



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11) 
1-0021847

(51)⁷ **C12P 7/46, C12R 1/01, C12N 9/10, C12P 7/18, 7/42, C12N 9/16** (13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2013-02105 | (22) | 13.12.2011 | | |
| (86) | PCT/US2011/064598 | 13.12.2011 | (87) | WO2012/082720 | 21.06.2012 |
| (30) | 61/459,446 | 13.12.2010 | US | | |
| (45) | 25.10.2019 | 379 | (43) | 25.04.2014 | 313 |
| (73) | MYRIANT CORPORATION (US)
66 Cummings Park, Woburn, MA 01801, United States of America | | | | |
| (72) | DOLE, Sudhanshu (IN), YOCUM, R., Rogers (US), HERMANN, Theron (US), YU, Xiaohui (CN) | | | | |
| (74) | Công ty Luật TNHH T&G (TGVN) | | | | |
-

(54) **VI KHUẨN ESCHERICHIA COLI ĐƯỢC BIẾN ĐỔI GEN SẢN XUẤT AXIT SUXINIC VÀ CÁC HOÁ CHẤT KHÁC**

(57) Sáng chế đề cập đến vi khuẩn biến đổi gen tạo ra ít nhất 20 gam trong một lít hóa chất hữu cơ được lựa chọn từ nhóm gồm axit suxinic, axit fumaric, axit malic, và 1,4-butandiol, trong môi trường tối thiểu, vi khuẩn nêu trên chứa ít nhất một gen ngoại sinh mã hóa chức năng sử dụng sucroza khác với thành phần đặc hiệu với sucroza của PTS. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp lên men sử dụng các hóa chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực sản xuất các hóa chất hữu cơ chuyên dụng và thông thường bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học đã được cải biến để tăng khả năng sử dụng nguyên liệu chứa sucroza của chúng. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến sự biến đổi gen cần cho sự vận chuyển và chuyển hóa sucroza để sản xuất axit succinic và các hóa chất khác bằng phương pháp sinh học.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Một số lượng lớn hóa chất hữu cơ hiện nay có nguồn gốc từ nguyên liệu hóa dầu. Có sự quan tâm ngày càng tăng về việc sản xuất nhiều hợp chất hữu cơ có nguồn gốc hóa dầu này bằng các quy trình lên men sinh học bằng cách sử dụng nguyên liệu tái chế. Danh mục các hợp chất hữu cơ có thể có nguồn gốc từ nguyên liệu tái chế bao gồm 1,4-điaxit (succinic, fumaric, malic, glucaric, malonic, và maleic), axit 2,5-furan dicarboxylic, axit propionic, axit 3-hydroxy propionic, axit aspartic, axit glucaric, axit glutamic, axit itaconic, axit levulinic, 3-hydroxybutyrolacton, glyxerol, sorbitol, xylitol, arabinitol, và các butandiol như 1,4 butandiol, 1,3-butandiol, và 2,3-butandiol. Bên cạnh các hợp chất này, nhiều loại hợp chất hữu cơ khác bao gồm, nhưng không bị giới hạn trong, axit amin, vitamin, rượu (như etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, và rượu cao), axit béo, este của axit béo, hydrocacbon, isoprenoit, turpen, carotenoit, và amin cũng có thể được sản xuất bằng cách sử dụng nguyên liệu tái chế. Trong bản mô tả này, hợp chất bất kỳ như vậy có thể được gọi là “hợp chất mong muốn”. Tuy nhiên, đối với hầu hết các hợp chất mong muốn này, quy trình lên men có ý nghĩa thương mại sử dụng sucroza làm nguồn cacbon vẫn chưa được phát triển.

Trong các hợp chất hữu cơ có thể có nguồn gốc từ nguyên liệu tái chế này, axit succinic có ý nghĩa đặc biệt. Nhiều loài vi sinh vật bao gồm *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* và *Brevibacterium flavum*, *Mannheimia succiniproducens*, *Basfia succiniproducens* và *Anaerobiospirillum succiniproducens* đã được xử lý di truyền để sử dụng làm chất xúc tác sinh học để sản xuất axit succinic

bằng cách sử dụng nguyên liệu tái chế. Các chất xúc tác sinh học này đã được chứng minh là tạo ra axit succinic với hiệu suất và năng suất rất cao. Hiện nay, sự sản xuất axit succinic bằng cách sử dụng các chất xúc tác sinh học này được thực hiện bằng cách sử dụng dextroza làm nguồn cacbon hữu cơ.

Cần phát triển các quy trình sử dụng nguyên liệu tái chế rẻ tiền hơn để làm cho sự sản xuất sinh học axit succinic trở nên cạnh tranh được với sự sản xuất axit succinic từ nguyên liệu hóa dầu bằng cách sử dụng các quy trình hóa học thuần túy. Các nỗ lực được thực hiện để sử dụng nguồn cacbon có nguồn gốc từ sự thủy phân các chất xenluloza làm nguyên liệu để sản xuất axit succinic bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học. Tuy nhiên, kỹ thuật sản xuất nguyên liệu từ chất xenluloza dùng cho lên men sinh học hiện nay còn rất chưa hoàn thiện. Vì vậy, có nhu cầu cấp bách về nguyên liệu có hiệu quả thích hợp cho sự sản xuất sinh học axit succinic. Giá thành của các loại đường khác nhau thay đổi theo thời gian và vị trí địa lý. Ở nhiều nơi trên thế giới, sucroza rẻ hơn glucoza trong hầu hết hoặc tất cả thời gian, đặc biệt là ở các vùng nhiệt đới mà ở đó cây mía phát triển tốt.

Mật rỉ đường có nguồn gốc từ quá trình chế biến cây mía là nguyên liệu có hiệu quả cho sự lên men công nghiệp bất kỳ. Mật rỉ đường rẻ tiền, có thể mua dễ dàng, và có nhiều. Mật rỉ đường giàu sucroza và có cần phát triển chất xúc tác sinh học có khả năng sử dụng sucroza làm nguồn cacbon để sản xuất axit succinic bằng lên men. Trong một số trường hợp, tốt hơn là sử dụng sucroza tinh khiết làm nguồn cacbon trong lên men, ví dụ, khi sản phẩm lên men cần có phải có độ tinh khiết cao, và trong đó là có hiệu quả hơn khi loại bỏ hợp chất không phải đường ra khỏi mật rỉ đường trước khi lên men. Sucroza tinh khiết ở dạng “đường ăn” đã được sản xuất trong nhiều năm bằng các phương pháp đã được biết rõ, và chất tương đương với nó cũng có thể được sử dụng làm nguồn cacbon theo sáng chế. Hơn nữa, sự sử dụng mật rỉ đường hoặc sucroza bằng chất xúc tác sinh học có ý nghĩa công nghiệp lớn hơn vì mật rỉ đường hoặc sucroza có thể được sử dụng để sản xuất nhiều loại hóa chất hữu cơ cũng như khối nguyên bào. Vì vậy, sáng chế có ứng dụng rộng hơn trong công nghiệp lên men nói chung ngoài sự sản xuất axit succinic bằng lên men. Môi trường chứa sucroza có thể bao gồm nước ép hoặc mật rỉ đường có nguồn gốc từ cây mía, củ cải đường, cao lương đường, hoặc nguyên liệu từ thực vật chứa sucroza khác bất kỳ.

Cơ chế vận chuyển sucroza và các đường khác thường hay được tìm thấy ở các vi khuẩn dựa vào hệ phosphotransferaza (phosphotransferase system: PTS). PTS cấu tạo từ các protein kết hợp hai mức năng lượng, enzym I và HPr, và một số protein của enzym II đặc hiệu với đường hoặc phức của protein, nó thường được cấu tạo từ ba miền protein, EIIA, EIIB và EIIC. Cấu tạo của miền EII khác nhau giữa các vi khuẩn. EII có thể được cấu tạo từ một protein dung hợp hoặc miền dung hợp và không dung hợp khác nhau. Sự di chuyển của đường cụ thể xuyên qua màng được hỗ trợ bởi miền xuyên màng. Tuy nhiên, nó là phức của ba miền hoặc protein của enzym, cùng hoạt động, nó tạo ra sự vận chuyển và sự phosphoryl hóa chất đường, dẫn đến sự tích lũy nội bào của hydrat cacbon được phosphoryl hóa (Neidhardt và Curtiss, 1996).

Có các cơ chế khác để vận chuyển sucroza vi khuẩn ngoài PTS. Các permeaza đường không phụ thuộc vào PTS này hỗ trợ sự tích lũy sucroza mà không cần cải biến hóa học. Chúng bao gồm hệ thống đồng vận chuyển cùng chiều cation hòa tan, như tác nhân đồng vận chuyển cùng chiều ScrT trong operon sucroza ở *Bifidobacterium lactis* và tác nhân vận chuyển CscB của chủng *E. coli* W. Các hệ vận chuyển đặc hiệu với sucroza này thường kết tụ với gen dị hóa và điều hòa với sự sắp xếp khác nhau ở các vi khuẩn khác nhau.

Có một số ví dụ trong tài liệu mô tả quá trình tách dòng gen sử dụng sucroza và sự cấy ghép các gen như vậy vào sinh vật về bản chất không chứa các gen nêu trên. Có một số ví dụ về tách dòng và chuyển cả gen sử dụng sucroza phụ thuộc vào PTS lẫn không phụ thuộc vào PTS. Tuy nhiên, mỗi ví dụ này có ít nhất một đặc điểm làm cho nó trở nên không mong muốn khi sử dụng trong thiết đặt thương mại. Ví dụ, sự duy trì gen sử dụng sucroza trên plasmid sao chép (như plasmid pScr1 được mô tả trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 2008/0274526 A1) là không mong muốn do plasmid có thể không ổn định (Shukla và cộng sự, 2004) hoặc bị mất đi trong nhiều thế hệ sinh trưởng qui mô lớn, và nó thường cần có kháng sinh để duy trì. Ngoài ra, sự biểu hiện gen của plasmid có nhiều bản sao có thể là quá mức, dẫn đến tổn năng lượng và nguyên liệu, hoặc ức chế sự sinh trưởng.

Gen sử dụng sucroza không phụ thuộc vào PTS của nhiễm sắc thể *cscAKB* của *E. coli* EC3132 đã được gắn vào trong nhiễm sắc thể của chủng có nguồn gốc từ *E. coli* K-12 (patent Mỹ số 6.960.455). Nhưng operon đặc biệt này được biết là tương đối

không có hiệu quả trong việc tạo ra sự sử dụng sucroza, đặc biệt là ở các nồng độ sucroza thấp, trong đó thời gian nhân đôi bằng 20 giờ (1200 phút) (Bockmann và cộng sự, 1992). Sự so sánh tính tương đồng của trình tự ADN của vùng operon *cscRAKB* của EC3132 mà với nó là nhân tố sử dụng sucroza có hiệu quả, *E. coli* ATCC 9637 (Shukla và cộng sự, 2004) bằng cách sử dụng chương trình Megalign của phần mềm DNASTAR bộc lộ chỉ số độ tương tự bằng 98,1. Vì vậy, có nhiều khác biệt giữa hai operon *csc*, và các khác biệt này là rải rác khắp operon. Nhiều đột biến điểm trong operon EC3132 gây ra sự thay đổi không bảo toàn trong trình tự protein, và một số đột biến có trong vùng khởi đầu, do đó nó phải là trường hợp operon của EC3132 bị khuyết tật đơn giản do một hoặc hơn một đột biến này. Thể đột biến ngẫu nhiên sinh trưởng nhanh hơn theo thời gian nhân đôi trên sucroza giảm xuống 50 phút có thể được phân lập từ EC3132, nhưng khi operon *cscAKB* đột biến được cấy ghép trong chủng K-12, thời gian nhân đôi trong môi trường sucroza tăng trở lại cao nhất trong 75 phút (Jahreis và cộng sự, 2002). Không operon nào trong số các operon *csc* đột biến của EC3132 làm thay đổi trình tự ADN trở thành giống operon hiệu dụng ATCC 9637 hơn. Như vậy, có thể là operon được bộc lộ bởi Jahreis và cộng sự (2002) không mong muốn bằng operon ATCC 9637.

Cách tiếp cận khác đã được đề xuất để cho phép sử dụng sucroza là việc thiết kế một cách đơn giản chủng để tiết ra invertaza (Lee và cộng sự, 2010a). Trong trường hợp này, invertaza của *Mannheimia succiniproducens* được chứng minh là tốt hơn invertaza của *E. coli* W, không dựa vào gợi ý từ việc sử dụng invertaza *E. coli* W. Hơn nữa, ở vi khuẩn, cách tiếp cận này vốn đã ít hiệu quả hơn việc nhập sucroza trước khi phân tách nó, vì sau khi phân tách glucoza và fructoza bằng invertaza, hai phân tử đường phải được nhận chứ không phải là chỉ một, và việc này cần nhiều năng lượng hơn để thực hiện. Hơn nữa, trong ví dụ của kỹ thuật trước đây này, trong khi sự bắt đầu lên men với 20 g/l sucroza, fructoza ngoài được tích lũy lên đến trên 10 g/l, và mất 50 giờ để fructoza ngoài này được sử dụng hoàn toàn (Lee và cộng sự, 2010b). Vì vậy, mặc dù chủng sử dụng sucroza được bộc lộ, hệ thống có đặc tính thực hiện không có ý nghĩa thương mại. Sự tiết ra fructoza bởi chủng *E. coli* sinh trưởng trong sucroza là vấn đề chung, và fructoza còn lại ở cuối thời gian lên men mong muốn, nó thường bằng 48 giờ hoặc ít hơn, là không mong muốn. Vì vậy, cần có vi sinh vật có thể lên

men sucroza thành sản phẩm mong muốn với hàm lượng có ý nghĩa thương mại, nó thường lớn hơn 20 gam trên lít, mà không cho phép lớn hơn 2 gam trên lít fructoza còn lại sau thời gian lên men bằng 48 giờ hoặc ít hơn.

Chủng *E. coli* SZ63 và SZ85 được xử lý trước đó để tạo ra D-lactat tinh khiết về mặt quang học từ đường hexoza và pentoza. Để mở rộng phạm vi chất nền chứa cả sucroza, operon *cscR'AKB* được tách dòng và được đặc trưng bởi *E. coli* KO11, dẫn xuất của *E. coli* W (Shukla và cộng sự, 2004). Operon sinh ra ở plasmit thu được được biểu hiện chức năng trong SZ63, nhưng không ổn định trong SZ85.

US 6,960,455 bộc lộ phương pháp sản xuất axit amin bằng cách sử dụng chủng có nguồn gốc từ *E. coli* K-12 được tải nạp với operon *cscRAKB* của chủng EC3132 được đặt ở vị trí *dsdA* trong nhiễm sắc thể. Kết quả của việc chèn operon *cscRKAB* ở vị trí này trong nhiễm sắc thể, chủng thu được có thể không dị hóa D-serin được. Như đã chỉ ra ở trên, gen *csc* được sử dụng trong kỹ thuật trước đây này có nguồn gốc từ operon EC3132 khiếm khuyết, nó sinh trưởng kém hơn trong nồng độ sucroza thấp (Bockmann và cộng sự, 1992; Jahreis và cộng sự, 2002). Chủng thu được chứa gen *cscR*, nó mã hóa gen kìm hãm, do đó chủng được dự kiến là gần tối ưu cho việc sử dụng sucroza, đặc biệt là có glucoza, nó có thể được dự kiến là gây ra sự kìm hãm gen *cscAKB* (Jahreis và cộng sự, 2002; Shukla và cộng sự, 2004). Mật rỉ đường thường chứa một ít glucoza. Không có nỗ lực nào được đề cập để hiệu chỉnh khiếm khuyết bất kỳ trong số các khiếm khuyết vốn có trong operon *csc* của EC3132 trong patent Mỹ số 6.960.455. Hơn nữa, sự sản xuất các hóa chất khác với axit amin, như suxinat không được đề cập đến trong sáng chế này.

Patent Mỹ số 7.179.623 bộc lộ chủng cấu tạo từ chủng không đồng hóa sucroza trong đó chủng nêu trên chứa gen sucroza PTS của *E. coli* VKPM B-7915 (gen *scrKYABR*), nhưng mặt khác, sáng chế này không đề cập đến sự sản xuất các hóa chất khác với axit amin, và hệ phụ thuộc vào PTS được bảo hộ trong bản mô tả này không phải là tối ưu cho sự sản xuất các hóa chất có nguồn gốc từ phosphoenol pyruvat (phosphoenol pyruvate: PEP).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chất xúc tác sinh học và phương pháp sử dụng nguyên liệu sinh học tái chế chứa sucroza để sản xuất sản phẩm thương mại quan trọng bằng lên men, ví dụ, nhưng không bị giới hạn trong hóa chất chuyên dụng và thông thường. Cụ thể là, sáng chế là hữu dụng để sản xuất axit hữu cơ bằng lên men bằng cách sử dụng nguyên liệu tái chế chứa sucroza. Cụ thể hơn, sáng chế là hữu dụng để sản xuất axit suxinic bằng lên men từ nguyên liệu tái chế chứa sucroza bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học được cấu tạo để có sự sử dụng sucroza được cải thiện. Nguyên lý của sáng chế có thể được áp dụng cho nhiều hợp chất hóa học cần thiết khác có thể được sản xuất bằng lên men, cụ thể là axit fumaric và axit malic.

Theo sáng chế, gen mã hóa protein có trong sự vận chuyển và chuyển hóa sucroza có thể được đưa vào trong nhiều loại chất xúc tác sinh học để tạo ra khả năng mới cho chất xúc tác sinh học để sử dụng sucroza làm nguồn cacbon và năng lượng trong môi trường lên men, hoặc để tăng hoặc cải thiện khả năng đã có của chất xúc tác sinh học để sự vận chuyển và chuyển hóa sucroza.

Theo một phương án, sáng chế cải thiện khả năng nhận và chuyển hóa sucroza bằng chất xúc tác sinh học đã được cấu tạo trước đó để sản xuất hóa chất như axit suxinic với lượng lớn về thương mại, trong đó chất xúc tác sinh học nêu trên ban đầu không có khả năng sử dụng có hiệu quả sucroza làm nguồn cacbon hữu cơ để sản xuất hóa chất có ý nghĩa thương mại bằng lên men như axit suxinic. Theo một khía cạnh của sáng chế, sự không có khả năng hoặc khả năng kém của chất xúc tác sinh học ban đầu sử dụng sucroza bắt nguồn từ sự không có gen mã hóa sự vận chuyển và chuyển hóa sucroza. Theo khía cạnh khác, sự không có khả năng của chất xúc tác sinh học sử dụng sucroza là do hậu quả không định trước của việc xử lý di truyền nhằm cải thiện hiệu suất và năng suất tạo ra axit suxinic trong môi trường lên men trong đó phần lớn nguồn cacbon hữu cơ khác với sucroza. Theo khía cạnh khác, sự không có khả năng của chất xúc tác sinh học sử dụng sucroza là do một hoặc hơn một khiếm khuyết trong hệ sử dụng sucroza tự nhiên mà nó làm cho hệ thống không có khả năng đạt được sự sử dụng sucroza có ý nghĩa thương mại để lên men bằng cách sử dụng môi trường chứa sucroza. Sáng chế đề xuất giải pháp di truyền để khắc phục khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh này về sự thiếu khuyết di truyền trong việc sử dụng sucroza.

Theo phương án khác, sáng chế nhằm tăng khả năng sử dụng sucroza của chất xúc tác sinh học dùng để sản xuất axit succinic. Sáng chế tăng sử dụng sucroza bằng chất xúc tác sinh học bằng cách cải thiện khả năng vận chuyển và chuyển hóa sucroza thông qua sự xử lý di truyền. Theo một khía cạnh của sáng chế, khả năng vận chuyển sucroza đã có của chất xúc tác sinh học được cải thiện nhờ sự đưa vào của gen mã hóa protein có trong cơ chế phụ thuộc vào PTS để hấp thụ sucroza. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất gen bổ sung mã hóa protein liên quan đến hệ sucroza permeaza không phụ thuộc vào PTS như hệ sucroza permeaza đồng vận chuyển cùng chiều cation để tăng khả năng vận chuyển sucroza đã có của chất xúc tác sinh học. Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế tăng sử dụng sucroza bằng cách tạo ra gen mã hóa sự chuyển hóa của sucroza được vận chuyển vào trong tế bào.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất axit succinic trong môi trường chứa sucroza sử dụng chất xúc tác sinh học mà nó vẫn giữ lại hệ phosphotransferaza phụ thuộc vào PTS chức năng để hấp thụ đường.

Sự sử dụng sucroza để sản xuất axit succinic bằng chất xúc tác sinh học bao gồm sự tham gia của nhiều protein có nhiệm vụ biến đổi của sucroza thành ba chất trung gian chứa cacbon mà chúng có thể đi vào trong chu trình axit tricarboxylic và cuối cùng tạo ra axit succinic. Theo một khía cạnh, sáng chế tăng cường bằng cách biến đổi gen hoạt tính của một hoặc hơn một enzym có trong sự biến đổi của sucroza thành sáu chất trung gian chứa cacbon mà chúng có thể còn được chuyển hóa bằng quá trình hóa sinh thông thường. Ngoài tác nhân vận chuyển sucroza, đích của enzym thích hợp cho việc xử lý di truyền được lựa chọn từ danh mục gồm sucroza phosphorylaza, sucroza hydrolaza (invertaza), sucroza-6-phosphat hydrolaza, glucoza kinaza (glucokinaza), và fructoza kinaza (fructokinaza).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất axit succinic bằng cách sử dụng sucroza làm nguyên liệu tái chế. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất axit succinic trong môi trường chứa sucroza sử dụng chất xúc tác sinh học có hoạt tính giảm trong hệ phosphotransferaza phụ thuộc vào PEP.

Theo một khía cạnh, sáng chế bộc lộ sự bổ sung gen cho sinh vật như cây ghép hoặc tăng hoạt tính của một hoặc hơn một protein và/hoặc enzym có trong sự nhận và

sự biến đổi của sucroza thành chất chuyển hóa trung gian như fructoza 1,6-bisphosphat mà nó có thể còn được chuyển hóa nhờ tế bào. Gen mã hóa protein hoặc enzym liên quan thích hợp cho sự xử lý di truyền theo sáng chế là một gen, hoặc sự kết hợp của hơn một gen được lựa chọn từ danh mục gồm các gen mã hóa tác nhân nhập sucroza phụ thuộc vào PTS (protein PTS thường được gọi là enzym II^{scr} , hoặc EII^{scr} , nó hoạt động cùng với các protein PTS khác để thực hiện sự nhận và phosphoryl hóa sucroza để tạo ra sucroza-6-phosphat tế chất bào), sucroza-6-phosphat hydrolaza, sucroza permeaza (permeaza không phụ thuộc vào PTS vận chuyển sucroza vào trong tế bào mà không cần sự phosphoryl hóa đi kèm), invertaza hoặc sucroza hydrolaza, sucroza phosphorylaza, glucoza kinaza (glucokinaza), fructoza kinaza (fructokinaza), hexoza-phosphat isomeraza, và phosphofructo kinaza (fructoza-1-phosphat kinaza).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất axit suxinic hoặc các hóa chất khác bằng cách sử dụng sucroza làm nguyên liệu tái chế. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất axit suxinic trong môi trường chứa sucroza sử dụng chất xúc tác sinh học có hoạt tính giảm trong ít nhất một protein của hệ PTS nguyên gốc của sinh vật so với hoạt tính của chủng ông bà hoặc cha mẹ. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất axit suxinic hoặc hóa chất khác trong môi trường chứa sucroza sử dụng chất xúc tác sinh học mà nó vẫn giữ lại hệ phosphotransferaza phụ thuộc vào PTS đủ chức năng để hấp thụ đường.

Các khía cạnh mới của sáng chế này là gen *cscABK* của tác nhân sử dụng sucroza không gây bệnh và mạnh khỏe đã được gắn ổn định vào trong nhiễm sắc thể của vi khuẩn, sao cho vi khuẩn được cấu tạo mới có thể tạo ra sản phẩm thương mại theo quy trình khả thi có tính thương mại. Hàm lượng sản phẩm từ sucroza ít nhất bằng hàm lượng được tạo ra bởi sinh vật cha mẹ từ glucoza, và hiệu suất sản xuất lớn hơn 0,8 g/g đường. Operon *cscABK* được gắn ở vị trí trong nhiễm sắc thể để không ảnh hưởng đến khía cạnh có liên quan bất kỳ về sự sinh trưởng hoặc sự tạo ra sản phẩm mong muốn.

Các lợi thế bổ sung của sáng chế này sẽ trở nên rõ ràng ngay trên cơ sở phần mô tả dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị động lực học của sự sử dụng sucroza và sự sản xuất axit suxinic bằng chủng SD14 của *E. coli* sinh trưởng trong môi trường tối thiểu được bổ sung 10% sucroza (theo khối lượng). Trên các hình vẽ từ 1 đến 5, sự lên men được thực hiện trong thiết bị lên men sinh vật ưa ít oxy cỡ nhỏ như được mô tả bởi Jantama và cộng sự (2008a), ngoại trừ một điểm là thể tích bằng 300 ml và sự trung hòa được thực hiện bằng dung dịch chứa 2,4 M kali cacbonat và 1,2 M kali hydroxit.

Fig.2 là đồ thị động lực học của sự sử dụng sucroza trong ba thử nghiệm khác nhau với các nồng độ khác nhau của nồng độ sucroza ban đầu. Nồng độ ban đầu 100 g/l, 150 g/l và 200 g/l sucroza được sử dụng. Chủng SD14 của *E. coli* được sử dụng trong các thử nghiệm này.

Fig.3 là đồ thị động lực học của sự thay đổi về nồng độ glucoza trong môi trường sinh trưởng trong sự sản xuất axit suxinic bằng lên men. Môi trường lên men chứa sucroza làm nguồn cacbon hữu cơ. Nồng độ ban đầu 100 g/l, 150 g/l và 200 g/l sucroza được sử dụng. Chủng SD14 của *E. coli* được sử dụng trong thử nghiệm này.

Fig.4 là đồ thị động lực học của sự thay đổi về nồng độ fructoza trong môi trường sinh trưởng trong sự sản xuất axit suxinic bằng lên men. Môi trường lên men chứa sucroza làm nguồn cacbon hữu cơ. Nồng độ ban đầu 100 g/l, 150 g/l và 200 g/l sucroza được sử dụng. Chủng SD14 của *E. coli* được sử dụng trong thử nghiệm này.

Fig.5 là đồ thị động lực học của sự tích lũy axit suxinic trong môi trường sinh trưởng. Nồng độ ban đầu 100 g/l, 150 g/l và 200 g/l sucroza được sử dụng. Chủng SD14 của *E. coli* được sử dụng trong thử nghiệm này.

Fig.6 là đồ thị động lực học của sự tích lũy axit suxinic trong sự sinh trưởng bằng lên men của chủng SD14 của *E. coli* trong thiết bị phản ứng sinh học New Brunswick 7.000 ml với thể tích ban đầu bằng 3.000 ml và sự vi sục khí với lưu lượng bằng 0,005 lít không khí trên phút.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất chất xúc tác sinh học để sản xuất axit suxinic với hàm lượng, hiệu suất và năng suất cao bằng cách sử dụng nguyên liệu chứa sucroza. Sucroza là disacarit cũng được biết như là sacaroza, 1-*O*- α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosit, và α -D-glucopyranosyl-1,2- β -D-fructofuranosit. Thuật ngữ “hiệu suất” như được hiểu trong sáng chế này là số gam sản phẩm (như axit suxinic) được tạo ra từ một gam đường (như glucoza hoặc sucroza) được sử dụng. Thuật ngữ “năng suất” như được hiểu trong sáng chế này là số gam sản phẩm (như axit suxinic) được tạo ra từ một lít dịch nuôi cấy trong một giờ. Thuật ngữ “hàm lượng” được hiểu là nồng độ sản phẩm (như axit suxinic) trong dịch lên men tính theo gam trên lít. Hiệu suất mong muốn đối với axit suxinic nằm trong khoảng từ 0,7 đến 1,2 gam axit suxinic được tạo ra từ một gam đường được sử dụng. Năng suất mong muốn đối với axit suxinic theo sáng chế này nằm trong khoảng 1 gam hoặc hơn 1 gam axit suxinic được tạo ra từ một lít trong một giờ.

Đối với hợp chất định trước bất kỳ, có thể thích hợp hơn khi tạo ra muối của hợp chất nêu trên, ví dụ như, axit suxinic có thể được tạo ra ở độ pH gần bằng 7 như muối của natri, kali, canxi, magie, amoni, v.v., trong khi lysin có thể được tạo ra như muối clorua, sulfat, bicarbonat, v.v. Như vậy, bất cứ lúc nào hợp chất được đặt tên trong bản mô tả này, muối bất kỳ của hợp chất nêu trên được bao gồm, và bất cứ lúc nào muối được đặt tên, axit tự do hoặc bazơ tự do cũng được bao gồm.

Tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn được đo theo tốc độ tăng về mật độ quang ở 550 hoặc 600 nanomet của dịch nuôi cấy dạng lỏng thu được từ sự nhân vi khuẩn. Tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn cũng được biểu hiện theo thời gian cần để nhân đôi tế bào của vi khuẩn. Tế bào của vi khuẩn *E. coli* kiểu đại đã được biết là sao chép một lần trong mỗi 20 phút. Ở tế bào của vi khuẩn thích hợp cho sự khảo sát này, tế bào của vi khuẩn được dự kiến có thời gian nhân đôi bằng ít nhất 20 phút, nhưng nhỏ hơn 20 giờ.

Theo sáng chế, chất xúc tác sinh học để sản xuất axit suxinic có thể được phát triển theo hai cách khác nhau. Theo cách tiếp cận thứ nhất, loài vi khuẩn kiểu đại được lựa chọn được xử lý di truyền để sinh trưởng bằng sucroza là nguồn cacbon duy nhất. Tốt hơn là chủng vi khuẩn đã được xử lý di truyền trong khi có khả năng sinh trưởng

tốt trong môi trường chứa sucroza là nguồn cacbon duy nhất, vẫn duy trì khả năng sử dụng các nguồn cacbon khác tốt tương tự. Một khi chủng vi sinh vật cụ thể có khả năng sinh trưởng trong sucroza là nguồn cacbon duy nhất được định rõ, sự xử lý di truyền tiếp theo được thực hiện theo cách chuyển hóa tiếp sau các phương pháp xử lý di truyền đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để thu được chủng vi khuẩn có thể sinh trưởng trong môi trường chứa sucroza và tạo ra axit suxinic với hiệu suất và năng suất cao. Ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 2010/115067 và công bố đơn sáng chế Mỹ số US 20100184171 cung cấp các chi tiết về các kỹ thuật xử lý di truyền hữu dụng để tạo ra chủng *E. coli* có khả năng tạo ra axit suxinic được cải thiện. Hai đơn sáng chế này được đưa vào trong bản mô tả này nhờ viện dẫn.

Theo cách tiếp cận thứ hai, chủng vi khuẩn đã được phát triển để có hiệu suất và năng suất có ý nghĩa thương mại để sản xuất axit suxinic như được mô tả trong công bố đơn sáng chế Mỹ số US 20100184171 và WO 2010/115067 được sử dụng làm chủng cha mẹ. Sự xử lý di truyền tiếp được thực hiện với chủng này để thu được chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng trong môi trường chứa sucroza và tạo ra axit suxinic với hàm lượng, hiệu suất, và năng suất có ý nghĩa thương mại.

Cụ thể hơn, sáng chế này tập trung phát triển chất xúc tác sinh học duy trì được khả năng tạo axit suxinic ban đầu của nó với hàm lượng và năng suất đủ cao trong khi vẫn có khả năng mới để sinh trưởng trong môi trường chứa sucroza là nguồn cacbon chính. Ví dụ, chủng KJ122 của *E. coli* được mô tả bởi Jantama và cộng sự (2008 a, b) có thể được lựa chọn làm chủng ban đầu dùng cho sáng chế. Chủng KJ122 của *E. coli* được biết là có khả năng tạo axit suxinic trong môi trường glucoza tối thiểu với hàm lượng và năng suất cao. Thuật ngữ “môi trường tối thiểu” nghĩa là môi trường chỉ chứa các muối khoáng, nguồn cacbon (như glucoza hoặc sucroza) và betain tinh khiết. “Môi trường tối thiểu” không chứa các thành phần giàu hoặc không xác định về mặt hóa học như peptit hoặc nucleotit, như được tìm thấy trong chiết xuất của men, trypton, pepton, dịch ngâm ngô, hoặc các sản phẩm thủy phân khác của vật liệu sinh học phức tạp. Môi trường tối thiểu có thể ở dạng lỏng hoặc rắn, như trong đĩa thạch. Môi trường tối thiểu có thể có một hoặc hơn một hợp chất tinh khiết, như vitamin hoặc axit amin, được bổ sung để thỏa mãn yêu cầu sinh trưởng riêng của một chủng cụ thể. Chủng KJ122 của *E. coli* có nguồn gốc từ chủng *E. coli* C bằng sự loại bỏ gen và sự tiến hóa về mặt

chuyển hóa như được mô tả trong công bố đơn sáng chế Mỹ số US 20100184171 và đơn quốc tế công bố vào ngày 7 tháng 10 năm 2010 số WO 2010/115067 A1. Hai tài liệu công bố đơn sáng chế này cung cấp chi tiết về các thay đổi di truyền dẫn đến sự phát triển của chủng KJ122 của *E. coli* được đưa ra trong bản mô tả này nhờ viện dẫn. KJ122 không có khả năng đáng kể bất kỳ để sử dụng sucroza làm nguồn cacbon để sản xuất axit suxinic. Thiếu khuyết này về sử dụng sucroza được lưu ý ở KJ122 có liên quan đến sự thiếu khuyết di truyền ở chủng cha mẹ của nó, cụ thể là chủng *E. coli* C được biết là khiếm khuyết di truyền về sử dụng sucroza.

Thuật ngữ “sử dụng sucroza” khi được sử dụng trong đơn này bao gồm cả sự vận chuyển sucroza từ môi trường sinh trưởng vào trong tế bào của vi khuẩn lẫn sự chuyển hóa sucroza tiếp theo trong tế bào. Khả năng không đáng kể của KJ122 về vận chuyển và chuyển hóa sucroza bắt nguồn từ sự thiếu gen mã hóa cả sự vận chuyển lẫn sự chuyển hóa sucroza. Các tác giả của sáng chế đã phát hiện cách tiếp cận di truyền có thể giúp KJ122 sử dụng sucroza làm nguồn hydrat cacbon trong khi vẫn duy trì được khả năng tạo axit suxinic ban đầu của nó với hàm lượng, hiệu suất, và năng suất cao.

Thuật ngữ “hydrat cacbon” khi được sử dụng trong sáng chế này bao gồm mono-sacarit như glucoza, fructoza, xyloza, và arabinoza, đisacarit như sucroza, melibioza, maltoza và lactoza, trisacarit như rafinoza và maltotrioza, và oligosacarot cao, và sản phẩm thủy phân có nguồn gốc từ sự tiêu hóa bằng enzym hoặc bằng hóa học polysacarit như tinh bột, xenluloza, và hemixenluloza.

Sự vận chuyển sucroza vào trong tế bào của vi khuẩn, và sự chuyển hóa sucroza tiếp theo, có thể được điều tiết bởi ít nhất bốn cơ chế khác nhau, bao gồm hệ phosphotransferaza (PTS) phụ thuộc vào phosphoenolpyruvat (phosphoenolpyruvate: PEP) và ba hệ không phụ thuộc vào PTS, bao gồm hệ sucroza permeaza đồng vận chuyển cùng chiều cation. Theo sáng chế, có thể biến đổi gen hệ bất kỳ trong số các hệ vận chuyển và sử dụng sucroza này với mục đích tạo ra khả năng mới để sử dụng sucroza hoặc để tăng cường khả năng sử dụng sucroza đã có. Thuật ngữ “chức năng sử dụng sucroza” khi được sử dụng trong sáng chế này chỉ cả chức năng hấp thụ sucroza lẫn sự chuyển hóa sucroza trong tế bào. Sự chuyển hóa sucroza trong tế bào bao gồm

sự biến đổi của sucroza thành ba hợp chất chứa cacbon có thể nhập vào trong sự tổng hợp các hợp chất hữu cơ quan trọng có ý nghĩa thương mại.

Các thuật ngữ “sinh vật PTS⁺” hoặc “vi khuẩn PTS⁺” chỉ vi khuẩn có khả năng vận chuyển sucroza dựa vào PTS. Thuật ngữ “sinh vật không PTS”, hoặc “vi khuẩn không PTS” chỉ tế bào của vi khuẩn mà khả năng hấp thụ sucroza của nó dựa vào các cơ chế vận chuyển khác với PTS. Tương tự, thuật ngữ “sự vận chuyển sucroza không dựa vào PTS” chỉ sự vận chuyển sucroza xuyên qua màng tế bào của vi khuẩn bằng cách sử dụng cơ chế khác với PTS phụ thuộc vào PEP. Thuật ngữ “sinh vật PTS⁻” chỉ sinh vật có sự đột biến trong một hoặc hơn một gen mã hóa protein hoạt động trong PTS, sao cho hoạt tính của PTS giảm so với hoạt tính của PTS kiểu dại. Thuật ngữ “sucroza permeaza” khi được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có trong sự hấp thụ sucroza từ môi trường vào trong tế bào. Protein có trong sự hấp thụ sucroza có thể là thành phần của PTS hoặc protein không gắn với PTS.

Một loại hệ bắt đầu bằng cách nhận sucroza vào trong tế bào nhờ hệ phosphotransferaza (PTS) sử dụng phosphoenolpyruvat (PEP) làm nguồn năng lượng và phosphat, và nó phosphoryl hóa sucroza trong quá trình vận chuyển. Ta cần gọi loại hệ nhận và chuyển hóa sucroza này là hệ hoặc cơ chế “phụ thuộc vào PTS”. Trong loại hệ thứ nhất này, có thành phần protein có ái lực hữu dụng hoặc đặc hiệu đối với sucroza. Protein này được gọi là, trong số các tên khác nhau, enzym II^{scr}. Enzym II^{scr} hoạt động cùng với hai protein khác không đặc hiệu đối với sucroza, được gọi là cấu trúc siêu phân tử PTS thông thường. Các protein khác nêu trên này (protein thông thường so với hơn một PTS đặc hiệu trong một sinh vật cụ thể) bao gồm các protein được gọi là, trong số các tên khác nhau, EI và Hpr. Ở *Escherichia coli* (*E. coli*), gene mã hóa các thành phần protein thông thường này được gọi là, trong số các tên khác nhau, *ptsH* và *ptsI*. Đa số vi khuẩn có một số protein PTS khác với enzym II^{scr}, chúng không đặc hiệu đối với sucroza, nhưng chúng đặc hiệu đối với các đường khác (như glucoza, manoza, v.v.), và chúng có thể hoạt động cùng với các cấu trúc siêu phân tử PTS thông thường để nhận các đường khác nêu trên. Các gen và protein tạo thành PTS được tìm thấy trong nhiều giống và loài vi khuẩn. Nhiều gen và protein như vậy tương đồng với các gen và protein được tìm thấy ở *E. coli*, nhưng một số gen và protein lại không tương đồng lắm, nếu không phải là tất cả, với các bản đối chiếu *E. coli* của

chúng. Ví dụ về loại hệ vận chuyển sucroza (phụ thuộc vào PTS) thứ nhất này là hệ được mã hóa bởi gen *scrKYABR* của, ví dụ, vi khuẩn giống *Klebsiella* và plasmit gam âm pUR400 (Reid và Abratt, 2005). Trong các operon này, *scrK* mã hóa fructokinaza, *scrY* mã hóa porin màng ngoài đặc hiệu với sucroza, *scrA* mã hóa protein vận chuyển PTS enzym II^{scr}, *scrB* mã hóa sucroza-6-phosphat hydrolaza, và *scrR* mã hóa gen kìm hãm.

Loại hệ vận chuyển sucroza thứ hai không sử dụng trực tiếp PEP làm nguồn năng lượng hoặc nguồn cho phosphat, mà thay vào đó sử dụng proton (hoặc cation khác) đồng vận chuyển cùng chiều làm nguồn năng lượng để chuyển sucroza vào trong tế bào mà không cần có sự phosphoryl hóa đi kèm. Ta có thể gọi loại hệ vận chuyển và chuyển hóa sucroza này là hệ “không phụ thuộc vào PTS”. Ví dụ về loại thứ hai này là hệ được mã hóa bởi gen *cscRAKB* của nhiễm sắc thể có trong một số, nhưng không phải là tất cả, các chủng của *E. coli* gần locus *dsdA* (đeaminaza D-serin). Ví dụ về chủng *E. coli* chứa gen *cscRAKB* là EC3132 (Bockman và cộng sự, 1992) và ATCC 9637, cũng được biết như là *E. coli* W hoặc chủng Waksman (Shukla và cộng sự, 2004). Lưu ý là, có một số nhầm lẫn trong tài liệu như đối với tính đồng nhất về họ của các chủng được mô tả bởi Shukla và cộng sự (2004). Trong ấn phẩm của Shukla và cộng sự (2004), chủng cha mẹ được gọi là KO11 được mô tả là có nguồn gốc từ ATCC 11303 hoặc *E. coli* B, nhưng trong thực tế chủng này có nguồn gốc từ ATCC 9637. Trong loại operon này, *cscA* mã hóa invectaza, *cscB* mã hóa tác nhân đồng vận chuyển cùng chiều sucroza, *cscK* mã hóa fructokinaza, và *cscR* mã hóa gen kìm hãm.

Cơ chế sử dụng sucroza thứ ba, mà nó cũng không phụ thuộc vào PTS, trong một số trường hợp có thể sử dụng một số gen hoặc loại gen tương tự làm một hệ khác. Theo cơ chế này, invectaza (ví dụ, được mã hóa bởi *cscA*) được đưa vào trong môi trường, một cách từ từ hoặc bằng sự phân giải tế bào, ở đó nó phân tách sucroza thành glucoza và fructoza. Sau đó, hai monosacarit này được nhận vào trong tế bào và được phosphoryl hóa theo cách thông thường đối với các monosacarit này. Loại hệ này được sử dụng nhờ men *Saccharomyces cerevisiae*, trong đó invectaza được mã hóa bởi gen, ví dụ *SUC2*, và invectaza được tiết vào chất bào và không gian ngoại bào. Sau đó, glucoza và fructoza thu được nhập bởi tác nhân khuếch tán có hỗ trợ, và sau đó các đường này được kinaza hóa bên trong tế bào.

Cơ chế sử dụng sucroza thứ tư, mà nó cũng không phụ thuộc vào PTS, trong một số trường hợp cũng có thể sử dụng một số gen hoặc loại gen tương tự làm một hệ khác. Theo cơ chế này, sucroza được nhận bởi, ví dụ, permeaza được mã hóa bởi *cscB*, sau đó nó được phân tách nhờ sự phân giải phospho được xúc tác bởi sucroza phosphorylaza. Sau đó, glucoza-1-phosphat và fructoza tế chất bào thu được được chuyển hóa theo cách thông thường đối với các chất chuyển hóa này.

Một báo cáo dạng tư liệu (Alaeddinoglu và Charles 1979) cho rằng gen sử dụng sucroza được mã hóa về mặt nhiễm sắc thể của *E. coli* được gắn gần vị trí *dsdA* (có thể là *cscRAKB*) cần có gene *ptsI* nguyên vẹn để hoạt động. Điều này mâu thuẫn với phần lớn còn lại của tư liệu, mà nó cho rằng gen *cscRAKB* mã hóa hệ không phụ thuộc vào PTS. Mâu thuẫn rõ ràng được đưa ra này, có thể là một hệ trong số các hệ mà ta đã xác định là hệ “không phụ thuộc vào PTS” trong thực tế có thể có một số phụ thuộc vào hệ PTS.

Theo một khía cạnh, sáng chế bộc lộ sự bổ sung gen vào sinh vật để cấy ghép hoặc tăng hoạt tính của một hoặc hơn một protein và/hoặc enzym có trong sự nhận và sự biến đổi sucroza thành các chất chuyển hóa trung gian như fructoza 1,6-bisphosphat mà nó có thể còn được chuyển hóa bởi tế bào. Gene mã hóa protein hoặc enzym có liên quan (trong bản mô tả này được gọi là “chức năng sử dụng sucroza”) thích hợp cho sự xử lý di truyền theo sáng chế được lựa chọn từ danh mục gồm các gen mã hóa tác nhân nhập sucroza phụ thuộc vào PTS (protein PTS thường được gọi là enzym II^{scr} , hoặc EII^{scr} , nó hoạt động cùng với protein PTS khác để thực hiện sự nhận và sự phosphoryl hóa sucroza để tạo ra sucroza-6-phosphat tế chất bào), sucroza-6-phosphat hydrolaza, fructokinaza, sucroza permeaza (permeaza không phụ thuộc vào PTS vận chuyển sucroza vào trong tế bào mà không cần có sự phosphoryl hóa đi kèm), invectaza hoặc sucroza hydrolaza, sucroza phosphorylaza, glucoza kinaza (cũng được biết như là glucokinaza), fructoza kinaza (cũng được biết như là fructokinaza), hexoza-phosphat isomeraza, và phosphofructo kinaza (fructoza-1-phosphat kinaza).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất axit suxinic hoặc các hóa chất khác bằng cách sử dụng sucroza làm nguyên liệu tái chế. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất axit suxinic từ môi trường chứa sucroza sử dụng chất xúc tác sinh học có hoạt tính giảm trong ít nhất một protein của hệ PTS nguyên

gốc của sinh vật so với hoạt tính của chủng ông bà hoặc cha mẹ. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất axit succinic hoặc hóa chất khác trong môi trường chứa sucroza sử dụng chất xúc tác sinh học vẫn duy trì được hệ phụ thuộc vào PTS tự nhiên đầy đủ chức năng dùng hấp thụ đường.

PTS ban đầu được phát hiện ở *E. coli* và nay nó được biết là có vai trò quan trọng trong sự vận chuyển hydrat cacbon trong rất nhiều loài vi khuẩn. Cấu tạo phân tử của PTS đã được biết rất rõ. Theo loài vi khuẩn, PTS được bảo toàn cao về cấu tạo cơ bản của nó. Sáng chế đề xuất chất xúc tác sinh học trong đó các thành phần của PTS được chuyển gen từ vi khuẩn cho thứ hai sang vi khuẩn nhận thứ nhất để giúp chất xúc tác sinh học sử dụng tốt hơn nguồn hydrat cacbon dự kiến để lên men. Cụ thể là, sáng chế đề xuất chất xúc tác sinh học có thể sử dụng nguyên liệu tái chế chứa sucroza để sản xuất bằng lên men các sản phẩm như axit succinic. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất chất xúc tác sinh học có thể sử dụng sucroza và mật rỉ đường có nguồn gốc từ quá trình chế biến cây mía để sản xuất axit succinic bằng lên men sinh học. Do trisacarit rafinoza chứa sucroza, tất cả các khía cạnh của sáng chế này áp dụng được cho sucroza sẽ cũng áp dụng được cho rafinoza, miễn là hệ phân tách rafinoza có trong chất xúc tác sinh học.

Hợp phần cơ bản của PTS là giống nhau ở tất cả các loài vi khuẩn đã được nghiên cứu cho đến nay. Nó chứa ba thành phần chính cụ thể là EI, HPr, và EII. Thành phần EI và HPr có trong tế chất bào và được biết là thành phần “thông thường” vì chúng có thể hoạt động cùng với nhiều thành phần EII đặc hiệu với hydrat cacbon.

Thành phần EII chứa ba thành phần con cụ thể là EIIA, EIIB và EIIC. Protein EIIB và EIIC là liên kết màng và thành phần EIIA được đặt trong tế chất bào hoặc mặt tế chất bào của protein màng. Enzym EII có thể tạo thành một protein có ba miền (A, B, và C) hoặc có thể được chia tách thành từ hai đến bốn protein riêng biệt. EII đặc hiệu với hydrat cacbon và *E. coli* được biết là có ít nhất 15 phức EII khác nhau. Vì vậy, thành phần EII đặc hiệu để vận chuyển glucoza xuyên qua màng được ký hiệu là EIIA^{Glc}/EIICB^{Glc}.

Thực chất, tất cả các thành phần của PTS là protein. Gen mã hóa các thành phần khác nhau của PTS đã được nhận dạng. Gen *ptsI* ở *E. coli* mã hóa protein EI 63

kDa. Histidin 10 kDa chứa protein mang phospho HPr được mã hóa bởi gen *ptsH* ở *E. coli*. Protein EI^{IA}^{Glc} được mã hóa bởi gen *crr* (carbonhydrate resistance repression resistant: chống lại sự kìm hãm tính kháng hydrat cacbon). Protein EI^{ICB}^{Glc} được mã hóa bởi gen *ptsG* ở *E. coli*.

Hệ PTS không chỉ có nhiệm vụ vận chuyển các hydrat cacbon khác nhau xuyên qua màng tế bào mà còn làm xúc tác cho sự biến đổi các hydrat cacbon thành các phosphoeste tương ứng của chúng trong khi vận chuyển. Sự vận chuyển và phosphoryl kết hợp của hydrat cacbon bởi PTS đạt được nhờ sự tương tác giữa các thành phần protein EI, HPr, và EII.

Khi thủy phân glucoza, bốn mol PEP được tạo ra từ hai mol glucoza, và một nửa PEP được sử dụng để tạo ra năng lượng để hấp thụ glucoza. Trong trường hợp nhận sucroza, hai mol hexoza có được từ một mol sucroza cũng tạo ra bốn mol PEP, nhưng chỉ một mol PEP được sử dụng để vận chuyển sucroza, vì vậy, làm tăng 1,5 lần lượng PEP khả dụng làm nguồn khung cacbon dùng cho sự tổng hợp sinh học trong tế bào khi sucroza được sử dụng làm nguồn cacbon. Có thể tiếp tục cải thiện hiệu suất tạo ra axit suxinic và các hóa chất khác bằng cách tạo cho *E. coli* hệ sử dụng sucroza không phụ thuộc vào PTS mà nó không sử dụng PEP để nhận sucroza. Cách tiếp cận này đặc biệt có lợi để sản xuất các hóa chất có nguồn gốc ít nhất một phần từ hoặc thông qua PEP, như suxinat, malat, fumarat, lactat, etanol, butanol, propan diol, 3-hydroxyaxit propionic, axit acrylic, axit propionic, axit lactic, axit amin như glutamat, aspartat, methionin, lysin, threonin, và isoleuxin, và nhiều hợp chất khác nữa.

Sáng chế đề xuất cách xử lý PTS và tiếp đó là kiểu sử dụng hydrat cacbon của vi khuẩn. Do các protein EI và HPr có đóng vai trò là “thành phần thông thường” của hệ PTS, sự bất hoạt của gen *ptsI* mã hóa protein EI hoặc gen *ptsH* mã hóa protein HPr có thể dẫn đến sự bất hoạt hoàn toàn của PTS. Sẽ gần như có ít hơn sự vận chuyển hydrat cacbon bằng hệ PTS trong tế bào của vi khuẩn mà ở đó hoạt tính của *ptsH* hoặc *ptsI* đã bị giảm. Khi PTS bị bất hoạt một phần hoặc hoàn toàn, tế bào của vi khuẩn phải phụ thuộc vào một hệ permeaza hoặc các hệ permeaza thay thế khác để vận chuyển hydrat cacbon. Mặt khác, khi gen mã hóa thành phần EII cụ thể đặc hiệu với hydrat cacbon bị bất hoạt, chỉ sự vận chuyển hydrat cacbon cụ thể này phụ thuộc vào thành phần EII bị bất hoạt có thể bị phong bế. Vì vậy, sự bất hoạt của gen *crr* hoặc

ptsG có thể phong bế chỉ sự vận chuyển glucoza bằng PTS, và sự vận chuyển các hydrat cacbon khác vẫn có thể diễn ra bình thường.

Khi có sự vận chuyển glucoza mạnh bằng PTS, EII^{Glc} vẫn không được phosphoryl hóa vì có chất nền là hydrat cacbon để nhận nhóm phosphate của nó. Tuy nhiên, khi không có glucoza trong môi trường, dạng đã được phosphoryl hóa của EII^{Glc} không thể chuyển nhóm phosphate của nó sang glucoza và vì vậy nó vẫn ở trạng thái được phosphoryl hóa của nó. EII^{Glc} chưa được unphosphoryl hóa điều tiết hiện tượng thường được biết như là sự kìm hãm chất dị hóa cacbon (carbon catabolite repression: CCR). Trong CCR, khi glucoza có trong môi trường sinh trưởng, sự vận chuyển và sử dụng các hydrat cacbon khác trong môi trường bị ngăn ngừa cho đến khi glucoza trong môi trường được sử dụng hoàn toàn. Sự kìm hãm chất dị hóa cacbon do tác dụng ức chế của EII^{Glc} chưa được phosphoryl hóa lên hệ permeaza. Nhiều permeaza có trong sự vận chuyển hydrat cacbon được biết là bị ức chế bởi EII^{Glc} chưa được phosphoryl hóa. Hơn nữa, EII^{Glc} chưa được phosphoryl hóa được biết là có tác dụng không tốt lên sự phiên mã của nhiều gen có trong sự vận chuyển và chuyển hóa hydrat cacbon bởi sự tác dụng của nó lên hệ adenylat xyclaza. Vì vậy, trong điều kiện nhất định, là có lợi khi giảm hoạt tính của hệ PTS đặc hiệu với glucoza để giải phóng tế bào khỏi sự kìm hãm chất dị hóa cacbon.

Trong sản xuất axit suxinic bằng lên men, cần bảo toàn PEP trong tế bào. PEP có thể hoạt động như chất nền để cacboxyl hóa các enzym trong tế bào. Sự cacboxyl hóa PEP tạo ra axit oxaloaxetic mà nó nhập vào trong vòng axit tricarboxylic và góp phần vào sự tạo ra axit suxinic. Tầm quan trọng của sự cacboxyl hóa PEP để sản xuất sinh học axit suxinic đã được biết rất rõ khi bằng chứng thực tế là một số chất trong số các chất xúc tác sinh học thành công hơn hiện nay được sử dụng để sản xuất axit suxinic, như KJ122, có PTS mà nó ít nhất bị giảm một phần về hoạt tính và sự vận chuyển hydrat cacbon ít nhất được điều tiết một phần bởi hệ permeaza không phụ thuộc vào hệ PTS. Sự giảm hoạt tính của PTS giúp bảo toàn PEP. Hơn nữa, chất xúc tác sinh học để sản xuất axit suxinic như KJ122 có sự biến đổi gen dẫn đến tăng tốc độ cacboxyl hóa PEP (Zhang và cộng sự, 2009 a, b). Vì vậy, ở chủng KJ122 được phát triển để sản xuất axit suxinic, PTS ít nhất bị bất hoạt một phần bởi sự đột biến trong gen *ptsI*. Hơn nữa, gen PEP carboxykinaza *pck* có sự đột biến gây ra sự tăng về hoạt

tính đặc hiệu đối với sự cacboxyl hóa PEP. Trong khi là có lợi khi giảm hoạt tính của PTS khi glucoza được sử dụng làm nguồn cacbon vô cơ để sản xuất axit suxinic bằng lên men, chiến lược tương tự có thể là tối ưu để phát triển chủng dùng để sản xuất axit suxinic bằng cách sử dụng sucroza làm nguồn cacbon hữu cơ chính.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất quy trình để tái hoạt hóa “thành phần thông thường” của hệ PTS ở chủng KJ122 và đồng thời làm bất hoạt sự hấp thụ glucoza bằng hệ PTS. Gen *ptsI* đột biến ở KJ122 được thay thế bởi gen *ptsI* kiểu dại và gen *ptsG* bị loại bỏ. Các xử lý di truyền này làm cho sự vận chuyển hydrat cacbon khác với glucoza bằng PTS. Hơn nữa, sự loại bỏ gen *ptsG* loại bỏ sự kìm hãm chất dị hóa cacbon do protein EIIA^{Glc} chưa được phosphoryl hóa. Trạng thái này trái ngược với trạng thái khi gen *ptsI* bị đột biến. Trong tế bào của vi khuẩn có gene *ptsI* nguyên vẹn và sự loại bỏ *ptsG*, protein EIIA^{Glc} được dự kiến ở trong trạng thái được phosphoryl hóa của nó. Khi protein EIIA^{Glc} trong trạng thái được phosphoryl hóa của nó, nó không gây ra tác động ức chế bất kỳ nào lên các permeaza khác và lên sự sao chép gen có trong sự chuyển hóa hydrat cacbon.

Khi sucroza được vận chuyển bằng PTS, nó nhập vào trong tế bào ở dạng đã được phosphoryl hóa như sucroza-6-phosphat. Sự chuyển hóa tiếp sucroza-6-phosphat trong tế bào bao gồm các phản ứng sinh hóa sau. Trong bước đầu tiên, sucroza-6-phosphat được thủy phân bằng enzym thủy phân thích hợp như sucroza-6-phosphat hydrolaza để giải phóng ra glucoza-6-phosphat và fructoza. Glucoza-6-phosphat được biến đổi thành fructoza-6-phosphat nhờ tác động của enzym isomeraza. Trong các bước tiếp theo, fructoza-6-phosphat được phosphoryl hóa tiếp để tạo ra fructoza 1-6 bisphosphat mà tiếp theo nó bị phân tách thành phosphoglyxeraldehit và dihydroxyaxeton phosphat. Cả ba hợp chất chứa cacbon này có nguồn gốc từ fructoza-1,6-bisphosphat sẽ nhập vào trong vòng axit tricarboxylic và tạo ra khung cacbon để sản xuất axit suxinic.

Fructoza được giải phóng từ sự thủy phân sucroza-6-phosphat cần được phosphoryl hóa trước khi nó có thể đi vào con đường glycol phân. Sự phosphoryl hóa fructoza được điều tiết bởi fructokinaza. Khi không có fructokinaza nội sinh hoặc khi hoạt tính của enzym nội sinh thấp, cần tạo ra nguồn bổ sung hoạt tính của enzym

fructokinaza bằng cách đưa gen ngoại sinh mã hóa hoạt tính của enzym fructoza kinaza.

Cách tiếp cận này làm bất hoạt gen *ptsG* và vận chuyển sucroza bằng PTS chỉ có thể thực hiện được ở các chủng mà ở đó có thành phần EIICB đặc hiệu với sucroza của PTS. Protein này được gọi là, trong số các tên khác nhau, enzym II^{scr}. Khi không có thành phần EIICB nội sinh đặc hiệu với sucroza như vậy ở chủng đã được phát triển để sản xuất axit succinic, cần tạo ra gen ngoại sinh mã hóa thành phần EIICB đặc hiệu với sucroza, nó có thể hoạt động cùng với “thành phần thông thường” của PTS đã có trong chất xúc tác sinh học để sản xuất axit succinic.

Theo phương án khác của sáng chế, khi cần duy trì PTS ở trạng thái có hoạt tính giảm dùng cho mục đích duy trì đủ quỹ PEP làm chất nền cho enzym carboxylaza và/hoặc carboxykinaza, sự vận chuyển sucroza có thể được hỗ trợ bằng cách sử dụng sucroza permeaza không phụ thuộc vào PTS. Trong điều kiện khi chất xúc tác sinh học đã được phát triển để sản xuất axit succinic không có gen mã hóa permeaza đặc hiệu với sucroza không dựa vào PTS, cần đưa gen ngoại sinh vào để có thể điều tiết sự vận chuyển sucroza không dựa vào PTS vào trong tế bào. Nhiều chủng vi khuẩn như chủng *E. coli* W được biết là có operon mã hóa các protein có trong sự vận chuyển sucroza không dựa vào PTS vào trong tế bào. Operon bất kỳ trong số các operon sucroza permeaza đã biết này của các chủng vi khuẩn khác có thể được đưa vào trong các chủng vi khuẩn không có khả năng vận chuyển sucroza không dựa vào PTS. Ví dụ về sự hấp thụ sucroza không dựa vào được mã hóa bởi gen *cscRAKB* của nhiễm sắc thể có ở gần vị trí *dsdA* (D-serin deaminaza) trong một số, nhưng không phải là tất cả, các chủng của *E. coli*. Ví dụ về chủng *E. coli* chứa gen *cscRAKB* là chủng EC3132 của *E. coli* và chủng ATCC 9637 của *E. coli*, cũng được biết như là *E. coli* W hoặc chủng Waksman, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella ssp.*, *Erwinia amylovora*, và nhiều chủng khác nữa.

Các chủng nhất định của *E. coli* như chủng W của *E. coli* (ATCC 9637) được biết là có con đường chuyển hóa vận chuyển sucroza không phụ thuộc vào PTS được mã hóa về mặt nhiễm sắc thể. Ba gen khác nhau có trong sự vận chuyển và chuyển hóa sucroza không phụ thuộc vào PTS, cụ thể là *cscB*, *cscA*, và *cscK* được tạo thành trong ADN của nhiễm sắc thể như là operon. Gen *cscB* mã hóa sucroza: tác nhân đồng vận

chuyển cùng chiều H^+ . Gen *cscA* mã hóa enzym invertaza phân tách sucroza được vận chuyển vào trong tế bào thành glucoza và fructoza. Gen *cscK* mã hóa fructokinaza. Operon *csc* bị kiểm soát bởi protein kìm hãm được mã hóa bởi gen *cscR*. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, các gen *cscA*, *cscB* và *cscK* được đưa vào trong chủng tạo suxinat KJ122, mà không cần có gen kiểm soát điều hòa nguyên vẹn *cscR*. Ba gen này, *cscABK*, có thể được đưa vào trong chủng KJ122 trong plasmit tự sao chép hoặc, tốt hơn là, có thể được gắn vào trong nhiễm sắc thể chủ. Theo phương án ưu tiên, ba gen, *cscABK*, được gắn ở vùng không thiết yếu của nhiễm sắc thể chủ (vùng mà ở đó sự chèn gen bổ sung gần như không có tác dụng không tốt lên khía cạnh sinh trưởng hoặc tạo ra có liên quan bất kỳ của sản phẩm dự kiến như suxinat trong quy trình thương mại) và gen bổ sung được biểu hiện từ một hoặc hơn một gen khởi đầu cơ định thích hợp.

Hàm lượng sản phẩm từ sucroza bằng ít nhất hàm lượng được tạo ra bởi sinh vật cha mẹ từ glucoza, và hiệu suất sản xuất lớn hơn 0,8 gam axit suxinic được tạo ra/gam sucroza được sử dụng. Gen ngoại sinh được đưa vào trong tế bào có thể được duy trì trong tế bào trong plasmit tự sao chép. Plasmit có thể được duy trì bằng sự lựa chọn kháng sinh hoặc sự bổ sung đột biến của nhiễm sắc thể. Tốt hơn là, gen ngoại sinh được gắn vào trong nhiễm sắc thể chủ sao cho không cần bổ sung kháng sinh bất kỳ nào để duy trì plasmit trong tế bào. Có một số vị trí có thể trong tế bào để gắn gen ngoại sinh. Vị trí ưu tiên để gắn gen ngoại sinh trong ADN của nhiễm sắc thể *E. coli* bao gồm các vùng có chức năng phụ đối với sự sinh trưởng và sự tạo ra sản phẩm trong điều kiện lên men thương mại.

Các permeaza đường không phụ thuộc vào PTS hỗ trợ cho sự vận chuyển sucroza vào trong tế bào mà không cần cải biến hóa học bất kỳ nào. Hệ sucroza permeaza không phụ thuộc vào PTS bao gồm hệ đồng vận chuyển cùng chiều cation hòa tan, như tác nhân đồng vận chuyển cùng chiều ScrT trong operon sucroza ở *Bifidobacterium lactis* và tác nhân vận chuyển CscB của *E. coli*. Các hệ vận chuyển đặc hiệu với sucroza này thường được kết hợp với gen dị hóa và điều hòa theo các trình tự khác nhau ở các vi khuẩn khác nhau.

Khi gen ngoại sinh thu được là operon, tốt hơn là loại bỏ gen hoặc protein điều hòa âm có thể có bất kỳ khởi operon. Là lý tưởng khi chỉ có gen và protein hoạt động

có lợi trong sự vận chuyển và chuyển hóa sucroza. Vì vậy, tốt hơn là sự biểu hiện của gen sử dụng sucroza không bị ức chế bởi gen kìm hãm hoặc bởi sự kìm hãm chất dị hóa cacbon.

Khi hệ vận chuyển sucroza không dựa vào PTS được sử dụng làm cơ chế vận chuyển, sucroza nhập vào trong tế bào vẫn ở dạng chưa được phosphoryl hóa và cần phosphoryl hóa sucroza trước khi nó có thể nhập vào trong quá trình chuyển hóa trong tế bào. Sucroza có thể được phosphoryl hóa bằng cách sử dụng sucroza kinaza nội sinh đã có trong tế bào. Trong trường hợp không có sucroza kinaza nội sinh trong tế bào, ADN ngoại sinh mã hóa sucroza kinaza có thể được đưa vào trong tế bào. Một khi sucroza được phosphoryl hóa, sucroza-6-phosphat thu được có thể được chuyển hóa bởi tác động của enzym sucroza-6-phosphat hydrolaza, glucoza-6-phosphat isomeraza, fructokinaza, phosphofructokinaza và fructoza 1,6-bisphosphat aldolaza như được mô tả ở trên. Hơn nữa, nếu cần, gen mã hóa các enzym này có thể được đưa vào trong chất xúc tác sinh học đang được phát triển. Như phương án thay thế, sau khi sucroza nhập vào tế bào, nó có thể được phân tách thành glucoza và fructoza nhờ invertaza. Glucoza và fructoza thu được có thể nhập vào trong sự chuyển hóa lần lượt nhờ tác động của enzym glucokinaza và fructokinaza.

Sự phosphoryl hóa sucroza cũng có thể được thực hiện nhờ (sucroza phosphorylaza (SPaza). Sucroza phosphorylaza làm xúc tác cho sự biến đổi sucroza (α -D-glucopyranosyl-1,2- β -D-fructofuranosit) và phosphat thành D-fructoza và α -G-1-P (α -D-glucoza 1-phosphat). Phản ứng phân giải chất phospho này thực hiện hai bước cần để cacbon của sucroza nhập vào trong sự chuyển hóa trung tâm, 1) sự phân tách disacarit thành hai monosacarit, và 2) sự phosphoryl hóa ít nhất một monosacarit. Lợi ích khác của sự phân giải phospho này là nó không sử dụng ATP để phosphoryl hóa như phản ứng glucokinaza. Thay cho năng lượng tạo thành liên kết phosphat có nguồn gốc từ năng lượng được giải phóng từ sự thủy phân. Như vậy, sự cải thiện về hiệu quả sử dụng sucroza có thể được thực hiện bằng cách đưa, ví dụ, ngoài gen *cscAKB* của chủng *E. coli* W, gen mã hóa sucroza phosphorylaza vào trong tế bào của vi khuẩn không có khả năng sử dụng sucroza. Theo cách khác, gen invertaza, *cscA* có thể được thay thế bằng gen mã hóa sucroza phosphorylaza. Một số sucroza phosphorylaza đã được mô tả (Goedl và cộng sự, 2007). Gen mã hóa sucroza phosphorylaza như vậy bất

kỳ có thể được tách dòng và được biểu hiện trong chủng nhận bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo phương án ưu tiên, kết cấu biểu hiện bao gồm gen sucroza phosphorylaza được gắn vào trong nhiễm sắc thể của chủng nhận.

Các hệ permeaza phụ thuộc vào PTS và không phụ thuộc vào PTS để vận chuyển sucroza không loại trừ tương hỗ lẫn nhau. Có thể có PTS hoạt động chức năng cùng với hệ permeaza không phụ thuộc vào PTS hoạt động chức năng để vận chuyển sucroza trong một tế bào của vi khuẩn.

Sáng chế bộc lộ việc chuyển gen một hoặc hơn một hệ vận chuyển và sử dụng sucroza từ một hoặc hơn một sinh vật cho mà trong tự nhiên có chứa các gen liên quan (ví dụ, *scrKYABR*, *cscRAKB*, *scrP*, *spl*, hoặc sự kết hợp, hoặc tập con của chúng) vào trong sinh vật nhận mà nó về bản chất không chứa gen có liên quan nêu trên, để tạo cho sinh vật nhận nêu trên khả năng mới để sử dụng sucroza hoặc để tăng cường khả năng sử dụng sucroza đã có. *ScrP* và *Spl* là các gen mã hóa sucroza phosphorylaza. Ví dụ về sinh vật nhận nêu trên mà nó về bản chất không chứa gen vận chuyển và sử dụng sucroza có liên quan bao gồm, nhưng không bị giới hạn trong, chủng *E. coli* K-12 (như EMG2, MG1655, W3110, W3350, C600, và DH5 α), nó là cơ sở về chủng dùng cho phần rất lớn công trình xử lý di truyền được thực hiện ở *E. coli*, ATCC 8739 (*E. coli* C), ATCC 11303 (*E. coli* B), BL21 (xem New England Biolabs catalog, 2007-2008) và dẫn xuất của các chủng này. Ví dụ khác về sinh vật nhận nêu trên bao gồm nhiều loại vi khuẩn và vi khuẩn cổ khác không có khả năng sử dụng sucroza tự nhiên, hoặc sử dụng sucroza kém. Hạn chế duy nhất là sinh vật nhận phải có khả năng biến đổi gen (bằng kỹ thuật di truyền, giao phối, truyền tính trạng, biến đổi, v.v.), sao cho gen sử dụng sucrozas theo sáng chế có thể được cấy ghép trong chủng nhận. Sinh vật nhận cũng có thể là loại đã được tạo, được lựa chọn, được sàng lọc, được nhân giống, hoặc được biến đổi theo cách khác sao cho nó có thể tạo được ngay hóa chất cần quan tâm. Ví dụ về loại chủng nhận này là KJ122 (Jantama và cộng sự, 2008 a, b) và ví dụ về hóa chất cần quan tâm là axit suxinic.

Ví dụ khác về sinh vật nhận bao gồm, nhưng không bị giới hạn trong: *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter asaii*, *Achromobacter delmarvae*, *Achromobacter viscosus*, *Achromobacter lacticum*, *Agrobacterium tumefaciens*,

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

Dưới đây, sáng chế sẽ được làm rõ một cách chi tiết. Vi khuẩn thuộc về giống *Escherichia* theo sáng chế là chủng được cấu tạo từ *Escherichia coli* không đồng hóa

sucroza là chủng cha mẹ, và nó sau khi tạo thành chứa gen sucroza, tốt hơn là gen không phụ thuộc vào sucroza PTS và có khả năng tạo axit suxinic.

Nguyên liệu di truyền để tạo khả năng sử dụng sucroza cho chủng vi khuẩn nhận có thể thu được từ nhiều chủng vi khuẩn cho. Tùy thuộc vào chủng vi khuẩn cho là nguồn nguyên liệu di truyền để tạo khả năng sử dụng sucroza, chủng nhận có được khả năng sử dụng sucroza phụ thuộc vào PTS hoặc khả năng sử dụng sucroza không phụ thuộc vào PTS.

Clostridium acetobutylicum ATCC 824 và *Clostridium beijerinickii* được biết là vận chuyển sucroza bằng PTS. Operon để vận chuyển và chuyển hóa sucroza trong mỗi sinh vật này được biết là để mã hóa ba protein chức năng và một protein điều hòa. Vì vậy, ở *Clostridium acetobutylicum*, operon vận chuyển và chuyển hóa sucroza chứa các gen *scrA*, *scrB*, *scrK* và *scrT* lần lượt mã hóa enzym II của PTS, sucroza-6-phosphat hydrolaza, fructokinaza, và protein điều hòa chống kết thúc. Trong trường hợp của *Clostridium beijerinickii*, operon vận chuyển và chuyển hóa sucroza chứa các gen *scrA*, *scrB*, *scrK* và *scrR* lần lượt mã hóa enzym II của PTS, sucroza-6-phosphat hydrolaza, fructokinaza, và protein điều hòa. Khi cần biến đổi chủng vi khuẩn không có khả năng sử dụng sucroza thành chủng sử dụng sucroza, chỉ các gen *scrA*, *scrB* và *scrK* thu được từ một loài trong số các loài *Clostridial* được đưa vào trong chủng âm sucroza-PTS. Tất cả ba gen này có thể có nguồn gốc từ một loài *Clostridium*. Theo cách khác, một hoặc hai gen có thể có nguồn gốc từ một loài và các gen còn lại có thể có nguồn gốc từ loài khác.

Staphylococcus xylosus có thể là nguồn gen *scrA* mã hóa protein PTS đặc hiệu với sucroza và gen *scrB* mã hóa sucroza phosphat hydrolaza.

Mannheimia succiniproducens là nguồn gen khác để mã hóa protein PTS đặc hiệu với sucroza. Gen MS0784 của *M. succiniproducens* gần đây đã được biết là để mã hóa protein có chức năng PTS đặc hiệu với sucroza. Gen MS0909 gần đây đã được biết là để mã hóa protein có hoạt tính sucroza 6-phosphat hydrolaza. *Corynebacterium glutamicum* là nguồn gen khác nữa hữu dụng theo sáng chế. Gen sucroza PTS mã hóa protein sucroza EIIBCA cũng như sucroza-6-phosphat hydrolaza có thể thu được từ operon sucroza PTS của *C. glutamicum*. Operon fructoza PTS của *C. glutamicum* có

thể được sử dụng làm nguồn gen fructoza-1-phosphat kinaza. Cả *Corynebacterium glutamicum* lẫn *Mannheimia succiniproducens* đều không có gen fructokinaza và fructoza được giải phóng từ sự thủy phân sucroza-6-phosphat được đưa vào trong môi trường và được hấp thụ bởi fructoza PTS. Một cách để cải thiện sự sử dụng sucroza ở các chủng không có hoạt tính của enzym fructoza kinaza là đưa gen ngoại sinh mã hóa enzym fructoza kinaza vào.

Các nguồn gen và protein sử dụng sucroza khác như sau: protein PTS đặc hiệu với sucroza ScrA có thể có nguồn gốc từ *Erwinia chrysanthemi* 3937. Tương tự, *Bacillus subtilis* có thể là nguồn protein PTS đặc hiệu với sucroza SacP. Gen *B. subtilis sacP* mã hóa protein của EIIBC^{scr} có lẽ là hoạt động cùng với EIIG^{glu} để vận chuyển sucroza. Gen *sacA* mã hóa sucroza-6-phosphat hydrolaza thủy phân sucroza-6-phosphat nội bào.

Trong operon *scrARBK* của loài *Clostridium*, *scrA* mã hóa miền EIIBC^{scr} của sucroza PTS, mà nó có thể được bổ sung bởi protein EIIG^{glu}. *scrB* mã hóa sucroza hydrolaza và *scrK* mã hóa fructokinaza. Ở *Staphylococcus xylosus*, *scrA* tách khỏi *scrB* và *scrK*. Gen *scrA* mã hóa EIIBC^{scr}. Gen *scrB* mã hóa sucroza hydrolaza và *scrK* mã hóa fructokinaza. Ở vi khuẩn tạo axit lactic gam dương *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, và *Streptococcus mutans*, *scrA* mã hóa protein sucroza PTS. *scrB* mã hóa sucroza-6-P hydrolaza. *scrK* mã hóa fructokinaza. Ở vi khuẩn đường ruột *Salmonella* spp, plasmit liên hợp và gen nhảy liên hợp có operon *scrKYABR*. *scrK* mã hóa fructokinaza, *scrY* mã hóa porin màng ngoài, *scrA* mã hóa protein vận chuyển EIIS^{scr}, và *scrB* mã hóa sucroza-6-p hydrolaza. *Erwinia amylovora* có cụm gen *scrKYABR* tương tự như ở *Klebsiella pneumonia* và pUR400. *Vibrio alginolyticus* có operon *scrRAKB*. Gen *scrA* mã hóa protein của EIIBC^{scr} được bổ sung bởi cấu trúc siêu phân tử EIIG^{glu} *E. coli* và *scrB* mã hóa sucroza hydrolaza.

Thể phân lập kiểu đại *E. coli* EC3132 có thể sử dụng sucroza trong khi chủng *E. coli* K12 không thể sử dụng sucroza. Gen không PTS có trong sự sử dụng và chuyển hóa sucroza cụ thể là *cscB*, *cscK*, *cscA* và *cscR* về mặt nhiễm sắc thể được đặt trong EC3132. Các gen *cscB*, *cscK*, *cscA* và *cscR* này của chủng *E. coli* EC3132 có thể được đưa vào trong chủng *E. coli* K12 để tạo khả năng sử dụng sucroza cho chủng *E. coli* K12.

Gen sucroza phosphorylaza có thể thu được từ *Bifidobacterium longum*, *Leuconostoc mesenteroides* (ví dụ, chủng DSM 20193), *Pseudobutyrvibrio ruminis*, hoặc ADN *Bifidobacterium lactis*. Gen *scrP* của *B. lactis* và gen *spl* của *B. longum* mã hóa sucroza phosphorylaza.

B. longum có thể là nguồn gen permeaza, phosphorylaza và fructokinaza. Trong *B. longum*, gen permeaza (*scrT*) và phosphorylaza (*scrP*) xuất hiện trong operon cùng với gen mã hóa gen điều hòa phiên mã (*scrR*). Cũng có trong *B. longum* là gen fructokinaza (*frk*) có thể được tạo ra bởi fructoza và chiuih sự kìm hãm được điều tiết bởi glucoza. Bằng cách sử dụng các tập hợp đoạn môi đặc hiệu, các khung đọc mở của các gen này có thể thu được và được biểu hiện trong chất xúc tác sinh học bằng cách sử dụng gen khởi đầu thích hợp.

Gen mã hóa glucokinaza và fructokinaza có thể thu được từ *Zymomonas mobilis*. Glucokinaza có tính đặc hiệu hexoza rộng có thể thu được từ *Bacillus sphaericus* C3-41. Glucokinaza của loài vi khuẩn này đã được biết là để phosphoryl hóa fructoza và cả manozơ. Glucokinaza được mã hóa bởi *E. coli glk*-thuộc hệ gen một cách riêng rẽ hoặc kết hợp với glucokinaza được mã hóa bởi *Zymomonas mobilis glk* nằm quanh vùng trong plasmit cũng làm xúc tác cho sự phosphoryl hóa glucoza. Bên cạnh đó, bản sao của *glk* đã có trong ADN hệ gen của *E. coli*, các bản sao bổ sung của gen *glk* được tạo ra trong plasmit có số bản sao thấp dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu cấu trúc nhất định, hoặc được gắn vào trong nhiễm sắc thể.

Gen ngoại sinh được đưa vào trong tế bào có thể được duy trì trong tế bào trong plasmit tự sao chép. Plasmit có thể được duy trì bằng sự lựa chọn kháng sinh hoặc sự bổ sung đột biến của nhiễm sắc thể. Tuy nhiên, khi gen ngoại sinh được duy trì trong chất xúc tác sinh học trong plasmit tự sao chép trong tế bào, cần bảo đảm là không có sự lãng phí không cần thiết về năng lượng và nguyên liệu dẫn đến sự ức chế sinh trưởng, và sự giảm về hiệu suất hoặc năng suất của chất hữu cơ được sản xuất bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học. Tốt hơn là, gen ngoại sinh được gắn vào trong nhiễm sắc thể chủ sao cho không cần bổ sung kháng sinh bất kỳ nào để duy trì plasmit trong tế bào. Có một số vị trí có thể trong tế bào để gắn gen ngoại sinh. Các vị trí ưu tiên để gắn gen ngoại sinh trong ADN của nhiễm sắc thể *E. coli* bao gồm các vùng có chức năng sinh trưởng phụ và tạo ra sản phẩm trong điều kiện lên men thương mại.

Khi gen ngoại sinh thu được là operon, tốt hơn là loại bỏ gen hoặc protein điều hòa âm có thể có bất kỳ khởi operon. Là lý tưởng khi chỉ có gene và protein hoạt động có lợi trong sự vận chuyển và chuyển hóa sucroza. Vì vậy, tốt hơn là sự biểu hiện gen sử dụng sucroza không bị ức chế bởi gen kìm hãm hoặc bởi sự kìm hãm chất dị hóa cacbon.

Gen cần cho sự sử dụng sucroza có thể có nguồn gốc từ hai sinh vật cho riêng rẽ. Ví dụ, gen *scrK* dùng cho fructokinaza có thể có nguồn gốc từ *K. pneumoniae*, và gen *cscsA* và *cscB* có thể có nguồn gốc từ chủng *E. coli* W, và ba gen này có thể được kết hợp vào trong một chủng nhận. Đối với ví dụ khác, gen mã hóa sucroza phosphorylaza của *Leuconostoc mesenteroides* có thể được cấy ghép cùng với gen *cscB* và *cscK* của chủng *E. coli* W, có hoặc không có gen *cscA*.

Vi khuẩn bất kỳ không đồng hóa sucroza và có khả năng tạo axit succinic có thể được cải thiện theo sáng chế.

Vi khuẩn theo sáng chế có thể thu được nhờ sự đưa gen sử dụng sucroza nhờ hệ sử dụng sucroza phụ thuộc vào PTS hoặc hệ sử dụng sucroza không phụ thuộc vào PTS vào trong chủng tạo axit succinic như KJ122. Theo cách khác, vi khuẩn theo sáng chế có thể thu được bằng cách tạo khả năng tạo axit succinic cho vi khuẩn trong đó hệ sử dụng sucroza phụ thuộc vào PTS hoặc hệ sử dụng sucroza không phụ thuộc vào PTS đã có. Phương án thay thế sau này có thể được thực hiện, ví dụ, tiếp theo tất cả các bước được sử dụng để tạo ra KJ122 (được bộc lộ trong Janatama và cộng sự, 2008), nhưng bắt đầu bằng chủng ATCC 9637 thay vì bắt đầu bằng chủng ATCC 8739.

Nguồn hệ sử dụng sucroza phụ thuộc vào PTS hoặc hệ sử dụng sucroza không phụ thuộc vào PTS không bị giới hạn cụ thể miễn là gen có liên quan có thể hoạt động hoặc được tạo ra để hoạt động trong tế bào của vi khuẩn được quan tâm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được thực hiện để minh họa cho sáng chế và không nhằm giới hạn sáng chế.

Ví dụ 1: Tạo SD14, dẫn xuất của KJ122 chứa cụm gen *cscBKA* của *E. coli* W.

Cụm gen *cscBKA* mã hóa các gen quy định sự hấp thụ và sử dụng sucroza, được khuếch đại từ ADN hệ gen của chủng W của *Escherichia coli* (ATCC 9637) bằng cách sử dụng phản ứng trình tự polymeraza. Đoạn môi PCR được thiết kế theo cách sao cho sản phẩm PCR thu được chỉ chứa gen *cscB*, *cscK*, và *cscA* của operon *csc* ban đầu ở chủng W và không chứa gen *cscR* chức năng mã hóa protein kìm hãm. Ngoài các trình tự tương đồng với operon *csc*, đoạn môi để khuếch đại PCR bao gồm 50 bazơ (bp) tại đầu 5' của trình tự tương đồng với vị trí để gắn vào trong nhiễm sắc thể *E. coli* KJ122. Trình tự đoạn môi PCR được sử dụng trong ví dụ này được liệt kê trong bảng 1. Vị trí đích để gắn là 291 bp phía trên gen *rrnC*. Vị trí này không mã hóa gen đã biết bất kỳ nào vì vậy tối thiểu hóa khả năng phá vỡ chức năng di truyền *E. coli* quan trọng.

Sản phẩm PCR thu được bằng cách sử dụng đoạn môi SD032 và SD033 và ADN của nhiễm sắc thể ATCC 9673 làm khuôn được tinh chế bằng cách sử dụng bộ tinh chế PCR Qiagen QIAquick như được chỉ dẫn bởi nhà sản xuất. Sau đó, các mảnh đã được tinh chế được biến đổi thành KJ122 chứa plasmit hỗ trợ pKD46 theo phương pháp được mô tả bởi Datsenko và Wanner. (Datsenko và Warner 2000). pKD46 có thể mua được từ Coli Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT. Sự lựa chọn đúng về phía sinh trưởng trong đĩa sucroza tối thiểu. Chủng thu được được thử nghiệm về sự gắn chính xác gen *csc* ở vị trí đích dự kiến trước *rrnC* bởi PCR chuẩn đoán bằng cách sử dụng đoạn môi từ SD033 đến SD036 trong các kết hợp thích hợp khác nhau. Các chủng đúng phát triển tốt trong môi trường sucroza tối thiểu và tạo ra các cụm màu đỏ trong đĩa sucroza MacConkey. Đối với tất cả các môi trường nuôi cấy, sucroza là siêu tinh khiết (ví dụ, số danh mục Sigma S 7903). Dung dịch nguyên liệu sucroza được pha 50% (khối lượng/thể tích) trong nước cất và được khử trùng bằng cách lọc qua thiết bị lọc bằng màng nylon 0,2 micromet hiệu Nalgene dùng một lần. Một thể phân lập cụ thể có tên là SD14 được sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

Theo cách tương tự như cách được mô tả ở trên, trình tự ADN bất kỳ mã hóa gen sử dụng sucroza (không phụ thuộc vào PTS hoặc phụ thuộc vào PTS, ví dụ, operon *scrKYBA* của *Klebsiella pneumoniae* hoặc pUR400) có thể được sao chép bởi PCR và được gắn vào trong nhiễm sắc thể của chủng nhận ở đích tương tự được mô tả ở trên hoặc ở đích khác thích hợp bất kỳ. Ví dụ, bằng cách sử dụng đoạn môi SD038

và SD039, operon *cscBAK* của *E. coli* W có thể được gắn ngay trước gen *dnaA* ở KJ122.

Các hình vẽ từ 1 đến 5 cung cấp kết quả của các thử nghiệm được thực hiện bằng chủng SD14 trong thiết bị lên men sinh vật ưa ít oxy cỡ nhỏ. Hình vẽ 1 cung cấp dữ liệu về động lực học của sự sử dụng sucroza, và động lực học của sự tích lũy glucoza, fructoza, và axit suxinic. Cũng được thể hiện trên hình vẽ 1 là động lực học của sự sinh trưởng của vi khuẩn. Hình vẽ từ 2 đến 5 lần lượt thể hiện động lực học của sự sử dụng sucroza, động lực học của sự tích lũy glucoza, động lực học của sự tích lũy fructoza, và động lực học của sự tích lũy axit suxinic. Trong các thử nghiệm được mô tả trên hình vẽ từ 2 đến 5, ba nồng độ sucroza khác nhau (100 g/l, 150 g/l và 200 g/l) được sử dụng.

Ví dụ 2: Phân tích sự sinh trưởng và sử dụng sucroza ở chủng tái tổ hợp SD14 trong thiết bị lên men 7 lít

Chủng SD14 được sinh trưởng trong môi trường tối thiểu được bổ sung 10% sucroza. Dung dịch nguyên liệu gốc chứa cả amoni hydroxit lẫn amoni bicacbonat (7 N NH_4OH và 3M NH_4HCO_3) được sử dụng để trung hòa axit suxinic được tạo ra trong thiết bị lên men ở nhiệt độ 39° C. Thể tích ban đầu bằng 3 lít chứa kali phosphat monobazơ (18 mM) magie sulfat (2 mM), betain (1,33 mM), nguyên tố vết (Jantama và cộng sự, 2008a, b), chất chống tạo bọt 204 (8 ppm) và sucroza được định mức với nồng độ 98 g/l. Ban đầu, độ pH được điều chỉnh đến độ pH 7,0 và sau đó được duy trì ở độ pH 6,5 bằng cách bổ sung dung dịch amoni hydroxit/amoni bicacbonat được mô tả ở trên. Không khí được cấp với lưu lượng 5 ml/phút. 150 ml chất cấy được sinh trưởng ưa khí và chứa môi trường tối thiểu với 2% sucroza và được bổ sung 0,1 mM canxi clorua.

Để so sánh, KJ122 được lên men trong môi trường tương tự với dung dịch trung hòa tương tự, ngoại trừ một điểm là nguồn cacbon là glucoza, nó được định mức với nồng độ 25 g/l và sau đó được phân phối theo chế độ cấp theo mẻ từ nồng độ là 220 g/l. Đường, suxinat, và sản phẩm phụ được phân tích bằng HPLC, như được mô tả (Zhang và cộng sự, 2009 a,b; Jantama và cộng sự, 2008 a, b).

Các kết quả được so sánh với quy trình cấp theo mẻ tiêu biểu của chủng cha mẹ

KJ122 được sinh trưởng trong glucoza trong bảng 2. Động lực học của sự sử dụng sucroza, sự tích lũy glucoza, sự tích lũy fructoza và sự tạo ra suxinat trong khi lên men bằng SD14 được thể hiện trên hình vẽ 6. Sucroza được sử dụng hoàn toàn sau 50 giờ và nồng độ axit suxinic trong môi trường đạt đến giá trị bằng 83,08 gam trên một lít canh lên men sau 50 giờ. Nồng độ glucoza và fructoza trong môi trường đạt đến giá trị đỉnh của chúng sau khoảng 25 giờ.

Ví dụ 3: Sự tách dòng và sự biểu hiện sucroza phosphorylaza ở SD14

Gen sucroza phosphorylaza của chủng *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20193 (Goedl và cộng sự, 2007) được tách dòng nhờ sự khuếch đại PCR bằng cách sử dụng đoạn mồi BY107 và BY108 (xem bảng 1) và ADN hệ gen làm khuôn. Sản phẩm PCR 1594 bp thu được được tinh chế trong cột tinh chế PRC Quiagen QIAquick, được phân tách bằng enzym giới hạn XbaI và BamHI (New England Biolabs), và được tinh chế nhờ sự điện di trên gel agarosa. Mảnh thu được được nối thành XbaI vào khung BamHI của pOM324 (đơn sáng chế Mỹ số 2009/0311756) để tạo ra plasmit pRY801, nó đặt gen sucroza phosphorylaza dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu cơ định mạnh. Kết cấu kết thúc gen sucroza phosphorylaza khởi đầu được cắt khỏi pRY801 bằng cách cắt bằng XhoI và BamHI, và các đầu dính của kết cấu thu được được làm cùn đi bằng bộ làm cùn Quick (New England Biolabs) và mảnh được làm cùn được thắt thành pMH17F (SEQ ID NO. 13) mà nó đã được cắt bằng BsrBI và được xử lý bằng phosphataza ruột bê (New England Biolabs), để tạo ra plasmit pRY802F (SEQ ID 14). Ở pRY802F, kết cấu biểu hiện sucroza phosphorylaza được kẹp sườn ở mỗi đầu bằng khoảng 500 bp của trình tự ADN tương đồng với trình tự ngay phía dưới gen *thrV* của chủng SD14. Kết cấu và trình tự bao quanh được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng pRY802F làm khuôn và đoạn mồi BY83 và BY84 (xem bảng 1). Mảnh 2,7 kilobazơ thu được được tinh chế trong cột tinh chế PCR Qiagen QIAquick. Sau đó, mảnh này được cấy ghép vào trong SD14 ngay cạnh vị trí *thrV* nhờ phương pháp thay thế gen hai bước của Jantama và cộng sự (2008 a, b), bằng cách sử dụng kết cấu *cat-sacB* có thể chọn được và không có thể chọn được với trình tự đi kèm tương tự tương đồng với vùng *thrV* đối với bước thứ nhất. Đối với bước thứ nhất, kết cấu *cat-sacB* thu được là mảnh *Eco* ICRI cùn của pCA2 và được thắt thành *BsrBI* được phân tách, và được xử lý phosphataza ruột bê, pMH17F như được mô tả ở trên, để tạo ra plasmit

pRY803F (SEQ ID NO 15). Kết cấu *cat-sacB* có các trình tự bao quanh tương đồng với vùng *thrV* được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng đoạn môi BY83 và BY84. Sản phẩm ADN dài 4 kb thu được được sử dụng để biến đổi SD14 thành kháng cloramphenicol để tạo ra chủng RY863. Trong bước thứ hai, sản phẩm ADN dài 2,7 kb được mô tả ở trên (nó chứa kết cấu biểu hiện sucroza phosphorylaza của RY802F) được sử dụng để biến đổi RY863 thành kháng sucroza (Jantama và cộng sự, 2008 a, b) để tạo ra chủng RY864. Chủng đúng được xác nhận bằng cách sử dụng PCR chuẩn đoán với ADN của nhiễm sắc thể làm khuôn và BY83 và BY84 làm đoạn môi. Chủng thu được, RY864, có kết cấu sucroza phosphorylaza được gắn gần *thrV*, và biểu hiện mức sucroza phosphorylaza đáng kể, nó cải thiện hiệu quả sử dụng sucroza bằng cách tiết kiệm một ATP trên một mol sucroza được phân tách.

Tài liệu tham khảo

Patent Mỹ số 6.960.455

Patent Mỹ số 7.179.623

Công bố đơn sáng chế Mỹ số 20080275426

Công bố đơn sáng chế Mỹ số 20090047719

Công bố đơn sáng chế Mỹ số 20090253192

Công bố đơn sáng chế Mỹ số 20090311756

Công bố đơn sáng chế Mỹ số 20100184171

Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2010/032698

Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2010/053052

Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2010/115067

Alaeddinoglu, N. G., and Charles, H. P. (1979) Transfer of a gene for sucrose utilization into *Escherichia coli* K12, and consequent failure of expression of genes for D-serine utilization, *J Gen Microbiol* 110, 47-59.

Bachmann, B. J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12, *Bacteriol Rev* 36, 525-557.

Becker, J., Klopprogge, C., Zelder, O., Heinzle, E., and Wittmann, C. (2005)

Amplified expression of fructose 1,6-Bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases in vivo flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8587-8596.

Bockmann, J., Heuel, H., and Lengeler, J. W. (1992) Characterization of a chromosomally encoded, non-PTS metabolic pathway for sucrose utilization in *Escherichia coli* EC3132, *Mol Gen Genet* 235, 22-32.

Caescu, C., Vidal, O., Krzewinski, F., Artenie, V., and Bouquelet, S. (2004) *Bifidobacterium longum* requires a fructokinase (Frk; ATP:D-fructose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.4) for fructose catabolism. *J. Bacteriol.* 186: 6515-6525.

Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6640-6645.

Deutscher, J., Francke, C., and Postma, PW. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbio. Mol. Bio. Rev.* 70: 939-1031.

Doelle, HW. (1982) Kinetic characteristics and regulatory mechanisms of glucokinase and fructokinase from *Zymomonas mobilis*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14: 241-246.

Dominquez, H., and Lindley, ND. (1996) complete sucrose metabolism requires fructose phosphotransferase activity in *Corynebacterium glutamicum* to ensure phosphorylation of liberated fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3878-3880.

Engels, V., Linden, SN., and Wendisch, VF. (2008) The global repressor SugR controls expression of genes of glycolysis and of the L-lactate dehydrogenase LdHA in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 190: 8033-8044.

Goedl, C., Schwarz, A., Minani, A., and Nidetzky, B. (2007) Recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*: characterization, kinetic studies of transglucosylation, and application of immobilised enzyme for production of alpha-D-glucose 1-phosphate, *J Biotechnol* 129, 77-86.

Han, B., Liu, H., Hu, X., Cai, Y., Zheng, D., Yuan, Z. (2007) Molecular characterization of a glucokinase with broad hexose specificity from *Bacillus sphaericus* strain C3-41. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3581-3586.

Hernandez_Montalvo, V., Martinez, A., Hernandez-Chavez, G., Bolivar, F., Valle, F., Gosset, G. (2003) Expression of galp and glk in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol. Bioengineer.* 83: 6897-694.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Charaoui-Boukerzaza, S. (2009) Catabolism of raffinose, sucrose, and melibiose in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* 191: 6960-6967.

Jahreis, K., Bentler, L., Bockmann, J., Hans, S., Meyer, A., Siepelmeier, J., and Lengeler, JW. (2002) Adaptation of sucrose metabolism in the *Escherichia coli* wild type strain EC3132. *J. Bacteriol.* 184: 5307-5316.

Jankovic, I., and Bruckner, R. (2007) Carbon catabolite repression of sucrose utilization in *Staphylococcus xylosus*: Catabolite control protein CcpA ensures glucose preference and autoregulatory limitation of sucrose utilization. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 12: 114-120.

Jantama, K., Haupt, MJ., Svoronos, SA., Zhang, X., Moore, JC. Shanmugam, KT., and Ingram, LO. (2008a) Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol. Bioeng.* 99: 1140-1153.

Jantama, K., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Svoronos, S. A., and Ingram, L. O. (2008b) Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C, *Biotechnol. Bioeng.* 101, 881-893.

Jiang, L., Cai, J., Wang, J., Liang, S., Xu, Z. and Yang, ST. (2010) Phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of sucrose by *Clostridium tyrobutyricum* ZJU 8235: evidence for the phosphotransferase transport system. *Bioresour. Technol.* 101: 304-9.

Lee, J., Mitchell, WJ., Tangney, M., and Blaschek, HP (2005) Evidence for the presence of an alternative glucose transport system in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 and the solvent-hyperproducing mutant BA101. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3384-3387.

Lee, J. W., Choi, S., Park, J. H., Vickers, C. E., Nielsen, L. K., and Lee, S. Y. (2010a) Development of sucrose-utilizing *Escherichia coli* K-12 strain by cloning beta-fructofuranosidases and its application for L-threonine production, *Appl Microbiol Biotechnol* 88, 905-913.

Lee, JW., Choi, S., Kim, JM., and Lee, SY. (2010b) *Mannheimia succiniproducens* phosphotransferase system for sucrose utilization. 76: 1699-1703.

Moon, M-W., Kim, H-J., Oh, T-K., Shin, C-S., Lee, J-S., Kim, S-J., and Lee, J-K. (2005) Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *FEMS Microbiol. Lett.* 244: 259-266.

Neidhardt, F. C., and Curtiss, R. (1996) *Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology*, 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.

Reid, SJ., and Abratt, VR. (2005) Sucrose utilization in bacteria: genetic organization and regulation. 67: 312-321.

Reizer, J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier Jr., MH., and Stulke, J. (1999) Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis – the complete complements of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 145: 3419-3429.

Scholten, E., Renz, T, and Thomas, J. (2009) Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. *Biotechnol Lett* 31:1947–1951.

Shukla, VB, Zhou, S., Yomano, LP., Shanmugam, KT, Preston, JF., Ingram, LO. (2004) Production of D(-)-lactate from sucrose and molasses. *Biotechnol. Lett.* 26: 689-693.

Tanaka, Y. Okai, N., Termoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2008) Regulation of the expression of phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system (PTS) genes in *Corynebacterium glutamicum* R. *Microbiol.* 154: 264-274.

Tangney, M., Yazdanian, M., and Mitchell, WJ. (1998) Sucrose transport and metabolism in *Clostridium beijerinickii*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 914-9.

Tangney, M. and Mitchell WJ (2002) Analysis of a catabolic operon for sucrose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2: 71-80.

Trindale, MI., Abratt, VR., and Reid, SJ. (2003) Induction of sucrose utilization genes from *bifidobacterium lactis* by sucrose and raffinose. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 24-32.

Wang, J., Zhu, J., Bennett, G. N. and San, K-Y. (2011) Succinate production from different carbon sources under anaerobic conditions by metabolic engineered *Escherichia coli* strains. *Metab. Eng.* 13: 328-335.

Yi, J., Draths, KM., Li, K., and Frost JW. (2003) Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol. Prog.* 19: 1450-1459.

Zhang, X. Jantama, K., Moore JC, Jarboe, LR., Shanmugam, KT., and Ingram, O. (2009a) Metabolic evolution of energy-conserving pathway for succinate production of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 20180-20185.

Zhang, X., Jantama, K., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2009b) "Re-engineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium." *App Environ Microbiol* 75: 7807-7813.

Bảng 1. Đoạn mồi được sử dụng trong PCR		
SEQ ID NO.	Đoạn mồi số	Trình tự đoạn mồi (từ 5' đến 3')
SEQ ID NO. 1	SD032	taaatttctcttgtcaggccggaataactccctataatgcgccaccact <u>aggcgtttgattaggcgatt</u>
SEQ ID NO. 2	SD033	ctcaggagaacccccgctgacccggcggtgtttgccgtgttccgtgtc <u>gatccgttgttccacctgatatt</u>
SEQ ID NO. 3	SD034	ttagtatgccaccaggaagt các đoạn mồi trong phần cài xen kẹp sườn <i>rrnc</i> (có 1

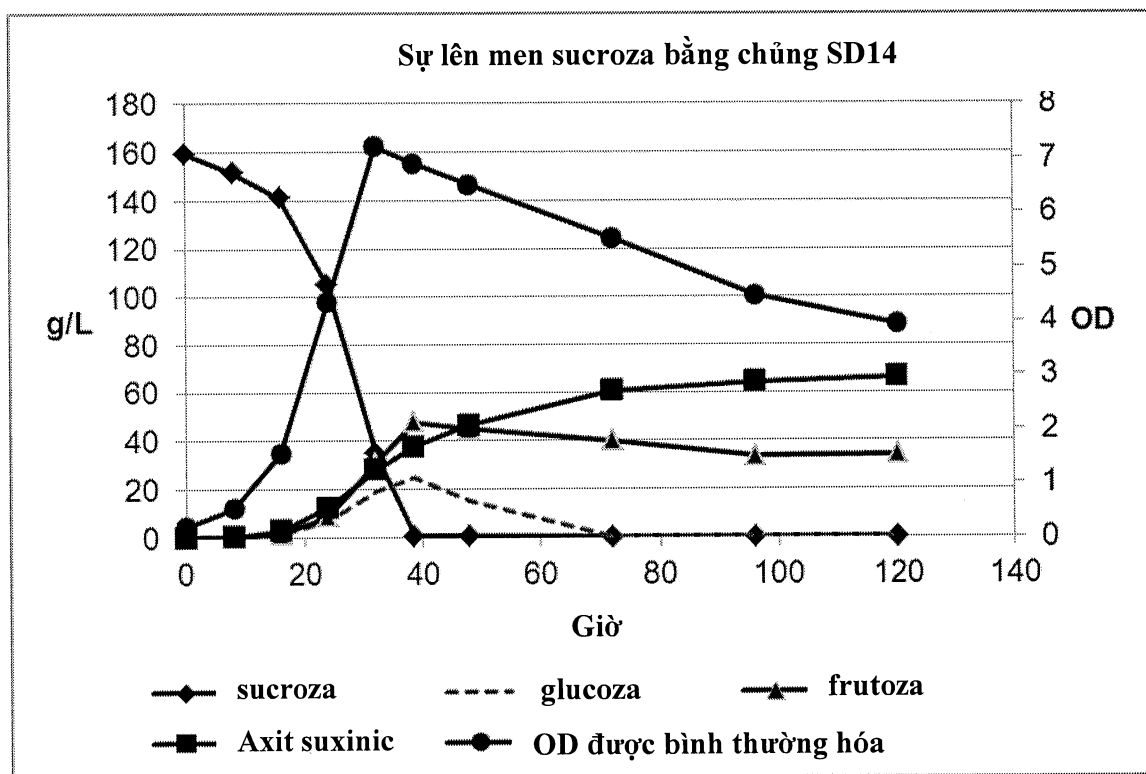
		ghép đôi không xứng với trình tự KJ122)
SEQ ID NO. 4	SD035	atgctcaaagaattaaactt các đoạn môi trong phần cài xen kẹp sườn <i>rrnc</i> (có 1 ghép đôi không xứng với trình tự KJ122)
SEQ ID NO. 5	SD036	cagttttcttcgcaatttcg đoạn môi bên trong đối với <i>cscB</i>
SEQ ID NO. 6	SD037	gacacgctcgcctaaggat đoạn môi bên trong đối với <i>cscA</i>
SEQ ID NO. 7	SD038	tggaaagtcctgtggataaatcgggaaaatctgtgagaaacagaagatct <u>gagcgactgtaccagaacatga</u>
SEQ ID NO. 8	SD039	agatcctgcaaaacgatcgggaccgcggatcatagcctaactgcgcaag <u>tcgccgtaatgggcttga</u>
SEQ ID NO. 9	BY83	ttacctagagaggggtgagaattgccgaacat
SEQ ID NO. 10	BY84	gatgagagaagattttcagcctgatacagatt
SEQ ID NO. 11	BY107	gggtctagaatagtggaggaataataatggaaattcaaaacaaag
SEQ ID NO. 12	BY108	cgcggatcctgtctgtcaatataatatttcccactatcagca
SEQ ID NO. 13	pMH17F	đòng plasmit của vùng <i>thrV</i> , kháng spectinomycin
SEQ ID NO. 14	pRY802F	gen sucroza phosphorylaza của <i>Leuconostoc mesenteroides</i> chủng DSM 20193 được điều khiển bởi gen khởi đầu cơ định, để gắn ở locus <i>thrV</i>
SEQ ID NO. 15	pRY803F	kết cấu <i>cat-sacB</i> để gắn ở locus <i>thrV</i>

Bảng 2. Ví dụ về lên men					
Chủng	Nguồn cacbon	Hàm lượng suxinat g/l	Hiệu suất suxinat g/g	Hàm lượng fructoza g/l	Thời gian
SD14	Sucroza Mẻ 98 g/l	83,1	0,85	1,80	45 giờ
KJ122	Glucosa Mẻ cấp liệu 106 g/l	82,6	0,86	0	48 giờ

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi khuẩn *Escherichia coli* được biến đổi gen tạo ra ít nhất 20 gam trong một lít hóa chất hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm axit suxinic, axit fumaric, axit malic và 1,4-butandiol, trong môi trường tối thiểu, vi khuẩn nêu trên chứa ít nhất một gen ngoại sinh mã hóa chức năng sử dụng sucroza được chọn từ nhóm bao gồm sucroza: tác nhân đồng vận chuyển cùng chiều H^+ , và fructokinaza.
2. Vi khuẩn *Escherichia coli* được biến đổi gen theo điểm 1, trong đó ít nhất một gen ngoại sinh mã hóa chức năng sử dụng sucroza được chứa trong plasmit sao chép.
3. Vi khuẩn *Escherichia coli* được biến đổi gen theo điểm 1, trong đó vi khuẩn này là chủng vi khuẩn hệ phosphotransferaza⁺.
4. Vi khuẩn *Escherichia coli* được biến đổi gen theo điểm 1, trong đó vi khuẩn này là chủng vi khuẩn hệ phosphotransferaza⁻.
5. Vi khuẩn *Escherichia coli* được biến đổi gen theo điểm 1, trong đó ít nhất một gen ngoại sinh mã hóa chức năng sử dụng sucroza được tích hợp vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn *Escherichia coli*.
6. Vi khuẩn *Escherichia coli* được biến đổi gen tạo ra ít nhất 20 gam trong một lít axit suxinic trong môi trường tối thiểu, vi khuẩn nêu trên chứa ít nhất một gen ngoại sinh mã hóa chức năng sử dụng sucroza được chọn từ nhóm bao gồm sucroza: tác nhân đồng vận chuyển cùng chiều H^+ , và fructokinaza.
7. Vi khuẩn *Escherichia coli* được biến đổi gen theo điểm 6, trong đó ít nhất một gen ngoại sinh mã hóa chức năng sử dụng sucroza được chứa trong plasmit sao chép.
8. Vi khuẩn *Escherichia coli* được biến đổi gen theo điểm 6, trong đó ít nhất một gen ngoại sinh mã hóa chức năng sử dụng sucroza được tích hợp vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn *Escherichia coli*.
9. Vi khuẩn *Escherichia coli* được biến đổi gen theo điểm 6, trong đó gen ngoại sinh đã nêu mã hóa enzym invertaza có chức năng sử dụng sucroza.
10. Vi khuẩn *Escherichia coli* được biến đổi gen theo điểm 6, trong đó vi khuẩn này là chủng vi khuẩn hệ phosphotransferaza⁺.

11. Vi khuẩn *Escherichia coli* được biến đổi gen theo điểm 6, trong đó vi khuẩn này là chủng vi khuẩn hệ phosphotransferaza⁻.

**FIG. 1**

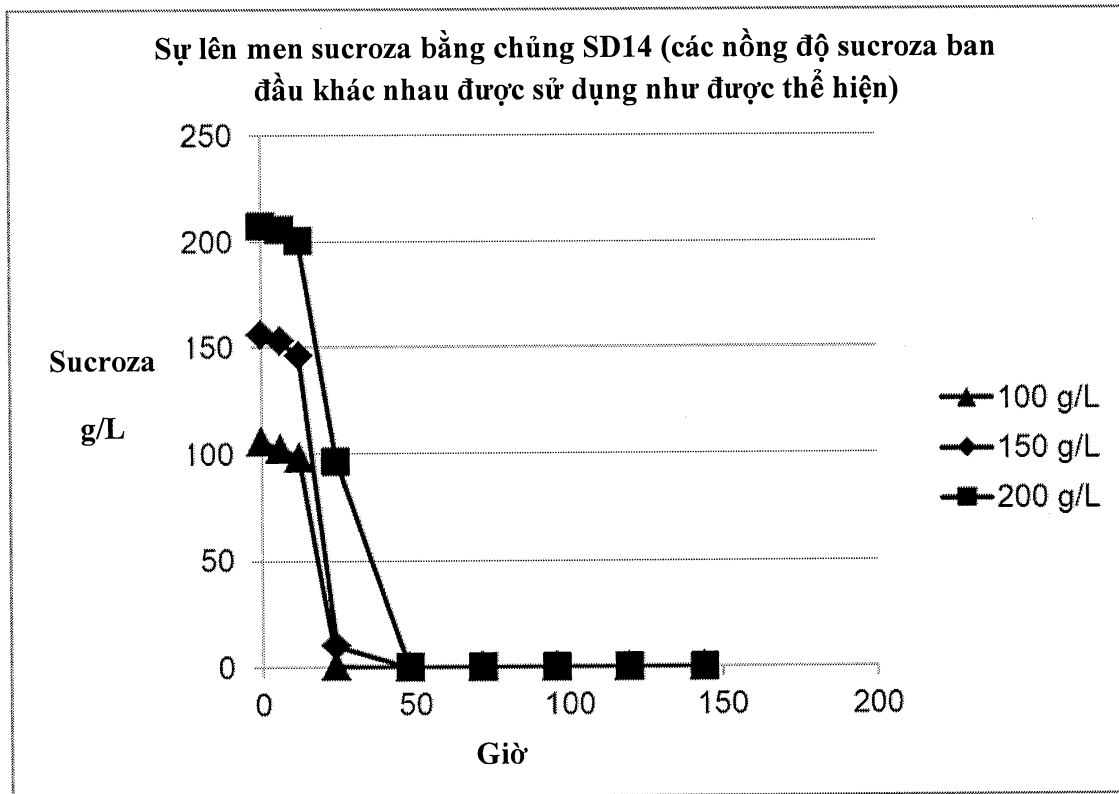


FIG.2

Sự lên men sucroza bằng chủng SD14 (nồng độ sucroza ban đầu là 100g/L, 150g/L và 200g/L). Sự tích lũy glucoza được thể hiện dưới đây.

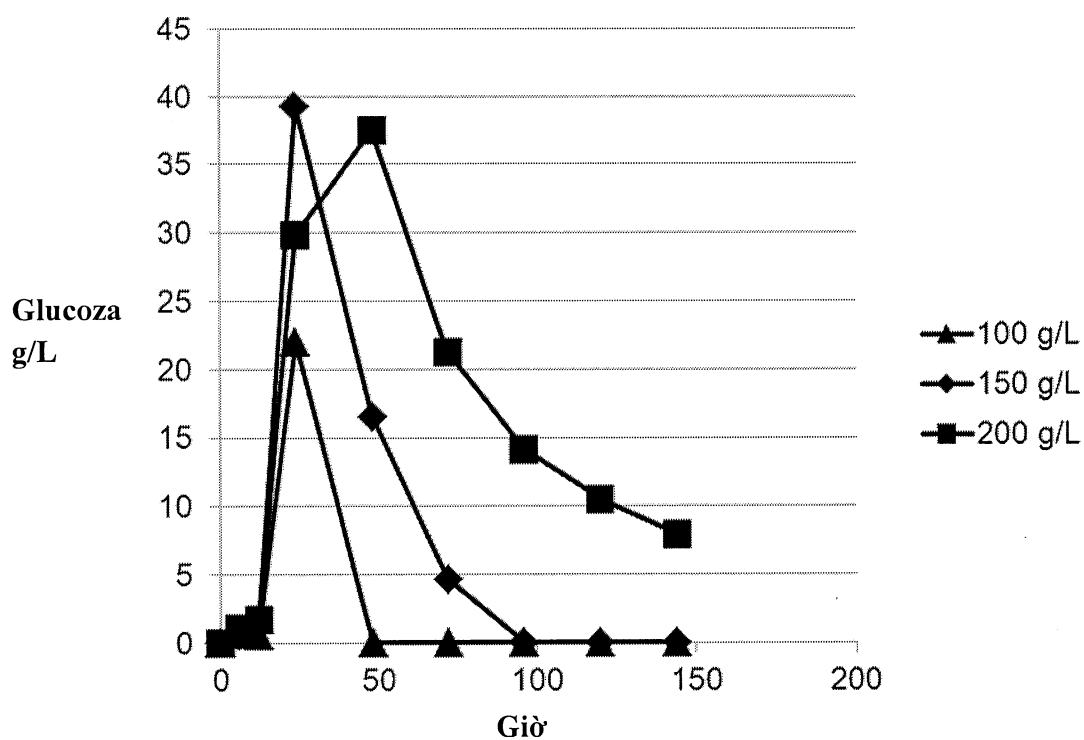


FIG.3

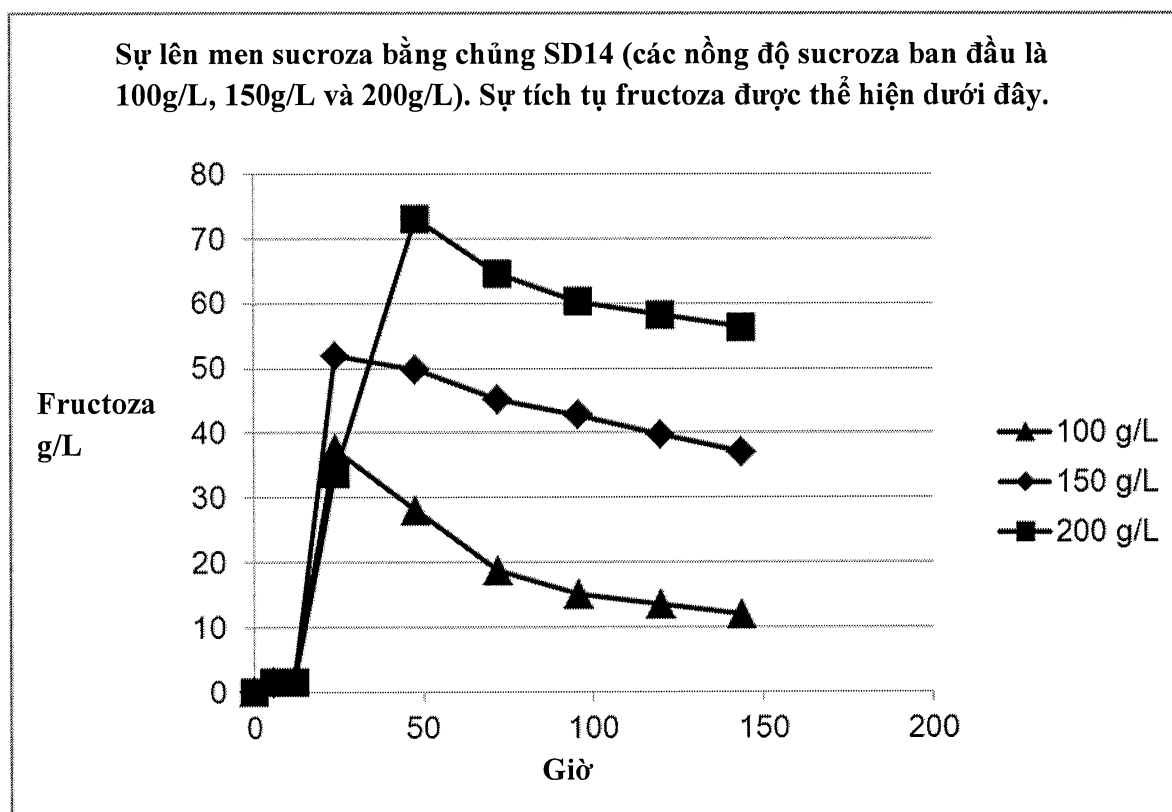


FIG.4

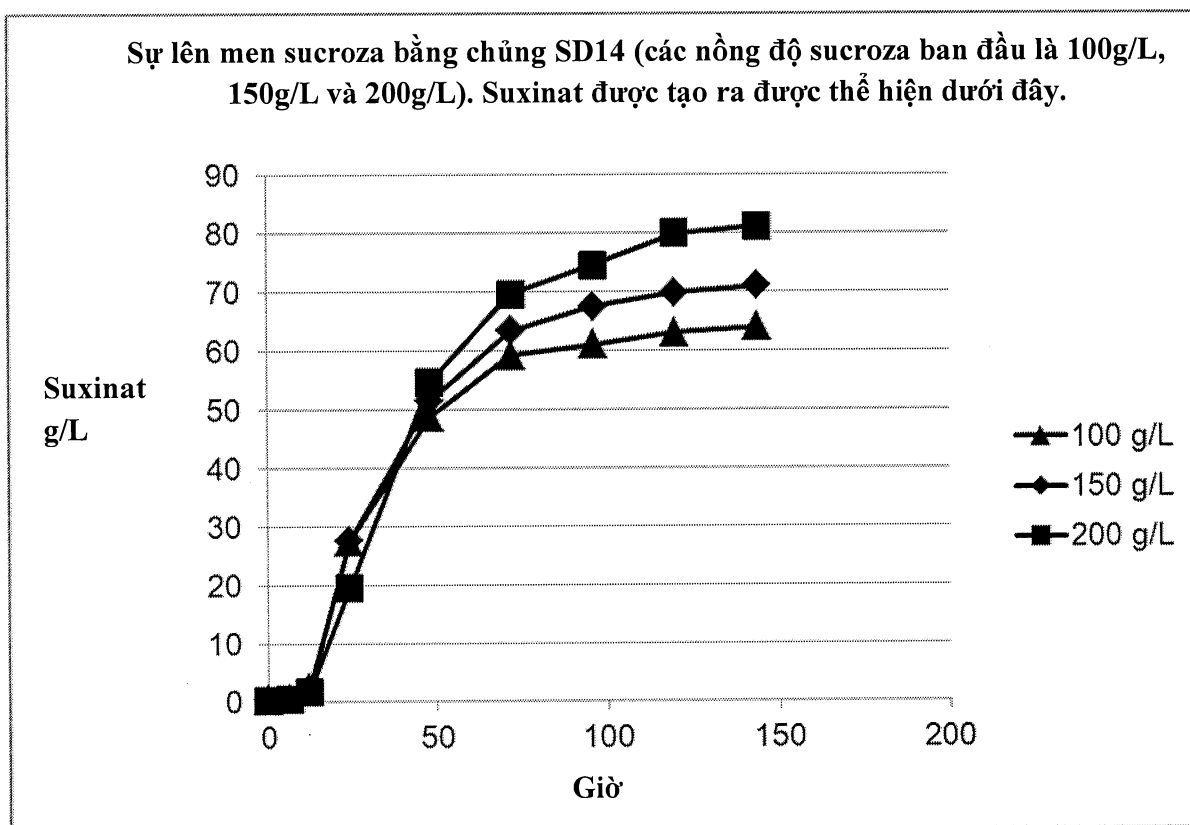


FIG. 5

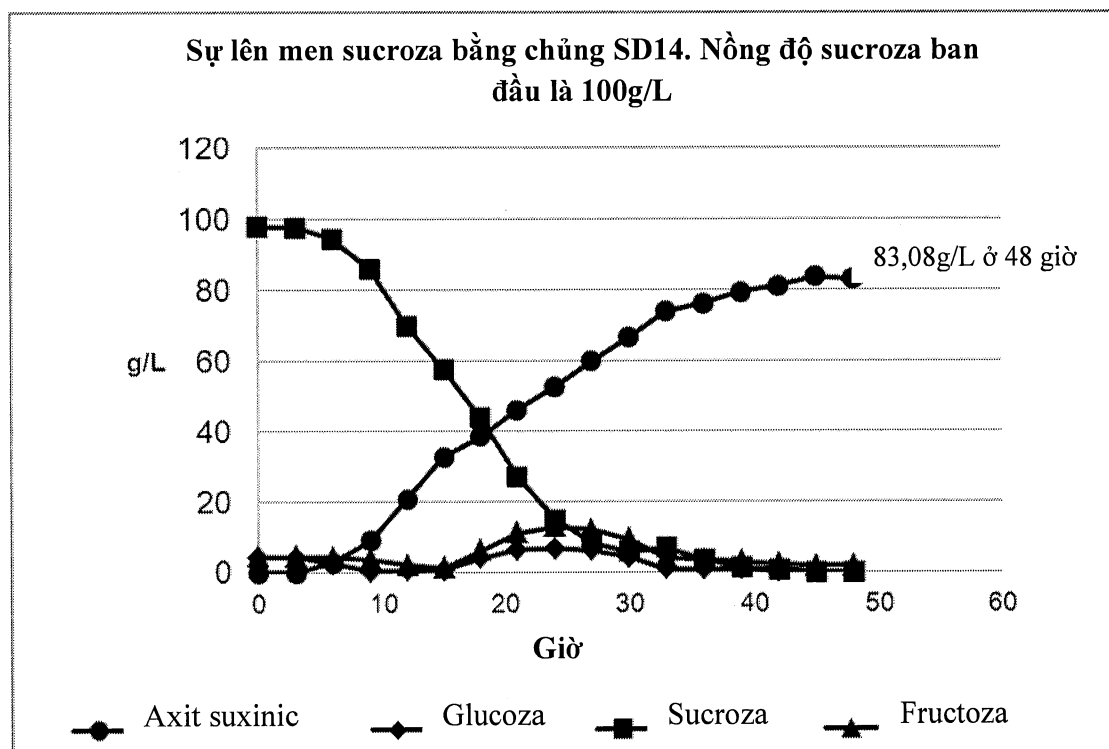


FIG. 6

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Myriant Corporation
Dole, Sudhanshu
Yocum, R. Rogers
Hermann, Theron
Yu, Xiaohui
- <120> VI KHUẨN ESCHERICHIA COLI ĐƯỢC BIẾN ĐỔI GEN SẢN XUẤT AXIT SUXINIC VÀ CÁC HÓA CHẤT KHÁC
- <130> MT2011-05PCT
- <150> US 61/459,446
<151> 2010-12-13
- <160> 15
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> SEQ ID NO. 1
<211> 71
<212> ADN
<213> ADN tổng hợp
<220> Đặc điểm: Đoạn mỗi PCR SD032
<400> Trình tự
taaatttcct cttgtcaggc cggaataact ccctataatg cgccaccact aggcgtttgg 60
attaggcgat t 71
- <210> SEQ ID NO. 2
<211> 73
<212> ADN
<213> ADN tổng hợp
<220> Đặc điểm: Đoạn mỗi PCR SD033
<400> Trình tự
ctcaggagaa ccccgctgac ccggcggcgt gtttgccgtt gttccgtgac gatccgttgt 60
tccacctgat att 73
- <210> SEQ ID NO. 3
<211> 20
<212> ADN
<213> ADN tổng hợp
<220> Đặc điểm: Đoạn mỗi PCR SD034
<400> Trình tự
ttagtatgcc accaggaagt 20
- <210> SEQ ID NO. 4
<211> 20
<212> ADN
<213> ADN tổng hợp
<220> Đặc điểm: Đoạn mỗi PCR SD035
<400> Trình tự
atgctcaaag aattaaactt 20
- <210> SEQ ID NO. 5
<211> 20
<212> ADN

<213> ADN tổng hợp
 <220> Đặc điểm: Đoạn mỗi PCR SD036
 <400> Trình tự
 cagttttctt cgcaatttcg 20

<210> SEQ ID NO. 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp
 <220> Đặc điểm: Đoạn mỗi PCR SD037
 <400> Trình tự
 gacacgctcg ccctaaggat 20

<210> SEQ ID NO.7
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp
 <220> Đặc điểm: Đoạn mỗi PCR SD038
 <400> Trình tự
 tggaaagtcc tgtggataaaa tcgggaaaat ctgtgagaaa cagaagatct gagcgactgt 60
 accagaacat ga 72

<210> SEQ ID NO. 8
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp
 <220> Đặc điểm: Đoạn mỗi PCR SD039
 <400> Trình tự
 agatcctgca aaacgatcgg gaccgcggat catagcctaa actgcgcaag tcgccgtaat 60
 gggcctttga 69

<210> SEQ ID NO. 9
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp
 <220> Đặc điểm: Đoạn mỗi PCR BY83
 <400> Trình tự
 ttacctagag aggggtgagaa ttgccgaaca t 31

<210> SEQ ID NO. 10
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp
 <220> Đặc điểm: Đoạn mỗi PCR BY84
 <400> Trình tự
 gatgagagaa gatttttcagc ctgatacaga tt 32

<210> SEQ ID NO. 11
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> ADN tổng hợp
 <220> Đặc điểm: Đoạn mỗi PCR BY107
 <400> Trình tự
 gggctctagaa tagtggagga ataataatgg aaattcaaaa caaag 45

<210> SEQ ID NO. 12

<211> 43

<212> ADN

<213> ADN tổng hợp

<220> Đặc điểm: Đoạn mỗi PCR BY108

<400> Trình tự

cgcggtatcct tgtctgtcaa tataatatattt cccactatca gca

43

<210> SEQ ID NO. 13

<211> 5772

<212> ADN

<213> ADN plasmit pMH17F

<220> Đặc điểm: Đồng plasmit của vùng thrV, kháng spectinomycin

<400> Trình tự

gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc 60

agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag 120

gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcga taaaacgccc 180

tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttccttgcat gaatccataa 240

aaggcgctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg 300

aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca 360

gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgtac ttaagccttt aggggtttta ggtctgtttt 420

gtagaggagc aaacagcgtt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta 480

gtgagttata cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc 540

tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaagggtcta gcggaattta 600

cagaggggtct agcagaattt acaagttttc cagcaaaggc ctagcagaat ttacagatac 660

ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattgggtata 720

gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttggt ttcaaagcaa 780

atgaactagc gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840

gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900

tcacttataa ccaatacgct cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatgggtgtat 960

tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttgggtta 1020

aaggctttga gattttccag tggacaaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat 1080

tagtttttag tgaagagata ttgccttatc ttttccagtt aaaaaattc ataaaatata 1140

atctggaaca tgttaagtct tttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat 1200

taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat 1260

ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg 1320

ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata 1380

agcgaggccg cccgactgat acgttgattt tccaagttga actagataga caaatggatc 1440

tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca 1500

ttacatcaga ttcctaccta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaccagt tttgaggcaa aatTTTTgag tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttcgtttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaaata cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaacia acaaaagtag aacaactgtt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc	1800
atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt	1860
gggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta	1920
acacctaata gaacagggtga aaccagtaaa acaaagcaac tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcgatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgctcccggt ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gccggtttgc gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct agggccccca	2280
attaattagt aatataatct attaaaggtc attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc	2340
cctgctcgcg caggctgggt gccaaagctct cgggtaacat caaggcccga tccttgagcg	2400
ccttgccctc ccgcacgatg atcgtgccgt gatcgaaatc cagatccttg acccgagtt	2460
gcaaaccctc actgatccgc atgccggttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgcttccag aaaaccgagg atgcgaacca cttcatccgg ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctcct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct	2640
tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gctgcccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc	2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgt cacgcaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtag taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttgggg	2940
tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcggtta cgccgtgggt cgatgtttga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgaggga agcgggtgat gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgta	3120
tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgctgggttac ggtgaccgta aggcttgatg	3240
aaacaacggc gcgagctttg atcaacgacc ttttggaac ttcggcttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca ttgttggtgca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgcat	3420

gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag 3480
 aacatagcgt tgccttggtgta ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac 3540
 aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg 3600
 ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg 3660
 gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgcctg ccggcccagt 3720
 atcagcccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg 3780
 cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg 3840
 tagtcggcaa ataatgtcta acaattcggt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggttga 3900
 actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc 3960
 tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg 4020
 aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta 4080
 aaatctagcg agggctttac taagctgacg cgggtgatga ctttttgaat gacctttaat 4140
 agattatatt actaattaat tggggaccct agaggtcccc ttttttattt taaaaatttt 4200
 ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg 4260
 tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat 4320
 taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttggtggg aattgtgagt 4380
 tacctagaga ggggtgagaat tgccgaacat gcgcataagt ttcccgga gatttcaggt 4440
 ggtcagcagc aacgcgttgc cattgcgcgt tcgctgtgta tgaagccgaa aattatgttg 4500
 tttgatgagc caacgctggc gctcgatcct gagatgggtga aagagggtgct ggatacgatg 4560
 attgggctgg cgcagtcggg tatgacaatg ttgtgtgtaa cacatgagat ggggtttgca 4620
 cgaaccgtcg ctgaccgggt aatttttatg gatcgtgggg aaatagtgga gcaagctgca 4680
 cctgatgaat tttttgcgca tcctaaatca gagcgtacga gggcattttt atcgcaggta 4740
 atccattaat tgaatgttag ttcgaaaagc aaaaaggcca tcctttcgga tggcctttcg 4800
 cttgatattga tgtctggcag tttatggcgg gcgtcctgcc cgccaccctc cgggcggtg 4860
 cttcgcaacg ttcaaataccg ctcccgggcg atttgccta ctcgggagag tgttcaccga 4920
 caaacaacag ataaaacaaa aggccagtc ttccgactga gccttttgtt ttatttgatg 4980
 tctggcagtt ccctactctc gcatggggag accccacact accatcggcg ctacggcggt 5040
 ttcacttctg agttcggcag ggggtcaggt gggaccaccg cgctactgcc gccagacaaa 5100
 ttcttttcta atctgccgaa ctttaacctt aaaagtgggt ctgataccca gagtcgaact 5160
 ggggacctca cccttaccaa gggtgcgctc taccaactga gccatatcag cacgctaaat 5220
 ttgatgcctg gcagttccct actctcgcat ggggagaccc cacactacca tcggcgctac 5280
 ggcgtttcac ttctgagttc ggcattgggt cagggtgggac caccgcgcta cggccgccag 5340

```

gcaaattctg ttttatcaga ccgcttctgc gttctgattt aatctgtatc aggctgaaaa 5400
tcttctctca tccggataac aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgccaa 5460
gctgtaccga gctcgaattc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 5520
ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc 5580
gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc 5640
ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgat atggtgcact 5700
ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc 5760
gctgacgaat tc 5772

```

<210> SEQ ID NO. 14

<211> 7558

<212> ADN

<213> ADN plasmit pRY802F

<220> Đặc điểm: Gen sucroza phosphorylaza của chủng *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20913 điều khiển bằng trình tự khởi đầu cơ bản để tích hợp ở locus thrV.

<400> Trình tự

```

gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc 60
agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag 120
gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcga taaaacgccc 180
tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttcttgcag gaatccataa 240
aaggcgctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg 300
aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca 360
gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt aggggttttaa ggtctgtttt 420
gtagaggagc aaacagcggt tgccgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta 480
gtgagttata cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc 540
tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta 600
cagaggggtct agcagaattt acaagttttc cagcaaaggc ctagcagaat ttacagatac 660
ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattggtata 720
gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttggt ttcaaagcaa 780
atgaactagc gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
tcacttataa ccaatacgtc cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat 960
tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta 1020
aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaaagt ctcaagcgaa aaattagaat 1080
tagtttttag tgaagagata ttgccttatc ttttccagtt aaaaaattc ataaaatata 1140

```

atctggaaca	tgtaagtct	tttgaaaaca	aatactctat	gaggatttat	gagtggttat	1200
taaaagaact	aacacaaaag	aaaactcaca	aggcaaatat	agagattagc	cttgatgaat	1260
ttaagttcat	gttaatgctt	gaaaataact	accatgagtt	taaaaggctt	aaccaatggg	1320
ttttgaaacc	aataagtaaa	gatttaaaca	cttacagcaa	tatgaaattg	gtggttgata	1380
agcgaggccg	cccgactgat	acgttgattt	tccaagttga	actagataga	caaatggatc	1440
tcgtaaccga	acttgagaac	aaccagataa	aatgaatgg	tgacaaaata	ccaacaacca	1500
ttacatcaga	ttcctaccta	cgtaacggac	taagaaaaac	actacacgat	gctttaactg	1560
caaaaattca	gctcaccagt	tttgaggcaa	aatTTTTTgag	tgacatgcaa	agtaagcatg	1620
atctcaatgg	ttcgttctca	tggtctacgc	aaaaacaacg	aaccacacta	gagaacatac	1680
tggtctaaata	cggaaggatc	tgaggttctt	atggctcttg	tatctatcag	tgaagcatca	1740
agactaacia	acaaaagtag	aacaactgtt	caccgttaga	tatcaaagg	aaaactgtcc	1800
atatgcacag	atgaaaacgg	tgtaaaaaag	atagatacat	cagagctttt	acgagttttt	1860
gggtgcattta	aagctgttca	ccatgaacag	atcgacaatg	taacagatga	acagcatgta	1920
acacctaata	gaacaggtga	aaccagtaaa	acaaagcaac	tagaacatga	aattgaacac	1980
ctgagacaac	ttgttacagc	tcaacagtca	cacatagaca	gcctgaaaca	ggcgatgctg	2040
cttatcgaat	caaagctgcc	gacaacacgg	gagccagtga	cgctcccgt	ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat	tctggaagaa	atagcgcttt	cagccggcaa	acctgaagcc	ggatctgcga	2160
ttctgataac	aaactagcaa	caccagaaca	gcccgtttgc	gggcagcaaa	acccgttatg	2220
cttgtaaacc	gttttgtgaa	aaaattttta	aaataaaaaa	ggggacctct	agggccccca	2280
attaattagt	aatataatct	attaaaggtc	attcaaaagg	tcatccaccg	gatcaattcc	2340
cctgctcgcg	caggctgggt	gccaaactct	cgggtaacat	caaggcccga	tccttgagac	2400
ccttgccctc	ccgcacgatg	atcgtgccgt	gatcgaaatc	cagatccttg	acccgcagtt	2460
gcaaaccctc	actgatccgc	atgccgttc	catacagaag	ctgggcgaac	aaacgatgct	2520
cgcttccag	aaaaccgagg	atgcgaacca	cttcatccgg	ggtcagcacc	accggcaagc	2580
gccgcgacgg	ccgaggtctt	ccgatctcct	gaagccaggg	cagatccgtg	cacagcacct	2640
tgccgtagaa	gaacagcaag	gccgccaatg	cctgacgatg	cgtggagacc	gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc	cagccaggac	agaaatgcct	cgacttcgct	gctgcccaag	gttgccgggt	2760
gacgcacacc	gtggaaacgg	atgaaggcac	gaaccacgtg	gacataagcc	tgttcggttc	2820
gtaagctgta	atgcaagtag	cgtatgcgct	cacgcaactg	gtccagaacc	ttgaccgaac	2880
gcagcgggtg	taacggcgca	gtggcggttt	tcatggcttg	ttatgactgt	ttttttgggg	2940
tacagtctat	gcctcgggca	tccaagcagc	aagcgcgtta	cgccgtgggt	cgatgtttga	3000
tgttatggag	cagcaacgat	gttacgcagc	agggcagtcg	ccctaaaaca	aagttaaaca	3060

tcatgagggga agcgggtgac gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgctca	3120
tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgctggttac ggtgaccgta aggcttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttgaaaac ttcggcttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca ttgttggtgca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgacg	3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgcctg ccggcccagt	3720
atcagcccgat catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataattgtcta acaattcggt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggctta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggctttac taagctgacg cgggtggatga ctttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggtcccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccgact ggaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttggtggtg aattgtgagt	4380
tacctagaga gggtgagaat tgccgaacat gcgcataagt tccccggaca gatttcaggt	4440
ggtcagcagc aacgcgttgc cattgcgcgt tcgctgtgta tgaagccgaa aattatgttg	4500
tttgatgagc caacgtcggc gctcgatcct gagatgggtga aagagggtgct ggatacgatg	4560
attgggctgg cgcagtcggg tatgacaatg ttgtgtgtaa cacatgagat ggggtttgca	4620
cgaaccgtcg ctgaccgggt aatttttatg gatcggtggg aaatagtgga gcaagctgca	4680
cctgatgaat tttttgcgca tcctaaatca gagcgctacga gggcattttt atcgaggtta	4740
atccattaat tgaatgttag ttcgaaaagc aaaaaggcca tcctttcgga tggcctttcg	4800
cttgatttga tgtctggcag tttatggcgg gcgtcctgcc cgccaccctc cgggccgttg	4860
cttcgcaacg ttcaaatacc tcgaggctat tgacgacagc tatggttcac tgtccaccaa	4920
ccaaaactgt gctcagtacc gccaatattt ctcccttgag ggggtacaaag aggtgtccct	4980

agaagagatc cacgctgtgt aaaaatttta caaaaaggta ttgactttcc ctacaggggtg	5040
tgtaataatt taattacagg cgggggcaac cccgcctgtt ctagaatagt ggaggaataa	5100
taatggaaat tcaaaacaaa gcaatgttga tcacttatgc tgattcgttg ggcaaaaact	5160
taaaagatgt tcatcaagtc ttgaaagaag atattggaga tgcgattggg ggggttcatt	5220
tgttgccttt cttcccttca acaggtgatc gcggttttgc gccagccgat tatactcgtg	5280
ttgatgccgc atttggtgat tgggcagatg tcgaagcatt ggggtgaagaa tactatttga	5340
tgtttgactt catgattaac catatttctc gtgaatcagt gatgtatcaa gattttaaga	5400
agaatcatga cgattcaaag tataaagatt tctttattcg ttgggaaaag ttctgggcaa	5460
aggccggcga aaaccgtcca acacaagccg atgttgactt aatttacaag cgtaaagata	5520
aggcaccaac gcaagaaatc acttttgatg atggcacaac agaaaacttg tggaatactt	5580
ttggtgaaga acaaattgac attgatgtta attcagccat tgccaaggaa tttattaaga	5640
caacccttga agacatggta aaacatgggtg ctaacttgat tcgtttggat gcctttgcgt	5700
atgcagttaa aaaagttgac acaaatgact tcttcgttga gccagaaatc tgggacactt	5760
tgaatgaagt acgtgaaatt ttgacaccat taaaggctga aattttacca gaaattcatg	5820
aacattactc aatccctaaa aagatcaatg atcatggta cttcacctat gactttgcat	5880
taccaatgac aacgctttac acattgtatt caggtaagac aaatcaattg gcaaagtggg	5940
tgaagatgtc accaatgaag caattcaca cattggacac gcatgatggg attgggtgtcg	6000
ttgatgcccg tgatattcta actgatgatg aaattgacta cgcttctgaa caactttaca	6060
aggttggcgc gaatgtcaaa aagacatatt catctgcttc atacaacaac cttgatattt	6120
accaaattaa ctcaacttat tattcagcat tgggaaatga tgatgcagca tacttgttga	6180
gtcgtgtcctt ccaagtcttt gcgcctggaa ttccacaaat ttattacgtt ggtttggtgg	6240
caggtgaaaa cgatatcgcg cttttggagt caactaaaga aggtcgtaat attaaccgtc	6300
attactatac gcgtgaagaa gttaagtcag aagttaagcg accagttggt gctaacttat	6360
tgaagctatt gtcatggcgt aatgaaagcc ctgcatttga tttggctggc tcaatcacag	6420
ttgacacgcc aactgataca acaattgtgg tgacacgtca agatgaaaat ggtcaaaaca	6480
aagctgtatt aacagccgat gcggccaaca aaacttttga aatcgttgag aatgggtcaaa	6540
ctgttatgag cagtgataat ttgactcaga actaaactat atttgaatca atttctaaga	6600
actgtttcct gaggggaagca gtttttttgc tgatagtggg aaatattata ttgacagaca	6660
aggatcctcc cggcggatth gtcctactcg ggagagtgtt caccgacaaa caacagataa	6720
aacaaaaggc ccagtcttcc gactgagcct tttgttttat ttgatgtctg gcagttccct	6780
actctcgcat ggggagaccc cacactacca tcggcgctac ggcggtttca cttctgagtt	6840
cggcatgggg tcaggtggga ccaccgcgt actgccgcca gacaaattct tttctaattct	6900

```

gccgaacttt aacctaataaa gtggtgctga taccagaggt cgaactgggg acctcaccct      6960
taccaaggggt gcgctctacc aactgagcca tatcagcacg ctaaatttga tgcctggcag      7020
ttccctactc tcgcatgggg agaccccaca ctaccatcgg cgctacggcg tttcacttct      7080
gagttcggga tgggggtcagg tgggaccacc gcgctacggc cgccaggcaa attctgtttt      7140
atcagaccgc ttctgcgttc tgatttaatc tgtatcaggc tgaaaatctt ctctcatccg      7200
gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctg taccgagctc      7260
gaattcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg ttacccaact      7320
taatcgccct gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac      7380
cgatcgccct tcccaacagt tgcgacgctt gaatggcgaa tggcgctga tgcgggtattt      7440
tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg      7500
ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgcca acaccgctg acgaattc      7558

```

<210> SEQ ID NO. 15

<211> 8998

<212> ADN

<213> ADN plasmid pRY803F

<220> Đặc điểm: Catset cat-sacB để tích hợp ở locus thrV

<400> Trình tự

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (5979)..(5979)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> Trình tự

```

gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg cttactggg tgcattagcc      60
agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag      120
gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcca taaaacgccc      180
tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttccttgcat gaatccataa      240
aaggcgctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg      300
aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgatggc ggagacaaaa ggaatattca      360
gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt agggttttta ggtctgtttt      420
gtagaggagc aaacagcggt tgcgacatcc ttttgtaata ctgcggaact gactaaagta      480
gtgagttata cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc      540
tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggctca gcggaattta      600
cagagggctc agcagaattt acaagttttc cagcaaaggc ctagcagaat ttacagatac      660
ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattgggtata      720
gtgattaaaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttggt ttcaaagcaa      780
atgaactagc gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct      840
gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt      900

```

tcacttataa ccaatacgc	cagatgatga acatcagtag	ggaaaatgct tatgggtgtat	960
tagctaaagc aaccagagag	ctgatgacga gaactgtgga	aatcaggaat ccttttggtta	1020
aaggcctttga gattttccag	tggacaaaact atgccaagtt	ctcaagcgaa aaattagaat	1080
tagtttttag tgaagagata	ttgccttatc ttttccagtt	aaaaaattc ataaaatata	1140
atctggaaca tgttaagtct	tttgaaaaca aatactctat	gaggatttat gagtggttat	1200
taaaagaact aacacaaaag	aaaactcaca aggcaaatat	agagattagc cttgatgaat	1260
ttaagttcat gttaatgctt	gaaaataact accatgagtt	taaaaggctt aaccaatggg	1320
ttttgaaacc aataagtaaa	gatttaaaca cttacagcaa	tatgaaattg gtgggttgata	1380
agcgaggccg cccgactgat	acgttgattt tccaagttga	actagataga caaatggatc	1440
tcgtaaccga acttgagaac	aaccagataa aatgaatgg	tgacaaaata ccaacaacca	1500
ttacatcaga ttcctaccta	cgtaacggac taagaaaaac	actacacgat gctttaactg	1560
caaaaattca gctcaccagt	tttgaggcaa aatttttgag	tgacatgcaa agtaagcatg	1620
atctcaatgg ttcgttctca	tggctcacgc aaaaacaacg	aaccacacta gagaacatac	1680
tggctaaata cggaaggatc	tgaggttctt atggctcttg	tatctatcag tgaagcatca	1740
agactaaca acaaaagtag	aacaactggt caccgttaga	tatcaaaggg aaaactgtcc	1800
atatgcacag atgaaaacgg	tgtaaaaaag atagatacat	cagagctttt acgagttttt	1860
ggtgcattta aagctgttca	ccatgaacag atcgacaatg	taacagatga acagcatgta	1920
acacctaata gaacaggtga	aaccagtaaa acaaagcaac	tagaacatga aattgaacac	1980
ctgagacaac ttgttacagc	tcaacagtca cacatagaca	gcctgaaaca ggcgatgctg	2040
cttatcgaat caaagctgcc	gacaacacgg gagccagtga	cgccctcccg ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat tctggaagaa	atagcgcttt cagccggcaa	acctgaagcc ggatctgcga	2160
ttctgataac aaactagcaa	caccagaaca gcccgtttgc	gggcagcaaa acccgttatg	2220
cttgtaaacc gttttgtgaa	aaaattttta aaataaaaaa	ggggacctct agggccccca	2280
attaattagt aatataatct	attaaaggtc attcaaaagg	tcattccaccg gatcaattcc	2340
cctgctcgcg caggctgggt	gccaaagctct cgggtaacat	caaggcccga tccttggagc	2400
ccttgccctc cgcacgatg	atcgtgccgt gatcgaaatc	cagatccctg acccgcatgt	2460
gcaaaccctc actgatccgc	atgcccgttc catacagaag	ctgggcgaac aaacgatgct	2520
cgccctccag aaaaccgagg	atgcgaacca cttcatccgg	ggtcagcacc accggcaagc	2580
gccgcgacgg ccgaggtctt	ccgatctcct gaagccaggg	cagatccgtg cacagcacct	2640
tgccgtagaa gaacagcaag	gccgccaatg cctgacgatg	cgtggagacc gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc cagccaggac	agaaatgcct cgacttcgct	gctgcccaag gttgccgggt	2760
gacgcacacc gtggaaacgg	atgaaggcac gaaccagtg	gacataagcc tgttcggttc	2820

gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgct cacgcaactg gtccagaacc ttgaccgaac	2880
gcagcggtgg taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttgggg	2940
tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcggtta cgccgtgggt cgatgtttga	3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca	3060
tcatgagggga agcggtgatc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgtca	3120
tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg	3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgctggttac ggtgaccgta aggcttgatg	3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttggaac ttcggcttcc cctggagaga	3300
gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca ttgttgtgca cgacgacatc attccgtggc	3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgag	3420
gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag	3480
aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac	3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg	3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc gcagtaaccg	3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgctg ccggcccagt	3720
atcagcccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg	3780
cctcgcgcg agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg	3840
tagtcggcaa ataattgtcta acaattcggt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggtta	3900
actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc	3960
tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg	4020
aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta	4080
aaatctagcg agggctttac taagctgac cgggtgatga ctttttgaat gacctttaat	4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agagggtccc ttttttattt taaaaatttt	4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg	4260
tttcccact ggaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat	4320
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagt	4380
tacctagaga ggggtgagaat tgccgaacat gcgcataagt ttcccggaca gatttcaggt	4440
ggtcagcagc aacgcgttgc cattgcgcgt tcgctgtgta tgaagccgaa aattatgttg	4500
tttgatgagc caacgtcggc gctcgatcct gagatgggtga aagagggtgt ggatacgatg	4560
attgggctgg cgcagtcggg tatgacaatg ttgtgtgtaa cacatgagat ggggtttgca	4620
cgaaccgtcg ctgaccgggt aatttttatg gatcgtgggg aaatagtgga gcaagctgca	4680
cctgatgaat tttttgcgca tcctaaatca gagcgtacga gggcattttt atcgcaggta	4740

atccattaat tgaatgttag ttcgaaaagc aaaaaggcca tcctttcgga tggcctttcg	4800
cttgatttga tgtctggcag tttatggcgg gcgtcctgcc cgccaccctc cgggcccgttg	4860
cttcgcaacg ttcaaatccg ctcgaattcc cgcgcccgat gaattgatcc gaagtcccta	4920
ttctctagaa agtataggaa cttcgaattg tcgacaagct agcatgtgac ggaagatcac	4980
ttcgcagaat aaataaatcc tgggtgtccct gttgataccg ggaagccctg ggccaacttt	5040
tggcgaaaat gagacgttga tcggcacgta agaggttcca actttcacca taatgaaata	5100
agatcactac cgggcgtatt ttttgagtta tcgagatttt caggagctaa ggaagctaaa	5160
atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa	5220
catttttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat	5280
attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt	5340
cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggg	5400
gagctggtga tatgggatag tgttcacctt tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa	5460
acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat	5520
tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag	5580
aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg	5640
gccaatatgg acaacttctt cgcccccggt ttcaccatgg gcaaataatta tacgcaaggc	5700
gacaagggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtttgtga tggcttccat	5760
gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcatg agtggcaggg cggggcgtaa	5820
tttttttaag gcagttattg gtgcccttaa acgcctgggtg ctacgcctga ataagtgata	5880
ataagcggat gaatggcaga aattcgaaag caaattcgac ccggtcgtcg gttcagggca	5940
gggtcgttaa atagccgctt atgtctattg ctggtttant cggtaaccgg ggatcgcggc	6000
cgcggaccgg atcccatcac atatacctgc cgttcactat tatttagtga aatgagatat	6060
tatgatattt tctgaattgt gattaaaaag gcaactttat gcccatgcaa cagaaactat	6120
aaaaaataca gagaatgaaa agaaacagat agatttttta gttctttagg ccgtagtct	6180
gcaaatacctt ttatgatttt ctatcaaaca aaagaggaaa atagaccagt tgcaatccaa	6240
acgagagtct aatagaatga ggtcgaaaag taaatcgcgc gggtttgta ctgataaagc	6300
aggcaagacc taaaatgtgt aaagggcaaa gtgtatactt tggcgtcacc ccttacatat	6360
tttaggtctt tttttattgt gcgtaactaa cttgccatct tcaaacagga gggctggaag	6420
aagcagaccg ctaacacagt acataaaaaa ggagacatga acgatgaaca tcaaaaagtt	6480
tgcaaaacaa gcaacagtat taacctttac taccgcactg ctggcaggag gcgcaactca	6540
agcgtttgcy aaagaaacga accaaaagcc atataaggaa acatacggca tttcccatat	6600
tacacgccat gatatgctgc aaatccctga acagcaaaaa aatgaaaaat atcaagttcc	6660

tgaattcgat	tcgtccacaa	ttaaaaatat	ctcttctgca	aaaggcctgg	acgtttggga	6720
cagctggcca	ttacaaaacg	ctgacggcac	tgtcgcaaac	tatcacggct	accacatcgt	6780
ctttgcatta	gccggagatc	ctaaaaatgc	ggatgacaca	tcgatttaca	tgttctatca	6840
aaaagtcggc	gaaacttcta	ttgacagctg	gaaaaacgct	ggccgcgtct	ttaaagacag	6900
cgacaaattc	gatgcaaattg	attctatcct	aaaagaccaa	acacaagaat	ggtcagggttc	6960
agccacattt	acatctgacg	gaaaaatccg	tttattctac	actgatttct	ccggtaaaca	7020
ttacggcaaa	caaacactga	caactgcaca	agttaacgta	tcagcatcag	acagctcttt	7080
gaacatcaac	ggtgtagagg	attataaatc	aatctttgac	ggtgacggaa	aaacgtatca	7140
aaatgtacag	cagttcatcg	atgaaggcaa	ctacagctca	ggcgacaacc	atacgtgag	7200
agatcctcac	tacgtagaag	ataaaggcca	caaatactta	gtatttgaag	caaacactgg	7260
aactgaagat	ggctaccaag	gcgaagaatc	tttatttaac	aaagcatact	atggcaaaag	7320
cacatcattc	ttccgtcaag	aaagtcaaaa	acttctgcaa	agcgataaaa	aacgcacggc	7380
tgagttagca	aacggcgctc	tcggtatgat	tgagctaaac	gatgattaca	cactgaaaaa	7440
agtgatgaaa	ccgctgattg	catctaacac	agtaacagat	gaaattgaac	gcgcgaacgt	7500
ctttaaaaatg	aacggcaaat	ggtacctggt	cactgactcc	cgcggatcaa	aatgacgat	7560
tgacggcatt	acgtctaacg	atattttacat	gcttggttat	gtttctaatt	ctttaactgg	7620
cccatacaag	ccgctgaaca	aaactggcct	tgtgttaaaa	atggatcttg	atcctaacga	7680
tgtaaccttt	acttactcac	acttcgctgt	acctcaagcg	aaaggaaaca	atgtcgtgat	7740
tacaagctat	atgacaaaca	gaggattcta	cgcagacaaa	caatcaacgt	ttgcgccgag	7800
cttcctgctg	aacatcaaag	gcaagaaaac	atctgttgtc	aaagacagca	tccttgaaca	7860
aggacaatta	acagttaaca	aataaaaacg	caaaagaaaa	tgccaatatc	ctattggcat	7920
tttcttttat	ttcttccatt	taaatggatg	catgcgctag	cggagtgtat	actggcttac	7980
tatgttggca	ctgatgaggg	tgtcagtgaa	gtgcttcatg	tggcaggaga	aaaaaggctg	8040
caccggtgcg	tcagcagaat	atgtgataca	ggatatattc	cgcttcctcg	ctcactgact	8100
gctgagctcc	cggcggattt	gtcctactcg	ggagagtgtt	caccgacaaa	caacagataa	8160
aacaaaaggc	ccagtcttcc	gactgagcct	tttgttttat	ttgatgtctg	gcagttccct	8220
actctcgcat	ggggagaccc	cacactacca	tcggcgctac	ggcggtttca	cttctgagtt	8280
cggcatgggg	tcagggtggga	ccaccgcgct	actgccgcca	gacaaattct	tttctaattct	8340
gccgaacttt	aacctaaaaa	gtggtgctga	taccagaggt	cgaactgggg	acctcaccct	8400
taccaagggt	gcgctctacc	aactgagcca	tatcagcacg	ctaaatttga	tgccctggcag	8460
ttccctactc	tcgcatgggg	agaccccaca	ctaccatcgg	cgctacggcg	tttacttct	8520
gagttcggca	tggggtcagg	tgggaccacc	gcgctacggc	cgccaggcaa	attctgtttt	8580

atcagaccgc ttctgcggtc tgatttaatc tgtatcaggc tgaaaatctt ctctcatccg	8640
gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctg taccgagctc	8700
gaattcactg gccgtcggtt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg ttacccaact	8760
taatcgcctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac	8820
cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgctga tgcggtatct	8880
tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg	8940
ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgccca acaccgctg acgaattc	8998