạo ra tập hợp các đoạn có chiều dài ngẫu nhiên

bằng cách sử dụng sự kết hợp ngẫu nhiên của nucleotit phosphothioat và sự phân cắt; tập hợp các đoạn này được sử dụng làm khuôn để 2) kéo dài khi có mặt của các bazơ “chung” như inosin; 3) sự sao chép phần bổ sung chứa inosin tạo ra sự kết hợp bazơ ngẫu nhiên và, sau đó gây đột biến. (Wong et al., *Biotechnol J.* 3:74-82 (2008); Wong *Nucleic Acids Res* 32:e26; Wong et al., *Anal. Biochem.* 341 :187-189 (2005).) Sử dụng phương pháp này có thể tạo ra thư viện lớn gồm các thể đột biến trong 2 đến 3 ngày sử dụng các phương pháp đơn giản. Phương pháp này rất không có định hướng so với sai lệch đột biến của các enzyme ADN polymeraza. Các khác biệt ở phương thức này làm cho phương pháp này có thể bổ sung cho (hoặc thay thế cho) phương pháp epPCR.

Trong phương pháp xáo trộn tổng hợp (Synthetic Shuffling), các oligonucleotit gộp lên nhau được thiết kế để mã hóa cho “tất cả sự đa dạng di truyền của đích” và cho phép sự đa dạng rất cao đối với thể hệ con cháu được xáo trộn. (Ness, et al., *Nat. Biotechnol* 20: 1251-1255 (2002).) Trong phương pháp này, chuyên gia có thể thiết kế các đoạn để được xáo trộn. Điều này giúp làm tăng sự đa dạng thu được của thể hệ con cháu. Chuyên gia có thể thiết kế các sai lệch trình tự /bộ ba mã hóa để làm cho các trình tự cùng họ xa hơn tái tổ hợp ở tỷ lệ gần với các trình tự cùng họ gần hơn và không yêu cầu có các gen khuôn tự nhiên.

Phương pháp cắt và trao đổi nucleotit (Nucleotit Exchange and Excision Technology – NextT) khai thác sự kết hợp của dUTP tiếp đó xử lý bằng uraxil ADN glycosylaza và sau đó là piperidin để thực hiện việc phân đoạn ADN đầu cuối. (Muller et al., *Nucleic Acids Res* 33 :e117 (2005)) Gen được ghép lại bằng cách sử dụng phương pháp kéo dài mỗi của PCR bên trong bằng polymeraza đọc kiểm chứng. Kích cỡ xáo trộn có thể kiểm soát được trực tiếp bằng cách sử dụng các tỷ lệ dUPT::dTTP khác nhau. Đây là phản ứng điểm cuối sử dụng các phương pháp đơn giản để kết hợp uraxil và phân cắt. Chuyên gia có thể sử dụng các đồng đẳng nucleotit khác như 8-oxo-guanin với phương pháp này. Ngoài ra, phương pháp này hoạt động tốt trên các đoạn rất ngắn (86 bp) và có tỷ lệ sai số thấp. Việc cắt hóa học ADN có nghĩa là rất ít dòng không được xáo trộn.

Trong phương pháp tái tổ hợp protein không phụ thuộc vào tính tương đồng về trình tự (Sequence Homology-Independent Protein Recombination (SHIPREC) cầu nối được sử dụng

để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình dung hợp giữa 2 gen xa/không cùng họ; phương pháp xử lý bằng nucleaza được sử dụng để tạo ra một loạt các thể lai giữa giữa 2 gen. Kết quả là tạo ra thư viện trao đổi chéo đơn của các thể dung hợp này. (Sieber, V., C. A. Martinez, and F. H. Arnold. 2001. Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat.Biotechnol* 19:456-460.) Phương pháp này tạo ra một loại xáo trộn giới hạn; việc tạo đột biến là một quá trình khác. Kỹ thuật này có thể tạo ra thư viện các thể lai có các đoạn khác nhau của mỗi 2 gen bố mẹ không cùng họ. Không cần có tính tương đồng. Phương pháp SHIPREC đã được thử nghiệm với một vùng liên kết nhân heme của CP450 ở vi khuẩn được dung hợp với các vùng đầu tận cùng N của CP450 ở động vật có vú; phương pháp này tạo ra hoạt tính của động vật có vú trong enzym hòa tan được nhiều hơn.

Trong phương pháp gây đột biến bão hòa điểm trong gen (Gene Site Saturation Mutagenesis -GSSM) các nguyên liệu ban đầu là plasmid ADN sợi kép siêu xoắn có đoạn chèn và 2 môi thoái biến ở vị trí mong muốn để đột biến. (Kretz, K. A., T. H. Richardson, K. A. Gray, D. E. Robertson, X. Tan, và J. M. Short, 2004, Gene site saturation mutagenesis: a comprehensive mutagenesis approach. *Methods Enzymol.* 388:3-11.) Các môi này mang đột biến quan tâm và gắn vào cùng trình tự trên các sợi đối diện; đột biến ở giữa của môi và ở nucleotit 20 của trình tự đúng sát cạnh mỗi bên. Trình tự này trong môi là NNN hoặc NNK (mã hóa) và MNN (không mã hóa) (N = tất cả 4, K = G, T, M = A, C). Sau khi kéo dài, DpnI được sử dụng để phân cắt ADN được metyl hóa ở gen dam để loại bỏ khuôn kiểu đại. Phương pháp này khảo sát tất cả các đột biến thay thế axit amin có thể tại một locus cho trước (tức là, một bộ ba mã hóa). Phương pháp này tạo điều kiện thuận lợi cho việc tạo ra tất cả các thay thế có thể tại một vị trí mà không có các bộ ba mã hóa vô nghĩa và sự biểu thị tương đương hoặc gần tương đương của tất cả các alen có thể. Phương pháp này không đòi hỏi phải biết trước cấu trúc, cơ chế hoặc các vùng của enzym đích. Nếu tiếp đó là phương pháp xáo trộn hoặc ghép gen, thì công nghệ này tạo ra thư viện các thể tái tổ hợp đa dạng chứa tất cả các dạng tổ hợp có thể của các đột biến điểm đơn. Lợi ích của sự kết hợp công nghệ này đã được chứng minh đối với sự cải tiến thành công trên 50 enzym khác nhau, và đối với nhiều hơn một đặc tính trong enzym cho trước.

Phương pháp gây đột biến cassette tổ hợp (Combinatorial Cassette Mutagenesis-CCM) bao gồm việc sử dụng các cassette oligonucleotit ngắn để thay thế các vùng giới hạn với số lượng lớn các thay đổi của trình tự axit amin có thể. (Reidhaar-Olson, J. F., J. U. Bowie, R. M. Breyer, J. C. Hu, K. L. Knight, W. A. Lim, M. C. Mossing, D. A. Parsell, K. R. Shoemaker, and R. T. Sauer, 1991, Random mutagenesis of protein sequences using oligonucleotit cassettes. *Methods Enzymol.* 208:564-586; và Reidhaar-Olson, J. F. and R. T. Sauer, 1988, Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences. *Science* 241 :53-57.) Các thay thế đồng thời ở các vị trí 2 hoặc 3 là có thể nhờ sử dụng phương pháp này. Ngoài ra, phương pháp này thử nghiệm vô số các thay đổi về trình tự có thể ở phạm vi có giới hạn của điểm. Phương pháp này đã được sử dụng để tìm ra nội dung thông tin của vùng liên kết ADN kim hãm lambda.

Phương pháp tạo đột biến nhiều cassette tổ hợp (Combinatorial Multiple Cassette Mutagenesis -CMCM) về cơ bản là tương tự với phương pháp CCM ngoại trừ việc nó được sử dụng làm một phần của chương trình lớn hơn: 1) Sử dụng epPCR ở tỷ lệ đột biến cao đến 2) các điểm nóng ID và các vùng nóng và sau đó 3) kéo dài bằng CMCM để bao phủ vùng xác định của khoảng trống trong trình tự protein. (Reetz, M. T., S. Wilensek, D. Zha, and K. E. Jaeger, 2001, Directed evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40:3589-3591.) Tương tự phương pháp CCM, phương pháp này có thể kiểm tra gần như tất cả các biến đổi có thể trên một vùng đích. Nếu được sử dụng cùng với các phương pháp tạo các đột biến ngẫu nhiên và các gen được xáo trộn, sẽ mang lại phương pháp tuyệt vời để tạo ra các protein được xáo trộn, đa dạng. Hướng nghiên cứu này đã thành công trong việc làm tăng khoảng 51 lần, tính chọn lọc đối kháng của một enzym.

Trong kỹ thuật sử dụng chủng gây đột biến, plasmit gây đột biến có điều kiện *ts* cho phép sự tăng 20 đến 4000-lần về tần suất đột biến ngẫu nhiên và tự nhiên trong quá trình chọn lọc và phong bế sự tích lũy các đột biến có hại nếu sự chọn lọc là không cần thiết. (Selifonova, O., F. Valle, and V. Schellenberger, 2001, Rapid evolution of novel traits in microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 67:3645-3649.) Phương pháp này dựa trên cơ sở gen *mutD5* có nguồn gốc từ plasmit, mã hóa cho tiểu đơn vị đột biến của ADN polymeraza III. Tiểu đơn vị này liên

kết với ADN polymeraza III nội sinh và thỏa hiệp khả năng đọc kiểm tra của polymeraza III trong bất kỳ chủng nào có chứa plasmit. Xuất hiện phổ rộng thể thay thế bazơ và các đột biến dịch khung. Để sử dụng hiệu quả, plasmit gây đột biến cần phải được loại bỏ khi đạt được kiểu hình mong muốn; điều này đạt được nhờ điểm khởi đầu sao chép nhảy với nhiệt độ, cho phép xử lý plasmit ở 41°C. Cần lưu ý rằng các chủng gây đột biến đã được tìm ra từ khá lâu (ví dụ, tham khảo Winter và coworkers, 1996, *J. Mol. Biol.* 260, 359-3680. Trong phương pháp này, quan sát được tỷ lệ đột biến tự phát cao. Đặc tính có điều kiện giảm các đột biến nên không mong muốn đến mức thấp nhất. Phương pháp này có thể được kết hợp với sự cải tiến thích nghi để tăng cường tỷ lệ tạo đột biến và nhanh chóng đạt được kiểu hình mong muốn hơn.

Phương pháp gây đột biến lướt qua (Look-Through Mutagenesis - LTM) là phương pháp gây đột biến đa chiều đánh giá và tối ưu các đột biến tổ hợp của axit amin chọn lọc. (Rajpal, A., N. Beyaz, L. Haber, G. Cappuccilli, H. Yee, R. R. Bhatt, T. Takeuchi, R. A. Lerner, and R. Crea, 2005, A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci U S.A* 102:8466-8471.) Thay vì làm bão hòa mỗi vị trí bằng tất cả các thay đổi axit amin có thể, bộ gồm 9 được chọn để bao quát phạm vi hóa học nhóm R của axit amin. Ít thay đổi hơn trên mỗi điểm cho phép nhiều vị trí được gây đột biến loại này. Đã đạt được sự tăng >800 lần về ái lực liên kết đối với kháng thể từ nmol thấp đến pmol nhờ phương pháp này. Đây là một cách tiếp cận hợp lý để giảm số lượng các thể kết hợp ngẫu nhiên đến mức thấp nhất và làm tăng khả năng phát hiện các đặc điểm được cải thiện bằng cách làm giảm đáng kể số lượng dòng cần sàng lọc. Phương pháp này đã được áp dụng cho việc thiết kế kháng thể, đặc biệt là làm tăng ái lực liên kết và/hoặc giảm sự phân giải. Phương pháp này có thể được kết hợp với các bước sàng lọc hoặc chọn lọc.

Sự ghép gen là phương pháp xáo trộn ADN có thể được áp dụng cho nhiều gen ở một thời điểm hoặc cho việc tạo ra thư viện các thể lai (nhiều đột biến) của một gen, (trên trang web: [www.verenium.com/Pages/Technology/EnzymTech/TechEnzyTGR.html](http://www.verenium.com/Pages/Technology/EnzymTech/TechEnzyTGR.html)) Thông thường, phương pháp này được sử dụng kết hợp với việc sàng lọc lưu lượng cực cao để tìm khoảng trống trình tự tiêu biểu cho việc cải tiến mong muốn. Phương pháp này cho phép sự tái tổ hợp nhiều gen không phụ thuộc tính tương đồng. Số lượng và vị trí chính xác của hiện tượng trao đổi chéo có thể được định trước bằng cách sử dụng các đoạn được thiết kế nhờ phân tích tin

sinh học. Phương pháp này dẫn đến mức đa dạng rất cao mà gần như không có sự tạo ra lại gen bố mẹ và mức độ gen bất hoạt thấp. Khi được kết hợp với GSSM, phạm vi đột biến rộng có thể được thử nghiệm về hoạt tính được cải thiện. Phương pháp này cho phép “trộn” và “điều chỉnh tinh” việc xáo trộn ADN, ví dụ, cách sử dụng bộ ba mã hóa có thể được tối ưu hóa.

Phương pháp tự động thiết kế protein trên máy tính (In Silico Protein Design Automation PDA) là thuật toán tối ưu hóa mà giữ lại khung protein được xác định cấu trúc có khúc cuộn đặc biệt, và tìm kiếm khoảng trống trình tự để thay thế axit amin mà có thể làm ổn định khúc cuộn và năng lượng toàn phần của protein. (Hayes, R. J., J. Bentzien, M. L. Ary, M. Y. Hwang, J. M. Jacinto, J. Vielmetter, A. Kundu, and B. I. Dahiyat, 2002, Combining computational and experimental screening for rapid optimization of protein properties. *Proc Natl Acad Sci U S.A* 99:15926-15931.) Phương pháp này cho phép dự đoán entropi dựa trên cấu trúc trên máy tính nhằm tìm kiếm sự dung nạp cấu trúc đối với các biến thể của axit amin protein. Cơ học thống kê được áp dụng để tính toán sự tương tác ghép đôi tại mỗi vị trí - sự dung nạp cấu trúc đối với sự thay thế axit amin là thước đo sự ghép đôi. Cuối cùng, phương pháp này được thiết kế để tạo ra các cải biến mong muốn đối với đặc tính của protein trong khi vẫn duy trì được tính toàn vẹn của các đặc điểm cấu trúc. Phương pháp này đánh giá nhờ máy tính và cho phép lọc một số lượng rất lớn các biến thể trình tự có thể ( $10^{50}$ ). Việc chọn lọc các biến thể trình tự để kiểm tra được gắn liền với các dự đoán dựa trên nhiệt động học thích hợp nhất và có vẻ là chỉ có tính ổn định hoặc các đặc tính đi kèm với tính ổn định có thể được tác động một cách có hiệu quả bằng phương pháp này. Phương pháp này đã được sử dụng thành công ở một số protein điều trị bệnh, đặc biệt là trong thiết kế các globulin miễn dịch. Các dự đoán trên máy tính tránh được việc thử nghiệm số lượng lớn quá mức của các biến thể tiềm năng. Các dự đoán dựa trên các cấu trúc ba chiều hiện có có nhiều khả năng thành công hơn các dự đoán dựa vào các cấu trúc theo lý thuyết. Phương pháp này có thể dễ dàng dự đoán và cho phép sàng lọc hướng đích nhiều đột biến đồng thời, điều không thể thực hiện bằng các phương pháp thử nghiệm đơn thuần do sự tăng theo hàm số mũ về số lượng.

Phương pháp gây đột biến bão hòa lặp lại (Iterative Saturation Mutagenesis - ISM) bao gồm 1) sử dụng hiểu biết về cấu trúc /chức năng để chọn vị trí thích hợp để cải tiến enzym. 2) gây đột biến bão hòa tại vị trí được chọn bằng cách sử dụng Stratagene QuikChange (hoặc

phương pháp thích hợp khác). 3) Sàng lọc/chọn lọc các đặc tính mong muốn. 4) Với các dòng chọn được, bắt đầu lại ở vị trí khác và tiếp tục lặp lại. (Reetz, M. T. and J. D. Carballera, 2007, Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. Nat.Protoc. 2:891-903; và Reetz, M. T., J. D. Carballera, and A. Vogel, 2006, Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. Angew. Chem. Int. Ed Engl. 45:7745-7751.) Đây là một phương pháp đã được chứng minh là đảm bảo tất cả các thay thế có khả năng xảy ra tại vị trí đã chọn được tạo ra để sàng lọc/chọn lọc.

Phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên để gây đột biến có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp bất kỳ. Ngoài ra, một hoặc sự kết hợp bất kỳ của các phương pháp tiến hóa định hướng có thể được sử dụng kết hợp với các kỹ thuật cải tiến thích nghi.

Để tạo ra các sinh vật sản xuất tốt hơn, việc tạo mô hình chuyển hóa có thể được sử dụng để tối ưu các điều kiện sinh trưởng. Việc tạo mô hình cũng được sử dụng để thiết kế các kỹ thuật làm bất hoạt gen mà tối ưu thêm việc sử dụng con đường này (tham khảo, ví dụ, các công bố patent Mỹ số 2002/0012939, 2003/0224363, 2004/0029149, 2004/0072723, 2003/0059792, 2002/0168654 và 2004/0009466, và patent Mỹ số 7,127,379). Phân tích mô hình cho phép dự đoán tin cậy về các tác động lên sự sinh trưởng của tế bào của việc thay đổi cơ chế chuyển hóa theo hướng sản xuất 1,3-butandiol hiệu quả hơn.

Một phương pháp tính toán để nhận biết và thiết kế các biến đổi chuyển hóa giúp cho quá trình sinh tổng hợp của sản phẩm mong muốn là phương pháp khung tính toán OptKnock (Burgard et al., Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003)). OptKnock là chương trình mô phỏng và tạo mô hình chuyển hóa đề xuất các kế hoạch xóa bỏ gen mà tạo ra các vi sinh vật ổn định về mặt di truyền có thể sản xuất nhiều sản phẩm đích. Đặc biệt, khung này còn đánh giá mạng lưới sinh hóa và/hoặc trao đổi chất hoàn chỉnh của vi sinh vật để đề xuất các thao tác di truyền bắt buộc sản phẩm hóa sinh mong muốn biến thành sản phẩm phụ bắt buộc của quá trình sinh trưởng tế bào. Bằng cách ghép việc sản xuất hóa sinh với quá trình sinh trưởng của tế bào thông qua việc xóa bỏ gen ở các vị trí chiến lược hoặc phá vỡ gen chức năng khác, áp lực chọn lọc sinh trưởng đối với các chủng được cải biến sau nhiều khoảng thời gian dài trong bình phản

ứng sinh học dẫn đến sự cải thiện về hoạt động là kết quả của quá trình sản xuất hóa sinh được ghép với quá trình sinh trưởng bắt buộc. Cuối cùng, khi các khuyết đoạn gen được tạo ra, có khả năng không đáng kể là các chủng được thiết kế trở lại tình trạng hoang dại của chúng vì các gen được chọn bởi OptKnock sẽ bị loại bỏ hoàn toàn từ bộ gen. Do đó, phương pháp tính toán này có thể được sử dụng để nhận biết các con đường thay thế dẫn đến quá trình sinh tổng hợp của sản phẩm mong muốn hoặc được sử dụng liên quan đến vi khuẩn không có trong tự nhiên để tối ưu hơn nữa quá trình sinh tổng hợp của sản phẩm mong muốn.

Nói ngắn gọn là, OptKnock là thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ phương pháp và hệ thống tính toán và để tạo mô hình cơ chế trao đổi chất tế bào. Chương trình OptKnock đề cập đến khung của các mô hình và các phương pháp kết hợp các ràng buộc đặc biệt vào các mô hình phân tích sự cân bằng dòng chất (flux balance analysis - FBA). Các ràng buộc này bao gồm, ví dụ, thông tin động học định tính, thông tin điều hòa định tính, và/hoặc dữ liệu thử nghiệm chip ADN. OptKnock cũng tính toán các giải pháp cho nhiều vấn đề trao đổi chất bằng cách, ví dụ, thắt chặt ranh giới dòng chất bắt nguồn từ các mô hình cân bằng dòng chất và tiếp theo khảo sát giới hạn hoạt động của mạng lưới trao đổi chất với sự có mặt của các đoạn chèn gen hoặc khuyết gen. Khung tính toán OptKnock cho phép tạo ra các dạng mô hình giúp kiểm tra hiệu quả các giới hạn hoạt động của các mạng lưới trao đổi chất và đưa ra các phương pháp để giải quyết các vấn đề lập trình tuyến tính nguyên-hỗn hợp tạo ra. Các phương pháp mô phỏng và tạo mô hình trao đổi chất được đề cập trong bản mô tả này như OptKnock được mô tả trong, ví dụ, U.S. 2002/0168654, WO 2002/055995, và U.S. 2009/0047719.

Một phương pháp tính toán khác để nhận biết và thiết kế các biến đổi chuyển hóa thích hợp cho sự sản xuất sinh tổng hợp sản phẩm là hệ mô phỏng và tạo mô hình chuyển hóa được gọi là SimPheny®. Phương pháp và hệ thống tính toán này được mô tả trong, ví dụ, U.S. 2003/0233218, nộp ngày 14 tháng 6 năm 2002, và trong tài liệu WO/2003/106998. SimPheny® là một hệ thống tính toán có thể được sử dụng để tạo ra mô hình mạng lưới trên máy tính và để mô phỏng dòng khối, năng lượng hoặc điện tích thông qua các phản ứng hóa học của hệ sinh học để xác định khoảng trống của giải pháp chứa bất kỳ và tất cả các chức năng có thể của các phản ứng hóa học trong hệ này, nhờ đó xác định được phạm vi hoạt tính cho phép đối với hệ sinh học. Hướng nghiên cứu này được gọi là tạo mô hình trên cơ sở các ràng buộc do khoảng

trông của giải pháp được xác định nhờ các ràng buộc như hóa học lượng đã biết của các phản ứng liên quan cũng như nhiệt động học phản ứng và các ràng buộc về khả năng đi kèm với các dòng tối đa thông qua các phản ứng. Khoảng trông được xác định bởi các ràng buộc này có thể được kiểm tra để xác định các khả năng về kiểu hình và hoạt động của hệ sinh học hoặc của các thành phần sinh hóa của nó.

Các hướng nghiên cứu dùng máy tính này phù hợp với các thực tế về sinh học bởi vì các hệ sinh học là linh hoạt và có thể đạt được cùng một kết quả theo nhiều cách khác nhau. Các hệ sinh học được thiết kế nhờ cơ chế tiến hóa được giới hạn bởi các ràng buộc cơ bản mà tất cả các hệ thống sống đều phải đối diện. Do đó, chiến lược tạo mô hình trên cơ sở các ràng buộc bao quát các thực tế chung này. Hơn nữa, khả năng để áp đặt liên tục các giới hạn khác nữa lên mô hình mạng lưới nhờ việc thắt chặt các ràng buộc dẫn đến sự giảm kích cỡ khoảng trông giải pháp, do đó tăng cường độ chính xác mà nhờ đó có thể dự đoán hoạt động sinh lý học hoặc kiểu hình.

Dựa vào các đề xuất và chỉ dẫn được đưa ra trong bản mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể áp dụng nhiều khung tính toán khác nhau cho việc tạo mô hình chuyển hóa và mô phỏng để thiết kế và thực hiện quá trình sinh tổng hợp hợp chất mong muốn ở các vi sinh vật chủ. Các phương pháp tạo mô hình chuyển hóa và mô phỏng như vậy bao gồm, ví dụ, các hệ tính toán được minh họa trên đây như SimPheny® và OptKnock. Để minh họa cho sáng chế, một số phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có dẫn chiếu đến khung tính toán OptKnock để tạo mô hình và mô phỏng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết làm thế nào để áp dụng việc nhận dạng, thiết kế và thực hiện các biến đổi về chuyển hóa nhờ sử dụng OptKnock cho bất kỳ các phương pháp và khung tính toán mô phỏng và tạo mô hình chuyển hóa khác được biết rõ trong lĩnh vực này.

Các phương pháp được mô tả trên sẽ đưa ra một tập hợp các phản ứng chuyển hóa cần phá hủy. Việc loại đi mỗi phản ứng trong tập hợp này hoặc sự cải biến chuyển hóa có thể tạo ra sản phẩm mong muốn dưới dạng sản phẩm bắt buộc trong suốt pha sinh trưởng của sinh vật. Bởi vì các phản ứng này là đã biết, giải pháp cho vấn đề OptKnock mức kép cũng sẽ đưa ra gen hoặc các gen có liên quan mã hóa cho một hoặc nhiều enzym xúc tác cho mỗi phản ứng trong

tập hợp các phản ứng. Việc nhận biết tập hợp phản ứng và các gen mã hóa cho các enzym tương ứng của nó tham gia vào mỗi phản ứng nhìn chung là một quá trình tự động hóa, được thực hiện nhờ sự tương quan của các phản ứng với cơ sở dữ liệu phản ứng có mối quan hệ giữa các enzym và gen mã hóa.

Khi được nhận dạng, tập hợp các phản ứng cần được phá vỡ để đạt được quá trình sản xuất sản phẩm mong muốn được phá vỡ trong tế bào hoặc sinh vật đích bằng cách phá hủy chức năng của ít nhất một gen mã hóa cho mỗi phản ứng chuyển hóa trong tập hợp này. Một phương pháp đặc biệt hữu dụng để đạt được sự phá vỡ chức năng của tập hợp phản ứng là bằng cách làm khuyết mỗi gen mã hóa. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, có thể phá vỡ phản ứng do sự sai khác trong gen khác bao gồm, ví dụ, đột biến, mất vùng điều hòa như vùng khởi đầu hoặc các vị trí liên kết cis cho các yếu tố điều hòa, hoặc nhờ sự cắt cụt trình tự mã hóa ở bất kỳ trong một số các vị trí. Những sai khác này ít hữu dụng hơn sự phá hủy hoàn toàn tập hợp gen có thể, ví dụ, khi cần đánh giá nhanh sự ghép của sản phẩm hoặc sự đảo ngược của gen ít có khả năng xảy ra.

Để nhận diện các giải pháp sản xuất bổ sung cho vấn đề OptKnock mức kép nêu trên mà dẫn đến phá hủy các tập hợp các phản ứng khác nữa hoặc các biến đổi chuyển hóa mà có thể dẫn đến quá trình sinh tổng hợp, bao gồm quá trình sinh tổng hợp sản phẩm mong muốn đi đôi với sự sinh trưởng, có thể thực hiện phương pháp tối ưu hóa, được gọi là cắt nguyên vẹn. Phương pháp này bắt đầu bằng cách giải quyết lặp lại vấn đề OptKnock lấy làm ví dụ ở trên kết hợp với ràng buộc bổ sung được gọi là cắt nguyên vẹn ở mỗi lần lặp lại. Các ràng buộc cắt nguyên vẹn trách cho quy trình giải quyết khỏi việc chọn chính xác cùng tập hợp phản ứng được nhận diện trong lần lặp lại bất kỳ trước mà kết hợp một cách bắt buộc quá trình sinh tổng hợp sản phẩm với sinh trưởng. Ví dụ, nếu sự biến đổi trong chuyển hóa đi đôi với sinh trưởng được nhận diện trước xác định các phản ứng 1, 2 và 3 để phá vỡ, thì các ràng buộc theo sau sẽ tránh cho các phản ứng này không bị xem xét đồng thời ở các giải pháp sau đó. Phương pháp cắt nguyên vẹn được biết rõ trong lĩnh vực này và có thể tìm thấy được mô tả trong, ví dụ, Burgard et al., *Biotechnol. Prog.* 17:791-797 (2001). Như với tất cả các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này liên quan đến việc sử dụng chúng kết hợp với khung tính toán OptKnock để mô phỏng và tạo mô hình chuyển hóa, phương pháp cắt nguyên vẹn làm giảm sự

rườm rà trong quá trình phân tích tính toán lặp lại còn có thể được áp dụng với các khung tính toán khác được biết rõ trong lĩnh vực này bao gồm, ví dụ, SimPheny®.

Các phương pháp lấy làm ví dụ trong bản mô tả cho phép tạo ra các tế bào và các sinh vật sản xuất sinh tổng hợp sản phẩm mong muốn, bao gồm việc ghép bắt buộc của quá trình sản xuất sản phẩm sinh hóa đích với quá trình sinh trưởng tế bào hoặc sinh vật được thiết kế để chứa các biến đổi ở gen được nhận diện. Do đó, các phương pháp tính toán được mô tả trong bản mô tả này cho phép nhận biết và thực hiện các cải biến về trao đổi chất được nhận biết bằng phương pháp trên máy tính được chọn từ phương pháp OptKnock hoặc SimPheny®. Tập hợp các cải biến về trao đổi chất có thể bao gồm, ví dụ, bổ sung một hoặc nhiều enzym của con đường sinh tổng hợp và/hoặc phá vỡ chức năng của một hoặc nhiều phản ứng chuyển hóa bao gồm, ví dụ, phá vỡ do làm mất gen.

Như được trình bày trên đây, phương pháp luận OptKnock được phát triển trên giả thuyết rằng các mạng vi khuẩn đột biến có thể được cải tiến hướng về các kiểu hình sinh trưởng tối đa được dự đoán theo tính toán của chúng khi được đưa vào chọn lọc sinh trưởng trong khoảng thời gian dài. Nói cách khác, cách tiếp cận này tạo cho vi sinh vật có khả năng tự tối ưu hóa dưới áp lực chọn lọc. Khung OptKnock cho phép liệt kê mọi khía cạnh của các tổ hợp khuyết gen bắt buộc sự ghép đôi giữa quá trình sản xuất sinh hóa và sinh trưởng của tế bào dựa trên hóa học lượng pháp của mạng. Việc nhận diện các kỹ thuật bất hoạt gen/phản ứng tối ưu đòi hỏi giải pháp cho vấn đề tối ưu hóa hai mức mà chọn tập hợp các phản ứng hoạt hóa sao cho giải pháp sinh trưởng tối ưu đối với mạng thu được sản xuất quá mức chất hóa sinh học quan tâm (Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)).

Mô hình hóa học lượng pháp trên máy tính của quá trình chuyển hóa ở *E. coli* có thể được dùng để xác định các gen cần thiết cho các con đường chuyển hóa như đã được lấy làm ví dụ và được mô tả trong, ví dụ, các công bố patent Mỹ số 2002/0012939, 2003/0224363, 2004/0029149, 2004/0072723, 2003/0059792, 2002/0168654 và 2004/0009466, và trong patent Mỹ số 7,127,379. Như được bộc lộ trong bản mô tả này, khung toán học OptKnock có thể được ứng dụng để định vị các mất đoạn của gen dẫn đến sự sản xuất sản phẩm mong muốn đồng thời với quá trình sinh trưởng. Hơn nữa, giải pháp của vấn đề OptKnock mức kép chỉ tạo ra một tập

hợp mất đoạn. Để liệt kê tất cả các giải pháp có ý nghĩa, nghĩa là, tất cả các kỹ thuật bất hoạt dẫn đến việc tạo ra sản phẩm đồng thời với sự sinh trưởng, phương pháp tối ưu hóa, được gọi là cắt nguyên vẹn, có thể được thực hiện. Điều này đòi hỏi việc giải quyết lặp lại vấn đề OptKnock kết hợp với ràng buộc bổ sung mà được gọi là cắt nguyên vẹn cho mỗi lần lặp lại, như được bàn luận ở trên.

Cần hiểu rằng các cải biến về cơ bản không có ảnh hưởng đến hoạt tính của nhiều phương án khác nhau theo sáng chế cũng được bao gồm trong định nghĩa theo sáng chế được đề xuất trong bản mô tả này. Theo đó, các ví dụ sau đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

#### Ví dụ I: Tổng hợp 1,3-butandiol qua alanin

Ví dụ này mô tả việc tạo ra vi khuẩn có khả năng sản xuất 1,3-butandiol sử dụng con đường alanin trên Fig.1 thông qua các bước A, B, C, D và H.

*Escherichia coli* được sử dụng làm sinh vật đích để cải biến con đường sản xuất 1,3-butandiol như được thể hiện trên Fig.1. *E. coli* là vật chủ tốt để tạo ra vi sinh vật không có trong tự nhiên có khả năng sản xuất 1,3-butandiol. *E. coli* dễ dàng để thao tác di truyền và được biết là có khả năng sản xuất nhiều sản phẩm khác nhau, như etanol, axit axetic, axit formic, axit lactic, và axit succinic, một cách hiệu quả trong các điều kiện kỵ khí hoặc vi hiếu khí.

Để tạo ra chủng *E. coli* được cải biến để sản xuất 1,3-butandiol, các axit nucleic mã hóa cho các enzym được sử dụng trong con đường alanin như đã được mô tả trước, được biểu hiện ở *E. coli* bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử đã biết (tham khảo, ví dụ, Sambrook, như trên, 2001 ; Ausubel như trên, 1999; Roberts et al., như trên, 1989).

Cụ thể, các gen *ortA* (YP\_001086914.1), *ortB* (YPJ01086915.1), *dat* (P19938), và *pdh* (P06672) mã hóa cho AKP thiolaza, AKP aminotransferaza và 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza, tương ứng, được tách dòng vào vectơ pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Germany) dưới sự kiểm soát của promoter PA 1 /lacO. Ngoài ra, các gen *yqhD* (NP\_417484.1) và  $\alpha$ dh

(AAA23199.2) mã hóa cho 3-oxobutylaldehyt reductaza (khử aldehyt) và A-hydroxy,2-butanon reductaza, tương ứng được tách dòng vào vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Germany) dưới sự kiểm soát của promoter PA1/lacO. Hai bộ plasmid được biến nạp vào *E. coli* chủng MG 1655 để biểu hiện protein và các enzym cần thiết cho quá trình tổng hợp 1,3-butandiol thông qua con đường alanin. Lưu ý rằng *E. coli* có khả năng sản xuất D-alanin.

Sinh vật được cải biến di truyền thu được được nuôi cấy trong môi trường chứa glucoza theo các quy trình được biết rõ trong lĩnh vực này (tham khảo, ví dụ, Sambrook et al., như trên, 2001). Sự biểu hiện của các gen của con đường alanin được kiểm chứng bằng cách sử dụng các phương pháp được biết rõ trong lĩnh vực này để xác định sự biểu hiện của polypeptit hoặc hoạt tính enzym, bao gồm ví dụ, Northern blot, khuếch đại mARN bằng PCR, thẩm tách miễn dịch. Hoạt tính enzym của các enzym được biểu hiện được xác nhận bằng cách sử dụng các thử nghiệm đặc hiệu với từng hoạt tính riêng. Khả năng của chủng *E. coli* được cải biến để sản xuất 1,3-butandiol được xác nhận bằng cách sử dụng HPLC, sắc kí khí - đo khối phổ (GCMS) hoặc sắc kí lỏng - đo khối phổ (LCMS).

Các chủng vi khuẩn được cải biến để có con đường tổng hợp 1,3-butandiol hoạt động còn được làm tốt hơn bằng cách tối ưu hóa để sử dụng hiệu quả con đường này. Nói ngắn gọn là, chủng được cải biến được đánh giá để xác định xem bất kỳ trong số các gen ngoại sinh có được biểu hiện ở mức độ giới hạn tỷ lệ không. Sự biểu hiện tăng đối với các enzym bất kỳ được biểu hiện ở mức độ thấp có thể hạn chế dòng này thông qua con đường này bằng cách, ví dụ, đưa vào số lượng bản sao của gen bổ sung.

Để tạo ra các sinh vật sản xuất tốt hơn, việc tạo mô hình chuyển hóa được sử dụng để tối ưu các điều kiện sinh trưởng. Mô hình này cũng được sử dụng để thiết kế các dạng bất hoạt gen để tối ưu thêm việc sử dụng con đường này (tham khảo, ví dụ, các công bố patent Mỹ số 2002/0012939, 2003/0224363, 2004/0029149, 2004/0072723, 2003/0059792, 2002/0168654 và 2004/0009466, và trong patent Mỹ số 7,127,379). Việc phân tích mô hình cho phép dự đoán tin cậy về các tác động của việc thay đổi cơ chế chuyển hóa theo hướng sản xuất 1,3-butandiol hiệu quả hơn lên sự sinh trưởng của tế bào. Một phương pháp tạo mô hình là hướng nghiên cứu tối ưu hai mức, OptKnock (Burgard et al., Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657 (2003)), được

áp dụng để chọn lọc dạng bất hoạt gen mà nhìn chung là dẫn đến việc sản xuất 1,3-butandiol tốt hơn. Cải tiến thích nghi cũng có thể được sử dụng để tạo ra các sinh vật sản xuất tốt hơn, ví dụ, các chất trung gian alanin hoặc 2-amino-4-oxopentanoat hoặc sản phẩm 1,3-butandiol. Tiến hóa thích nghi được thực hiện để cải thiện cả đặc tính về sinh trưởng và sản xuất (Fong và Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058 (2004); Alper et al., Science 314:1565-1568 (2006)). Dựa trên các kết quả này, các chu kỳ tiếp theo bao gồm việc tạo mô hình, cải biến di truyền và tiến hóa thích nghi có thể có thể áp dụng cho sinh vật sản xuất 1,3-butandiol để làm tăng việc sản xuất hơn nữa.

Đối với việc sản xuất 1,3-butandiol ở quy mô lớn, sinh vật có con đường alanin nêu trên được nuôi cấy trong nồi lên men sử dụng môi trường được biết rõ trong lĩnh vực này để hỗ trợ quá trình sinh trưởng cho sinh vật trong các điều kiện kỵ khí. Quá trình lên men được thực hiện theo mẻ, theo mẻ có bổ sung cơ chất hoặc lên men liên tục. Các điều kiện kỵ khí được duy trì bằng cách đầu tiên sục khí nitơ vào môi trường và sau đó bịt kín bình nuôi cấy (ví dụ, bình có thể được bịt kín bằng màng ngăn và nắp lượn sóng). Các điều kiện vi hiếu khí cũng có thể được sử dụng bằng cách tạo một lỗ nhỏ để thông khí giới hạn. Độ pH của môi trường được duy trì ở giá trị pH 7 bằng cách bổ sung axit, như H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Xác định tốc độ sinh trưởng bằng cách đo mật độ quang bằng máy đo quang phổ (600 nm), và tỷ lệ hấp thụ glucoza bằng cách theo dõi sự giảm nguồn cacbon theo thời gian. Các sản phẩm phụ như các rượu, axit hữu cơ không mong muốn, và đường glucoza dư có thể được đo bằng phương pháp HPLC (Shimadzu) với cột HPX-O 87 (BioRad), sử dụng đầu dò chỉ số khúc xạ đối với glucoza và rượu, và đầu dò UV đối với axit hữu cơ, Lin et al., Biotechnol. Bioeng., 775-779 (2005).

Ví dụ II: Tổng hợp 1,3-BDO sử dụng axetoaxetyl-CoA làm chất trung gian

Ví dụ này mô tả việc tạo ra vi khuẩn có khả năng sản xuất 1,3-butandiol sử dụng axetoaxetyl-CoA làm tiền chất (các bước G, H và I trên Fig.2).

*Escherichia coli* được sử dụng làm sinh vật đích để cải biến con đường này thông qua các bước G (phản ứng chuyển hóa axetoaxetyl-CoA thành 3-hydroxybutyryl-CoA), H (phản ứng chuyển hóa 3-hydroxybutyryl-CoA thành 3-hydroxybutyraldehyt) và I (phản ứng chuyển hóa 3-hydroxybutyraldehyt thành 1,3-butandiol) trên Fig.2. *E. coli* là vật chủ tốt để tạo ra vi

sinh vật không có trong tự nhiên có khả năng sản xuất 1,3-butandiol. *E. coli* dễ dàng để thao tác di truyền và được biết là có khả năng sản xuất nhiều sản phẩm khác nhau, như etanol, axit axetic, axit formic, axit lactic, và axit succinic, một cách hiệu quả trong các điều kiện kỵ khí hoặc vi hiếu khí.

Để tạo ra một chủng *E. coli* được cải biến để sản xuất 1,3-butandiol, các axit nucleic mã hóa cho các enzym được sử dụng trong con đường đã được bộc lộ (các bước G, H và I) như được mô tả trước đây, được biểu hiện ở *E. coli* bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử đã biết (tham khảo, ví dụ, Sambrook, như trên, 2001; Ausubel như trên, 1999; Roberts et al, như trên, 1989). Lưu ý rằng *E. coli* có enzym thiolaza tự nhiên được mã hóa bởi atoB (Số đăng ký: NP\_416728.1) kết hợp hai phân tử axetyl-CoA tạo ra axetoaxetyl-CoA.

Ngoài ra, *hbd* (NP\_349314.1) mã hóa cho axetoaxetyl-CoA reductaza (khử keton), được tách dòng vào vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Germany) dưới sự kiểm soát của promotor PA1/lacO. Plasmid được biến nạp vào *E. coli* chủng MG 1655 để biểu hiện enzym này cần thiết cho sự tạo ra 3-hydroxybutyryl-CoA thông qua axetoaxetyl-CoA. Aldehyt dehydrogenaza (được chọn từ bảng A dưới đây) chuyển hóa 3-hydroxybutyryl-CoA thành 3-hydroxybutyraldehyt, và rượu dehydrogenaza (được chọn từ Bảng B dưới đây) tiếp tục khử 3-hydroxybutyraldehyt thành 1,3-BDO cũng được tách dòng vào vector pZE13 dưới sự kiểm soát của promotor PA1/lacO.

Sinh vật cải biến di truyền thu được được nuôi cấy trong môi trường chứa glucoza theo các quy trình được biết rõ trong lĩnh vực này (tham khảo, ví dụ, Sambrook et al., như trên, 2001). Sự biểu hiện của các gen của con đường này được kiểm chứng bằng các phương pháp được biết rõ trong lĩnh vực này để xác định sự biểu hiện của polypeptit hoặc hoạt tính enzym, bao gồm, ví dụ, Northern blot, khuếch đại mARN bằng PCR, thẩm tách miễn dịch. Hoạt tính enzym của các enzym được biểu hiện được xác nhận bằng cách sử dụng các thử nghiệm đặc hiệu với từng hoạt tính riêng. Khả năng sản xuất 1,3-butandiol của chủng *E. coli* được cải biến được xác nhận bằng phương pháp HPLC, sắc kí khí - đo khối phổ (GCMS) hoặc sắc kí lỏng - đo khối phổ (LCMS).

Các chủng vi khuẩn được cải biến để có con đường tổng hợp 1,3-butandiol hoạt động còn được làm tốt hơn bằng cách tối ưu hóa việc sử dụng hiệu quả con đường này. Nói ngắn gọn là, chủng được cải biến được đánh giá để xác định xem gen ngoại sinh bất kỳ có được biểu hiện ở mức độ giới hạn tỷ lệ không. Sự biểu hiện được tăng lên đối với các enzym bất kỳ được biểu hiện ở mức độ thấp có thể hạn chế dòng chất qua con đường này bằng cách, ví dụ, đưa vào nhiều bản sao của gen bổ sung.

Để tạo ra các sinh vật sản xuất tốt hơn, việc tạo mô hình chuyển hóa được sử dụng để tối ưu các điều kiện sinh trưởng. Mô hình này cũng được sử dụng để thiết kế các dạng bất hoạt gen mà tối ưu hơn nữa việc sử dụng con đường này (tham khảo, ví dụ, các công bố patent Mỹ số 2002/0012939, 2003/0224363, 2004/0029149, 2004/0072723, 2003/0059792, 2002/0168654 và 2004/0009466, và trong patent Mỹ số 7,127,379). Phân tích mô hình cho phép dự đoán tin cậy về các tác động của việc thay đổi cơ chế chuyển hóa theo hướng sản xuất 1,3-butandiol hiệu quả hơn lên sự sinh trưởng của tế bào. Một phương pháp tạo mô hình là hướng nghiên cứu tối ưu hai mức độ, OptKnock (Burgard et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), được áp dụng để chọn lọc các dạng bất hoạt gen mà nhìn chung là dẫn đến việc sản xuất 1,3-butandiol tốt hơn. Cải tiến thích nghi cũng có thể được sử dụng để tạo ra các sinh vật sản xuất tốt hơn, ví dụ, chất trung gian acetyl-CoA hoặc sản phẩm 1,3-butandiol. Cải tiến thích nghi được thực hiện để cải thiện cả các đặc tính về sinh trưởng và sản xuất (Fong and Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et al., *Science* 314: 1565-1568 (2006)). Dựa trên các kết quả này, các chu kỳ tiếp theo bao gồm việc tạo mô hình, cải biến di truyền và cải tiến thích nghi có thể có thể áp dụng cho sinh vật sản xuất 1,3-butandiol để tăng việc sản xuất hơn nữa.

Đối với việc sản xuất 1,3-butandiol ở quy mô lớn, sinh vật tái tổ hợp được nuôi cấy trong nồi lên men sử dụng môi trường được biết rõ trong lĩnh vực để hỗ trợ sinh trưởng cho sinh vật dưới các điều kiện kỵ khí. Quá trình lên men được thực hiện theo mẻ, theo mẻ có bổ sung cơ chất hoặc lên men liên tục. Các điều kiện kỵ khí được duy trì bằng cách đầu tiên sục khí nitơ vào môi trường, sau đó bịt kín bình nuôi cấy (ví dụ, bình có thể được bịt kín bằng màng ngăn và nắp lượn sóng). Các điều kiện vi hiếu khí cũng có thể được sử dụng bằng cách tạo một lỗ nhỏ cho sự thông khí hạn chế. Độ pH của môi trường được duy trì ở giá trị pH 7 bằng cách bổ sung axit, như H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Xác định tốc độ sinh trưởng bằng cách đo mật độ quang

bằng máy đo quang phổ (600 nm), và tỷ lệ hấp thụ glucoza bằng cách theo dõi sự giảm nguồn cacbon theo thời gian. Các sản phẩm phụ như các rượu, axit hữu cơ không mong muốn, và đường glucoza dư có thể được đo bằng phương pháp HPLC (Shimadzu) với cột HPX-087 (BioRad), sử dụng đầu dò chỉ số khúc xạ đối với glucoza và rượu, và đầu dò UV đối với axit hữu cơ (Lin et al., Biotechnol. Bioeng., 90:775-779 (2005)).

Một số aldehyt dehydrogenaza đã được thử nghiệm về hoạt tính trên 3-hydroxybutyryl-CoA. Dịch ly giải thô của vi khuẩn, mỗi chủng mang một trong sáu gen được nêu trong bảng A dưới đây mã hóa cho aldehyt dehydrogenaza được thử nghiệm về hoạt tính trên 3-hydroxybutyryl-CoA bằng cách đo sự giải phóng gốc CoA. Các gen được thử nghiệm và phát hiện được là có hoạt tính đáng kể trên 3 -HBCoA mã hóa cho các protein có số đăng ký và số GI sau đây:

Bảng A

| Protein        | Mã số<br>GenBank | Số GI     | Sinh vật                                          |
|----------------|------------------|-----------|---------------------------------------------------|
| <i>bld</i>     | AAP42563.1       | 31075383  | <i>Clostridium<br/>saccharoperbutylacetonicum</i> |
| <i>ald</i>     | ACL06658.1       | 218764192 | <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01       |
| <i>ald</i>     | YP_001452373     | 157145054 | <i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895            |
| <i>pduP</i>    | NP_460996.1      | 16765381  | <i>Salmonella enterica typhimurium</i>            |
| <i>pduP</i>    | ABJ64680.1       | 116099531 | <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367              |
| Bse1DRAFT_1651 | ZP_02169447      | 163762382 | <i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10            |

Để hiệu chỉnh hoạt tính cơ sở trong dịch ly giải, hoạt tính đo được được so sánh với mẫu đối chứng âm không có gen ALD (chỉ có vector, “Vo”). Fig.4 thể hiện hoạt tính đặc hiệu của mỗi gen trong số các gen đích trên 3-hydroxybutyryl-CoA. Các số ID của gen được thể hiện trên trục x.

Ngoài ra, bid (số đăng ký GenBank: AAP42563.1, Số GI: 31075383) cũng được thử nghiệm về hoạt tính trên 3-HBCoA. Fig.5 sau thể hiện hoạt tính của gen trên 3-hydroxybutyryl-CoA trước và sau khi thẩm tách.

Rượu dehydrogenaza được thử nghiệm về hoạt tính trên 3-hydroxybutyraldehyt và được chứng minh là có hoạt tính đáng kể được nêu dưới đây.

Bảng B

| Protein                | Mã số GenBank  | Số GI     | Sinh vật                        |
|------------------------|----------------|-----------|---------------------------------|
| <i>Bdh (Cbei_2181)</i> | YP_001309304   | 150017050 | <i>Clostridium beijerinckii</i> |
| <i>Bdh (Cbei_1722)</i> | YP_001309535.1 | 150016596 | <i>Clostridium beijerinckii</i> |
| <i>Bdh (Cbei_2421)</i> | YP_001309535.1 | 150017281 | <i>Clostridium beijerinckii</i> |

Phương thức sau được sử dụng để chứng minh hoạt tính của rượu dehydrogenaza (tức là, phản ứng chuyển hóa 3-hydroxybutyraldehyt thành 1,3-BDO) và hoạt tính aldehyt và rượu dehydrogenaza kết hợp (tức là, phản ứng chuyển hóa 3-hydroxybutyryl-CoA thành 1,3-BDO).

Các tế bào khả biến hóa học được biến nạp bằng plasmit chứa aldehyt dehydrogenaza hoặc rượu dehydrogenaza (được nêu trong các bảng A và B trên đây). Chọn các khuẩn lạc từ đĩa và nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung 100ug/ml carbenexilin qua đêm, sau đó dùng 0,6mL để cho vào vào 60mL dịch nuôi cấy chứa rượu dehydrogenaza, hoặc dùng 1,5mL để cho vào 500mL dịch nuôi cấy chứa aldehyt dehydrogenaza. Nuôi cấy các tế bào ở nhiệt độ 37°C để đạt O.D. bằng 0,7 và cảm ứng bằng IPTG. Ủ dịch nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong khi biểu hiện protein trong thời gian 4 giờ. Chia dịch nuôi cấy tế bào thành các phần phân ước nhỏ 30 ml, ly tâm và giữ phần vón tế bào ở nhiệt độ -80°C. Mẫu dịch nuôi cấy tế bào được sử dụng để đánh giá mật độ tế bào cuối cùng.

Các tổ hợp chứa rượu dehydrogenaza và aldehyt dehydrogenaza được sàng lọc trong đĩa 96 giếng với 3-hydroxybutyryl-CoA làm cơ chất cùng với mẫu đối chứng (không có cơ chất). Theo cách khác, để kiểm tra hoạt tính của rượu dehydrogenaza, chỉ bổ sung rượu dehydrogenaza có và không có cơ chất 3-hydroxybutyraldehyt. Quá trình chuẩn bị dịch ly giải

tế bào được thực hiện trên nước đá trong phòng lạnh (4°C). Mật độ tế bào cuối cùng được sử dụng để tính lượng chất phản ứng ly giải tế bào Bug Buster đối với mỗi cục vón tế bào. Bổ sung Lysozym (10uL) và benzonaza (10uL) vào 35mL bugbuster và đảo đều để trộn. Đầu tiên, bổ sung 50 µm dithiothreitol (dung dịch gốc 100 mM) vào cục vón tế bào, sau đó bổ sung 0,5mL mỗi O.D. bằng 1,0 (ở bước sóng 600 nm) của hỗn hợp Bug Buster và enzym vào cục vón tế bào và trộn đều để tạo huyền phù lại.

Bổ sung 50ul dung dịch MOPS 1M (pH = 7,5), và 25ul hỗn hợp đồng nhân tố (NADH 4mM và NADPH 4mM), cả 100 uL dịch ly giải tế bào chứa aldehyt dehydrogenaza, 150 uL dịch ly giải tế bào chứa rượu dehydrogenaza hoặc chỉ 150 uL dịch ly giải tế bào chứa rượu dehydrogenaza vào mỗi giếng và trộn đều. Sau đó, bổ sung cơ chất tương ứng vào mỗi giếng. Huyền phù lại 25mg 3-hydroxybutyryl CoA trong 250uL nước và bổ sung 5ul dung dịch thu được vào mỗi giếng để kiểm tra hoạt tính của cả rượu và aldehyt dehydrogenaza đối với nồng độ cuối cùng là 1,8mM. Để kiểm tra hoạt tính của rượu dehydrogenaza, bổ sung vào mỗi giếng 50uL dung dịch 3-hydroxybutyraldehyt (được điều chế bằng cách trộn 0,6mL axetaldehyt trong 5mL nước có bổ sung bazơ xúc tác (một hạt NaOH) Guthrie, J.P. (tài liệu đính kèm). Nồng độ cuối cùng của 3-hydroxybutyraldehyt trong mỗi giếng gần bằng 50mM. Đĩa 96-giếng sâu được bịt kín bằng lớp bịt PCR dẻo và được ủ ở nhiệt độ 30°C có lắc qua đêm (tổng cộng là 18 giờ). Bởi vì protein và các mảnh vỡ tế bào tạo ra kết tủa trong quá trình ủ, các đĩa được ly tâm trong thời gian 10 phút ở lực 4500xg, và lọc dịch nổi qua đĩa lọc 96 giếng Whatman (0,45µm) trước khi phân tích LC-MS. Các mẫu được phân tích về việc tạo ra 1,3-butandiol.

Fig.6 thể hiện các nồng độ 1,3-BDO khi bổ sung 3-hydroxybutyraldehyt làm cơ chất và trong mẫu đối chứng không có cơ chất. Số GI đối với rượu dehydrogenaza được thể hiện.

Fig.7 thể hiện các nồng độ 1,3-BDO khi bổ sung 3-hydroxybutyryl-CoA làm cơ chất và trong mẫu đối chứng không có cơ chất. Số GI đối với rượu dehydrogenaza được thể hiện. Số GI đối với aldehyt dehydrogenaza được thử nghiệm là 163762382.

Ví dụ III: Tổng hợp 1,3-BDO sử dụng 4-hydroxybutyryl-CoA làm chất trung gian

Ví dụ này mô tả việc tạo ra vi khuẩn có khả năng sản xuất 1,3-butandiol sử dụng 4-hydroxybutyryl-CoA làm tiền chất (các bước A, B và E trên Fig.3).

*Escherichia coli* được sử dụng làm sinh vật đích để cải biến con đường này thông qua các bước A, B và E trên Fig.3. *E. coli* là vật chủ tốt để tạo ra vi sinh vật không có trong tự nhiên có khả năng sản xuất 1,3-butandiol. *E. coli* dễ dàng để thao tác di truyền và được biết là có khả năng sản xuất nhiều các sản phẩm, như etanol, axit axetic, axit formic, axit lactic, và axit succinic, một cách hiệu quả trong các điều kiện kỵ khí hoặc vi hiếu khí.

Để tạo ra chủng *E. coli* chủng được cải biến để sản xuất 1,3-butandiol, các axit nucleic mã hóa cho các enzym được sử dụng trong con đường đã được bộc lộ (các bước A, B và E) như được mô tả trước đây, được biểu hiện ở *E. coli* bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử được biết rõ (tham khảo, ví dụ, Sambrook, như trên, 2001; Ausubel như trên, 1999; Roberts et al, như trên, 1989). Chủng tái tổ hợp được cải biến để tạo ra lượng đáng kể của 4-hydroxybutyryl-CoA đã được mô tả bởi những người nộp đơn trước đây (Burk et al. (US 20090075351) và sẽ được sử dụng để chèn vào con đường sản xuất 1,3-butandiol được đề xuất.

Ngoài ra, các gen *abfD* (YP\_3001396399.1), *crt* (NPJ49318.1) và *adhE2* (AAK09379.1) mã hóa cho 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza, crotonaza và 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo ra rượu) tương ứng, được tách dòng vào vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Germany) dưới sự kiểm soát của promotor PA1/lacO. Plasmid được biến nạp vào *E. coli* chủng tái tổ hợp sản xuất 4-hydroxybutyryl-CoA để biểu hiện protein và các enzym cần thiết để tổng hợp 1,3-butandiol từ chất chuyển hóa này.

Sinh vật được cải biến di truyền thu được được nuôi cấy trong môi trường chứa glucoza theo các quy trình được biết rõ trong lĩnh vực này (tham khảo, ví dụ, Sambrook et al., như trên, 2001). Sự biểu hiện của các gen của con đường này được kiểm chứng bằng các phương pháp được biết rõ trong lĩnh vực này để xác định sự biểu hiện của polypeptit hoặc hoạt tính enzym, bao gồm, ví dụ, Northern blot, khuếch đại mARN bằng PCR, thẩm tách miễn dịch. Hoạt tính enzym của các enzym được biểu hiện được xác nhận bằng các thử nghiệm đặc hiệu với từng hoạt tính Riêng. Khả năng sản xuất 1,3-butandiol của chủng *E. coli* được cải biến được xác

nhận bằng phương pháp HPLC, sắc kí khí - đo khối phổ (GCMS) hoặc sắc kí lỏng - đo khối phổ (LCMS).

Các chủng vi khuẩn được cải biến để có con đường tổng hợp 1,3-butandiol hoạt động còn được làm tốt hơn nữa bằng cách tối ưu hóa việc sử dụng hiệu quả con đường này. Nói ngắn gọn là, chủng được cải biến được đánh giá để xác định xem gen ngoại sinh bất kỳ có được biểu hiện ở mức độ giới hạn tỷ lệ không. Sự biểu hiện tăng đối với các enzym bất kỳ được biểu hiện ở mức độ thấp có thể hạn chế dòng chất qua con đường này bằng cách, ví dụ, đưa vào nhiều bản sao của gen bổ sung.

Để tạo ra các sinh vật sản xuất tốt hơn, việc phân tích mô hình chuyển hóa được sử dụng để tối ưu các điều kiện sinh trưởng. Mô hình này cũng được sử dụng để thiết kế các dạng bất hoạt gen để tối ưu thêm việc sử dụng con đường này (tham khảo, ví dụ, các công bố patent Mỹ số 2002/0012939, 2003/0224363, 2004/0029149, 2004/0072723, 2003/0059792, 2002/0168654 và 2004/0009466, và trong patent Mỹ số 7,127,379). Phân tích mô hình cho phép dự đoán tin cậy về các tác động của việc thay đổi cơ chế chuyển hóa theo hướng sản xuất 1,3-butandiol hiệu quả hơn lên sự sinh trưởng của tế bào. Một phương pháp tạo mô hình là hướng nghiên cứu tối ưu hai mức, OptKnock (Burgard et al., *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), được áp dụng để chọn lọc các dạng bất hoạt gen mà nhìn chung là dẫn đến việc sản xuất 1,3-butandiol tốt hơn. Cải tiến thích nghi cũng có thể được sử dụng để tạo ra các sinh vật sản xuất tốt hơn, ví dụ, chất trung gian acetyl-CoA hoặc sản phẩm 1,3-butandiol. Cải tiến thích nghi được thực hiện để cải thiện cả đặc tính về sinh trưởng và sản xuất (Fong và Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper et al., *Science* 314: 1565-1568 (2006)). Dựa trên các kết quả này, các chu kì tiếp theo bao gồm việc tạo mô hình, cải biến di truyền và cải tiến thích nghi có thể áp dụng cho sinh vật sản xuất 1,3-butandiol để tăng việc sản xuất lên nữa.

Để sản xuất 1,3-butandiol ở quy mô lớn, sinh vật tái tổ hợp được nuôi cấy trong nồi lên men sử dụng môi trường được biết rõ trong lĩnh vực để hỗ trợ quá trình sinh trưởng cho sinh vật trong các điều kiện kỵ khí. Quá trình lên men được thực hiện theo mẻ, theo mẻ có bổ sung cơ chất hoặc lên men liên tục. Các điều kiện kỵ khí được duy trì bằng cách đầu tiên sục khí nitơ vào môi trường, sau đó bịt kín bình nuôi cấy (ví dụ, bình có thể được bịt kín bằng màng ngăn

và nắp lượn sóng). Các điều kiện vi hiếu khí cũng có thể được sử dụng bằng cách tạo một lỗ nhỏ cho phép sự thông khí giới hạn. Độ pH của môi trường được duy trì ở giá trị pH 7 bằng cách bổ sung axit, như  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Xác định tốc độ sinh trưởng bằng cách đo mật độ quang bằng máy đo quang phổ (600 nm), và tỷ lệ hấp thụ glucoza bằng cách kiểm soát sự giảm nguồn cacbon theo thời gian. Các sản phẩm phụ như các rượu, axit hữu cơ không mong muốn, và đường glucoza dư có thể được đo bằng phương pháp HPLC (Shimadzu) với cột HPX-087 (BioRad), sử dụng đầu dò chỉ số khúc xạ đối với glucoza và rượu, và đầu dò UV đối với axit hữu cơ (Lin et al., *Biotechnol Bioeng.* 90:775-779 (2005))

Bảng 36 (Tham chiếu: Fig.1)

| Bước | Mã phân loại EC | Cơ chất mong muốn      | Sản phẩm mong muốn     | Danh pháp Enzym                                                        | Danh pháp Gen       | Số đăng ký GenBank (nếu sẵn có) | Vị sinh vật                              | Cơ chất đã biết                                 |
|------|-----------------|------------------------|------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| A    | 2.3.1.b         | D-alanin               | 2-amino-4-oxopentanoat | AKP Thiolaza                                                           | <i>ortA</i>         | YP_001086914.1                  | <i>Clostridium difficile</i> 630         | D-alanin                                        |
|      |                 |                        |                        |                                                                        | <i>ortB</i>         | YP_001086915.1                  | <i>Clostridium difficile</i> 630         | D-alanin                                        |
|      |                 |                        |                        |                                                                        | <i>Amet_2368</i>    | YP_001320181.1                  | <i>Alkaliphilus metalliredigenes QYF</i> | D-alanin                                        |
|      |                 |                        |                        |                                                                        | <i>Amet_2369</i>    | YP_001320182.1                  | <i>Alkaliphilus metalliredigenes QYF</i> | D-alanin                                        |
|      |                 |                        |                        |                                                                        | <i>Teth514_1478</i> | YP_001663101.1                  | <i>Thermoanaerobacter sp. X514</i>       | D-alanin                                        |
|      |                 |                        |                        |                                                                        | <i>Teth514_1479</i> | YP_001663102.1                  | <i>Thermoanaerobacter sp. X514</i>       | D-alanin                                        |
| B    | 2.6.1.a         | 2-amino-4-oxopentanoat | 2,4-oxopentanoat       | 2-amino-4-oxopentanoat aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin) | <i>aspC</i>         | NP_415448.1                     | <i>Escherichia coli</i>                  | L-aspartat                                      |
|      |                 |                        |                        |                                                                        | <i>avtA</i>         | YP_026231.1                     | <i>Escherichia coli</i>                  | L-alanin, L-valin                               |
|      |                 |                        |                        |                                                                        | <i>AAT2</i>         | P23542.3                        | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>          | L-aspartat                                      |
|      |                 |                        |                        |                                                                        | <i>dat</i>          | P19938                          | <i>Bacillus sp. YM-1</i>                 | D-alanin, D-2-aminobutanoat, D-aspartat         |
|      |                 |                        |                        |                                                                        | <i>dat</i>          | O07597                          | <i>Bacillus subtilis</i>                 | D-alanin, D-2-aminobutanoat, D-aspartat         |
|      |                 |                        |                        |                                                                        | <i>ldh</i>          | P0A393                          | <i>Bacillus cereus</i>                   | L-leuxin, L-valin, 2-aminobutanoat, L-isoleuxin |
| C    | 4.1.1.a         | 2,4-dioxopentanoat     | 3-oxobutanal           | 2,4-dioxopentanoat decarboxylaza                                       | <i>nadX</i>         | NP_229443.1                     | <i>Thermotoga maritima</i>               | L-aspartat                                      |
|      |                 |                        |                        |                                                                        | <i>pdC</i>          | P06672.1                        | <i>Zymomonas mobilis</i>                 | 2-ketobutytrat                                  |

|   |         |                        |                      |                                           |               |             |                                               |                                                                                                              |
|---|---------|------------------------|----------------------|-------------------------------------------|---------------|-------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |         |                        |                      |                                           | <i>pdh1</i>   | P06169      | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>               | 2-ketobutytrat, 3-hydroxybutytrat                                                                            |
|   |         |                        |                      |                                           | <i>mdhC</i>   | P20906.2    | <i>Pseudomonas putida</i>                     | 2-ketobutytrat                                                                                               |
|   |         |                        |                      |                                           | <i>kgd</i>    | O50463.4    | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>             | alpha-ketoglutarat                                                                                           |
| D | 1.1.1.a | 3-oxobutyraldehyd      | 4-hydroxy, 2-butanon | 3-oxobutyraldehyd reductaza (kür aldehyd) | <i>alrA</i>   | BAB12273.1  | <i>Acinetobacter sp. Strain M-1</i>           | C2-C14 aldehyd                                                                                               |
|   |         |                        |                      |                                           | <i>ADH2</i>   | NP_014032.1 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>               | propionaldehyd, isobutyraldehyd, butyraldehyd, 2-metylbutyraldehyd, 3-metylbutyraldehyd, 2-phenylaxetaldehyd |
|   |         |                        |                      |                                           | <i>yqhD</i>   | NP_417484.1 | <i>Escherichia coli</i>                       | axetaldehyd, malondialdehyd, propanaldehyd, butanaldehyd, và acrolein                                        |
|   |         |                        |                      |                                           | <i>bdh I</i>  | NP_349892.1 | <i>Clostridium acetobutylicum</i>             | butyraldehyd                                                                                                 |
|   |         |                        |                      |                                           | <i>bdh II</i> | NP_349891.1 | <i>Clostridium acetobutylicum</i>             | butyraldehyd                                                                                                 |
|   |         |                        |                      |                                           | <i>4hbd</i>   | YP_726053.1 | <i>Ralstonia eutropha H16</i>                 | Succinat semialdehyd                                                                                         |
|   |         |                        |                      |                                           | <i>ADHI</i>   | AAR91477.1  | <i>Geobacillus thermoglucosidasius M10EXG</i> | etanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 1-hexanol, 1-octanol, 2-propanol                                  |
|   |         |                        |                      |                                           | <i>mmsb</i>   | P28811.1    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 | 3-hydroxybutyraldehyd, malonic semialdehyd, metylmalonat semialdehyd                                         |
|   |         |                        |                      |                                           | <i>P84067</i> | P84067      | <i>Thermus thermophilus</i>                   | metylmalonat semialdehyd                                                                                     |
| E | 4.1.1.a | 2-amino-4-oxopentanoat | 4-aminobutan-2-on    | 2-amino-4-oxopentanoat                    | <i>lysA</i>   | NP-417315.1 | <i>Escherichia coli</i>                       | mesodiaminopimelat                                                                                           |

|   |         |                      |                      |                      |                                    |             |             |                                              |                                                         |
|---|---------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------------|-------------|-------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
|   |         |                      |                      |                      | decarboxylaza                      | <i>lysA</i> | AAA25361.1  | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>            | mesodiaminopimelat                                      |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>lysA</i> | BAC92756.1  | <i>Methylophilus methylotrophus</i>          | mesodiaminopimelat                                      |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>odc1</i> | AA59967.1   | <i>Homo sapiens</i>                          | D-ornithin                                              |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>panD</i> | P0A790      | <i>Escherichia coli</i>                      | L-aspartat                                              |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>panD</i> | Q9X4N0      | <i>Corynebacterium glutanicum</i>            | L-aspartat                                              |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>panD</i> | P65660      | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>            | L-aspartat                                              |
| F | 4.3.1.a | 4-aminobutan-2-on    | butanon              | 4-aminobutan-2-on    | 4-aminobutan-2-on<br>amoniak lyaza | <i>aspA</i> | NP_418562   | <i>Escherichia coli</i> K12<br>subsp. MG1655 | L-aspartat                                              |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>aspA</i> | P44324.1    | <i>Haemophilus influenzae</i>                | L-aspartat                                              |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>aspA</i> | P07346.1    | <i>Pseudomonas fluorescens</i>               | L-aspartat                                              |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>ansB</i> | P26899.1    | <i>Bacillus subtilis</i>                     | L-aspartat                                              |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>aspA</i> | P33109.1    | <i>Serratia marcescens</i>                   | L-aspartat                                              |
| G | 4.2.1.a | butanon              | 4-hydroxy, 2-butanon | butanon              | butanon hydrataza                  | <i>fumA</i> | P0AC33      | <i>Escherichia coli</i> K12                  | fumarat                                                 |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>fumC</i> | P05042      | <i>Escherichia coli</i> K12                  | fumarat                                                 |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>fumC</i> | O69294      | <i>Campylobacter jejuni</i>                  | fumarat                                                 |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>fumC</i> | P84127      | <i>Thermus thermophilus</i>                  | fumarat                                                 |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>fumH</i> | P14408      | <i>Rattus norvegicus</i>                     | fumarat                                                 |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>hmd</i>  | ABC88407.1  | <i>Eubacterium barkeri</i>                   | 2-metylen-glutarat                                      |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>dmdA</i> | ABC88408    | <i>Eubacterium barkeri</i>                   | dimetylmaleat                                           |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>dmdB</i> | ABC88409.1  | <i>Eubacterium barkeri</i>                   | dimetylmaleat                                           |
| H | 1.1.1.a | 4-hydroxy, 2-butanon | 1,3-butanediol       | 4-hydroxy, 2-butanon | 4-hydroxy, 2-butanon reductaza     | <i>bdh</i>  | AAA58352.1  | <i>Homo sapiens</i>                          | 3-oxobutytrat                                           |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>adh</i>  | AAA23199.2  | <i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B593    | axeton                                                  |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>adhA</i> | AAC25556    | <i>Pyrococcus furiosus</i>                   | 2-pentanaol,<br>pyruvaldehyd                            |
|   |         |                      |                      |                      |                                    | <i>ldh</i>  | YP_725182.1 | <i>Ralstonia eutropha</i>                    | Lactat, 2-oxobutytrat,<br>2-oxopentanoat, 2-oxoglutarat |

|   |         |                        |                            |                                                                   |                |             |                                           |                          |
|---|---------|------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------|-------------|-------------------------------------------|--------------------------|
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>adh</i>     | P14941.1    | <i>Thermoanaerobacter brockii HTD4</i>    | axeton                   |
| I | 4.3.1.a | 2-amino-4-oxopentanoat | axetylacrylat              | 2-amino-4-oxopentanoat amoniac lyaza                              | <i>aspA</i>    | NP_418562   | <i>Escherichia coli K12 subsp. MG1655</i> | L-aspartat               |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>aspA</i>    | P44324.1    | <i>Haemophilus influenza</i>              | L-aspartat               |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>aspA</i>    | P07346.1    | <i>Pseudomonas fluorescens</i>            | L-aspartat               |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>ansB</i>    | P26899.1    | <i>Bacillus subtilis</i>                  | L-aspartat               |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>aspA</i>    | P33109.1    | <i>Serratia marcescens</i>                | L-aspartat               |
| J | 4.1.1.a | axetylacrylat          | butenon                    | Axetylacrylat decarboxylaza                                       | <i>xyIII</i>   | YP_709328.1 | <i>Pseudomonas putida</i>                 | 4-oxalocrotonat          |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>xyIII</i>   | YP_709353.1 | <i>Pseudomonas putida</i>                 | 4-oxalocrotonat          |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>dmpH</i>    | CAA43228.1  | <i>Pseudomonas sp. CF600</i>              | 4-oxalocrotonat          |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>dmpE</i>    | CAA43225.1  | <i>Pseudomonas sp. CF600</i>              | 4-oxalocrotonat          |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>pdg</i>     | U63827      | <i>Lactobacillus plantarum</i>            | xinamat và các dẫn xuất  |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>pad</i>     | AB330293    | <i>Klebsiella oxytoca</i>                 | xinamat và các dẫn xuất  |
| K | 2.6.1.a | 4-aminobutan-2-on      | 3-oxobutanal               | 4-aminobutan-2-on aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin) | <i>SkyPYD4</i> | ABF58893    | <i>Saccharomyces kluyveri</i>             | beta-alanin              |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>gabT</i>    | P22256      | <i>Escherichia coli</i>                   | 4-aminobutyrat           |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>Abat</i>    | P50554      | <i>Rattus norvegicus</i>                  | 3-amino-2-metylpropionat |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>UGAI</i>    | NP_011533   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>           | 4-aminobutyrat           |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>kdd</i>     | AAL93966.1  | <i>Fusobacterium nucleatum</i>            | 3,5-diaminohexanoat      |
|   |         |                        |                            |                                                                   | <i>lysDH</i>   | BAB39707    | <i>Geobacillus stearothermophilus</i>     | L-lysin                  |
| L | 1.1.1.a | 2-amino-4-oxopentanoat | 2-amino-4-hydroxypentanoat | 2-amino-4-oxopentanoat dehydrogenaza                              | <i>thrA</i>    | AAC73113    | <i>Escherichia coli</i>                   | aspartate semialdehyt    |

|   |         |                            |                          |                                                                            |               |                   |                                   |                                                 |
|---|---------|----------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------|
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>hom6</i>   | CAA89671          | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>   | aspartate semialdehyt                           |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>hom2</i>   | CAD63186          | <i>Lactobacillus plantarum</i>    | aspartate semialdehyt                           |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>akthr2</i> | O81852            | <i>Arabidopsis thaliana</i>       | aspartate semialdehyt                           |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>hom1</i>   | CAD64819          | <i>Lactobacillus plantarum</i>    | aspartate semialdehyt                           |
| M | 2.6.1.a | 2-amino-4-hydroxypentanoat | 2-oxo-4-hydroxypentanoat | 2-amino-4-hydroxypentanoat aminotransferaza hoặc oxidoreductaza (khử amin) | <i>aspC</i>   | NP_415448.1       | <i>Escherichia coli</i>           | L-aspartat                                      |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>avtA</i>   | YP_026231.1       | <i>Escherichia coli</i>           | L-alanin, L-valin                               |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>AAT2</i>   | P23542.3          | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>   | L-aspartat                                      |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>dat</i>    | Bacillus sp. YM-1 | P19938                            | D-alanin, D-2-aminobutanoat, D-aspartat         |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>dat</i>    | Bacillus subtilis | O07597                            | D-alanin, D-2-aminobutanoat, D-aspartat         |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>ldh</i>    | P0A393            | <i>Bacillus cereus</i>            | L-leuxin, L-valin, 2-aminobutanoat, L-isoleuxin |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>nadX</i>   | NP_229443.1       | <i>Thermotoga maritima</i>        | L-aspartat                                      |
| N | 4.1.1.a | 2-oxo-4-hydroxypentanoat   | 3-hydroxybutanal         | 2-oxo-4-hydroxypentanoat                                                   | <i>pdC</i>    | P06672.1          | <i>Zymomonas mobilis</i>          | 2-ketobutytrat                                  |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>pdC1</i>   | P06169            | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>   | 2-ketobutytrat, 3-hydroxypyruvat                |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>mdlC</i>   | P20906.2          | <i>Pseudomonas putida</i>         | 2-ketobutytrat                                  |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>kgd</i>    | O50463.4          | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | alpha-ketoglutarat                              |
| O | 1.1.1.a | 3-oxobutylaldehyt          | 3-hydroxybutyr aldehyt   | 3-oxobutylaldehyt reductaza (khử keton)                                    | <i>bdh</i>    | AAA58352.1        | <i>Homo sapiens</i>               | 3-oxobutytrat                                   |
|   |         |                            |                          |                                                                            | <i>adh</i>    | AAA23199.2        | <i>Clostridium</i>                | axeton                                          |

|   |         |                       |                |                                 |  |  |  |               |                               |                                               |                                                                                                              |
|---|---------|-----------------------|----------------|---------------------------------|--|--|--|---------------|-------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |         |                       |                |                                 |  |  |  |               | <i>beijerinckii</i> NRRL B593 |                                               |                                                                                                              |
|   |         |                       |                |                                 |  |  |  | <i>adhA</i>   | AAC25556                      | <i>Pyrococcus furiosus</i>                    | 2-pentanaol, pyruvaldehyt                                                                                    |
|   |         |                       |                |                                 |  |  |  | <i>ldh</i>    | YP_725182.1                   | <i>Ralstonia eutropha</i>                     | lactat, 2-oxobutyraat, 2-oxopentanaol, 2-oxoglutarat                                                         |
|   |         |                       |                |                                 |  |  |  | <i>adh</i>    | P14941.1                      | <i>Thermoanaerobacter brockii</i> HTD4        | axeton                                                                                                       |
| P | 1.1.1.a | 3-hydroxybutyraldehyt | 1,3-butanediol | 3-hydroxybutyraldehyt reductaza |  |  |  | <i>alrA</i>   | BAB12273.1                    | <i>Acinetobacter</i> sp. Strain M-1           | C2-C14 aldehyt                                                                                               |
|   |         |                       |                |                                 |  |  |  | <i>ADH2</i>   | NP_014032.1                   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>               | propionaldehyt, isobutyraldehyt, butyraldehyt, 2-metylbutyraldehyt, 3-metylbutyraldehyt, 2-phenylaxetaldehyt |
|   |         |                       |                |                                 |  |  |  | <i>yqhD</i>   | NP_417484.1                   | <i>Escherichia coli</i>                       | axetaldehyt, malondialdehyt, propanaldehyt, butanaldehyt, vääcrolein                                         |
|   |         |                       |                |                                 |  |  |  | <i>bdh I</i>  | NP_349892.1                   | <i>Clostridium acetobutylicum</i>             | butyraldehyt                                                                                                 |
|   |         |                       |                |                                 |  |  |  | <i>bdh II</i> | NP_349891.1                   | <i>Clostridium acetobutylicum</i>             | butyraldehyt                                                                                                 |
|   |         |                       |                |                                 |  |  |  | <i>4hbd</i>   | YP_726053.1                   | <i>Ralstonia eutropha</i> H16                 | succinat semialdehyt                                                                                         |
|   |         |                       |                |                                 |  |  |  | <i>ADHI</i>   | AAR91477.1                    | <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> M10EXG | etanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 1-hexanol, 1-octanol, 2-propanol                                  |
|   |         |                       |                |                                 |  |  |  | <i>mmsb</i>   | P28811.1                      | <i>Pseudomonas</i>                            | 3-hydroxybutyraldehyt                                                                                        |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |                             |                                                          |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----------------------------|----------------------------------------------------------|
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | <i>aeruginosa</i>           | aldehyd, malonic semialdehyt, methylmalonat semialdehyt, |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | <i>Thermus thermophilus</i> | methylmalonat semialdehyt,                               |

| Bảng 37 (Tham chiếu: Fig.2) |                 |                   |                       |                                         |                  |                                 |                                           |                                                                           |  |  |  |
|-----------------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--|--|--|
| Bước                        | Mã phân loại EC | Cơ chất mong muốn | Sản phẩm mong muốn    | Danh pháp Enzym                         | Danh pháp Gen    | Số đăng ký GenBank (nếu sẵn có) | Vi sinh vật                               | Cơ chất đã biết                                                           |  |  |  |
| A                           | 1.2.1. b        | axetoaxetyl-CoA   | 3-oxobutyraldehyt     | axetoaxetyl-CoA reductaza (tạo aldehyd) | <i>Ald</i>       | AAT66436                        | <i>Clostridium beijerinckii</i>           | butyryl-CoA                                                               |  |  |  |
|                             |                 |                   |                       |                                         | <i>sucD</i>      | NP_904963.1                     | <i>Porphyromonas gingivalis</i>           | succinyl-CoA                                                              |  |  |  |
|                             |                 |                   |                       |                                         | <i>bphG</i>      | BAA03892.1                      | <i>Pseudomonas sp</i>                     | axetaldehyt, propionaldehyt, butyraldehyt, isobutyraldehyt và formaldehyt |  |  |  |
|                             |                 |                   |                       |                                         | <i>Msed_0709</i> | YP_001190808.1                  | <i>Metallosphaera sedula</i>              | malonyl-CoA                                                               |  |  |  |
|                             |                 |                   |                       |                                         | <i>mcr</i>       | NP_378167                       | <i>Sulfolobus tokodaii</i>                | malonyl-CoA, methylmalonyl-CoA                                            |  |  |  |
| B                           | 1.1.1.a         | 3-oxobutyraldehyt | 3-hydroxybutyraldehyt | 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử keton) | <i>bdh</i>       | AAA58352.1                      | <i>Homo sapiens</i>                       | 3-oxobutytrat                                                             |  |  |  |
|                             |                 |                   |                       |                                         | <i>adh</i>       | AAA23199.2                      | <i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B593 | axeton                                                                    |  |  |  |
|                             |                 |                   |                       |                                         | <i>adhA</i>      | AAC25556                        | <i>Pyrococcus furiosus</i>                | 2-pentanaol, pyruvaldehyt                                                 |  |  |  |
|                             |                 |                   |                       |                                         | <i>ldh</i>       | YP_725182.1                     | <i>Ralstonia eutropha</i>                 | lactat, 2-oxobutytrat, 2-oxopentanoat, 2-oxoglutarat                      |  |  |  |
|                             |                 |                   |                       |                                         | <i>adh</i>       | P14941.1                        | <i>Thermoanaerobacter brockii</i> HTD4    | axeton                                                                    |  |  |  |

| C | 1.1.1.a | 3-hydroxybutyraldehyt | 1,3-butanediol       | 3-hydroxybutyraldehyt reductaza      | <i>alrA</i>   | BAB12273.1  | <i>Acinetobacter</i> sp. Strain M-1           | C2-C14 aldehyt                                                                                               |
|---|---------|-----------------------|----------------------|--------------------------------------|---------------|-------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |         |                       |                      |                                      | <i>ADH2</i>   | NP_014032.1 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>               | propionaldehyt, isobutyraldehyt, butyraldehyt, 2-metylbutyraldehyt, 3-metylbutyraldehyt, 2-phenylaxetaldehyt |
|   |         |                       |                      |                                      | <i>yqhD</i>   | NP_417484.1 | <i>Escherichia coli</i>                       | axetaldehyt, malondialdehyt, propanaldehyt, butanaldehyt, và acrolein                                        |
|   |         |                       |                      |                                      | <i>bdh I</i>  | NP_349892.1 | <i>Clostridium acetobutylicum</i>             | butyraldehyt                                                                                                 |
|   |         |                       |                      |                                      | <i>bdh II</i> | NP_349891.1 | <i>Clostridium acetobutylicum</i>             | butyraldehyt                                                                                                 |
|   |         |                       |                      |                                      | <i>4hbd</i>   | YP_726053.1 | <i>Ralstonia eutropha</i> H16                 | succinat semialdehyt                                                                                         |
|   |         |                       |                      |                                      | <i>ADHI</i>   | AAR91477.1  | <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> M10EXG | etanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 1-hexanol, 1-octanol, 2-propanol                                  |
|   |         |                       |                      |                                      | <i>mmsb</i>   | P28811.1    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 | 3-hydroxybutyraldehyt, malonic semialdehyt, metylmalonat semialdehyt                                         |
|   |         |                       |                      |                                      | <i>P84067</i> | P84067      | <i>Thermus thermophilus</i>                   | metylmalonat semialdehyt                                                                                     |
| D | 1.1.1.c | axetoaxetyl-CoA       | 4-hydroxy, 2-butanon | axetoaxetyl-CoA reductaza (tao ruou) | <i>adhE2</i>  | AAK09379.1  | <i>Clostridium acetobutylicum</i>             | butanoyl-CoA                                                                                                 |
|   |         |                       |                      |                                      | <i>mcr</i>    | AAS20429.1  | <i>Chloroflexus</i>                           | malonyl-CoA                                                                                                  |

|   |         |                      |                      |                                           |  |  |               |  |             |                                               |                    |                                                                                                              |  |
|---|---------|----------------------|----------------------|-------------------------------------------|--|--|---------------|--|-------------|-----------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|   |         |                      |                      |                                           |  |  | <i>FAR</i>    |  |             |                                               | <i>aurantiacus</i> |                                                                                                              |  |
|   |         |                      |                      |                                           |  |  | <i>alrA</i>   |  | AAD38039.1  | <i>Simmondsia chinensis</i>                   |                    | axyl-CoA mạch dài                                                                                            |  |
| E | 1.1.1.a | 3-oxobutyraldehyt    | 4-hydroxy, 2-butanon | 3-oxobutyraldehyt reductaza (khử aldehyt) |  |  |               |  | BAB12273.1  | <i>Acinetobacter sp. Strain M-1</i>           |                    | C2-C14 aldehyt                                                                                               |  |
|   |         |                      |                      |                                           |  |  | <i>ADH2</i>   |  | NP_014032.1 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>               |                    | propionaldehyt, isobutyraldehyt, butyraldehyt, 2-metylbutyraldehyt, 3-metylbutyraldehyt, 2-phenylaxetaldehyt |  |
|   |         |                      |                      |                                           |  |  | <i>yqhD</i>   |  | NP_417484.1 | <i>Escherichia coli</i>                       |                    | axetaldehyt, malondialdehyt, propanaldehyt, butanaldehyt, và acrolein                                        |  |
|   |         |                      |                      |                                           |  |  | <i>bdh I</i>  |  | NP_349892.1 | <i>Clostridium acetobutylicum</i>             |                    | butyraldehyt                                                                                                 |  |
|   |         |                      |                      |                                           |  |  | <i>bdh II</i> |  | NP_349891.1 | <i>Clostridium acetobutylicum</i>             |                    | butyraldehyt                                                                                                 |  |
|   |         |                      |                      |                                           |  |  | <i>4hbd</i>   |  | YP_726053.1 | <i>Ralstonia eutropha H16</i>                 |                    | succinat semialdehyt                                                                                         |  |
|   |         |                      |                      |                                           |  |  | <i>ADHI</i>   |  | AAR91477.1  | <i>Geobacillus thermoglucosidasius M10EXG</i> |                    | etanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 1-hexanol, 1-octanol, 2-propanol                                  |  |
|   |         |                      |                      |                                           |  |  | <i>mmsb</i>   |  | P28811.1    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 |                    | 3-hydroxybutyaldehyt, malonic semialdehyt, metylmalonat semialdehyt,                                         |  |
|   |         |                      |                      |                                           |  |  | <i>P84067</i> |  | P84067      | <i>Thermus thermophilus</i>                   |                    | metylmalonat semialdehyt                                                                                     |  |
| F | 1.1.1.a | 4-hydroxy, 2-butanon | 1,3-butanediol       | 4-hydroxy,2-butanon reductaza             |  |  | <i>bdt</i>    |  | AAA58352.1  | <i>Homo sapiens</i>                           |                    | 3-oxobutytrat                                                                                                |  |
|   |         |                      |                      |                                           |  |  | <i>adh</i>    |  | AAA23199.2  | <i>Clostridium</i>                            |                    | axeton                                                                                                       |  |

|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  |                  |                               |  |                                                      |
|---|---------|----------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|--|--|--|--|------------------|-------------------------------|--|------------------------------------------------------|
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  |                  | <i>beijerinckii</i> NRRL B593 |  |                                                      |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>adhA</i>      | AAC25556                      |  | 2-pentanoal, pyruvaldehyt                            |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>ldh</i>       | YP_725182.1                   |  | lactat, 2-oxobutytrat, 2-oxopentanoat, 2-oxoglutarat |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>adh</i>       | P14941.1                      |  | axeton                                               |
| G | 1.1.1.a | axetoaxetyl-CoA      | 3-hydroxybutyryl-CoA                         | axetoaxetyl-CoA reductaza (khử keton)        |  |  |  |  | <i>hdb</i>       | NP_349314.1                   |  | axetoaxetyl-CoA                                      |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>hbd</i>       | AAM14586.1                    |  | axetoaxetyl-CoA                                      |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>Hbd2</i>      | EDK34807.1                    |  | axetoaxetyl-CoA                                      |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>Hbd1</i>      | EDK32512.1                    |  | axetoaxetyl-CoA                                      |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>Msed_1423</i> | YP_001191505                  |  | 3-hydroxybutyryl-CoA (chưa chắc chắn)                |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>Msed_0399</i> | YP_001190500                  |  | 3-hydroxybutyryl-CoA (chưa chắc chắn)                |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>Msed_0389</i> | YP_001190490                  |  | 3-hydroxybutyryl-CoA (chưa chắc chắn)                |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>Msed_1993</i> | YP_001192057                  |  | 3-hydroxybutyryl-CoA (chưa chắc chắn)                |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>fadB</i>      | P21177.2                      |  | 3-oxoaxetyl-CoA                                      |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>fadJ</i>      | P77399.1                      |  | 3-oxoaxetyl-CoA                                      |
| H | 1.2.1.b | 3-hydroxybutyryl-CoA | 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt) | 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt) |  |  |  |  | <i>Ald</i>       | AAT66436                      |  | butyryl-CoA                                          |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>sucD</i>      | NP_904963.1                   |  | succinyl-CoA                                         |
|   |         |                      |                                              |                                              |  |  |  |  | <i>bphG</i>      | BAA03892.1                    |  | axetaldehyt, propionaldehyt, butyraldehyt,           |

|   |         |                      |               |                                           |              |            |  |  |                                |
|---|---------|----------------------|---------------|-------------------------------------------|--------------|------------|--|--|--------------------------------|
|   |         |                      |               |                                           |              |            |  |  | isobutyraldehyt và formaldehyt |
|   |         |                      |               |                                           |              |            |  |  | malonyl-CoA                    |
|   |         |                      |               |                                           |              |            |  |  | malonyl-CoA, methylmalonyl-CoA |
| I | 1.1.1.c | 3-hydroxybutyryl-CoA | 1,3-butandiol | 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo rượu) | <i>adhE2</i> | AAK09379.1 |  |  | butanoyl-CoA                   |
|   |         |                      |               |                                           | <i>mcr</i>   | AAS20429.1 |  |  | malonyl-CoA                    |
|   |         |                      |               |                                           | <i>FAR</i>   | AAD38039.1 |  |  | axyl-CoA mạch dài              |

Bảng 38 (Tham chiếu: Fig.3)

| Bước | Mã phân loại EC | Cơ chất mong muốn    | Sản phẩm mong muốn   | Danh pháp Enzym                  | Danh pháp Gen | Số đăng ký GenBank (nếu sẵn có) | Vi sinh vật                                | Cơ chất đã biết                                          |
|------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|---------------|---------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| A    | 4.2.1.a         | 4-hydroxybutyryl-CoA | Crotonyl-CoA         | 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza | <i>abfD</i>   | YP_001396399.1                  | <i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555        | 4-hydroxybutyryl-CoA                                     |
|      |                 |                      |                      |                                  | <i>abfD</i>   | P55792                          | <i>Clostridium aminobutyricum</i>          | 4-hydroxybutyryl-CoA                                     |
|      |                 |                      |                      |                                  | <i>abfD</i>   | YP_001928843                    | <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATTC 33277 | 4-hydroxybutyryl-CoA                                     |
| B    | 4.2.1.a         | crotonyl-CoA         | 3-hydroxybutyryl-CoA | crotonaza                        | <i>crt</i>    | NP_349318.1                     | <i>Clostridium acetobutylicum</i>          | 3-hydroxybutyryl-CoA                                     |
|      |                 |                      |                      |                                  | <i>crtI</i>   | YP_001393856                    | <i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555        | 3-hydroxybutyryl-CoA                                     |
|      |                 |                      |                      |                                  | <i>crt</i>    | YP_001929291.1                  | <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATTC 33277 | ví dụ dựa trên sự tương đồng trình tự                    |
|      |                 |                      |                      |                                  | <i>paaA</i>   | NP_745427.1                     | <i>Pseudomonas putida</i>                  | enoyl-CoA, dẫn xuất cis-dihydrodiol của phenylaxetyl-CoA |
|      |                 |                      |                      |                                  | <i>paaB</i>   | NP_745426.1                     | <i>Pseudomonas putida</i>                  | enoyl-CoA, dẫn xuất cis-dihydrodiol của phenylaxetyl-CoA |

|   |          |                       |                                              |               |                  |                |                                     |                                                                                                              |
|---|----------|-----------------------|----------------------------------------------|---------------|------------------|----------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |          |                       |                                              |               | <i>phaA</i>      | ABF82233.1     | <i>Pseudomonas fluorescens</i>      | enoyl-CoA, dẫn xuất cis-dihydrodiol của phenylaxetyl-CoA                                                     |
|   |          |                       |                                              |               | <i>phaB</i>      | ABF82234.1     | <i>Pseudomonas fluorescens</i>      | enoyl-CoA, dẫn xuất cis-dihydrodiol của phenylaxetyl-CoA                                                     |
|   |          |                       |                                              |               | <i>maoC</i>      | NP_415905.1    | <i>Escherichia coli</i>             | enoyl-CoA, dẫn xuất cis-dihydrodiol của phenylaxetyl-CoA                                                     |
|   |          |                       |                                              |               | <i>paaF</i>      | NP_415911.1    | <i>Escherichia coli</i>             | enoyl-CoA, dẫn xuất cis-dihydrodiol của phenylaxetyl-CoA                                                     |
|   |          |                       |                                              |               | <i>paaG</i>      | NP_415912.1    | <i>Escherichia coli</i>             | enoyl-CoA, dẫn xuất cis-dihydrodiol của phenylaxetyl-CoA                                                     |
| C | 1.2.1. b | 3-hydroxybutyryl-CoA  | 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza (tạo aldehyt) |               | <i>Ald</i>       | AAT66436       | <i>Clostridium beijerinckii</i>     | butyryl-CoA                                                                                                  |
|   |          |                       |                                              |               | <i>sucD</i>      | NP_904963.1    | <i>Porphyromonas gingivalis</i>     | succinyl-CoA                                                                                                 |
|   |          |                       |                                              |               | <i>bphG</i>      | BAA03892.1     | <i>Pseudomonas sp</i>               | axetaldehyt, propionaldehyt, butyraldehyt, isobutyraldehyt và formaldehyt                                    |
|   |          |                       |                                              |               | <i>Msed_0709</i> | YP_001190808.1 | <i>Metallosphaera sedula</i>        | malonyl-CoA                                                                                                  |
|   |          |                       |                                              |               | <i>mcr</i>       | NP_378167      | <i>Sulfolobus tokodaii</i>          | malonyl-CoA, methylmalonyl-CoA                                                                               |
| D | 1.1.1. a | 3-hydroxybutyraldehyt | 3-hydroxybutyraldehyt reductaza              | 1,3-butandiol | <i>alrA</i>      | BAB12273.1     | <i>Acinetobacter sp. Strain M-1</i> | C2-C14 aldehyt                                                                                               |
|   |          |                       |                                              |               | <i>ADH2</i>      | NP_014032.1    | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>     | propionaldehyt, isobutyraldehyt, butyraldehyt, 2-metylbutyraldehyt, 3-metylbutyraldehyt, 2-phenylaxetaldehyt |
|   |          |                       |                                              |               | <i>yqhD</i>      | NP_417484.1    | <i>Escherichia coli</i>             | axetaldehyt,                                                                                                 |

|   |         |                          |               |                                                  |  |  |  |             |                                                                   |                                                                                            |
|---|---------|--------------------------|---------------|--------------------------------------------------|--|--|--|-------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |         |                          |               |                                                  |  |  |  |             | malondialdehyt,<br>propanaldehyt,<br>butanaldehyt, và<br>acrolein |                                                                                            |
|   |         |                          |               | <i>bdh I</i>                                     |  |  |  | NP_349892.1 | <i>Clostridium<br/>acetobutylicum</i>                             | butyraldehyt                                                                               |
|   |         |                          |               | <i>bdh II</i>                                    |  |  |  | NP_349891.1 | <i>Clostridium<br/>acetobutylicum</i>                             | butyraldehyt                                                                               |
|   |         |                          |               | <i>4hbd</i>                                      |  |  |  | YP_726053.1 | <i>Ralstonia eutropha<br/>H16</i>                                 | succinat<br>semialdehyt                                                                    |
|   |         |                          |               | <i>ADHI</i>                                      |  |  |  | AAR91477.1  | <i>Geobacillus<br/>thermoglucosidasius<br/>M10EXG</i>             | etanol, 1-butanol,<br>1-pentanol,<br>1-heptanol,<br>1-hexanol,<br>1-octanol,<br>2-propanol |
|   |         |                          |               | <i>mmsb</i>                                      |  |  |  | P28811.1    | <i>Pseudomonas<br/>aeruginosa</i>                                 | 3-hydroxy<br>butyraldehyt, malonic<br>semialdehyt,<br>metylmalonat,<br>semialdehyt         |
|   |         |                          |               | <i>P84067</i>                                    |  |  |  | P84067      | <i>Thermus thermophilus</i>                                       | metylmalonat<br>semialdehyt                                                                |
| E | 1.1.1.c | 3-hydroxybutyryl-<br>CoA | 1,3-butandiol | 3-hydroxybutyryl-<br>CoA reductaza (tạo<br>rượu) |  |  |  | AAK09379.1  | <i>Clostridium<br/>acetobutylicum</i>                             | butanoyl-CoA                                                                               |
|   |         |                          |               | <i>mcr</i>                                       |  |  |  | AAS20429.1  | <i>Chloroflexus<br/>aurantiacus</i>                               | malonyl-CoA                                                                                |
|   |         |                          |               | <i>FAR</i>                                       |  |  |  | AAD38039.1  | <i>Simmondsia chinensis</i>                                       | axyl-CoA mạch dài                                                                          |

Mặc dù sáng chế được mô tả với việc tham khảo đến các phương án được bộc lộ ở đây, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng xác định được rằng các ví dụ cụ thể và các nghiên cứu chi tiết nêu trên đây chỉ để minh họa sáng chế. Cần hiểu rằng, các biến đổi khác nhau có thể được tạo mà không ra khỏi ý tưởng của sáng chế. Do đó, sáng chế chỉ được giới hạn bởi bộ yêu cầu bảo hộ dưới đây.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật không có trong tự nhiên có con đường 1,3-butandiol (1,3-BDO), trong đó vi sinh vật không có trong tự nhiên này bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa enzym crotonaza, trong đó crotonaza này xúc tác phản ứng hydrat hóa crotonyl-CoA để tạo ra 3-hydroxybutyryl-CoA.
2. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 1, trong đó crotonaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crtI*, *ech*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD*, *Msed\_1220*, *fadA*, *fadB*, *fadI*, *fadJ*, và *fadR*.
3. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vi sinh vật này còn bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa enzym 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo rượu.
4. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 3, trong đó 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo rượu này được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *adhE*, *adhE2*, *mcr*, *Rcas\_2929*, *NAP1\_02720*, *MGP2080\_00535*, và *FAR*.
5. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vi sinh vật này còn bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa enzym 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo aldehyt hoặc 3-hydroxy-butylaldehyt reductaza.
6. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 5, bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo aldehyt và ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa enzym 3-hydroxybutylaldehyt reductaza..
7. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 5 hoặc 6, trong đó 3-hydroxybutylaldehyt reductaza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdh I*, *bdh II*, *adhA*, *4hbd*, *adhI*, *P84067*, *mmsb*, *dhat*, và *3hidh*.
8. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 5 hoặc 6, trong đó 3-hydroxybutyryl-CoA reductaza tạo aldehyt được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao *acr1*, *sucD*, *bphG*, *bld*, *adhE*, *Msed\_0709*, *mcr*, *asd-2*, *Saci\_2370*, *Ald*, và *eutE*:

9. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, còn bao gồm ít nhất một axit nucleic ngoại sinh mã hóa enzym 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza.
10. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm 9, trong đó 4-hydroxybutyryl-CoA dehydrataza được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP\_02294*, *ANACOL\_02527*, *NtherDRAFT\_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crtI*, *ech*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD*, *Msed\_1220*, *fadA*, *fadB*, *fadI*, *fadJ*, và *fadR*.
11. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó vi sinh vật này bao gồm hai, ba, bốn hoặc năm axit nucleic ngoại sinh, mỗi axit nucleic ngoại sinh mã hóa một enzym của con đường 1,3-BDO.
12. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó ít nhất một axit nucleic ngoại sinh là axit nucleic khác loại.
13. Vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó vi sinh vật không có trong tự nhiên này ở trong môi trường nuôi cấy gần như kỵ khí.
14. Phương pháp sản xuất 1,3-BDO, bao gồm nuôi cấy vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong các điều kiện và khoảng thời gian đủ để sản xuất ra 1,3-BDO.
15. Phương pháp theo điểm 14, còn bao gồm bước tách 1,3-BDO ra khỏi các thành phần khác trong dịch nuôi cấy.
16. Phương pháp theo điểm 14, trong đó bước tách bao gồm chiết, chiết lỏng-lỏng liên tục, bay hơi qua màng, lọc qua màng, tách bằng màng, thẩm thấu ngược, điện thẩm tách, chưng cất, kết tinh, ly tâm, lọc chiết, sắc ký trao đổi ion, sắc ký rây phân tử, sắc ký hấp phụ, hoặc siêu lọc.
17. Phương pháp theo điểm 14, trong đó bước tách bao gồm chưng cất.
18. Phương pháp theo điểm 14, còn bao gồm bước chuyển hóa hóa học 1,3-BDO thành hợp chất, polyme, hoặc sản phẩm khác.
19. Môi trường nuôi cấy bao gồm vi sinh vật không có trong tự nhiên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BURGARD, ANTHONY P.

BURK, MARK J.

STERHOUT, ROBIN E.

PHARKYA, PRITI

<120> VI SINH VẬT KHÔNG CÓ TRONG TỰ NHIÊN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT 1,3-BUTANDIOL SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

<130> 066662-0297

<140> 12/772,114

<141> 2010-04-30

<150> 61/174,473

<151> 2009-04-30

<160> 1

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> *Euglena gracilis*

<400> 1

Met Thr Tyr Lys Ala Pro Val Lys Asp Val Lys Phe Leu Leu Asp Lys

1 5 10 15

Val Phe Lys Val

20

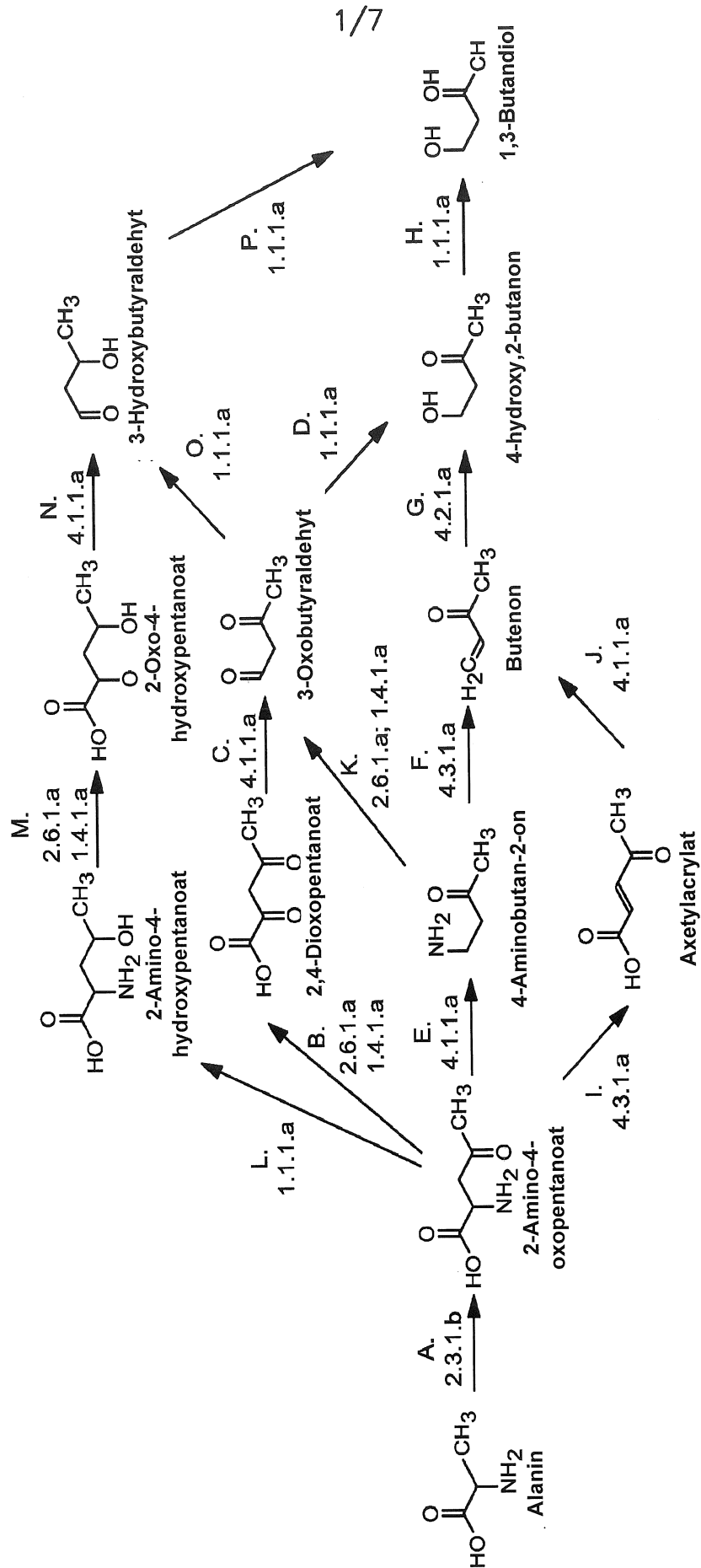
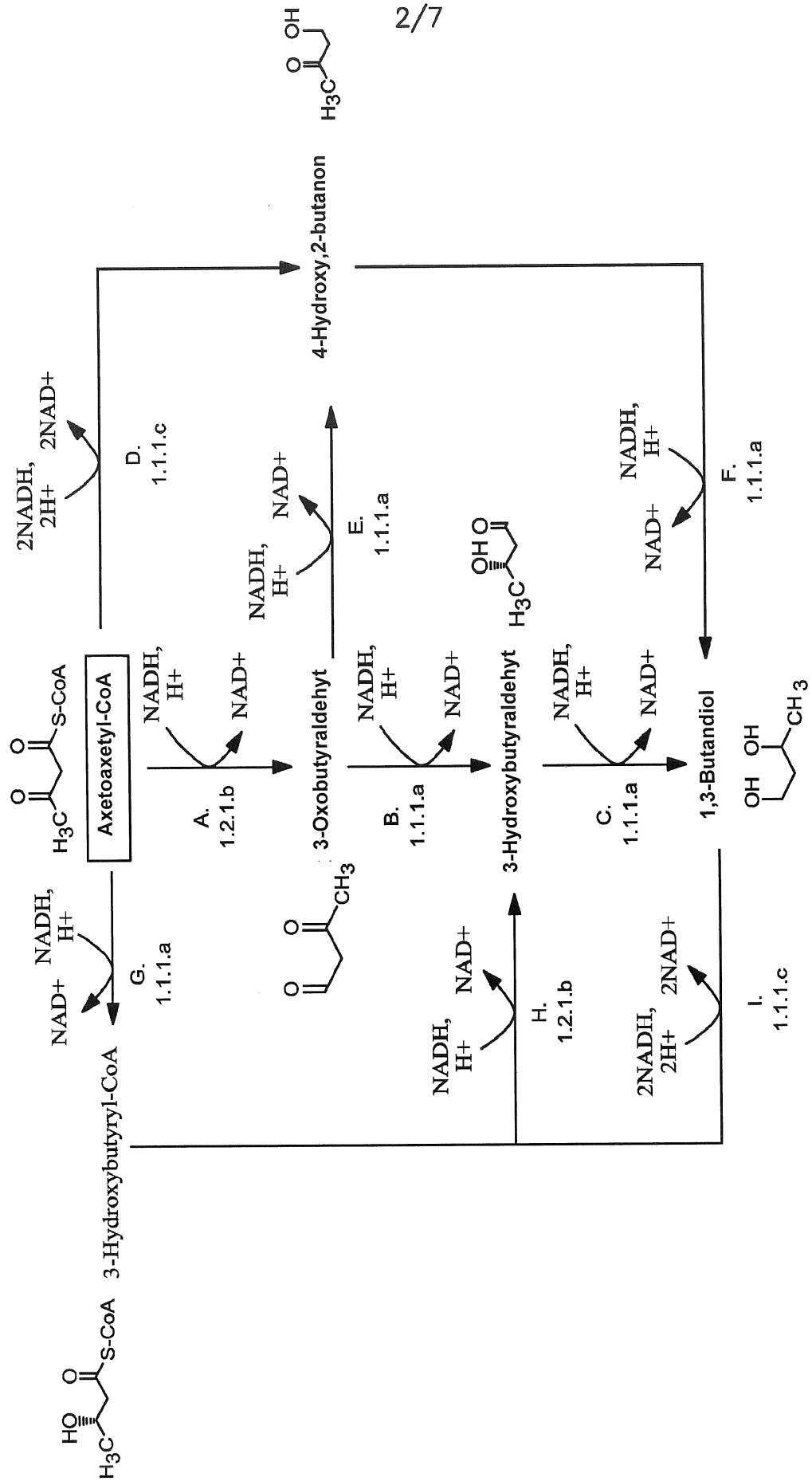


FIG. 1

**FIG. 2**

3/7

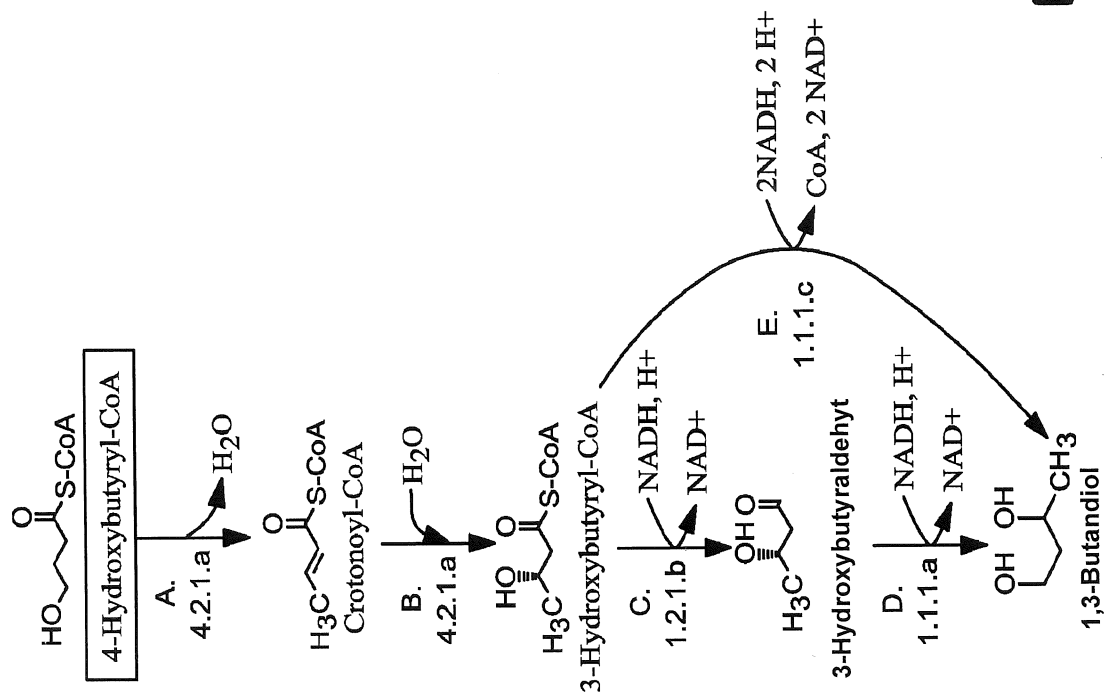


FIG. 3

4/7

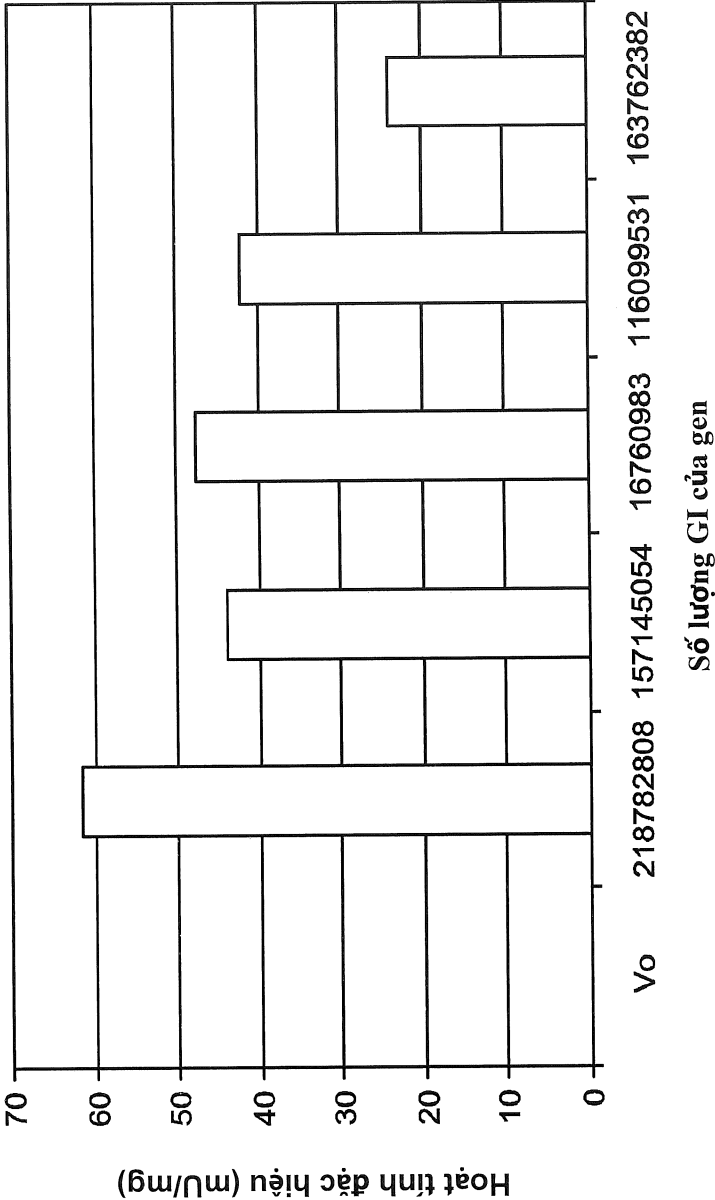


FIG. 4

5/7

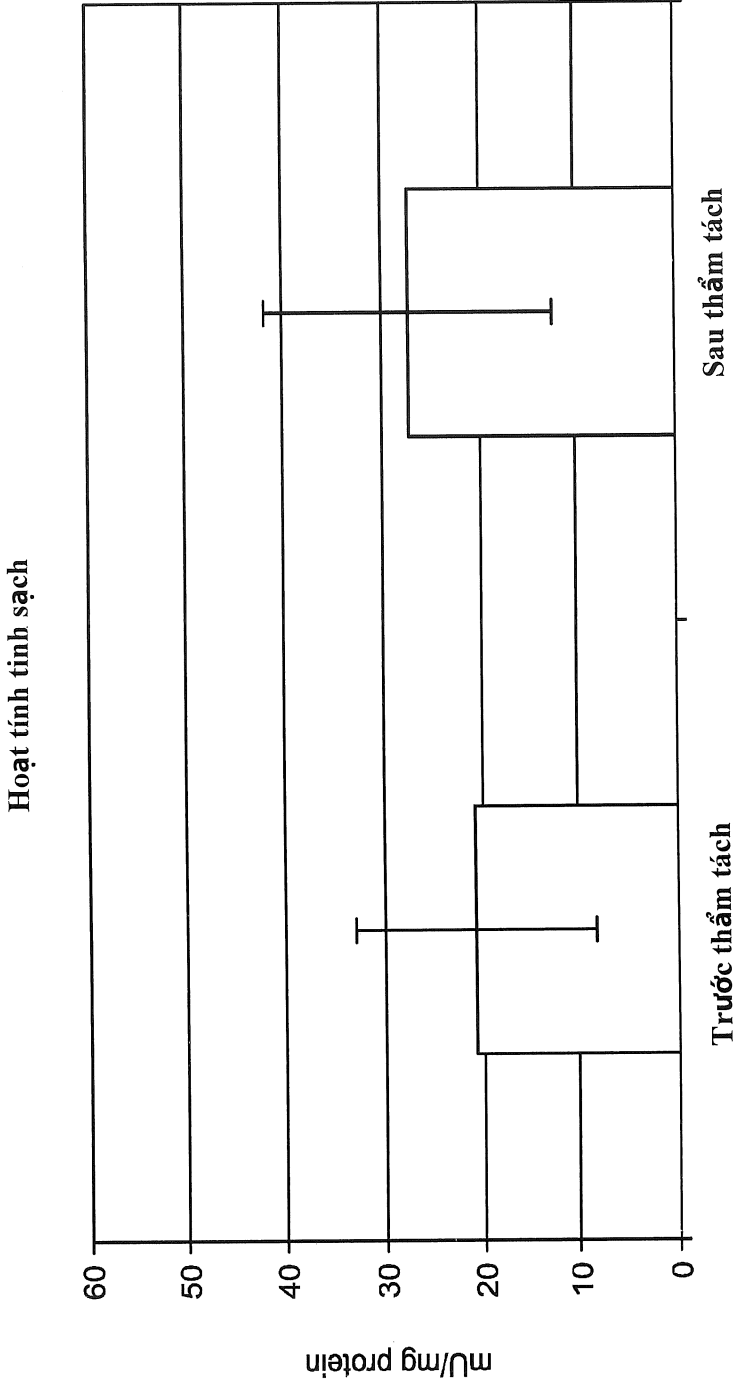


FIG. 5

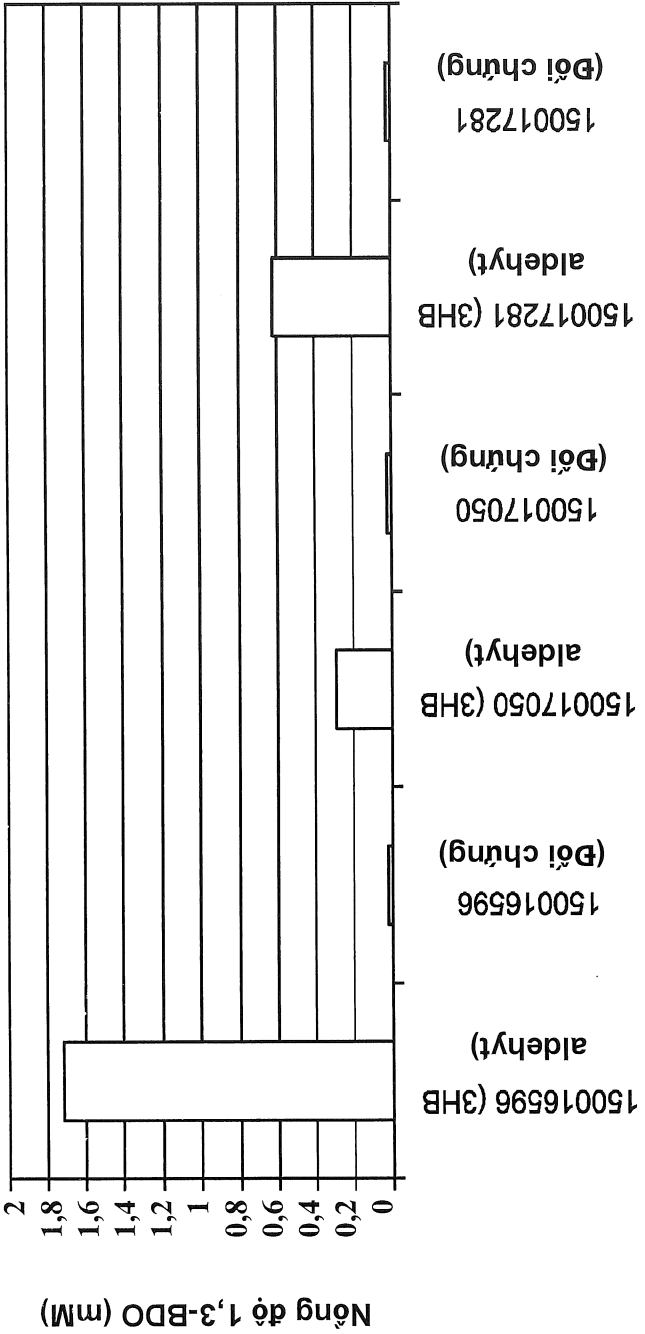


FIG. 6

7/7

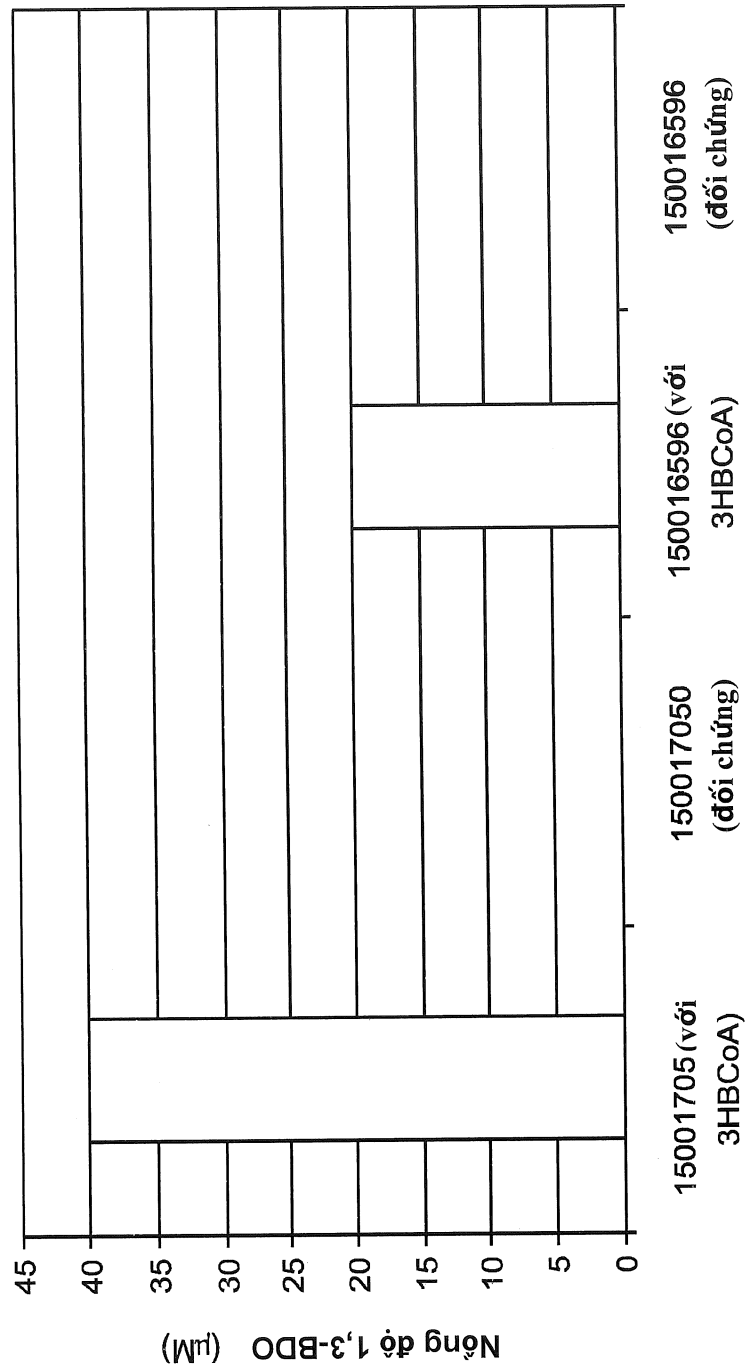


FIG. 7