



(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) 
1-0022135

(51)⁷ C12N 1/21, C12P 19/32, 7/04, 7/28,
C12N 15/09

(13) B

(21) 1-2014-00658

(22) 27.07.2012

(86) PCT/JP2012/069247 27.07.2012

(87) WO2013/018734 07.02.2013

(30) 2011-167808 29.07.2011 JP

(45) 25.11.2019 380

(43) 25.08.2014 317

(73) Mitsui Chemicals, Inc. (JP)

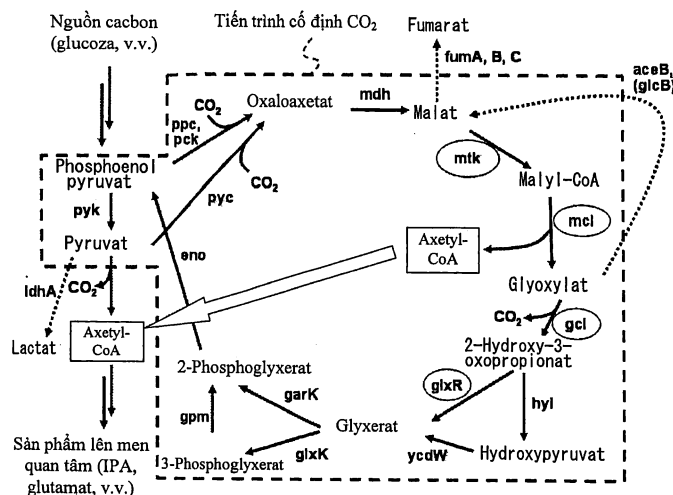
5-2, Higashi-Shimbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 1057117, Japan

(72) FUJII, Ryota (JP), SHIRAI, Tomokazu (JP), ARAKI, Tadashi (JP), AMANO, Koh (JP), MATSUMOTO, Yoshiko (JP), TATENO, Toshihiro (JP), TAKEBAYASHI, Nozomi (JP), MORISHIGE, Takashi (JP), TAKAHASHI, Hitoshi (JP), WADA, Mitsufumi (JP), SHIMIZU, Hiroshi (JP), FURUSAWA, Chikara (JP), HIRASAWA, Takashi (JP), HIDESEKI, Tomonori (JP), ENDO, Ayako (JP), JURCEN-LOHMANN, Dominik Lukas (DE), MADHAVAN, Anjali (IN), CHONG, SU SUN (MY)

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

(54) VI SINH VẬT SẢN XUẤT AXETYL-COA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXETYL-COA BẰNG CÁCH SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, có khả năng tổng hợp hiệu quả axetyl-CoA sử dụng cacbon dioxit, và phương pháp sản xuất các chất bằng cách sử dụng vi sinh vật này. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có chu trình sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền ít nhất một loại hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, cho vi sinh vật này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA và phương pháp sản xuất các chất bằng cách sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

Trong hầu hết các vi sinh vật, axetyl-CoA được sản xuất bằng cách sử dụng đường chẳng hạn như glucoza làm nguồn cacbon. Đường trước tiên được chuyển hóa thành pyruvat thông qua tiến trình chuyển hóa được gọi là tiến trình thủy phân glucoza, như tiến trình Embden-Meyerhof, tiến trình Entner-Doudoroff, hoặc tiến trình pentoza phosphat. Tiếp theo, pyruvat được chuyển hóa thành axetyl-CoA bởi các tác động của decarboxylaza, pyruvat format-lyaza, và các enzym tương tự. Trong quy trình này, cacbon dioxit và format được tạo ra dưới dạng các sản phẩm phụ, và một số cacbon có nguồn gốc từ đường sẽ mất đi. Do đó, một số nghiên cứu đã được tiến hành với mục đích đạt được sự tái cố định của cacbon dioxit để làm tăng hiệu suất của axetyl-CoA.

Trong các vi sinh vật, có một số tiến trình đã biết để cố định cacbon dioxit làm nguồn cacbon (Appl. Environ. Microbiol. 77(6), 1925-1936, 2011). Các ví dụ cụ thể về các tiến trình này bao gồm chu trình Calvin-Benson, chu trình TCA khử, tiến trình Wood-Ljungdahl, chu trình 3-hydroxypropionat, và chu trình 4-hydroxybutyrat. Chu trình Calvin-Benson là tiến trình cố định CO₂ tồn tại ở cây và vi khuẩn quang hợp, và chứa khoảng 12 loại enzym. Trong chu trình Calvin-Benson, CO₂ được cố định bởi ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza (RubisCO) và, cuối cùng, glyxeraldehyt 3-phosphat được sản xuất. Chu trình

TCA khử được tìm thấy trong vi khuẩn ưa ít oxy và vi khuẩn kỵ khí bao gồm vi khuẩn lưu huỳnh màu lục, và chứa 11 loại enzym. Chu trình này đặc trưng bởi các enzym cố định CO₂ (tức là, axetyl-CoA carboxylaza, 2-oxoglutarat synthaza) mà đòi hỏi ferredoxin làm coenzym. Trong chu trình TCA khử, pyruvat được sản xuất từ CO₂ bởi phản ứng ngược của chu trình TCA thông thường. Tiến trình Wood-Ljungdahl được tìm thấy trong các vi sinh vật kỵ khí như vi khuẩn sản xuất axit axetic, và chứa 9 loại enzym. Trong tiến trình Wood-Ljungdahl, CO₂ và format trên coenzym được khử bởi format dehydrogenaza, CO dehydrogenaza, v.v., và, cuối cùng được chuyển hóa thành axetyl-CoA. Chu trình 3-hydroxypropionat được tìm thấy trong vi khuẩn *Chloroflexus* và các vi khuẩn tương tự, và chứa 13 loại enzym. Trong chu trình 3-hydroxypropionat, CO₂ được cố định bởi tác động của axetyl-CoA (propionyl-CoA) carboxylaza và axetyl-CoA được sản xuất thông qua malonyl-CoA và các chất tương tự. Chu trình 4-hydroxybutyrat tồn tại trong vi khuẩn cổ và các vi khuẩn tương tự. Trong chu trình 4-hydroxybutyrat, CO₂ được cố định bởi các tác động của pyruvat synthaza, axetyl-CoA (propionyl-CoA) carboxylaza, và phosphoenolpyruvat carboxylaza, nhờ đó axetyl-CoA được sản xuất thông qua 4-hydroxybutyryl CoA và các chất tương tự.

Để sản xuất chất hữu dụng, một vài phương pháp đã được báo cáo dưới dạng ý tưởng đưa tiến trình cố định cacbon dioxit vào vi sinh vật sản xuất hợp chất hữu dụng. Ví dụ, Công bố đơn quốc tế (WO) 2009/094485 và WO 2010/071697 bộc lộ các phương pháp sản xuất axetyl-CoA từ cacbon dioxit, bằng cách sử dụng vi sinh vật mà tiến trình tương tự với tiến trình Wood-Ljungdahl của vi khuẩn axit axetic được đưa vào vi sinh vật này. Để làm ví dụ về sự cố định CO₂ để sản xuất hợp chất hữu dụng, WO 2009/046929 bộc lộ phương pháp sản xuất axit lactic từ cacbon dioxit bằng cách sử dụng vi sinh vật mà hydrogenaza và tetrahydrofolat lyaza được đưa vào vi sinh vật này. WO 2011/099006 đề xuất chu trình trong đó CO₂ được cố định thông qua phản ứng cố định cacbon dioxit lên trên axetyl-CoA hoặc phản ứng khử malonyl-CoA. Patent Đức số 102007059248 đề xuất quy trình sản xuất axetyl-CoA bằng tiến trình tương tự với chu trình 4-hydroxybutyrat.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Tuy nhiên, các chu trình cố định cacbon dioxit đã biết không tất yếu có hiệu quả từ quan điểm về sự cố định CO₂ và sản xuất các sản phẩm hóa học hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA. Ví dụ, chu trình Calvin-Benson là chu trình cố định cacbon dioxit nổi bật nhất được tìm thấy trong tự nhiên, nhưng RubisCO liên quan đến sự cố định cacbon dioxit có

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

Khi cố gắng sản xuất chất nhất định bằng cách đưa loại chu trình này vào vi sinh vật, cần xem xét số lượng các enzym có liên quan trong chu trình và số lượng các hoạt tính enzym cần được truyền bổ sung. Tức là, khi số lượng các enzym có liên quan trong chu trình hoặc số lượng các hoạt tính enzym cần được truyền bổ sung tăng, thì việc điều hòa trở nên khó khăn hơn và gánh nặng trên vi sinh vật tăng. Ví dụ, để đưa tiến trình Wood-Ljungdahl vào *Escherichia coli*, cần phải đưa vào ít nhất 9 loại gen. Trên thực tế, sẽ là nhiệm vụ rất khó khăn để tạo cấu trúc tiến trình sản xuất chất và cả việc đưa vào và điều hòa nhiều gen như vậy. Rõ ràng sẽ có lợi nếu tạo cấu trúc chu trình bao gồm số lượng nhỏ các enzym bằng cách truyền số lượng các enzym nhỏ hơn, về mặt tạo cấu trúc chu trình và về mặt kết hợp với tiến trình sản xuất chất khác.

Do đó, để cố định CO_2 và chuyển hóa nó thành axetyl-CoA, sẽ lý tưởng để (A) mỗi enzym có liên quan đến tiến trình có hoạt tính đủ cao; (B) chu trình không bao gồm enzym tiêu thụ axetyl-CoA; và (C) chu trình có cấu hình đơn giản và số lượng nhỏ các enzym mới được truyền. Tuy nhiên, không có chu trình sản xuất axetyl-CoA từ CO_2 nào đã được báo cáo cho đến nay thỏa mãn tất cả các điều kiện (A) đến (C), và, do đó, khả năng thực hiện các chu trình này là thấp. Trên thực tế, đối với các đề xuất liên quan đến chu trình cố định cacbon dioxit hiện có, hầu như không có ví dụ thực tế về việc chuyển hóa CO_2 thành axetyl-CoA hoặc chất có nguồn gốc từ axetyl-CoA để sử dụng trong lên men bằng cách truyền hoạt tính enzym cho vi sinh vật có thể sử dụng được về mặt công nghiệp.

Sáng chế đề xuất vi sinh vật hữu dụng để sản xuất hiệu quả axetyl-CoA bằng cách sử dụng cacbon dioxit, và phương pháp sản xuất axetyl-CoA hoặc chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Biện pháp giải quyết vấn đề

Khía cạnh của sáng chế là như sau.

[1] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có chu trình sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền ít nhất một loại hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, cho vi sinh vật mà không có chức năng nào trong số các chức năng sau:

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

(b) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO_2 thành pyruvat;

(c) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO_2 thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA;

(d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO_2 thành format; trong đó vi sinh vật này không có hoạt tính malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza nội sinh bất kỳ.

[2] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm [1], bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA trong đó phosphoenolpyruvat hoặc pyruvat được chuyển hóa thành oxaloacetat, và sau đó thành 2-hydroxy-3-oxopropionat do các tác động của malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, và sau đó lại thành phosphoenol pyruvat thông qua 2-

phosphoglyxerat.

[3] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm [1] hoặc [2], bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA bao gồm:

(f) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

pyruvat kinaza và pyruvat carboxylaza;

phosphoenolpyruvat carboxylaza; và

phosphoenolpyruvat carboxykinaza;

(g) malat dehydrogenaza;

(h) malat thiokinaza;

(i) malyl-CoA lyaza;

(j) glyoxylat carboligaza;

(k) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza; và

hydroxypyruvat isomeraza và hydroxypyruvat reductaza;

(l) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

glyxerat 2-kinaza; và

phosphoglyxerat mutaza và glyxerat 3-kinaza; và

(m) enolaza.

[4] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [3], trong đó vi sinh vật này là vi sinh vật thuộc Enterobacteriaceae hoặc vi sinh vật thuộc vi khuẩn coryneform.

[5] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [4], trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Escherichia* hoặc vi khuẩn *Pantoea* thuộc Enterobacteriaceae, hoặc vi sinh vật này là vi khuẩn *Corynebacterium* thuộc vi khuẩn coryneform.

[6] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [5], trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Escherichia* trong đó hoạt tính của lactat dehydrogenaza sở hữu bởi vi khuẩn *Escherichia* được làm bất hoạt hoặc được làm giảm.

[7] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [6], trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Escherichia* trong đó hoạt tính của ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm isoxitrat lyaza và malat synthaza sở hữu bởi vi khuẩn *Escherichia* được làm bất hoạt hoặc được làm giảm.

[8] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [7], trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Escherichia* trong đó hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, và hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza được truyền hoặc được tăng cường.

[9] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [8], trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Escherichia* trong đó hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza, và hoạt tính dehydrogenaza rượu isopropyllic được truyền hoặc được tăng cường.

[10] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [5], trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Pantoea* trong đó hoạt tính của fumarat hydrataza A và fumarat hydrataza C sở hữu bởi vi khuẩn *Pantoea* được làm bất hoạt hoặc được làm giảm.

[11] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [5] hoặc [10], trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Pantoea* trong đó hoạt tính của malat synthaza sở hữu bởi vi khuẩn *Pantoea* được làm bất hoạt hoặc được làm giảm.

[12] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [11], trong đó malat thiokinaza được sử dụng là malat thiokinaza thu được bằng cách cải biến mtkB có nguồn gốc từ *Methylobacterium extorquens* để biến đổi axit amin tương ứng với axit amin thứ 144 thành isoleuxin, asparagin, axit aspartic, lysin, arginin, histidin, glutamin, hoặc prolin, và/hoặc để biến đổi axit amin thứ 244 thành axit glutamic, alanin, leuxin, isoleuxin, methionin, asparagin, tyrosin, lysin, hoặc arginin.

[13] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA, bao gồm sản xuất axetyl-CoA từ nguyên liệu nguồn cacbon bằng cách sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [12].

[14] Phương pháp sản xuất axeton, bao gồm bước sản xuất axeton từ nguyên liệu nguồn cacbon bằng cách sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm [9] hoặc [12].

[15] Phương pháp sản xuất rượu isopropylic, bao gồm bước sản xuất rượu isopropylic từ nguyên liệu nguồn cacbon bằng cách sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo [9] hoặc [12].

[16] Phương pháp sản xuất glutamat, bao gồm bước sản xuất glutamat từ nguyên liệu nguồn cacbon bằng cách sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo [5], [10], [11], hoặc [12].

Hiệu quả có lợi theo sáng chế

[0011] Sáng chế đề xuất vi sinh vật hữu ích để chuyển hóa hiệu quả cacbon dioxit thành axetyl-CoA, và phương pháp sản xuất axetyl-CoA hoặc chất chuyển hóa hữu dụng sử dụng vi sinh vật này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ tiến trình để minh họa nét chính của tiến trình cố định cacbon dioxit theo một phương án của sáng chế.

Fig. 2A và Fig. 2B thể hiện độ tương đồng giữa các trình tự mtkB khác nhau.

Fig. 3A và Fig. 3B thể hiện độ tương đồng giữa các trình tự mtkA khác nhau.

Fig. 4 là đồ thị thể hiện mẫu kết hợp ^{13}C của glutamat được sản xuất bởi các vi khuẩn *Pantoea* khác nhau theo Ví dụ 41.

Fig. 5 là đồ thị thể hiện mẫu kết hợp ^{13}C của glutamat được sản xuất bởi các vi khuẩn *Corynebacterium* khác nhau theo Ví dụ 50.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế là vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có chu trình sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền ít nhất một loại hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, cho vi sinh vật mà không có chức năng nào trong số các chức năng (a), (b), (c), (d) sau, trong đó không có chức năng nào trong số các chức năng nêu trong (a), (b), (c), hoặc (d) được truyền cho vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không thể hiện chức năng nào trong số các chức năng nêu trong (a), (b), (c), và (d).

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

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

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

(d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format; trong đó vi sinh vật này không có hoạt tính malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza nội sinh bất kỳ.

Theo sáng chế, bằng cách truyền hoạt tính enzym đã được xác định trước, có thể được tạo cấu trúc chu trình cố định cacbon dioxit mà cố định CO₂ được tạo ra trong quá trình chuyển hóa hydrat cacbon hoặc CO₂ được cung cấp từ bên ngoài, và tạo ra vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có chu trình sản xuất axetyl-CoA trong đó CO₂ được chuyển hóa một cách hiệu quả thành axetyl-CoA.

Tức là, do kết quả của các nghiên cứu khác nhau về sự chuyển hóa CO₂ thành axetyl-CoA, đã phát hiện thấy rằng CO₂ được chuyển hóa thành axetyl-CoA bằng cách truyền ít nhất một loại hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, cho vi sinh vật mà không có chức năng nào trong số các chức năng sau:

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

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

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

(d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format; trong đó vi sinh vật này không có hoạt tính malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza nội sinh bất kỳ.

Hơn nữa, bằng cách sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA mà chuyển hóa CO₂ thành axetyl-CoA, hoặc bằng cách truyền bổ sung hoạt tính enzym đã được xác định trước cho vi sinh vật, các chất bao gồm axetyl-CoA và các chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA như rượu isopropyllic, etanol, axeton, axit xitric, axit itaconic, axit axetic, axit butyric, axit (poly-)3-hydroxybutyric, axit 3-hydroxyisobutyric, axit 3-aminoisobutyric, axit 2-hydroxyisobutyric, axit metacrylic, axit (poly)glutamic, axit glutamic, arginin,

ornithin, xitruilin, leuxin, isoleuxin, hoặc prolin, được sản xuất một cách hiệu quả.

Sáng chế đề xuất chu trình sản xuất axetyl-CoA đơn giản nhất và thực tế mà cố định CO_2 và chuyển hóa nó thành axetyl-CoA (Fig. 1).

Các phương án ưu tiên của chu trình sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA được thể hiện trên Fig. 1 (dưới đây trong bản mô tả này có thể được gọi là "chu trình của Fig. 1").

Chu trình này liên quan đến 8 đến 10 loại enzym, tức là,

ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

phosphoenolpyruvat carboxylaza;

phosphoenolpyruvat carboxykinaza, và

pyruvat carboxylaza và pyruvat kinaza;

malat dehydrogenaza;

malat thiokinaza;

malyl-CoA lyaza;

glyoxylat carboligaza;

ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

hydroxypyruvat isomeraza và hydroxypyruvat reductaza; và

2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza;

ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

glyxerat 2-kinaza; và

phosphoglyxerat mutaza và glyxerat 3-kinaza; và

enolaza.

(Phosphoenol)pyruvat carboxylaza hoặc phosphoenolpyruvat carboxykinaza có liên quan đến sự cố định cacbon dioxit. (Phosphoenol)pyruvat carboxylaza là enzym cố định cacbon dioxit có hoạt tính cao. Ví dụ, RubisCO được sử dụng trong quá trình quang hợp ở cây hoặc dạng tương tự được biết là có hoạt tính riêng nằm trong khoảng từ khoảng 3 U/mg đến 20 U/mg (J. Biol. Chem. 274(8) 5078-82(1999), Anal. Biochem. 153(1) 97-101, 1986). Mặt khác, (phosphoenol)pyruvat carboxylaza được báo cáo là có hoạt tính riêng

nằm trong khoảng từ 30 U/mg trong *Escherichia coli*, hoặc cao như 100 U/mg đến 150 U/mg (J. Biol. Chem. 247, 5785-5792 (1972); Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 140-142 (1995); Biochim Biophys Acta. 1475(3):191-206, 2000). Đối với malat thiokinaza (mtk) mà tổng hợp malyl-CoA, nghiên cứu theo sáng chế tiết lộ rằng malat thiokinaza theo sáng chế có hoạt tính cao hơn so với hoạt tính của các enzym thông thường đã biết (J. Biol. Chem. 248(21) 7295-303, 1973). Chu trình của Fig. 1 bao gồm từ 8 đến 10 loại enzym, và, do đó, là chu trình đơn giản nhất trong số các chu trình sản xuất axetyl-CoA đã biết. Chỉ cần số lượng nhỏ các enzym được truyền cho vi sinh vật. Ngoài ra, chu trình của Fig. 1 không bao gồm enzym mà tiêu thụ axetyl-CoA. Do đó, có thể nói rằng chu trình của Fig. 1 là chu trình lý tưởng để cố định CO₂ và chuyển hóa nó thành axetyl-CoA.

Ưu điểm khác của chu trình của Fig. 1 là ở chỗ, vì chu trình này độc lập với tiến trình thủy phân glucoza, nên chu trình này có thể được kết hợp tự do với các tiến trình thủy phân glucoza khác nhau. Ví dụ, chu trình của Fig. 1 có thể được kết hợp dễ dàng với, tiến trình sản xuất NADPH với tốc độ sản xuất cao và thường được sử dụng trong sản xuất các chất (Công bố đơn vào pha quốc gia Nhật (JP-A) số 2007-510411), vì chu trình của Fig. 1 độc lập với tiến trình pentoza phosphat.

Trong chu trình của Fig. 1, mỗi trong số malat dehydrogenaza (mdh), 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza (glxR), và hydroxypyruvat reductaza (ycdW) tiêu thụ NADH (hoặc NADPH) làm năng lượng khử; mỗi trong số malat thiokinaza (mtk), glyxerat 3-kinaza (glxK), glyxerat 2-kinaza (garK), và pyruvat carboxylaza (pyc) tiêu thụ ATP; và pyruvat kinaza (pyk) sản xuất pyruvat.

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

Trong trường hợp trong đó pyruvat được sử dụng làm chất khởi đầu, phương trình được làm cân bằng là: "pyruvat + 2CoA + CO₂ + 3NAD(P)H + 4ATP → 2axetyl-CoA + 3NAD(P)⁺ + 4ADP".

Tức là, chu trình của Fig. 1 đòi hỏi việc bổ sung phosphoenolpyruvat (hoặc pyruvat), NAD(P)H, và ATP để cố định CO₂ và chuyển hóa nó thành axetyl-CoA.

Trong số các tiến trình lên men mà sản xuất axetyl-CoA dưới dạng hợp chất trung gian, phương trình được làm cân bằng của các tiến trình tiêu thụ oxy trong quá trình lên men được liệt kê trong Bảng 1. Giả sử rằng, trong các tiến trình lên men này, coenzym khử

như NADH được sản xuất trong tiến trình này và coenzym khử này được chuyển hóa lại thành dạng được oxy hóa bởi tác động của oxy. Do đó, nếu có thể tiêu thụ coenzym khử đã được sản xuất bởi chu trình của Fig. 1 thay vì tiêu thụ oxy, có thể mong đợi rằng năng lượng khử được tạo ra trong quá trình lên men có thể được sử dụng một cách hiệu quả trong chu trình sản xuất axetyl-CoA để cố định CO_2 và chuyển hóa nó thành sản phẩm.

Ở đây, coenzym khử chỉ coenzym ở trạng thái khử và có liên quan trong phản ứng oxy hóa-khử, và ví dụ về coenzym khử bao gồm NADH, NADPH, FADH_2 , FMNH_2 , và coenzym quinon khử. Coenzym khử tốt hơn là NADH hoặc NADPH, tốt hơn nữa là NADH. Coenzym oxy hóa chỉ dạng được oxy hóa của coenzym khử, và ví dụ về coenzym oxy hóa bao gồm NAD^+ , NADP^+ , FAD, FMN, và coenzym quinon oxy hóa. Coenzym oxy hóa tốt hơn là NAD^+ hoặc NADP^+ , tốt hơn nữa là NAD^+ .

Bảng 1

Tên hợp chất	Phương trình lên men
Rượu isopropylic	$C_6H_{12}O_6 + H_2O + 3/2O_2 \rightarrow C_3H_8O + 3CO_2 + 3H_2O$
Axeton	$C_6H_{12}O_6 + 2O_2 \rightarrow C_3H_6O + 3H_2O + 3CO_2$
Axit glutamic	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 + NH_3 \rightarrow C_5H_9NO_4 + CO_2 + 3H_2O$
Glutamin	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 + 2NH_3 \rightarrow C_5H_{10}N_2O_3 + CO_2 + 4H_2O$
Arginin	$C_6H_{12}O_6 + 1/2O_2 + 4NH_3 \rightarrow C_6H_{14}N_2O_2 + 5H_2O$
Ornithin	$C_6H_{12}O_6 + 1/2O_2 + NH_3 \rightarrow C_5H_{12}N_2O_2 + 2H_2O + CO_2$
Xitruilin	$C_6H_{12}O_6 + 1/2O_2 + 3NH_3 \rightarrow C_6H_{13}N_3O_3 + 4H_2O$
Prolin	$C_6H_{12}O_6 + 1/2O_2 + NH_3 \rightarrow C_5H_9NO_2 + 3H_2O + CO_2$
Axit axetic	$C_6H_{12}O_6 + 2O_2 \rightarrow 2C_2H_4O_2 + 2CO_2 + 2H_2O$
Axit (poly-)3-hydroxybutyric	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 \rightarrow C_4H_8O_3 + 2CO_2 + 2H_2O$
Axit itaconic	$C_6H_{12}O_6 + 1,5O_2 \rightarrow C_5H_6O_4 + CO_2 + 3H_2O$
Axit citric	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 \rightarrow C_6H_8O_7 + 2H_2O$
Axit butyric	$C_6H_{12}O_6 + O_2 \rightarrow C_4H_8O_2 + 2H_2O + 2CO_2$
Leuxin (Isoleuxin)	$3/2C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 + NH_3 \rightarrow C_6H_{13}NO_2 + 4H_2O + 3CO_2$
Axit 4-aminobutyric	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 + NH_3 \rightarrow C_4H_9NO_2 + 3H_2O + 2CO_2$
Axit 4-hydroxybutyric	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 \rightarrow C_4H_8O_3 + 2H_2O + 2CO_2$

Như được thể hiện trong Bảng 1, quy trình lên men trong đó oxy có mặt bên phía trái của phương trình lên men, thường đòi hỏi lượng lớn oxy. Trong các trường hợp này, có thể cần phải thông khí lớn và/hoặc khuấy mạnh, điều này làm tăng chi phí thiết bị và chi phí năng lượng điện. Do đó, bằng cách đưa vào chu trình của Fig. 1, năng lượng khử dư có thể được tiêu thụ và sự thông khí lớn/khuấy có thể được làm giảm nhẹ, và chi phí của quá trình sản xuất lên men được mong đợi là có thể được làm giảm.

Để cung cấp năng lượng khử cho chu trình theo sáng chế, năng lượng khử có thể được cung cấp bằng cách bổ sung chất mà có thể tạo ra năng lượng khử, hoặc truyền năng lượng từ bên ngoài. Ví dụ cụ thể bao gồm sử dụng chất có mức độ khử cao hơn (ví dụ, hydro, sulfite, rượu, hoặc parafin) làm cơ chất; cung cấp năng lượng khử trực tiếp bởi sự nuôi cấy bằng điện; và cung cấp năng lượng khử bởi phản ứng quang hóa ở sinh vật. Khác với quy trình lên men được thể hiện trong Bảng 1, miễn là năng lượng khử có thể được cung cấp từ bên ngoài, có thể điều khiển tiến trình cố định cacbon dioxit dự định ngay cả trong quá trình lên men trong đó coenzym khử không được sản xuất.

Các khía cạnh của sáng chế được mô tả dưới đây.

"Cố định CO₂" theo sáng chế chỉ sự chuyển hóa CO₂ được tạo ra trong quá trình chuyển hóa hydrat cacbon hoặc CO₂ được cung cấp từ bên ngoài thành hợp chất hữu cơ.

CO_2 có thể là HCO_3^- . Ở đây, "cố định CO_2 " cũng có thể được gọi là "cố định cacbon dioxit".

Thuật ngữ "quy trình" trong bản mô tả này bao gồm quy trình độc lập, cũng như quy trình mà đạt được hiệu quả dự định của quy trình này mặc dù nó không thể được phân biệt rõ ràng với quy trình khác. Trong bản mô tả này, khoảng số được biểu thị bằng cách sử dụng từ "đến" nghĩa là khoảng bao gồm các giá trị số được đưa ra trước và sau từ "đến" là giá trị tối thiểu và giá trị cực đại, một cách tương ứng.

Theo sáng chế, viện dẫn đến lượng của mỗi thành phần trong hợp phần, khi hợp phần này bao gồm nhiều chất tương ứng với mỗi thành phần, lượng của mỗi thành phần này nghĩa là tổng lượng nhiều chất này, trừ khi có chỉ dẫn khác.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bất hoạt" chỉ tình trạng trong đó hoạt tính của enzyme (ở đây, yếu tố mà bản thân chúng không có hoạt tính enzyme cũng được bao gồm trong phạm vi của "enzyme", trừ khi được nêu rõ là bị loại trừ) như được xác định bởi hệ xác định hiện có bất kỳ không lớn hơn 1/10 của hoạt tính ở vi sinh vật trước khi bất hoạt, giả định rằng hoạt tính ở vi sinh vật trước khi bất hoạt là 100.

Sự "giảm" hoạt tính enzyme theo sáng chế nghĩa là tình trạng trong đó hoạt tính của enzyme bị làm giảm một cách đáng kể bởi kỹ thuật tái tổ hợp di truyền đối với gen mã hóa enzyme này so với hoạt tính trước khi xử lý như vậy.

Sự "tăng cường" "hoạt tính" theo sáng chế theo nghĩa rộng nghĩa là hoạt tính enzyme trong các vi sinh vật trở nên cao hơn sau khi tăng cường so với hoạt tính enzyme trước khi tăng cường.

Phương pháp để tăng cường không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là hoạt tính của enzyme sở hữu bởi vi sinh vật được tăng cường. Ví dụ về phương pháp này bao gồm tăng cường bởi gen enzyme được đưa vào từ bên ngoài tế bào, tăng cường bởi sự biểu hiện được tăng cường của gen enzyme bên trong tế bào, và sự kết hợp bất kỳ của các phương pháp này.

Ví dụ cụ thể về sự tăng cường bởi gen enzyme được đưa vào từ bên ngoài tế bào bao gồm: đưa vào gen mã hóa enzyme có hoạt tính có hoạt tính cao hơn so với enzyme của vật chủ từ bên ngoài tế bào của vi sinh vật chủ bởi kỹ thuật tái tổ hợp di truyền, bằng cách đó bổ sung hoạt tính enzyme của gen enzyme đã được đưa vào; thay thế hoạt tính enzyme đã được đưa vào cho hoạt tính enzyme nội tại mà vật chủ có ban đầu; làm tăng số lượng bản sao của gen enzyme của vật chủ hoặc gen enzyme được đưa vào từ bên ngoài tế bào lên hai hoặc nhiều bản sao; và sự kết hợp bất kỳ của các phương pháp này.

Ví dụ cụ thể về tăng cường bởi sự biểu hiện được tăng cường của gen enzym ở vi sinh vật bao gồm: đưa trình tự bazơ mà tăng cường sự biểu hiện của gen enzym từ bên ngoài của vi sinh vật chủ vào bên trong vi sinh vật; thay thế gen khởi đầu khác cho gen khởi đầu của gen enzym mà vi sinh vật chủ có trên hệ gen của nó, nhờ đó làm tăng cường sự biểu hiện của gen enzym; và sự kết hợp bất kỳ của các phương pháp này.

Việc "truyền" "hoạt tính" theo sáng chế theo nghĩa rộng nghĩa là tạo ra hoạt tính của enzym dự định bằng cách đưa, từ bên ngoài, gen mã hóa enzym vào sinh vật không có gen mã hóa enzym dự định này. Phương pháp truyền hoạt tính không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là hoạt tính của enzym dự định có thể được truyền cho vi sinh vật, và ví dụ về phương pháp như vậy bao gồm biến nạp với plasmit chứa gen enzym, đưa gen enzym vào hệ gen, và sự kết hợp bất kỳ của các phương pháp này.

Gen khởi đầu được sử dụng để "tăng cường" hoặc "truyền" "hoạt tính" không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là gen khởi đầu này cho phép sự biểu hiện gen, và ví dụ về gen khởi đầu bao gồm gen khởi đầu cơ định và gen khởi đầu cảm ứng.

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

Theo sáng chế, hoạt tính enzym có thể được truyền bằng cách đưa, từ bên ngoài, gen mã hóa enzym vào tế bào sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền. Trong trường hợp này, gen enzym được đưa vào có thể là đồng loại hoặc khác loại với tế bào chủ.

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

Cụm từ "bởi kỹ thuật tái tổ hợp di truyền" theo sáng chế bao gồm sự biến đổi bất kỳ đối với trình tự bazơ gây ra bởi sự cài xen ADN khác vào trình tự bazơ của gen nguyên thể, thể hoặc làm khuyết vị trí nhất định của gen, hoặc sự kết hợp bất kỳ của các phương pháp

này. Ví dụ, sự biến đổi có thể tạo ra từ sự đột biến.

Theo sáng chế, vi sinh vật trong đó hoạt tính của yếu tố hoặc enzym được làm bất hoạt chỉ vì sinh vật trong đó hoạt tính nguyên thể bị làm suy yếu bởi phương pháp nhất định được áp dụng từ bên ngoài tế bào đối với tế bào bên trong. Vi sinh vật như vậy có thể được tạo ra bởi, ví dụ, sự phá vỡ gen mã hóa protein hoặc enzym (sự phá vỡ gen).

Ví dụ về sự phá vỡ gen theo sáng chế bao gồm đưa vào đột biến đối với trình tự bazơ của gen, cài xen ADN khác vào trình tự bazơ, hoặc làm khuyết phần nhất định của gen, mà được tiến hành với ý định ngăn cho chức năng của gen không được thực hiện. Do kết quả của sự phá vỡ gen, ví dụ, gen trở nên không thể được phiên mã thành mRNA, và gen cấu trúc ngừng không được dịch mã. Theo cách khác, do sự không hoàn thành của mRNA đã được phiên mã, trình tự axit amin của protein cấu trúc đã được dịch mã bị làm đột biến hoặc làm khuyết, và, do đó, chức năng nội tại của protein cấu trúc trở nên không được thực hiện.

Biến thể phá vỡ gen có thể được chuẩn bị bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ miễn là có thể thu được biến thể phá vỡ trong đó enzym hoặc protein đích không được biểu hiện. Các phương pháp khác nhau để phá vỡ gen đã được báo cáo (nhân giống tự nhiên, bổ sung tác nhân gây đột biến, chiếu xạ UV, chiếu xạ bức xạ, sự phát sinh đột biến ngẫu nhiên, transposon, sự phá vỡ gen định hướng điểm). Xem xét sự phá vỡ chỉ gen cụ thể, sự phá vỡ gen bởi sự tái tổ hợp tương đồng là được ưu tiên. Phương pháp phá vỡ gen bởi sự tái tổ hợp tương đồng được mô tả trong J. Bacteriol., 161, 1219-1221 (1985), J. Bacteriol., 177, 1511-1519 (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 6640-6645 (2000), và các tài liệu tương tự, và người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng thực hiện được sự tái tổ hợp tương đồng bằng cách sử dụng các phương pháp này hoặc áp dụng các phương pháp này.

"Vật chủ" theo sáng chế nghĩa là vi sinh vật ở trạng thái mà hiệu quả của sáng chế có thể được tạo ra do kết quả của việc đưa vào một hoặc nhiều gen từ bên ngoài vi sinh vật.

Cụ thể hơn, "vật chủ" theo sáng chế nghĩa là vi sinh vật mà có thể được làm cho có khả năng sản xuất axetyl-CoA từ nguyên liệu nguồn cacbon bằng cách sử dụng cách thức nhất định, bất kể việc vi sinh vật nội tại có khả năng bẩm sinh để sản xuất axetyl-CoA từ nguyên liệu nguồn cacbon hay không.

"Vật chủ" theo sáng chế có thể có tiến trình để sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng. "Chất chuyển hóa hữu dụng" theo sáng chế được sử dụng làm tên chung cho các chất chuyển hóa chính trong các tiến trình chuyển hóa của các vi sinh vật, như rượu, các axit amin, các

axit hữu cơ, và các terpen. Vi sinh vật có thể là vi sinh vật bất kỳ miễn là có thể làm cho vi sinh vật này có khả năng sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng bằng cách sử dụng cách thức bất kỳ, bất kể việc vi sinh vật nội tại có khả năng bẩm sinh để sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng hay không.

"Chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA" theo sáng chế chỉ bất kỳ trong số các chất chuyển hóa khác nhau được sản xuất thông qua axetyl-CoA trong các tiến trình chuyển hóa. Ví dụ về chất chuyển hóa này bao gồm rượu như rượu isopropyllic, etanol, hoặc butanol; các axit amin như axit L-glutamic, L-glutamin, L-arginin, L-Ornithin, L-xitruin, L-leuxin, L-isoleuxin hoặc L-prolin; các axit hữu cơ như axit 3-hydroxybutyric, axit poly-3-hydroxybutyric, axit polyglutamic, axit 3-hydroxyisobutyric, axit 3-aminoisobutyric, axit 2-hydroxyisobutyric, axit metacrylic, axit xitric, axit axetic, axit propionic, axit butyric, axit caproic, hoặc axit mevalonic; và các terpen như isopren, squalen, steroid, hoặc carotenoid. Ví dụ khác về chất chuyển hóa bao gồm axeton. Vi sinh vật có thể là vi sinh vật bất kỳ miễn là có thể làm cho vi sinh vật này có khả năng sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA bằng cách sử dụng cách thức nhất định, bất kể việc vi sinh vật nội tại có khả năng bẩm sinh để sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA hay không.

"Sự sản xuất axetyl-CoA" theo sáng chế chỉ sự chuyển hóa chất bất kỳ thành axetyl-CoA trong tiến trình chuyển hóa. Vì axetyl-CoA là hợp chất trung gian chuyển hóa và được chuyển hóa nhanh chóng thành các chất khác nhau trong các tiến trình chuyển hóa, lượng biểu kiến của axetyl-CoA không nhất thiết tăng. Tuy nhiên, hiệu quả có thể được xác nhận gián tiếp bởi sự phát hiện nhãn có nguồn gốc từ CO₂ trong chất có nguồn gốc từ axetyl-CoA, bởi sự tăng hiệu suất của chất có nguồn gốc từ axetyl-CoA so với sự tiêu thụ đường, hoặc bởi cách tương tự. Vì các yếu tố khác nhau (ví dụ, lượng coenzym, lượng cơ chất, hoặc sự thay đổi hiện tượng chuyển hóa gây ra bởi sự ức chế phản hồi) có liên quan đến sự chuyển hóa, nên lượng sản xuất axetyl-CoA không luôn luôn tỷ lệ thuận với lượng của mỗi chất có nguồn gốc từ axetyl-CoA. Tuy nhiên, trong trường hợp trong đó tiến trình để sản xuất chất cụ thể từ axetyl-CoA được tăng cường hoặc trường hợp trong đó tiến trình như vậy được tăng cường một cách nội tại (ví dụ, trong trường hợp vi sinh vật sản xuất rượu isopropyllic hoặc vi sinh vật sản xuất glutamat được mô tả dưới đây), hiệu quả chuyển hóa từ axetyl-CoA hầu như không bị tác động bởi các yếu tố bên ngoài, và, do đó, hiệu quả sản xuất chất cụ thể có thể được đánh giá dưới dạng chỉ số hiệu quả sản xuất axetyl-CoA.

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế bao gồm chu trình sản xuất axetyl-

CoA thu được bằng cách truyền ít nhất một loại hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, cho vi sinh vật mà không có chức năng nào trong số các chức năng sau:

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

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

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

(d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format; trong đó vi sinh vật này không có hoạt tính malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza nội sinh bất kỳ.

Xét về hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tốt hơn là được truyền hoạt tính enzym của malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza, tốt hơn nữa là được truyền hoạt tính enzym của malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, và glyoxylat carboligaza, tốt hơn nữa là được truyền hoạt tính enzym của malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, và 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và/hoặc hydroxypyruvat reductaza.

Cụm từ "không có (một cách tự nhiên)" ở đây nghĩa là vi sinh vật chủ thực chất không có thuộc tính trong tự nhiên.

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

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

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

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

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

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

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

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

Tất cả các chu trình cố định cacbon dioxit từ (1) đến (7) đã được mô tả ở trên có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc từ malonyl-CoA thành 3-hydroxypropionat. Loại phản ứng này được xúc tác bởi malonat semialdehyt dehydrogenaza hoặc malonyl-CoA reductaza (WO 2011/099006). Tin rằng phản ứng khử của axit carboxylic hoặc (thio)este của nó, như khử succinyl-CoA hoặc khử malonyl-CoA, nhìn chung khó tiến hành dưới dạng phản ứng enzym và phải tránh dùng chúng làm các tiền trình lên men khi có thể (Atsumi et al., Nature, 451,(3), 86-89, 2008; Yim et al., Nat. Chem. Biol., 7, 445-452, 2011).

"Chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat" trong bản mô tả này chỉ các chu trình từ (8) đến (10) sau:

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

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

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

chuyển hóa thành axetyl-CoA.

Tất cả các chu trình cố định cacbon dioxit từ (8) đến (10) đều có phản ứng enzym chuyển hóa axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat. Phản ứng này được xúc tác bởi pyruvat synthaza (WO 2011/099006). Phản ứng tổng hợp của pyruvat bởi pyruvat synthaza đòi hỏi năng suất khử mạnh từ ferredoxin và diễn ra chậm, và chỉ diễn ra dưới các điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt vì phản ứng là nhạy với oxy.

"Chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA" trong bản mô tả này chỉ chu trình được thể hiện trên Fig. 9H hoặc 9J của WO 2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa thành crotonyl-CoA, etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA, oxaloaxetat, malat, và malyl-CoA, mà lại được chuyển hóa thành axetyl-CoA.

Sự chuyển hóa của crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA được xúc tác bởi crotonyl-CoA carboxylaza-reductaza hoặc methylcrotonyl-CoA carboxylaza. Vì giá trị Km của crotonyl-CoA carboxylaza-reductaza đối với các cacbonat là cao (14 mM; PNAS 104(25) 10631-10636, 2007), nên hoạt tính đủ ở nồng độ cơ chất thấp không thể được mong đợi. Crotonyl-CoA, là cơ chất của crotonyl-CoA carboxylaza-reductaza, được sản xuất từ 3-hydroxybutyryl-CoA bởi phản ứng loại nước. Nhìn chung, enzym có liên quan trong phản ứng loại nước chủ yếu xúc tác phản ứng ngược (tức là, phản ứng hydrat hóa) trong môi trường chứa nước. Do đó, tốc độ sản xuất đủ cao của crotonyl-CoA không thể được mong đợi. Ngoài ra, hoạt tính riêng đã được báo cáo của methylcrotonyl-CoA carboxylaza là không cao như vậy (0,2 U/mg đến 0,6 U/mg; Arch Biochem Biophys. 310(1) 64-75, 1994), và tốc độ sản xuất đủ cao của crotonyl-CoA làm cơ chất không thể được mong đợi vì cùng lý do.

"Chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format" trong bản mô tả này chỉ chu trình được thể hiện trên Fig. 5, 6, 13 hoặc 14 của WO 2009/046929, tức là, chu trình có tiền trình trong đó phản ứng diễn ra từ CO₂ thông qua format và serin, và oxaloaxetat được chuyển hóa thành malat, malyl-CoA, và glyxerat, mà lại được chuyển hóa thành oxaloaxetat.

Phản ứng enzym từ CO₂ thành format đòi hỏi năng suất khử mạnh, diễn ra chậm, và chỉ diễn ra dưới các điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt vì phản ứng là nhạy với oxy.

Trong bản mô tả này, "không thể hiện chức năng" của chu trình cố định cacbon dioxit "mặc dù được truyền" có nghĩa là chu trình cố định cacbon dioxit không thể hiện chức năng

ngay cả khi hoạt tính của enzym dự định được truyền bằng cách đưa gen mã hóa enzym có hoạt tính này vào vi sinh vật không có gen mã hóa enzym dự định. Việc "chu trình cố định cacbon dioxit không thực hiện chức năng" có thể được xác nhận gián tiếp, ví dụ, bởi việc không phát hiện thấy nhãn có nguồn gốc từ CO_2 trong chất chuyển hóa trong chu trình hoặc chất có nguồn gốc từ chất chuyển hóa này trong thử nghiệm sử dụng CO_2 đã được gắn nhãn, hoặc bởi việc không có sự tăng hiệu suất của chất có nguồn gốc từ chất chuyển hóa trong chu trình so với sự tiêu thụ đường.

Chu trình sản xuất axetyl-CoA cần được tạo cấu trúc trong vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, hydroxypyruvat reductaza, glyoxylat carboligaza, hoặc 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza. Ví dụ về chu trình sản xuất axetyl-CoA được thể hiện trên Fig. 1. Chu trình sản xuất axetyl-CoA không bao gồm enzym mà tiêu thụ axetyl-CoA, như axetyl-CoA carboxylaza hoặc pyruvat synthaza.

Trong chu trình sản xuất axetyl-CoA của Fig. 1, cacbon dioxit trước tiên được liên kết với phosphoenolpyruvat hoặc pyruvat bởi tác động của phosphoenolpyruvat carboxylaza (ppc), pyruvat carboxylaza (pyc), hoặc phosphoenolpyruvat carboxykinaza (pck), và được chuyển hóa thành oxaloaxetat. Oxaloaxetat được chuyển hóa thành malat bởi tác động của malat dehydrogenaza (mdh). Malat được chuyển hóa thành malyl-CoA (malat CoA) bởi tác động của malat thiokinaza (mtk). Malyl-CoA (malat CoA) được chuyển hóa thành axetyl-CoA và glyoxylat bởi tác động của malyl-CoA lyaza (Mcl). Glyoxylat được chuyển hóa thành 2-hydroxy-3-oxopropionat bởi tác động của glyoxylat carboligaza (gcl). 3-hydroxy-2-oxopropionat được chuyển hóa thành glyxerat bởi tác động của 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza (glxR), hoặc theo cách khác, được chuyển hóa thành hydroxypyruvat bởi tác động của hydroxypyruvat isomeraza (hyi) và sau đó thành glyxerat bởi tác động của hydroxypyruvat reductaza (ycdW). Glyxerat được chuyển hóa thành 3-phosphoglyxerat bởi tác động của glyxerat 3-kinaza (glxK), hoặc được chuyển hóa thành 2-phosphoglyxerat bởi tác động của glyxerat 2-kinaza (garK). 3-phosphoglyxerat được chuyển hóa thành 2-phosphoglyxerat bởi tác động của phosphoglyxerat mutaza (gpm). 2-phosphoglyxerat được chuyển hóa thành phosphoenolpyruvat bởi tác động của enolaza (eno). Trong trường hợp trong đó pyruvat carboxylaza được bao gồm trong chu trình, phosphoenolpyruvat được chuyển hóa thành pyruvat bởi tác động của pyruvat kinaza (pyk).

Hoạt tính enzym được truyền cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là chu trình sản xuất axetyl-CoA có thể được tạo cấu trúc chức năng nhờ hoạt tính này, và có thể được chọn lọc một cách thích hợp trong phạm vi được mô tả

trong bản mô tả này tùy thuộc vào vi sinh vật chủ.

Trong vi sinh vật trong đó chu trình khép kín không thể được tạo thành với bất kỳ trong số các tiền chất trên Fig. 1 vì sự vắng mặt một phần của các enzym trong chu trình của Fig. 1, (các) enzym vắng mặt này cần phải được cung cấp. Ví dụ, trong số các vi khuẩn *Escherichia*, *Escherichia coli* không có malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza, vì vậy ít nhất hai enzym này cần phải được truyền.

Vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis* không có malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, và glyoxylat carboligaza, vì vậy ít nhất malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, và glyoxylat carboligaza cần phải được truyền.

Trong số các vi khuẩn coryneform, ví dụ, *Corynebacterium glutamicum* không có malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, vì vậy ít nhất malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, và 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và/hoặc hydroxypyruvat reductaza cần phải được truyền.

Enzym mà tiêu thụ axetyl-CoA như được mô tả ở trên chỉ enzym mà sử dụng axetyl-CoA làm cơ chất và xúc tác sự chuyển hóa của axetyl-CoA thành chất khác. Ví dụ về enzym này bao gồm axetyl-CoA carboxylaza, mà được phân loại dưới dạng số mã enzym: 6.4.1.2 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.) và xúc tác phản ứng chuyển hóa axetyl-CoA thành malonyl-CoA; và pyruvat synthaza, mà được phân loại dưới dạng số mã enzym: 1.2.7.1 và xúc tác phản ứng chuyển hóa exetyl-CoA thành pyruvat.

Chu trình bao gồm enzym mà tiêu thụ axetyl-CoA như được mô tả ở trên chỉ chu trình khép kín trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa, thông qua chu trình này, thành axetyl-CoA lại bởi tác động của enzym mà tiêu thụ axetyl-CoA. Trong trường hợp trong đó chất được sản xuất bởi phản ứng chuyển hóa của enzym mà tiêu thụ axetyl-CoA được chuyển hóa tiếp thành sản phẩm khác mà không được chuyển hóa lại thành exetyl-CoA (ví dụ, trong trường hợp trong đó chất được chuyển hóa thông qua tiến trình sản xuất rượu isopropyllic thành sản phẩm cuối cùng, rượu isopropyllic), chu trình này là không khép kín, và, do đó, chu trình này bị loại trừ khỏi "chu trình bao gồm enzym mà tiêu thụ axetyl-CoA".

Chu trình khép kín chỉ tiến trình bắt đầu từ chất bất kỳ trong chu trình, trong đó chất này được chuyển hóa thông qua chu trình này thành chất khác và, cuối cùng, được chuyển hóa thành chất giống như chất ban đầu.

Malat thiokinaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 6.2.1.9 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng liên kết malat với CoA và chuyển hóa malat thành malyl-CoA. Trong phản ứng này, một phân tử ATP được tiêu thụ, và một phân tử ADP và một phân tử phosphat được sản xuất. Malat thiokinaza có cấu trúc siêu phân tử lớn gồm khoảng 400 axit amin và cấu trúc siêu phân tử nhỏ gồm 300 axit amin. Trong gen này, cấu trúc siêu phân tử lớn thường được theo sau bởi cấu trúc siêu phân tử nhỏ. Ở đây, để thuận tiện, cấu trúc siêu phân tử lớn được gọi là mtkB, và cấu trúc siêu phân tử nhỏ được gọi là mtkA. Đã có báo cáo rằng hoạt tính riêng của malat thiokinaza đã được tinh chế là, ví dụ, 2,5 U/mg (Anal Biochem. 227(2), 363-367, 1995).

Malat thiokinaza chủ yếu được tìm thấy trong tiến trình đồng hóa đối với các nguồn cacbon C1 như metan (J. Bacteriol. 176(23), 7398-7404, 1994) và tiến trình 3-hydroxypropionat (Arch. Microbiol., 151, 252-256, 1989), và khác biệt ở chỗ malyl-CoA lyaza có mặt trong vùng lân cận của nó trong hệ gen. Enzym này có thể thích hợp để sử dụng. Ví dụ về việc đánh giá hoạt tính của malat thiokinaza đã được tinh chế là đã biết đối với malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylobacterium extorquens*, nhưng chỉ có một vài ví dụ về việc so sánh hoạt tính với trình tự thực tế. Ví dụ duy nhất về việc đánh giá hoạt tính cùng với trình tự là đã biết đối với enzym có nguồn gốc từ *Methylobacterium extorquens* AM1 (Số nộp lưu ngân hàng gen AAA62654 và AAA62655) (J. Bacteriol. 176(23), 7398-7404, 1994). Trong tài liệu này, gen mã hóa cho malat thiokinaza được tách dòng, và gen đã được tách dòng được đưa vào cùng chủng *Methylobacterium extorquens* để đánh giá hoạt tính. Tuy nhiên, khi các tác giả sáng chế tổng hợp trình tự này trên thực tế và tiến hành đánh giá, thì không thể phát hiện được hoạt tính. Do điều này, trình tự AAA62655 được so sánh với trình tự của malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylobacterium extorquens* mới được thu nhận theo sáng chế (SEQ ID NO: 70). Kết quả là, đã phát hiện thấy rằng AAA62655 có khuyết đoạn lớn (36 axit amin) ở đầu tận carboxy, và ngắn bất thường so với trình tự của các malat thiokinaza khác (ví dụ, trên Fig. 3). Do đó, tin rằng trình tự loại không hoạt động sai được mô tả trong tài liệu nêu trên.

Sáng chế này, trên thực tế, là ví dụ được báo cáo lần đầu tiên trong đó malat thiokinaza được tách dòng trên thực tế và được biểu hiện bởi vi sinh vật của loài khác, và hoạt tính có liên quan với trình tự.

Ví dụ về malat thiokinaza bao gồm các malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylobacterium* như *Methylobacterium extorquens* (SEQ ID NO:70 và 71), các malat

thiokinaza có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum* hoặc *Hyphomicrobium denitrificans*, các malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Rhizobium* như *Rhizobium* sp. NGR234, các malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Granulibacter* như *Granulibacter bethesdensis* (SEQ ID NO:107 và 108), các malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Nitrosomonas* như *Nitrosomonas europaea*, các malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus*, và các malat thiokinaza có nguồn gốc từ Gammaproteobacteria.

Xét về hiệu quả sản xuất các chất hữu dụng được sản xuất thông qua axetyl-CoA, ví dụ cụ thể về trình tự axit amin được ưu tiên bao gồm trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium* (SEQ ID NO:73, 74, 110, và 111), trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Rhizobium* (SEQ ID NO:75 và 76), trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Nitrosomonas* (SEQ ID NO:113 và 114), trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Methylococcus* (SEQ ID NO:116 và 117), và trình tự axit amin có nguồn gốc từ Gammaproteobacteria (ví dụ, SEQ ID NO:118 và 119).

Malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium* (SEQ ID NO:73, 74, 110, và 111), malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Rhizobium* (SEQ ID NO:75 và 76) và malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Nitrosomonas* (SEQ ID NO:113 và 114) có chung 65% đến 80% độ tương đồng trình tự với nhau. Malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylococcus* (SEQ ID NO:116 và 117) có 70% đến 80% độ tương đồng trình tự với malat thiokinaza có nguồn gốc từ Gammaproteobacteria (ví dụ, SEQ ID NO:118 và 119).

Malat thiokinaza có ít nhất 70% độ tương đồng trình tự axit amin với mỗi trong số các trình tự amino của malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium*, malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Rhizobium*, malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Nitrosomonas*, malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylococcus*, và malat thiokinaza có nguồn gốc từ Gammaproteobacteria được mô tả trong bản mô tả này, và có hoạt tính malat thiokinaza có thể thích hợp để sử dụng để sản xuất axetyl-CoA hoặc sản xuất sản phẩm hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA theo sáng chế.

Kết quả sắp hàng của malat thiokinaz như nêu trong các Ví dụ được thể hiện trên Fig. 2A và Fig. 2B (MtkB: cấu trúc siêu phân tử lớn của mtk; Fig. 2A và Fig. 2B được gọi chung dưới đây trong bản mô tả này là "Fig. 2") và Fig. 3A và Fig. 3B (MtkA: cấu trúc siêu phân tử nhỏ của mtk; Fig. 3A và Fig. 3B được gọi chung dưới đây trong bản mô tả này là "Fig. 3"). Như được thể hiện trên Fig. 2 và Fig. 3, đã phát hiện thấy rằng malat thiokinaza có trình tự chung tương đồng cao trên toàn bộ chiều dài, trong đó các axit amin giống nhau hoặc

tương đồng được bảo toàn.

Liên quan đến các axit amin, malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylobacterium extorquens* (được biểu thị là Me trên Fig. 2 và Fig. 3), và malat thiokinaza có hoạt tính enzym cao có nguồn gốc từ *Rhizobium* sp. (được biểu thị là Rh trên Fig. 2 và Fig. 3), *Hyphomicrobium methylovorum* (được biểu thị là Hme trên Fig. 2 và Fig. 3), *Hyphomicrobium denitrificans* (được biểu thị là Hd trên Fig. 2 và Fig. 3), *Nitrosomonas europaea* (được biểu thị là Ne trên Fig. 2 và Fig. 3), *Methylococcus capsulatus* (được biểu thị là Mc trên Fig. 2 và Fig. 3), và Gammaproteobacteria (được biểu thị là gam trên Fig. 2 và Fig. 3) được phân loại thành 4 nhóm gồm nhóm thứ nhất đến nhóm thứ tư được mô tả dưới đây. Trên Fig. 2 và Fig. 3, các nhóm này được biểu thị bởi 4 loại ký hiệu, ".+##*", một cách tương ứng.

Nhóm thứ nhất bao gồm các ví trí ở đó *Rhizobium* sp., *Hyphomicrobium methylovorum*, *Hyphomicrobium denitrificans*, *Nitrosomonas europaea*, *Methylococcus capsulatus*, và Gammaproteobacteria, mà có hoạt tính enzym cao, có các trình tự khác với trình tự của *Methylobacterium extorquens*, và được biểu thị bởi ký hiệu "." trên Fig. 2 và Fig. 3. Vị trí trình tự được mô tả theo vị trí trong trình tự axit amin của *Methylobacterium extorquens*.

Nhóm thứ nhất trong các MtkB (Fig. 2) bao gồm histidin, prolin hoặc lysin ở vị trí 18; arginin, axit glutamic, axit aspartic, hoặc alanin ở vị trí 21; tyrosin hoặc histidin ở vị trí 26; axit glutamic, alanin, hoặc arginin ở vị trí 29; arginin hoặc valin ở vị trí 34; arginin, serin hoặc axit glutamic ở vị trí 36; arginin, threonin, valin, hoặc glyxin ở vị trí 42; valin ở vị trí 44; axit aspartic, axit glutamic, histidin, isoleuxin, hoặc leuxin ở vị trí 66; histidin, lysin, hoặc axit glutamic ở vị trí 67; axit aspartic hoặc axit glutamic ở vị trí 74; serin, phenylalanin, alanin, hoặc axit glutamic ở vị trí 75; threonin, lysin, hoặc histidin ở vị trí 80; histidin hoặc prolin ở vị trí 84; glutamin, alanin, glyxin, hoặc lysin ở vị trí 89; leuxin hoặc valin ở vị trí 92; axit glutamic, alanin, hoặc glutamin ở vị trí 100; methionin, threonin, serin, hoặc valin ở vị trí 102; axit aspartic, asparagin, axit glutamic, histidin, hoặc serin ở vị trí 103; isoleuxin hoặc prolin ở vị trí 104; alanin, axit aspartic, lysin, hoặc glutamin ở vị trí 105; phenylalanin hoặc leuxin ở vị trí 112; isoleuxin ở vị trí 121; methionin, valin, hoặc threonin ở vị trí 122; serin hoặc alanin ở vị trí 127; serin, alanin, glutamin, hoặc axit glutamic ở vị trí 128; alanin, serin, threonin, axit glutamic, hoặc arginin ở vị trí 139; isoleuxin ở vị trí 144; arginin hoặc lysin ở vị trí 146; glyxin hoặc alanin ở vị trí 166; axit aspartic, axit glutamic, lysin, hoặc arginin ở vị trí 170; asparagin, prolin, axit aspartic, hoặc

glyxin ở vị trí 171; isoleuxin hoặc leuxin ở vị trí 173; glyxin, asparagin, prolin, hoặc alanin ở vị trí 175; arginin, lysin, histidin, hoặc glutamin ở vị trí 176; glyxin, alanin hoặc arginin ở vị trí 183; xystein hoặc isoleuxin ở vị trí 184; tyrosin, leuxin, hoặc lysin ở vị trí 191; alanin ở vị trí 193; arginin, axit glutamic, asparagin, hoặc serin ở vị trí 206; glyxin, lysin, asparagin, axit glutamic, hoặc prolin ở vị trí 207; axit aspartic, glutamin, axit glutamic, serin, hoặc lysin ở vị trí 208; axit glutamic ở vị trí 231; arginin ở vị trí 233; lysin, asparagin, hoặc leuxin ở vị trí 235; axit glutamic hoặc isoleuxin ở vị trí 238; threonin, isoleuxin, hoặc valin ở vị trí 243; tyrosin, alanin, hoặc axit glutamic ở vị trí 244; glyxin ở vị trí 249; axit aspartic ở vị trí 256; asparagin hoặc axit aspartic ở vị trí 258; isoleuxin, leuxin, hoặc phenylalanin ở vị trí 278; lysin hoặc asparagin ở vị trí 300; threonin, arginin, alanin, axit glutamic, hoặc glutamin ở vị trí 307; leuxin, valin, xystein, hoặc tyrosin ở vị trí 336; glyxin, axit aspartic, axit glutamic, glutamin, hoặc arginin ở vị trí 340; arginin hoặc leuxin ở vị trí 358; alanin hoặc axit aspartic ở vị trí 375; axit aspartic, lysin, axit glutamic, hoặc alanin ở vị trí 379; và tryptophan, alanin, arginin, hoặc valin ở vị trí 385.

Nhóm thứ nhất trong các MtkA (Fig. 3) bao gồm phenylalanin ở vị trí 16; lysin, arginin, axit glutamic, hoặc glutamin ở vị trí 19; isoleuxin hoặc histidin ở vị trí 20; arginin hoặc axit aspartic ở vị trí 30; glutamin, threonin, hoặc serin ở vị trí 46; alanin, serin, lysin, hoặc arginin ở vị trí 47; leuxin hoặc prolin ở vị trí 49; methionin, arginin, hoặc leuxin ở vị trí 51; axit aspartic hoặc axit glutamic ở vị trí 67; alanin hoặc valin ở vị trí 68; valin hoặc isoleuxin ở vị trí 71; prolin ở vị trí 74; isoleuxin ở vị trí 90; xystein, alanin, hoặc isoleuxin ở vị trí 93; valin ở vị trí 94; axit aspartic, alanin, hoặc serin ở vị trí 119; methionin, serin, hoặc xystein ở vị trí 121; isoleuxin, threonin, hoặc leuxin ở vị trí 124; alanin hoặc xystein ở vị trí 137; arginin, valin, hoặc asparagin ở vị trí 151; valin ở vị trí 155; alanin, arginin hoặc lysin ở vị trí 171; lysin, arginin, hoặc valin ở vị trí 193; methionin, valin, hoặc isoleuxin ở vị trí 195; axit glutamic, glutamin, arginin, hoặc lysin ở vị trí 197; alanin hoặc glyxin ở vị trí 223; leuxin hoặc arginin ở vị trí 224; alanin ở vị trí 226; methionin ở vị trí 230; phenylalanin, alanin hoặc axit glutamic ở vị trí 259; valin hoặc methionin ở vị trí 267; axit glutamic hoặc lysin ở vị trí 271; alanin, xystein, hoặc leuxin ở vị trí 273; threonin hoặc asparagin ở vị trí 280; serin hoặc alanin ở vị trí 282; alanin, lysin, glutamin, glyxin, hoặc axit glutamic ở vị trí 294; và methionin, glutamin, arginin, leuxin, hoặc histidin ở vị trí 295.

Malat thiokinaza có một hoặc nhiều trong số các trình tự axit amin này là được ưu tiên hơn xét về hoạt tính enzym.

Nhóm thứ hai bao gồm các trình tự chung đặc trưng đối với tất cả các *Rhizobium* sp.,

Hyphomicrobium methylovorum, *Hyphomicrobium denitrificans*, *Nitrosomonas europaea*, *Methylococcus capsulatus*, và Gammaproteobacteria, và được biểu thị bởi ký hiệu "+" trên Fig. 2 và Fig. 3. Các vị trí của các trình tự đặc trưng này được mô tả theo các vị trí trong trình tự axit amin của *Hyphomicrobium methylovorum*.

Nhóm thứ hai trong các MtkB (Fig. 2) bao gồm valin ở vị trí 43; isoleuxin ở vị trí 120; isoleuxin ở vị trí 143; alanin ở vị trí 192; axit glutamic ở vị trí 230; arginin ở vị trí 232; glyxin ở vị trí 248; và axit aspartic ở vị trí 255.

Nhóm thứ hai trong các MtkA (Fig. 3) bao gồm phenylalanin ở vị trí 16; prolin ở vị trí 74; isoleuxin ở vị trí 90; valin ở vị trí 94; valin ở vị trí 155; alanin ở vị trí 226; và methionin ở vị trí 230.

Vùng không có độ tương đồng, tức là, vùng không phải là các trình tự chung đặc trưng này và các trình tự chung được bảo toàn trong số các trình tự này, có thể có đột biến. Các malat thiokinaza có bất kỳ trong số các trình tự axit amin này là được ưu tiên hơn, xét về hoạt tính enzym.

Nhóm thứ ba bao gồm các trình tự chung đặc trưng đối với *Rhizobium* sp., *Hyphomicrobium methylovorum*, *Hyphomicrobium denitrificans*, và *Nitrosomonas europaea*, và được biểu thị bởi ký hiệu "#" trên Fig. 2 và Fig. 3. Các vị trí của các trình tự đặc trưng này được mô tả theo các vị trí trong trình tự axit amin của *Hyphomicrobium methylovorum*.

Nhóm thứ ba trong các MtkB (Fig. 2) bao gồm axit glutamic ở vị trí 29; arginin ở vị trí 34; isoleuxin ở vị trí 68; histidin ở vị trí 83; leuxin ở vị trí 91; leuxin ở vị trí 95; isoleuxin ở vị trí 103; phenylalanin ở vị trí 111; axit aspartic ở vị trí 141; glyxin ở vị trí 182; xystein ở vị trí 183; valin ở vị trí 252; lysin ở vị trí 299; valin ở vị trí 345; axit glutamic ở vị trí 354; arginin ở vị trí 357; và alanin ở vị trí 374.

Nhóm thứ ba trong các MtkA (Fig. 3) bao gồm isoleuxin ở vị trí 20; alanin ở vị trí 68; xystein ở vị trí 93; methionin ở vị trí 121; leuxin ở vị trí 123; alanin ở vị trí 137; leuxin ở vị trí 224; alanin ở vị trí 236; tyrosin ở vị trí 237; isoleuxin ở vị trí 238; axit glutamic ở vị trí 261; valin ở vị trí 267; leuxin ở vị trí 270; lysin ở vị trí 271; valin ở vị trí 275; isoleuxin ở vị trí 277; threonin ở vị trí 280; và serin ở vị trí 282.

Vùng không có độ tương đồng, tức là, vùng không phải là các trình tự chung đặc trưng này và các trình tự chung được bảo toàn trong số các trình tự này, có thể có đột biến. Các malat thiokinaza có bất kỳ trong số các trình tự axit amin này là được ưu tiên hơn xét

về hoạt tính enzym.

Nhóm thứ tư bao gồm các trình tự chung đặc trưng đối với *Methylococcus capsulatus* và Gammaproteobacteria, và được biểu thị bởi ký hiệu "*" trên Fig. 2 và Fig. 3. Các vị trí của các trình tự chung đặc trưng này được mô tả theo các vị trí trong trình tự axit amin của *Methylococcus capsulatus*.

Nhóm thứ tư trong các MtkB (Fig. 2) bao gồm asparagin ở vị trí 2; tyrosin ở vị trí 15; prolin ở vị trí 18; tyrosin ở vị trí 26; axit aspartic ở vị trí 28; valin ở vị trí 34; axit glutamic ở vị trí 36; isoleuxin ở vị trí 38; glyxin ở vị trí 53; valin ở vị trí 60; alanin ở vị trí 63; serin ở vị trí 65; axit glutamic ở vị trí 67; axit aspartic ở vị trí 74; methionin ở vị trí 76; isoleuxin ở vị trí 114; glutamin ở vị trí 119; threonin ở vị trí 122; axit glutamic ở vị trí 128; axit glutamic ở vị trí 132; valin ở vị trí 136; lysin ở vị trí 143; valin ở vị trí 145; axit glutamic ở vị trí 147; isoleuxin ở vị trí 153; xystein ở vị trí 160; lysin ở vị trí 162; valin ở vị trí 163; alanin ở vị trí 166; isoleuxin ở vị trí 167; leuxin ở vị trí 173; methionin ở vị trí 174; glutamin ở vị trí 176; arginin ở vị trí 179; leuxin ở vị trí 180; methionin ở vị trí 181; isoleuxin ở vị trí 184; leuxin ở vị trí 194; glutamin ở vị trí 195; isoleuxin ở vị trí 203; valin ở vị trí 204; glyxin ở vị trí 205; leuxin ở vị trí 211; phenylalanin ở vị trí 218; asparagin ở vị trí 219; leuxin ở vị trí 237; axit glutamic ở vị trí 239; axit glutamic ở vị trí 240; valin ở vị trí 245; axit glutamic ở vị trí 246; glyxin ở vị trí 249; asparagin ở vị trí 253; alanin ở vị trí 256; alanin ở vị trí 277; histidin ở vị trí 281; axit glutamic ở vị trí 298; lysin ở vị trí 299; asparagin ở vị trí 302; xystein ở vị trí 304; isoleuxin ở vị trí 306; isoleuxin ở vị trí 330; leuxin ở vị trí 334; glutamin ở vị trí 336; serin ở vị trí 340; leuxin ở vị trí 341; phenylalanin ở vị trí 370; asparagin ở vị trí 375; axit aspartic ở vị trí 377; axit aspartic ở vị trí 378; alanin ở vị trí 381; và isoleuxin ở vị trí 386.

Nhóm thứ tư trong các MtkA (Fig. 3) bao gồm phenylalanin ở vị trí 4; valin ở vị trí 5; asparagin ở vị trí 6; histidin ở vị trí 8; serin ở vị trí 9; valin ở vị trí 11; isoleuxin ở vị trí 12; histidin ở vị trí 20; alanin ở vị trí 28; arginin ở vị trí 30; threonin ở vị trí 33; leuxin ở vị trí 56; axit aspartic ở vị trí 60; axit aspartic ở vị trí 72; valin ở vị trí 73; isoleuxin ở vị trí 91; arginin ở vị trí 96; valin ở vị trí 97; alanin ở vị trí 102; valin ở vị trí 107; isoleuxin ở vị trí 111; glutamin ở vị trí 114; arginin ở vị trí 117; glyxin ở vị trí 119; axit aspartic ở vị trí 121; threonin ở vị trí 129; prolin ở vị trí 130; threonin ở vị trí 134; axit glutamic ở vị trí 137; xystein ở vị trí 138; lysin ở vị trí 139; valin ở vị trí 140; asparagin ở vị trí 163; axit glutamic ở vị trí 168; leuxin ở vị trí 175; threonin ở vị trí 191; axit aspartic ở vị trí 192; valin ở vị trí 194; threonin ở vị trí 195; valin ở vị trí 196; alanin ở vị trí 199; valin ở vị trí 210; valin ở vị

trí 221; alanin ở vị trí 222; alanin ở vị trí 224; arginin ở vị trí 225; alanin ở vị trí 227; axit glutamic ở vị trí 260; threonin ở vị trí 263; alanin ở vị trí 266; methionin ở vị trí 268; axit aspartic ở vị trí 269; alanin ở vị trí 270; axit glutamic ở vị trí 272; leuxin ở vị trí 274; tyrosin ở vị trí 277; arginin ở vị trí 280; asparagin ở vị trí 281; alanin ở vị trí 283; isoleuxin ở vị trí 285; leuxin ở vị trí 290; arginin ở vị trí 291; alanin ở vị trí 292; và axit glutamic ở vị trí 295.

Vùng không có độ tương đồng, tức là, vùng không phải là các trình tự chung đặc trưng này và các trình tự chung được bảo toàn trong số các trình tự này, có thể có đột biến.

Các malat thiokinaza có bất kỳ trong số các trình tự axit amin này là được ưu tiên nhất xét về hoạt tính enzym.

Để làm gen mã hóa malat thiokinaza (mtk), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa malat thiokinaza thu được từ mỗi trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng.

Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Methylobacterium* như *Methylobacterium extorquens* (SEQ ID NO: 67 và 68), *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum* hoặc *Hyphomicrobium denitrificans*, *Rhizobium* như *Rhizobium* sp. NGR234, *Granulibacter* như *Granulibacter bethesdensis*, *Nitrosomonas* như *Nitrosomonas europaea*, *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus*, hoặc Gammaproteobacteria.

Xét về hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium* (SEQ ID NO: 61, 62, 86, và 87), *Rhizobium* (ví dụ, SEQ ID NO: 63), *Granulibacter* (SEQ ID NO: 81 và 82), *Nitrosomonas* (SEQ ID NO: 91 và 92), *Methylococcus* (SEQ ID NO: 96 và 97), hoặc Gammaproteobacteria (SEQ ID NO: 102 và 103) là được ưu tiên.

Cụ thể, trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium* (SEQ ID NO: 61, 62, 86, và 87), *Rhizobium* mà việc sử dụng codon của nó được tối ưu hóa (ví dụ, SEQ ID NO: 63), *Nitrosomonas* (SEQ ID NO: 91 và 92), *Methylococcus* (SEQ ID NO: 96 và 97), hoặc Gammaproteobacteria (SEQ ID NO: 102 và 103) là được ưu tiên.

Malyl-CoA lyaza là enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 4.1.3.24 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng sản xuất glyoxylat và axetyl-CoA từ malyl-CoA. Ví dụ về malyl-CoA lyaza bao gồm các malyl-CoA lyaza có nguồn gốc từ *Methylobacterium* như

Methylobacterium extorquens, *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum* hoặc *Hyphomicrobium denitrificans*, *Chloroflexus* như *Chloroflexus aurantiacus*, *Nitrosomonas* như *Nitrosomonas europaea*, hoặc *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus*.

Xét về hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, ví dụ cụ thể về trình tự axit amin được ưu tiên bao gồm trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Methylobacterium* (SEQ ID NO: 69), *Hyphomicrobium* (SEQ ID NO: 72 và 109), *Nitrosomonas* (SEQ ID NO: 112), hoặc *Methylococcus* (SEQ ID NO: 115).

Đã có báo cáo rằng hoạt tính riêng của malyl-CoA lyaza đã được tinh chế trong *Methylobacterium extorquens* là, ví dụ, 28,1 U/mg (Biochem. J. 139, 399-405, 1974).

Để làm gen mã hóa malyl-CoA lyaza (mcl), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa malyl-CoA lyaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Methylobacterium* như *Methylobacterium extorquens*, *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum* hoặc *Hyphomicrobium denitrificans*, hoặc *Chloroflexus* như *Chloroflexus aurantiacus*. Xét về hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, ví dụ được ưu tiên hơn của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Methylobacterium* và gen có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium*.

Ví dụ cụ thể về trình tự bazơ được ưu tiên của gen có nguồn gốc từ *Methylobacterium* bao gồm trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Methylobacterium extorquens* (SEQ ID NO: 66). Ví dụ cụ thể về trình tự bazơ được ưu tiên của gen có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium* bao gồm trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium methylovorum* (SEQ ID NO: 60) hoặc *Hyphomicrobium denitrificans* (SEQ ID NO: 85). Ví dụ cụ thể về trình tự bazơ được ưu tiên của gen có nguồn gốc từ *Nitrosomonas* bao gồm trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Nitrosomonas europaea* (SEQ ID NO: 90). Ví dụ cụ thể về trình tự bazơ được ưu tiên của gen có nguồn gốc từ *Methylococcus* bao gồm trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Methylococcus capsulatus* (SEQ ID NO: 95).

Axetyl-CoA carboxylaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 6.4.1.2 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa axetyl-CoA và CO₂ thành malonyl-CoA.

Malonat semialdehyt dehydrogenaza được phân loại dưới dạng số mã enzym:

1.2.1.18 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa malonyl-CoA thành malonat semialdehyt.

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

Crotonyl-CoA carboxylaza-reductaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 1.3.1.85 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác chuyển hóa crotonyl-CoA thành etylmalonyl-CoA.

Methylcrotonyl-CoA carboxylaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 6.4.1.4 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa crotonyl-CoA thành glutaconyl-CoA.

Pyruvat synthaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 1.2.7.1 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa exetyl-CoA thành pyruvat.

Tốt hơn là, ở vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, hoạt tính của ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm lactat dehydrogenaza, malat synthaza, và fumarat hydrataza được làm bất hoạt hoặc được làm giảm. Kết quả là, axetyl-CoA có thể được sản xuất một cách hiệu quả hơn.

Trong số các lactat dehydrogenaza, malat synthaza, và fumarat hydrataza đã nêu ở trên, mỗi trong số này là enzym đích mà hoạt tính của nó có thể được làm bất hoạt hoặc được làm giảm, malat synthaza xúc tác phản ứng chuyển hóa axetyl-CoA và glyoxylat thành malat. Phản ứng này là phản ứng ngược của phản ứng được xúc tác bởi malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza. Do đó, tốt hơn nếu làm bất hoạt hoặc làm giảm hoạt tính của malat synthaza, vì phản ứng chuyển hóa axetyl-CoA và glyoxylat lại thành malat có thể được phong bế hoặc được làm giảm và hiệu suất của axetyl-CoA được cải thiện.

Trong số các lactat dehydrogenaza, malat synthaza, và fumarat hydrataza, hoạt tính của nó có thể được làm bất hoạt hoặc được làm giảm, tốt hơn là làm bất hoạt fumarat hydrataza xét về hiệu quả sản xuất axetyl-CoA. Việc làm bất hoạt fumarat hydrataza ngăn ngừa sự chuyển hóa malat thành các chất khác bao gồm fumarat và sự giảm lượng malat, và do đó cải thiện hiệu suất của axetyl-CoA.

Lactat dehydrogenaza (ldhA) là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 1.1.1.28 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa pyruvat thành lactat, hoặc chuyển hóa lactat thành pyruvat.

Isoxitrat lyaza (aceA) được phân loại dưới số mã enzym: 4.1.3.1 dựa trên báo cáo của Commission on Enzymes, International Union of Biochemistry (I.U.B.), và là tên chung của các enzym xúc tác phản ứng chuyển hóa isoxitrat thành succinat và glyoxylat.

Malat synthaza (aceB và glcB) là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 2.3.3.9 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa axetyl-CoA và glyoxylat thành malat và CoA. Tùy thuộc vào vi sinh vật, nhiều chất đồng phân của malat synthaza được mã hóa trong hệ gen. Hầu hết các chủng *Escherichia coli* có hai gen được đặt tên là aceB và glcB, một cách tương ứng, và cả hai gen này đều được mô tả trong bản mô tả này. Mỗi trong số các *Pantoea ananatis* và *Corynebacterium glutamicum* có một loại gen tương ứng với aceB hoặc glcB, và để thuận tiện, gen này được mô tả chung là aceB trong bản mô tả này.

Fumarat hydrataza (fum) là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 4.2.1.2 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa malat thành fumarat. Tùy thuộc vào vi sinh vật, nhiều chất đồng phân của fumarat hydrataza được mã hóa trong hệ gen. Ví dụ, *Escherichia coli* có ba loại fumarat hydrataza, là fumA, fumB, và fumC. *Pantoea ananatis* có fumA và fumC, và *Corynebacterium glutamicum* có fumC.

Phosphoenolpyruvat carboxylaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 4.1.1.31 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa phosphoenolpyruvat và cacbon dioxit thành oxaloaxetat và phosphat. Ví dụ về phosphoenolpyruvat carboxylaza bao gồm các phosphoenolpyruvat carboxylaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*, vi khuẩn *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum*, vi khuẩn *Starkeya* như *Starkeya novella*, vi khuẩn *Rhodopseudomonas* như *Rhodopseudomonas sp.*, hoặc vi khuẩn *Streptomyces* như *Streptomyces coelicolor*.

Để làm gen mã hóa phosphoenolpyruvat carboxylaza (ppc), ADN có trình tự bazơ

của gen mã hóa phosphoenolpyruvat carboxylaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*, vi khuẩn *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum*, vi khuẩn *Starkeya* như *Starkeya novella*, vi khuẩn *Rhodopseudomonas* như *Rhodopseudomonas sp.*, hoặc vi khuẩn *Streptomyces* như *Streptomyces coelicolor*.

Phosphoenolpyruvat carboxykinaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 4.1.1.32, số mã enzym: 4.1.1.38, hoặc số mã enzym: 4.1.1.49 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa phosphoenolpyruvat và cacbon đioxit thành oxaloacetat. Trong số các số mã enzym này, các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 4.1.1.32 có liên quan đến phản ứng chuyển hóa GDP thành GTP; các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 4.1.1.38 có liên quan đến phản ứng chuyển hóa phosphat thành pyrophosphat; và các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 4.1.1.49 có liên quan đến phản ứng chuyển hóa ADP thành ATP. Ví dụ về phosphoenolpyruvat carboxykinaza bao gồm các phosphoenolpyruvat carboxykinaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Actinobacillus* như *Actinobacillus succinogenes*, vi khuẩn *Mycobacterium* như *Mycobacterium smegmatis*, hoặc vi khuẩn *Trypanosoma* như *Trypanosoma brucei*.

Để làm gen mã hóa phosphoenolpyruvat carboxykinaza (pck), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa phosphoenolpyruvat carboxykinaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Actinobacillus* như *Actinobacillus succinogenes*, vi khuẩn *Mycobacterium* như *Mycobacterium smegmatis*, hoặc vi khuẩn *Trypanosoma* như *Trypanosoma brucei*.

Pyruvat carboxylaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 6.4.1.1 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa pyruvat và cacbon đioxit thành oxaloacetat. Phản ứng tiêu thụ ATP, và sản xuất ADP và phosphat. Ví dụ về pyruvat carboxylaza bao gồm các pyruvat carboxylaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, hoặc vi khuẩn *Mycobacterium* như *Mycobacterium*

smegmatis.

Để làm gen mã hóa pyruvat carboxylaza (pyc), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa phosphoenolpyruvat carboxylaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, hoặc vi khuẩn *Mycobacterium* như *Mycobacterium smegmatis*.

Malat dehydrogenaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 1.1.1.37 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và sử dụng NADH làm coenzym và xúc tác phản ứng sản xuất malat từ oxaloacetat. Ví dụ về malat dehydrogenaza bao gồm các malat dehydrogenaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

Để làm gen mã hóa malat dehydrogenaza (mdh), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa malat dehydrogenaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Glyoxylat carboligaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 4.1.1.47 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa hai phân tử glyoxylat thành một phân tử 2-hydroxy-3-oxopropionat. Phản ứng này được đi kèm bởi sự khử carboxyl một phân tử cacbon dioxid. Ví dụ về glyoxylat carboligaza bao gồm các glyoxylat carboligaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Rhodococcus* như *Rhodococcus jostii*.

Để làm gen mã hóa glyoxylat carboligaza (gcl), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa glyoxylat carboligaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Rhodococcus* như *Rhodococcus jostii*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 1.1.1.60 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và sử dụng NADH làm coenzym và xúc tác phản ứng chuyển hóa 2-hydroxy-3-oxopropionat thành glyxerat. Ví dụ về 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza bao gồm các 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

Để làm gen mã hóa 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza (glxR), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

Hydroxypyruvat isomeraza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 5.3.1.22 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng đồng phân hóa 2-hydroxy-3-oxopropionat thành hydroxypyruvat. Ví dụ về hydroxypyruvat isomeraza bao gồm các hydroxypyruvat isomeraza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Để làm gen mã hóa hydroxypyruvat isomeraza (hyi), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa hydroxypyruvat isomeraza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Hydroxypyruvat reductaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 1.1.1.81 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và sử dụng NADH hoặc NADPH làm coenzym và xúc tác phản ứng chuyển hóa hydroxypyruvat thành glyxerat.

Ví dụ về hydroxypyruvat reductaza bao gồm các hydroxypyruvat reductaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Để làm gen mã hóa hydroxypyruvat reductaza (ycdW), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa hydroxypyruvat reductaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Glyxerat 3-kinaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 2.7.1.31 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa glyxerat thành 3-phosphoglyxerat. Trong phản ứng này, một phân tử ATP được tiêu thụ, và một phân tử ADP và một phân tử phosphat được sản xuất. Ví dụ về glyxerat 3-kinaza bao gồm các glyxerat 3-kinaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

Để làm gen mã hóa glyxerat 3-kinaza (glxK) theo sáng chế, ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa glyxerat 3-kinaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Glyxerat 2-kinaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 2.7.1.165 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa glyxerat thành 2-phosphoglyxerat. Trong phản ứng này, một phân tử ATP được tiêu thụ, và một phân tử ADP và một phân tử phosphat được sản xuất. Ví dụ về glyxerat 2-kinaza bao gồm các glyxerat 2-kinaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

Để làm gen mã hóa glyxerat 2-kinaza (garK) theo sáng chế, ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa glyxerat 2-kinaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như

Pantoea ananatis.

Phosphoglyxerat mutaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 5.4.2.1 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa 3-phosphoglyxerat thành 2-phosphoglyxerat. Ví dụ về phosphoglyxerat mutaza bao gồm các phosphoglyxerat mutaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Để làm gen mã hóa phosphoglyxerat mutaza (gpm), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa phosphoglyxerat mutaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Enolaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 4.2.1.11 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa 2-phosphoglyxerat thành phosphoenolpyruvat. Ví dụ về enolaza bao gồm các enolaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Để làm gen mã hóa enolaza (eno), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa enolaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Pyruvat kinaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 2.7.1.40 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng chuyển hóa phosphoenolpyruvat và ADP thành pyruvat và ATP. Ví dụ về pyruvat kinaza bao gồm các pyruvat kinaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Để làm gen mã hóa pyruvat kinaza (pyk), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa pyruvat kinaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có thể là vi sinh vật có, ngoài tiến trình để chuyển hóa axetyl-CoA thành chất chuyển hóa hữu dụng, tiến trình mà sản xuất chất chuyển hóa khác bằng cách sử dụng axetyl-CoA làm nguyên liệu thô, hoặc có thể là vi sinh vật mà hoạt tính enzym của nó liên quan đến tiến trình sản xuất chất chuyển hóa khác được tăng cường. Kết quả là, các chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA có thể được sản xuất từ nguyên liệu nguồn cacbon và cacbon dioxit, và hiệu suất của chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA có thể được làm tăng.

Vi sinh vật được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là vi sinh vật này không có chức năng nào trong số các chức năng sau:

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

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

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

(d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format; trong đó vi sinh vật này không có hoạt tính malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza nội sinh bất kỳ.

Ví dụ về vi sinh vật bao gồm vi sinh vật thuộc *Enterobacteriaceae* và vi sinh vật thuộc vi khuẩn coryneform. Ví dụ cụ thể về vi sinh vật bao gồm vi sinh vật thuộc *Enterobacteriaceae* như vi khuẩn *Escherichia* và vi khuẩn *Pantoea*; vi sinh vật thuộc vi khuẩn coryneform như vi khuẩn *Corynebacterium* và vi khuẩn *Brevibacterium*; nấm dạng sợi; và nấm tia.

Ví dụ cụ thể về vi sinh vật thuộc *Enterobacteriaceae* bao gồm vi khuẩn thuộc *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Morganella*, hoặc *Erwinia*. Trong số này, vi sinh vật thuộc *Escherichia*

và vi sinh vật thuộc *Pantoea* là được ưu tiên từ quan điểm về sự sản xuất hiệu quả các chất chuyển hóa hữu dụng.

Ví dụ về vi khuẩn *Corynebacterium* bao gồm *Corynebacterium glutamicum*.

Vi khuẩn *Escherichia* không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về vi khuẩn này bao gồm *Escherichia coli*. Ví dụ cụ thể về *Escherichia coli* bao gồm *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325) và *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 47076), có nguồn gốc từ chủng kiểu đại kiểu chuẩn K12, và *Escherichia coli* B (ATCC 11303) có nguồn gốc từ chủng kiểu đại kiểu chuẩn B.

Cả vi khuẩn *Escherichia* và vi khuẩn *Pantoea* đều thuộc Enterobacteriaceae, và có liên quan gần gũi với nhau (J. Gen. Appl. Microbiol. 43(6) 355-361 (1997); International Journal of Systematic Bacteriology, p1061-1067, 1997).

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

Ngoài ra, một số vi khuẩn thuộc *Erwinia* đã được phân loại lại thành *Pantoea ananas* hoặc *Pantoea stewartii* (International Journal of Systematic Bacteriology, 43(1), 162-173, 1993).

Ví dụ về vi khuẩn *Enterobacter* bao gồm *Enterobacter agglomerans* và *Enterobacter aerogenes*. Cụ thể hơn, các chủng được minh họa trong Patent châu Âu số 952221 có thể được sử dụng. Ví dụ về các chủng đại diện của *Enterobacter* bao gồm *Enterobacter agglomerans* ATCC 12287.

Ví dụ về các chủng đại diện của vi khuẩn *Pantoea* bao gồm *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*, *Pantoea agglomerans*, và *Pantoea citrea*. Ví dụ cụ thể về các chủng này bao gồm các chủng sau.

·*Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614) (Patent châu Âu số 0952221)

·*Pantoea ananatis* AJ13356 (FERM BP-6615) (Patent châu Âu số 0952221)

Mặc dù các chủng này được mô tả là *Enterobacter agglomerans* trong Patent châu Âu số 0952221, các chủng này được phân loại lại thành *Pantoea ananatis* như được mô tả trên đây dựa trên phân tích trình tự bazơ của 16S rARN và dạng tương tự.

"Vi khuẩn coryneform" theo sáng chế chỉ vi sinh vật thuộc *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, hoặc *Microbacterium*, như được định nghĩa trong Bergey's Manual of

Determinative Bacteriology, 8, 599 (1974).

Ví dụ về vi khuẩn coryneform còn bao gồm vi sinh vật mà đã được phân loại thành *Brevibacterium* nhưng được phân loại lại thành *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255, 1991), và các vi khuẩn có liên quan như vi sinh vật thuộc *Brevibacterium*. Ví dụ về vi khuẩn coryneform được liệt kê dưới đây.

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

Ví dụ cụ thể của nó bao gồm các chủng sau.

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511, *Corynebacterium callunae* ATCC 15991, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13020, ATCC 13032 và ATCC 13060, *Corynebacterium lilium* ATCC 15990, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12340 (FERM BP-1539), *Corynebacterium herculis* ATCC13868, *Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020, *Brevibacterium flavum* ATCC 13826, ATCC 14067, và AJ 12418 (FERM BP-2205), *Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068, *Brevibacterium lactofermentum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13869, *Brevibacterium roseum* ATCC 13825, *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066, *Brevibacterium thiogenitalis* ATCC 19240, *Corynebacterium amoniacgenes* ATCC 6871 và ATCC 6872, *Brevibacterium album* ATCC 15111, *Brevibacterium cerinum* ATCC 15112, và *Microbacterium amoniacphilum* ATCC 15354.

Trong trường hợp trong đó vi khuẩn *Escherichia* được sử dụng làm vi sinh vật, ví dụ được ưu tiên về vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế bao gồm vi khuẩn *Escherichia* sản xuất axetyl-CoA trong đó hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, và hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza được truyền hoặc được tăng cường.

Trong trường hợp trong đó vi khuẩn *Escherichia* được sử dụng làm vi sinh vật, ví

dự được ưu tiên về vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế còn bao gồm vi khuẩn *Escherichia* sản xuất axetyl-CoA sản xuất trong đó hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza, và hoạt tính dehydrogenaza rượu isopropyllic được truyền hoặc được tăng cường.

Thiolaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 2.3.1.9 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng sản xuất axetoaxetyl-CoA từ axetyl-CoA.

Ví dụ về thiolaza bao gồm các thiolaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Clostridium beijerinckii*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, *Halobacterium* sp., vi khuẩn *Zoogloea* như *Zoogloea ramigera*, *Rhizobium* sp., vi khuẩn *Bradyrhizobium* như *Bradyrhizobium japonicum*, *Candida* như *Candida tropicalis*, vi khuẩn *Caulobacter* như *Caulobacter crescentus*, vi khuẩn *Streptomyces* như *Streptomyces collinus*, hoặc vi khuẩn *Enterococcus* như *Enterococcus faecalis*.

Để làm gen mã hóa thiolaza, ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa thiolaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Clostridium beijerinckii*; vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, *Halobacterium* sp., vi khuẩn *Zoogloea* như *Zoogloea ramigera*, *Rhizobium* sp., vi khuẩn *Bradyrhizobium* như *Bradyrhizobium japonicum*, *Candida* như *Candida tropicalis*, vi khuẩn *Caulobacter* như *Caulobacter crescentus*, vi khuẩn *Streptomyces* như *Streptomyces collinus*, hoặc vi khuẩn *Enterococcus* như *Enterococcus faecalis*. Ví dụ được ưu tiên hơn của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ sinh vật chưa có nhân điển hình như vi khuẩn *Clostridium* hoặc vi khuẩn *Escherichia*, và ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Escherichia coli* là được đặc biệt ưu tiên.

Axetoaxetat decarboxylaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 4.1.1.4 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng sản xuất axeton từ axetoaxetat.

Ví dụ về axetoaxetat decarboxylaza bao gồm các axetoaxetat decarboxylaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Clostridium*

beijerinckii; hoặc vi khuẩn *Bacillus* như *Bacillus polymyxa*.

Để làm gen mã hóa axetoaxetat decarboxylaza, ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa axetoaxetat decarboxylaza thu được từ sinh vật bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Clostridium* hoặc vi khuẩn *Bacillus*. Ví dụ cụ thể của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Bacillus polymyxa*. ADN tốt hơn nữa là ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Clostridium acetobutylicum*.

Để làm gen mã hóa axetoaxetat decarboxylaza, ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa axetoaxetat decarboxylaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Clostridium* hoặc vi khuẩn *Bacillus*. Ví dụ cụ thể của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Bacillus polymyxa*. ADN tốt hơn nữa là ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Clostridium acetobutylicum*.

Dehydrogenaza rượu isopropylic là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 1.1.1.80 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng sản xuất rượu isopropylic từ axeton.

Ví dụ về dehydrogenaza rượu isopropylic bao gồm các dehydrogenaza rượu isopropylic có nguồn gốc từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium beijerinckii*.

Để làm gen mã hóa dehydrogenaza rượu isopropylic, ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa dehydrogenaza rượu isopropylic thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Clostridium*, như *Clostridium beijerinckii*.

CoA transferaza là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 2.8.3.8 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng sản xuất axetoaxetat từ axetoaxetyl-CoA.

Ví dụ về CoA transferaza bao gồm các CoA transferaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Clostridium beijerinckii*; vi khuẩn *Roseburia* như *Roseburia intestinalis*; vi khuẩn *Faecalibacterium* như *Faecalibacterium prausnitzii*; vi khuẩn *Coprococcus*; các Trypanosoma như *Trypanosoma brucei*; hoặc vi

khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

Để làm gen mã hóa CoA transferaza, ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa CoA transferaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium acetobutylicum*, vi khuẩn *Roseburia* như *Roseburia intestinalis*, vi khuẩn *Faecalibacterium* như *Faecalibacterium prausnitzii*, vi khuẩn *Coprococcus*, các Trypanosoma như *Trypanosoma brucei*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*. Ví dụ được ưu tiên hơn của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Clostridium* hoặc vi khuẩn *Escherichia*, và ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Escherichia coli* là được ưu tiên hơn nữa.

Từ quan điểm về hoạt tính enzym, tốt hơn là mỗi trong số bốn loại enzym nêu trên là enzym có nguồn gốc từ ít nhất một vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn *Clostridium*, vi khuẩn *Bacillus*, và vi khuẩn *Escherichia*. Cụ thể, trường hợp trong đó axetoaxetat decarboxylaza và dehydrogenaza rượu isopropylic có nguồn gốc từ vi khuẩn *Clostridium*, và trong đó hoạt tính CoA transferaza và hoạt tính thiolaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Escherichia*, là được ưu tiên hơn.

Cụ thể, từ quan điểm về hoạt tính enzym, tốt hơn là mỗi trong số bốn loại enzym nêu trên có nguồn gốc từ bất kỳ trong số *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, hoặc *Escherichia coli*. Tốt hơn là axetoaxetat decarboxylaza là enzym có nguồn gốc từ *Clostridium acetobutylicum*, và mỗi trong số CoA transferaza và thiolaza có nguồn gốc từ *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Escherichia coli*, và dehydrogenaza rượu isopropylic có nguồn gốc từ *Clostridium beijerinckii*. Liên quan đến bốn loại enzym, tốt hơn là hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza có nguồn gốc từ *Clostridium acetobutylicum*, và hoạt tính dehydrogenaza rượu isopropylic có nguồn gốc từ *Clostridium beijerinckii*, và hoạt tính CoA transferaza và hoạt tính thiolaza có nguồn gốc từ *Escherichia coli*, từ quan điểm về hoạt tính enzym.

Gen mã hóa CoA transferaza (atoD và atoA) và gen mã hóa thiolaza (atoB) có nguồn gốc từ *Escherichia coli* tạo ra operon trên hệ gen của *Escherichia coli* theo thứ tự atoD, atoA, và atoB (Journal of Bacteriology Vol,169 pp 42-52 Lauren Sallus Jenkins et al.). Do đó, sự biểu hiện của gen mã hóa CoA transferaza và gen mã hóa thiolaza có thể được kiểm soát đồng thời bằng cách cải biến gen khởi đầu atoD.

Từ những gì nêu trên đây, khi hoạt tính CoA transferaza và hoạt tính thiolaza thu được từ các gen trong hệ gen của vật chủ *Escherichia coli*, tốt hơn nếu tăng cường sự biểu hiện của cả hai gen mã hóa enzym bằng cách, ví dụ, thay thế gen khởi đầu chịu trách nhiệm cho sự biểu hiện của cả hai gen mã hóa enzym bằng gen khởi đầu khác, từ quan điểm thu được khả năng sản xuất đủ rượu isopropyllic. Ví dụ về gen khởi đầu được sử dụng để tăng cường sự biểu hiện của hoạt tính CoA transferaza và hoạt tính thiolaza bao gồm gen khởi đầu GAPDH có nguồn gốc từ *Escherichia coli* đã được mô tả ở trên.

Ví dụ về vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA mà sản xuất chất chuyển hóa khác bằng cách sử dụng axetyl-CoA làm nguyên liệu thô bao gồm vi sinh vật thu được bằng cách truyền hoặc tăng cường, hoặc làm bất hoạt hoặc làm giảm, bất kỳ trong số các hoạt tính enzym đã được mô tả ở trên, sử dụng *Escherichia coli* có hệ thống sản xuất rượu isopropyllic (sau đây trong bản mô tả này được gọi là "*Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic") làm vật chủ.

Escherichia coli sản xuất rượu isopropyllic có thể là *Escherichia coli* bất kỳ miễn là các gen tương ứng để truyền khả năng sản xuất rượu isopropyllic có thể được đưa vào hoặc được cải biến.

Escherichia coli tốt hơn nữa là *Escherichia coli* mà khả năng sản xuất rượu isopropyllic đã được truyền trước cho vi khuẩn này. Bằng cách sử dụng *Escherichia coli* này, rượu isopropyllic có thể được sản xuất một cách hiệu quả.

Ví dụ về *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic là *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic mà hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza, hoạt tính dehydrogenaza rượu isopropyllic, hoạt tính CoA transferaza, và hoạt tính thiolaza đã được truyền cho vi khuẩn này để có khả năng sản xuất rượu isopropyllic từ nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật, và được mô tả trong, ví dụ, WO 2009/008377. Ví dụ khác về *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic bao gồm vi sinh vật được mô tả trong WO 2009/094485, WO 2009/094485, WO 2009/046929, hoặc WO 2009/046929.

Escherichia coli sản xuất rượu isopropyllic là *Escherichia coli* có hệ thống sản xuất rượu isopropyllic, và có khả năng sản xuất rượu isopropyllic nhờ kỹ thuật tái tổ hợp di truyền. Hệ thống sản xuất rượu isopropyllic có thể là hệ thống bất kỳ mà giúp cho *Escherichia coli* quan tâm có khả năng sản xuất rượu isopropyllic.

Trong *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic theo sáng chế, tốt hơn là, bốn hoạt tính enzym —hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza, hoạt tính dehydrogenaza rượu

isopropyllic, hoạt tính CoA transferaza, và hoạt tính thiolaza đã được mô tả ở trên — được truyền từ bên ngoài tế bào.

Theo sáng chế, ví dụ về *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic có hệ thống sản xuất rượu isopropyllic bao gồm biến thể pIPA/B và biến thể pIaaa/B được mô tả trong WO 2009/008377. Ví dụ về *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic còn bao gồm biến thể trong đó, trong số các enzym có liên quan đến sự sản xuất rượu isopropyllic, hoạt tính CoA transferaza và hoạt tính thiolaza được tăng cường bằng cách tăng cường sự biểu hiện của các gen tương ứng trên hệ gen của *Escherichia coli*, và trong đó hoạt tính dehydrogenaza rượu isopropyllic và hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza được tăng cường bằng cách tăng cường sự biểu hiện của các gen tương ứng sử dụng plasmit hoặc các plasmit (đôi khi được gọi là "biến thể pIa/B::atoDAB").

Theo sáng chế, *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic có thể là *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic bao gồm hệ thống sản xuất rượu isopropyllic, trong đó hoạt tính của gen kìm hãm phiên mã GntR được làm bất hoạt, và *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic bao gồm nhóm enzym phụ trợ có kiểu hoạt tính enzym mà nhờ nó duy trì hoặc tăng cường được khả năng sản xuất rượu isopropyllic do sự bất hoạt hoạt tính GntR. Do đó, sự sản xuất rượu isopropyllic có thể được làm tăng thêm.

Thuật ngữ "nhóm enzym phụ trợ" theo sáng chế chỉ một enzym hoặc hai hoặc nhiều enzym, mà ảnh hưởng đến khả năng sản xuất rượu isopropyllic. Ngoài ra, hoạt tính của các enzym được bao gồm trong nhóm enzym phụ trợ được làm bất hoạt, được hoạt hóa, hoặc được tăng cường. Cụm từ "kiểu hoạt tính enzym của nhóm enzym phụ trợ" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ kiểu hoạt tính enzym của các enzym mà có khả năng duy trì hoặc làm tăng lượng sản xuất rượu isopropyl được cải thiện đạt được bởi sự bất hoạt hoạt tính GntR một mình, và bao gồm một enzym của hỗn hợp của hai hoặc nhiều enzym.

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

(1) duy trì hoạt tính kiểu đại của glucoza-6-phosphat isomeraza (Pgi), glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza (Zwf), và phosphogluconat dehydrogenaza (Gnd);

(2) bất hoạt hoạt tính glucoza-6-phosphat isomeraza (Pgi), và tăng cường hoạt tính glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza (Zwf); và

(3) bất hoạt hoạt tính glucoza-6-phosphat isomeraza (Pgi), tăng cường hoạt tính glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza (Zwf), và bất hoạt hoạt tính phosphogluconat

dehydrogenaza (Gnd).

Trong số này, kiểu hoạt tính enzym của nhóm enzym phụ trợ được mô tả trong mục (3) nêu trên là được ưu tiên hơn từ quan điểm về khả năng sản xuất rượu isopropylic.

Nhóm enzym phụ trợ và kiểu hoạt tính enzym của nó không bị giới hạn ở Nhóm enzym phụ trợ và kiểu hoạt tính enzym đã được nêu ở trên. Bất kỳ nhóm enzym phụ trợ và kiểu hoạt tính enzym của nó mà bao gồm sự bất hoạt hoạt tính GntR, và nhờ nó lượng sản xuất rượu isopropylic trong *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropylic có thể được làm tăng, đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Nhóm enzym phụ trợ không nhất thiết được cấu thành bởi nhiều enzym, và có thể được cấu thành bởi một enzym.

GntR chỉ yếu tố phiên mã mà điều hòa âm tính operon có liên quan đến sự chuyển hóa gluconat thông qua tiến trình Entner-Doudoroff. GntR là tên chung của các gen kìm hãm phiên mã GntR có tác dụng kìm hãm chức năng của hai nhóm gen (GntI và GntII), mà chịu trách nhiệm cho sự hấp thu và chuyển hóa của axit gluconic.

Glucoza-6-phosphat isomeraza (Pgi) là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 5.3.1.9 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng sản xuất D-fructoza-6-phosphat từ D-glucoza-6-phosphat.

Glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza (Zwf) được phân loại dưới dạng số mã enzym: 1.1.1.49 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.) và xúc tác phản ứng sản xuất D-glucono-1,5-lacton-6-phosphat từ D-glucoza-6-phosphat.

Ví dụ về glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza bao gồm các glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Deinococcus* như *Deinococcus radiophilus*; nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger* hoặc *Aspergillus aculeatus*; vi khuẩn *Acetobacter* như *Acetobacter hansenii*; vi khuẩn *Thermotoga* như *Thermotoga maritima*; nấm *Cryptococcus* như *Cryptococcus neoformans*; nấm *Dictyostelium* như *Dictyostelium discoideum*; *Pseudomonas* như *Pseudomonas fluorescens* hoặc *Pseudomonas aeruginosa*; *Saccharomyces* như *Saccharomyces cerevisiae*; vi khuẩn *Bacillus* như *Bacillus megaterium*; hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

Để làm gen mã hóa glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza (Zwf), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa thiolaza thu được từ bất kỳ trong số các sinh vật có nguồn gốc enzym đã nêu ở trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết

của gen này, có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Deinococcus* như *Deinococcus radiophilus*, nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger* hoặc *Aspergillus aculeatus*; vi khuẩn *Acetobacter* như *Acetobacter hansenii*, vi khuẩn *Thermotoga* như *Thermotoga maritima*, nấm *Cryptococcus* như *Cryptococcus neoformans*, nấm *Dictyostelium* như *Dictyostelium discoideum*, *Pseudomonas* như *Pseudomonas fluorescens* hoặc *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces* như *Saccharomyces cerevisiae*, vi khuẩn *Bacillus* như *Bacillus megaterium*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*. Ví dụ được ưu tiên hơn của nó bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ sinh vật chưa có nhân điển hình như vi khuẩn *Deinococcus*, nấm *Aspergillus*, vi khuẩn *Acetobacter*, vi khuẩn *Thermotoga*, *Pseudomonas*, vi khuẩn *Bacillus*, hoặc vi khuẩn *Escherichia*. ADN tốt hơn nữa là ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Escherichia coli*.

Phosphogluconat dehydrogenaza (Gnd) là tên chung của các enzym được phân loại dưới dạng số mã enzym: 1.1.1.44 dựa trên báo cáo của Enzyme Commission of International Union of Biochemistry (I.U.B.), và xúc tác phản ứng sản xuất D-ribuloza-5-phosphat và CO₂ từ 6-phospho-D-gluconat.

Mỗi trong số các hoạt tính của các enzym này theo sáng chế có thể là hoạt tính được đưa từ bên ngoài tế bào vào tế bào, hoặc hoạt tính thu được bởi sự biểu hiện quá mức của gen mã hóa enzym mà vi khuẩn chủ có trên hệ gen của nó thông qua sự tăng cường hoạt tính gen khởi đầu đối với gen mã hóa enzym hoặc sự thay thế gen khởi đầu bằng gen khởi đầu khác.

Escherichia coli có hoạt tính enzym được tăng cường theo sáng chế chỉ *Escherichia coli* trong đó hoạt tính enzym được tăng cường nhờ phương pháp nhất định. Loại *Escherichia coli* này có thể được tạo cấu trúc bằng cách đưa gen mã hóa enzym hoặc protein từ bên ngoài tế bào vào tế bào bằng cách sử dụng plasmid nhờ công nghệ tái tổ hợp gen như được mô tả ở trên; hoặc bằng cách biểu hiện quá mức gen mã hóa enzym mà vi khuẩn chủ có trên hệ gen của nó thông qua sự tăng cường hoạt tính gen khởi đầu đối với gen mã hóa enzym hoặc thay thế gen khởi đầu này bằng gen khởi đầu khác; hoặc sự kết hợp của các phương pháp này.

Gen khởi đầu của gen thích hợp cho *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic có thể là gen khởi đầu bất kỳ có khả năng kiểm soát sự biểu hiện của bất kỳ trong số các gen đã được mô tả ở trên. Gen khởi đầu của gen tốt hơn là gen khởi đầu hiệu nghiệm mà hoạt động chủ yếu ở vi sinh vật, và không nhạy với sự kìm hãm biểu hiện ngay cả trong điều

kiện có mặt glucoza. Ví dụ cụ thể của nó bao gồm gen khởi đầu của glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "GAPDH") hoặc gen khởi đầu của serin hydroxymetyltransferaza.

Gen khởi đầu trong *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropylic nghĩa là vùng mà ARN polymeraza có yếu tố sigma liên kết với để bắt đầu phiên mã. Ví dụ, gen khởi đầu GAPDH có nguồn gốc từ *Escherichia coli* được mô tả ở các Bazo số 397 đến 440 trong thông tin trình tự bazơ của số nộp lưu ngân hàng gen X02662.

Trong *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropylic, lactat dehydrogenaza (LdhA) có thể bị phá vỡ. Sự phá vỡ lactat dehydrogenaza kìm hãm sự sản xuất lactat ngay cả trong các điều kiện nuôi cấy trong đó sự cung cấp oxy bị giới hạn, kết quả là, rượu isopropylic có thể được sản xuất một cách hiệu quả. "Các điều kiện trong đó sự cung cấp oxy bị giới hạn" nhìn chung có nghĩa là các điều kiện: 0,02 vvm đến 2,0 vvm (vvm: thể tích thông khí [mL]/thể tích chất lỏng [mL]/thời gian [phút]) ở tốc độ khuấy từ 200 đến 600 vòng/phút, khi chỉ sử dụng không khí làm nguồn khí.

Lactat dehydrogenaza (LdhA) chỉ enzym sản xuất D-lactat và NAD từ pyruvat và NADH.

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA để sản xuất axeton có thể là vi sinh vật chỉ có hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, và hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza trong số các hoạt tính trong hệ thống sản xuất rượu isopropylic. Tức là, khi sản xuất axeton bằng cách sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, vi sinh vật không có hoạt tính dehydrogenaza rượu isopropylic có thể được sử dụng.

Ví dụ khác về tiến trình để sản xuất chất chuyển hóa khác bằng cách sử dụng axetyl-CoA làm nguyên liệu thô bao gồm tiến trình sản xuất glutamat từ axetyl-CoA. Ví dụ được ưu tiên về vi sinh vật có tiến trình sản xuất chất chuyển hóa khác hoặc vi sinh vật mà hoạt tính enzym của nó có liên quan trong tiến trình sản xuất chất chuyển hóa khác được tăng cường bao gồm vi sinh vật thu được bằng cách truyền hoặc tăng cường, hoặc làm bất hoạt các hoạt tính enzym trong tiến trình đã được mô tả ở trên mà sản xuất glutamat từ axetyl-CoA hoặc làm giảm hoạt tính enzym mà ức chế sự sản xuất glutamat từ axetyl-CoA bằng cách sử dụng vi sinh vật có tiến trình sản xuất một cách hiệu quả glutamat (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "vi sinh vật sản xuất glutamat") hoặc bằng cách sử dụng vi sinh vật sản xuất glutamat làm vật chủ.

Ví dụ về vi sinh vật sản xuất glutamat bao gồm các vi sinh vật đã nêu ở trên có khả

năng sản xuất các L-axit amin.

Ví dụ cụ thể về vi sinh vật sản xuất glutamat bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vi khuẩn *Enterobacteriaceae* như vi khuẩn *Escherichia* hoặc vi khuẩn *Pantoea*, và vi khuẩn coryneform như *Corynebacterium glutamicum*.

Vi sinh vật sản xuất glutamat có thể là vi sinh vật bất kỳ mà cho phép sự đưa vào hoặc cải biến gen để truyền khả năng sản xuất glutamat. Tốt hơn nữa nếu vi sinh vật sản xuất glutamat là vi khuẩn *Pantoea* hoặc vi khuẩn coryneform mà khả năng sản xuất glutamat đã được truyền trước đó cho vi khuẩn này. Bằng cách sử dụng loại vi sinh vật này, glutamat có thể được sản xuất một cách hiệu quả hơn.

Ví dụ về phương pháp truyền khả năng sản xuất glutamat cho vi sinh vật bao gồm cải biến vi sinh vật sao cho sự biểu hiện của gen mã hóa enzym có liên quan đến sự sinh tổng hợp L-glutamat được làm tăng và/hoặc được biểu hiện quá mức. Ví dụ về enzym có liên quan đến sự sinh tổng hợp L-glutamat bao gồm glutamat dehydrogenaza, glutamin synthetaza, glutamat synthaza, isoxitrat dehydrogenaza, aconitat hydrataza, xitrat synthaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, pyruvat carboxylaza, pyruvat dehydrogenaza, pyruvat kinaza, phosphoenolpyruvat synthaza, enolaza, phosphoglyxeromutaza, phosphoglyxerat kinaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, trioza-phosphat isomeraza, fructoza-bisphosphat aldolaza, phosphofructokinaza, và glucoza-phosphat isomeraza. Trong số các enzym này, tốt hơn là một hoặc nhiều trong số xitrat synthaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, và glutamat dehydrogenaza có hoạt tính được làm tăng, và tốt hơn nữa là cả ba enzym này đều có hoạt tính được tăng cường.

Ví dụ về vi sinh vật sản xuất glutamat bao gồm vi sinh vật sản xuất glutamat được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (JP-A) số 2005-278643.

Vi sinh vật sản xuất L-glutamat được sử dụng có thể là vi sinh vật có khả năng tích lũy L-glutamat với lượng vượt quá nồng độ bão hòa của L-glutamat trong môi trường lỏng khi vi sinh vật được nuôi cấy trong các điều kiện có tính axit (sau đây trong bản mô tả này được gọi là "Khả năng tích lũy L-glutamat trong các điều kiện có tính axit"). Ví dụ, biến thể có độ bền tăng đối với L-glutamat trong môi trường có độ pH thấp có thể thu được nhờ phương pháp được mô tả trong Patent châu Âu số 1078989, nhờ đó tạo ra khả năng tích lũy L-glutamat với lượng vượt quá nồng độ bão hòa.

Ví dụ cụ thể về vi sinh vật có khả năng tích lũy L-glutamat nội tại trong các điều kiện có tính axit bao gồm *Pantoea ananatis* AJ13356 (FERM BP-6615) và AJ13601 (FERM

BP-7207) (xem Patent châu Âu số 0952221). *Pantoea ananatis* AJ13356 được nộp lưu với National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (tên hiện nay: International Patent Organism Depository, National Institute of Technology and Evaluation (IPOD, NITE); địa chỉ: Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan) dưới số truy cập FERM P-16645 vào ngày 19 tháng 2 năm 1998, và sau đó được chuyển đến cơ quan nộp lưu quốc tế theo hiệp ước Budapest với số truy cập FERM BP-6615 vào ngày 11 tháng 1 năm 1999. Chủng này được nhận diện là *Enterobacter agglomerans* và được nộp lưu là *Enterobacter agglomerans* AJ13355 khi được phân lập lần đầu tiên, nhưng, theo phân tích trình tự bazơ gần đây đối với 16S rARN và dạng tương tự, chủng này được phân loại là *Pantoea ananatis* (xem phần các Ví dụ dưới đây. Tương tự, AJ13356 và AJ13601 nêu dưới đây tạo ra từ AJ13355 được nộp lưu ở cơ quan nộp lưu nêu trên là *Enterobacter agglomerans*, nhưng các chủng này được mô tả là *Pantoea ananatis* trong bản mô tả này. AJ13601 được nộp lưu với National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (tên hiện nay: International Patent Organism Depository, National Institute of Technology and Evaluation (IPOD, NITE) dưới số truy cập FERM P-17156 vào ngày 18 tháng 8 năm 1999, và sau đó được chuyển đến cơ quan nộp lưu quốc tế theo hiệp ước Budapest với số truy cập FERM BP-7207 vào ngày 6 tháng 7 năm 2000.

Ví dụ khác về phương pháp truyền hoặc tăng cường khả năng sản xuất L-glutamat bao gồm phương pháp truyền độ bền đối với chất tương tự axit hữu cơ hoặc chất ức chế hô hấp, và phương pháp truyền độ nhạy đối với chất ức chế sự tổng hợp thành tế bào. Ví dụ cụ thể về phương pháp bao gồm truyền độ bền đối với axit monofloaxetic (JP-A số S50-113209), truyền độ bền đối với adenin hoặc độ bền đối với thymin (JP-A số S57-065198), làm yếu ureaza (JP-A số S52-038088), truyền độ bền đối với axit malonic (JP-A số S52-038088), truyền độ bền đối với benzopyron hoặc naphthoquinon (JP-A số S56-001889), truyền độ bền đối với HOQNO (JP-A số S56-140895 A), truyền độ bền đối với axit α -ketomalonic (JP-A số S57-002689 A), truyền độ bền đối với guanidin (JP-A số S56-035981), và phương pháp truyền độ bền đối với penixilin (JP-A số H04-088994).

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

· *Brevibacterium flavum* AJ3949 (FERM BP-2632; xem JP-A số S50-113209)

· *Corynebacterium glutamicum* AJ11628 (FERM P-5736; xem JP-A số S57-065198)

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

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

Phương pháp khác để truyền hoặc tăng cường khả năng sản xuất L-glutamin bao gồm truyền độ bền đối với 6-diazo-5-oxo-norleuxin (JP-A số H03-232497), truyền độ bền đối với chất tương tự purin và độ bền đối với methionin sulfoxit (JP-A số S61-202694), và truyền độ bền đối với axit α -ketomaleic (JP-A số S56-151495). Ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-glutamin bao gồm các vi sinh vật sau.

- Brevibacterium flavum* AJ11573 (FERM P-5492; JP-A số S56-161495)
- Brevibacterium flavum* AJ11576 (FERM BP-10381; JP-A số S56-161495)
- Brevibacterium flavum* AJ12212 (FERM P-8123; JP-A số S61-202694)

Ví dụ được ưu tiên về các vi sinh vật sản xuất prolin, leuxin, isoleuxin, valin, arginin, xitruilin, ornithin, và/hoặc axit polyglutamic bao gồm vi sinh vật được mô tả trong JP-A số 2010-41920. Vi sinh vật sản xuất axit axetic, axit (poly)3-hydroxybutyric, axit itaconic, axit xitric, và/hoặc axit butyric được mô tả trong Fermentation Handbook (Kyoritsu Shuppan Co., Ltd.).

Ví dụ về các vi sinh vật sản xuất axit 4-aminobutyric bao gồm vi sinh vật trong đó glutamat decarboxylaza được đưa vào vi sinh vật sản xuất glutamat, như các vi sinh vật được mô tả trong JP-A số 2011-167097.

Ví dụ về các vi sinh vật sản xuất axit 4-hydroxybutyric bao gồm vi sinh vật trong đó glutamat decarboxylaza, transaminaza, và/hoặc aldehyt dehydrogenaza được đưa vào vi sinh vật sản xuất glutamat, như các vi sinh vật được mô tả trong JP-A số 2009-171960.

Ví dụ về các vi sinh vật sản xuất axit 3-hydroxyisobutyric bao gồm vi sinh vật mà tiến trình mô tả trong WO 2009/135074 hoặc WO 2008/145737 được đưa vào đó.

Ví dụ về các vi sinh vật sản xuất axit 2-hydroxyisobutyric bao gồm vi sinh vật mà tiến trình mô tả trong WO 2009/135074 hoặc WO 2009/156214 được đưa vào đó.

Ví dụ về các vi sinh vật sản xuất axit 3-aminoisobutyric hoặc axit metacrylic bao gồm vi sinh vật mà tiến trình mô tả trong WO 2009/135074 được đưa vào đó.

Vi sinh vật theo sáng chế là vi sinh vật được tạo cấu trúc để có chu trình sản xuất axetyl-CoA của Fig. 1. bằng cách truyền ít nhất cả hai enzym malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza. Do đó, vi sinh vật vốn có malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza không được bao gồm trong vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế.

Ví dụ về vi sinh vật vốn có Mtk và mcl bao gồm vi sinh vật methanotrophic như *Methylobacterium extorquens*. Vì hệ vectơ thích hợp cho vi sinh vật methanotrophic hoặc các kỹ thuật để cải biến các gen trong hệ gen của vi sinh vật methanotrophic đã không được phát triển, nên thao tác di truyền đối với các vi sinh vật là khó khăn hơn so với vi sinh vật công nghiệp như *Escherichia coli* và *Corynebacterium*. Ngoài ra, các vi sinh vật này sinh trưởng chậm trong nhiều trường hợp và do đó không thích hợp để sản xuất các chất chuyển hóa hữu dụng.

Phương pháp sản xuất axetyl-CoA, axeton, rượu isopropylic, hoặc glutamat theo sáng chế bao gồm sản xuất axetyl-CoA, axeton, rượu isopropylic, hoặc glutamat dưới dạng sản phẩm quan tâm từ nguyên liệu nguồn cacbon sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA

đã được mô tả ở trên. Tức là, phương pháp sản xuất axetyl-CoA bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA ở trạng thái trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguyên liệu nguồn cacbon (sau đây trong bản mô tả này, được gọi là quy trình nuôi cấy), và thu gom sản phẩm quan tâm (axetyl-CoA, axeton, rượu isopropylic, hoặc glutamat) thu được sau khi tiếp xúc (sau đây trong bản mô tả này, được gọi là quy trình thu gom).

Theo phương pháp sản xuất axetyl-CoA, vì vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được nuôi cấy ở trạng thái trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguyên liệu nguồn cacbon, nên nguyên liệu nguồn cacbon này được đồng hóa bởi vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, và sản phẩm quan tâm có thể được sản xuất một cách hiệu quả trong khi cacbon dioxid được cố định.

Nguyên liệu nguồn cacbon không bị giới hạn miễn là nguyên liệu này chứa nguồn cacbon có thể được đồng hóa bởi vi sinh vật, và nguyên liệu này tốt hơn là nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật.

Theo sáng chế, nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật chỉ các cơ quan như rễ, thân, thân cây, cành, lá, hoa, và hạt; phần chính của cây chứa các cơ quan này; và sản phẩm phân hủy của các cơ quan của cây, và còn bao gồm các nguồn cacbon mà có thể được sử dụng làm nguồn cacbon bởi vi sinh vật trong quá trình nuôi cấy trong số các nguồn cacbon thu được từ phần chính của cây, cơ quan của cây và sản phẩm phân hủy của nó.

Ví dụ phổ biến về các nguồn cacbon trong nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật bao gồm đường như tinh bột, sucroza, glucoza, fructoza, xyloza, và arabinoza; sản phẩm phân hủy thực vật dạng thảo mộc và có chất gỗ hoặc chất thủy phân xenluloza, mỗi trong số này chứa các thành phần nêu trên với lượng lớn; và tổ hợp của chúng. Nguồn cacbon theo sáng chế có thể còn bao gồm glyxerin và axit béo có nguồn gốc từ dầu thực vật.

Ví dụ được ưu tiên về nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật bao gồm các cây trồng nông nghiệp như ngũ cốc, ngô, lúa, lúa mì, đậu tương, mía, củ cải đường, cây bông, và các cây tương tự, và tổ hợp của chúng. Dạng của nó để làm nguyên liệu thô không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể là sản phẩm thô, nước ép, sản phẩm được ép, hoặc các sản phẩm tương tự. Theo cách khác, nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật có thể ở dạng mà chỉ gồm nguồn cacbon đã được mô tả ở trên.

Trong quy trình nuôi cấy, sự tiếp xúc giữa vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA và nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật nhìn chung được tạo ra bằng cách nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA trong môi trường nuôi cấy chứa nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật.

Mật độ tiếp xúc giữa nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật và vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có thể thay đổi tùy thuộc vào hoạt tính của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA. Nhìn chung, nồng độ của nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật trong môi trường nuôi cấy có thể là nồng độ sao cho nồng độ đường ban đầu ở dạng glucoza có thể được điều chỉnh bằng 20% theo khối lượng hoặc thấp hơn so với tổng khối lượng của hỗn hợp. Từ quan điểm về độ dung nạp đường của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, nồng độ đường ban đầu tốt hơn nếu được điều chỉnh bằng 15% theo khối lượng hoặc thấp hơn. Các thành phần khác có thể được bổ sung với các lượng bổ sung thông thường đối với môi trường nuôi cấy vi sinh vật, mà không bị giới hạn một cách cụ thể.

Hàm lượng của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA trong môi trường nuôi cấy có thể thay đổi theo loại và hoạt tính của vi sinh vật, và lượng chất lỏng vi khuẩn tiền nuôi cấy (OD 660nm=4 đến 8) được bổ sung khi bắt đầu nuôi cấy nhìn chung có thể được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 0,1% theo khối lượng đến 30% theo khối lượng so với chất lỏng nuôi cấy, và tốt hơn nếu được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 1% theo khối lượng đến 10% theo khối lượng so với chất lỏng nuôi cấy từ quan điểm kiểm soát điều kiện nuôi cấy.

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có thể là môi trường nuôi cấy bất kỳ thường được sử dụng mà bao gồm nguồn cacbon, nguồn nitơ, và ion vô cơ, và ngoài ra còn bao gồm yếu tố vết vô cơ, axit nucleic, và vitamin, v.v., cần thiết cho vi sinh vật để sản xuất sản phẩm quan tâm, mà không bị giới hạn một cách cụ thể.

Điều kiện nuôi cấy cho quy trình nuôi cấy không bị giới hạn một cách cụ thể, và nuôi cấy có thể được thực hiện, ví dụ, trong các điều kiện ưa khí ở độ pH và nhiệt độ được kiểm soát một cách thích hợp trong khoảng pH từ 4 đến 9, tốt hơn là pH từ 6 đến 8, và trong khoảng nhiệt độ từ 20°C đến 50°C, tốt hơn là từ 25°C đến 42°C.

Thể tích thông khí của khí vào hỗn hợp đã được mô tả ở trên không bị giới hạn một cách cụ thể. Khi chỉ sử dụng không khí làm nguồn khí, thể tích thông khí nhìn chung nằm trong khoảng từ 0,02 vvm đến 2,0 vvm (vvm: thể tích thông khí [mL]/thể tích chất lỏng [mL]/thời gian [phút]) ở tốc độ nằm trong khoảng từ 50 đến 600 vòng/phút. Từ quan điểm kìm hãm tổn hại vật lý đối với *Escherichia coli*, tiến hành thông khí tốt hơn là ở thể tích thông khí nằm trong khoảng từ 0,1 vvm đến 2,0 vvm, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 vvm đến 1,0 vvm.

Quy trình nuôi cấy có thể được tiếp tục từ lúc bắt đầu nuôi cấy cho đến khi nguyên liệu nguồn cacbon trong hỗn hợp bị cạn kiệt, hoặc cho đến khi hoạt tính của vi sinh vật sản

xuất axetyl-CoA biến mất. Khoảng thời gian của quy trình nuôi cấy có thể thay đổi theo số lượng và hoạt tính của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA trong hỗn hợp và lượng của nguyên liệu nguồn cacbon. Nhìn chung, khoảng thời gian này có thể là ít nhất một giờ, và tốt hơn là ít nhất bốn giờ. Khoảng thời gian của quy trình nuôi cấy có thể được tiếp tục một cách không giới hạn nhờ bổ sung mới nguyên liệu nguồn cacbon hoặc vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA. Tuy nhiên, từ quan điểm về hiệu quả của quy trình, khoảng thời gian này nhìn chung có thể được điều chỉnh bằng 5 ngày hoặc ít hơn, tốt hơn là bằng 72 giờ hoặc ít hơn. Đối với các điều kiện khác, các điều kiện được sử dụng để nuôi cấy thông thường có thể được áp dụng.

Các phương pháp thu gom sản phẩm quan tâm tích lũy trong môi trường nuôi cấy không bị giới hạn một cách cụ thể. Ví dụ, có thể sử dụng phương pháp bao gồm loại bỏ tế bào vi sinh vật khỏi môi trường nuôi cấy, ví dụ, bằng cách phân tách bằng ly tâm, và sau đó tách sản phẩm quan tâm sử dụng phương pháp phân tách thông thường như chưng cất hoặc phân tách màng trong các điều kiện thích hợp cho loại sản phẩm quan tâm.

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

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA sử dụng trong phương pháp sản xuất axeton tốt hơn là vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, và hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza, đã được mô tả ở trên là khía cạnh được ưu tiên của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, từ quan điểm về hiệu quả sản xuất axeton.

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được sử dụng trong phương pháp sản xuất rượu isopropylic tốt hơn là vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza, và hoạt tính dehydrogenaza rượu isopropylic, đã được mô tả ở trên là khía cạnh được ưu tiên của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, từ quan điểm về hiệu quả sản xuất rượu isopropylic.

Phương pháp sản xuất rượu isopropylic hoặc phương pháp sản xuất axeton tốt hơn là bao gồm quy trình nuôi cấy trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được nuôi cấy trong khi khí được cung cấp vào hỗn hợp chứa vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA và nguyên liệu nguồn cacbon; và quy trình thu gom để thu gom sản phẩm quan tâm, trong đó rượu

isopropyllic hoặc axeton được sản xuất nhờ quy trình nuôi cấy này được tách và được thu gom từ hỗn hợp này.

Theo phương pháp sản xuất rượu isopropyllic hoặc phương pháp sản xuất axeton, vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được nuôi cấy trong khí khí được cung cấp vào hỗn hợp (nuôi cấy thông khí). Trong nuôi cấy thông khí này, rượu isopropyllic được sản xuất hoặc axeton được sản xuất được giải phóng vào hỗn hợp, và được làm bay hơi khỏi hỗn hợp. Kết quả là, rượu isopropyllic được sản xuất hoặc axeton được sản xuất có thể được tách một cách dễ dàng khỏi hỗn hợp. Ngoài ra, vì rượu isopropyllic được sản xuất hoặc axeton được sản xuất được tách liên tục khỏi hỗn hợp, nên sự tăng nồng độ của rượu isopropyllic hoặc axeton trong hỗn hợp có thể được kiểm soát. Do đó, có thể không cần thiết đặc biệt tập trung vào độ dung nạp của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA đối với rượu isopropyllic hoặc axeton.

Hỗn hợp trong phương pháp này có thể chủ yếu bao gồm môi trường cơ bản nhìn chung thường được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật chủ. Đối với điều kiện nuôi cấy, các điều kiện nuôi cấy đã được mô tả ở trên sẽ được áp dụng.

Trong quy trình thu gom, rượu isopropyllic hoặc axeton được sản xuất trong quy trình nuôi cấy và được tách khỏi hỗn hợp được thu gom. Phương pháp thu gom có thể là phương pháp bất kỳ có khả năng thu gom rượu isopropyllic hoặc axeton ở trạng thái khí hoặc giọt nhỏ được làm bay hơi khỏi hỗn hợp bởi sự nuôi cấy thông thường. Ví dụ về phương pháp thu gom bao gồm phương pháp thu gom vào bộ phận thu gom như đồ chứa kín khí thường được sử dụng. Cụ thể, phương pháp này tốt hơn là bao gồm cho dung dịch thu hồi để thu hồi rượu isopropyllic hoặc axeton tiếp xúc với rượu isopropyllic hoặc axeton được tách khỏi hỗn hợp, từ quan điểm về việc chỉ thu gom rượu isopropyllic hoặc axeton với độ tinh khiết cao.

Trong phương pháp sản xuất rượu isopropyllic hoặc phương pháp sản xuất axeton, rượu isopropyllic hoặc axeton có thể được thu gom ở trạng thái trong đó rượu isopropyllic hoặc axeton được hòa tan trong dung dịch thu hồi hoặc hỗn hợp. Ví dụ về phương pháp thu gom bao gồm phương pháp được mô tả trong WO 2009/008377. Rượu isopropyllic hoặc axeton được thu gom có thể được xác nhận bằng cách sử dụng biện pháp phát hiện thông thường như HPLC. Rượu isopropyllic được thu gom có thể được tinh chế tiếp, nếu cần. Ví dụ về phương pháp tinh chế bao gồm chưng cất, v.v..

Trong trường hợp trong đó rượu isopropyllic hoặc axeton được thu gom là ở trạng thái dung dịch gốc nước, thì phương pháp sản xuất rượu isopropyllic hoặc phương pháp sản

xuất axeton có thể còn bao gồm quy trình loại nước ngoài quy trình thu gom. Việc loại nước của rượu isopropyllic hoặc axeton có thể được tiến hành bởi phương pháp thông thường.

Ví dụ về thiết bị thích hợp cho phương pháp sản xuất rượu isopropyllic hoặc axeton trong đó rượu isopropyllic hoặc axeton có thể được thu gom ở trạng thái được hòa tan trong dung dịch thu hồi hoặc hỗn hợp bao gồm thiết bị sản xuất được thể hiện trên Fig. 1 của WO 2009/008377.

Trong thiết bị sản xuất này, đường ống bơm để bơm khí từ bên ngoài thiết bị được nối với thùng nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy bao gồm vi sinh vật được sử dụng và nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật, nhờ đó có thể thông khí cho môi trường nuôi cấy.

Thùng thu hồi chứa dung dịch thu hồi dưới dạng chất lỏng thu hồi được nối với thùng nuôi cấy thông qua ống nối. Khí hoặc chất lỏng mà đã chuyển đến thùng thu hồi tiếp xúc với dung dịch thu hồi, và xuất hiện sự sủi bọt.

Kết quả là, rượu isopropyllic hoặc axeton, mà đã được sản xuất trong thùng nuôi cấy bằng cách nuôi cấy trong điều kiện thông khí, được làm bay hơi do sự thông khí, và, do đó, được tách một cách dễ dàng khỏi môi trường nuôi cấy, và được thu hồi trong dung dịch thu hồi trong thùng thu hồi. Kết quả là, rượu isopropyllic hoặc axeton có thể được sản xuất ở trạng thái tinh khiết hơn theo cách đơn giản và liên tục.

Phương pháp sản xuất glutamat theo sáng chế bao gồm sản xuất glutamat làm sản phẩm quan tâm từ nguyên liệu nguồn cacbon sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA đã được mô tả ở trên. Cụ thể, phương pháp sản xuất glutamat bao gồm nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA ở trạng thái trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguyên liệu nguồn cacbon (sau đây trong bản mô tả này, được gọi là quy trình nuôi cấy), và thu gom sản phẩm quan tâm (glutamat) thu được sau khi tiếp xúc (sau đây trong bản mô tả này, được gọi là quy trình thu gom).

Theo phương pháp sản xuất glutamat, vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được nuôi cấy ở trạng thái trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguyên liệu nguồn cacbon, nguyên liệu nguồn cacbon này được đồng hóa bởi vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, và sản phẩm quan tâm có thể được sản xuất một cách hiệu quả trong khi cacbon dioxit được cố định.

Môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy có thể là môi trường nuôi cấy bất kỳ thường được sử dụng bao gồm nguồn cacbon, nguồn nitơ, và muối vô cơ; và chất dinh dưỡng vết hữu cơ như axit amin hoặc vitamin khi cần. Môi trường nuôi cấy tổng hợp hoặc

môi trường nuôi cấy tự nhiên có thể được sử dụng. Nguồn cacbon và nguồn nitơ được sử dụng trong môi trường nuôi cấy có thể thuộc loại bất kỳ mà có thể được sử dụng bởi vi sinh vật được nuôi cấy.

Ví dụ về nguyên liệu nguồn cacbon có thể được sử dụng bao gồm đường như glucoza, glyxerol, fructoza, sucroza, maltoza, manosa, galactoza, dịch thủy phân tinh bột, và ri đường; và các axit hữu cơ như axit axetic hoặc axit xitric, và rượu như etanol có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với các nguồn cacbon khác.

Ví dụ về nguồn nitơ có thể được sử dụng bao gồm amoniac, các muối amoni như amoni sulfat, amoni cacbonat, amoni clorua, amoni phosphat, hoặc amoni axetat, và muối của axit nitric.

Ví dụ về chất vi dinh dưỡng hữu cơ có thể được sử dụng bao gồm các axit amin, vitamin, axit béo, và axit nucleic; và pepton, casamino axit, chất chiết nấm men, và dịch thủy phân protein đậu tương, mỗi trong số này chứa các thành phần nêu trên. Trong trường hợp trong đó sử dụng thể đột biến khuyết dưỡng mà đòi hỏi axit amin và các chất tương tự cho sự sinh trưởng, tốt hơn là cung cấp chất dinh dưỡng được yêu cầu.

Ví dụ về muối vô cơ có thể được sử dụng bao gồm muối của axit phosphoric, muối magie, muối canxi, muối sắt, và muối mangan.

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

Trong trường hợp trong đó L-axit amin quan tâm là L-glutamat, việc nuôi cấy có thể được thực hiện sao cho L-glutamat sản xuất được được kết tủa và được tích lũy trong môi trường nuôi cấy, bằng cách sử dụng môi trường lỏng mà các điều kiện của nó được điều chỉnh để làm kết tủa L-glutamat. Ví dụ, các điều kiện để làm kết tủa L-glutamat có thể là độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0, tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 4,0, tốt hơn nữa là độ pH nằm trong khoảng từ 4,3 đến 4,0, tốt hơn nữa là độ pH bằng 4,0. Để đạt được cả sự sinh trưởng tăng trong các điều kiện có tính axit và sự kết tủa hiệu quả của L-glutamat, độ pH tốt hơn là từ 5,0 đến 4,0, tốt hơn nữa là từ 4,5 đến 4,0, tốt hơn nữa là từ 4,3 đến 4,0. Việc nuôi cấy ở độ pH đã được mô tả ở trên có thể được thực hiện trong toàn bộ thời gian nuôi cấy hoặc trong một phần của khoảng thời gian nuôi cấy.

L-axit amin có thể được thu gom từ chất lỏng nuôi cấy sau khi kết thúc nuôi cấy theo phương pháp thu gom đã biết. Ví dụ, việc thu gom có thể được thực hiện bởi phương pháp trong đó sự kết tinh theo nồng độ được tiến hành sau khi loại bỏ tế bào vi khuẩn khỏi môi trường nuôi cấy, hoặc bởi sắc ký trao đổi ion. Trong trường hợp trong đó việc nuôi cấy được tiến hành trong các điều kiện mà cho phép sự kết tủa của L-glutamat trong môi trường nuôi cấy, L-glutamat được kết tủa vào môi trường nuôi cấy có thể được thu gom bằng cách phân tách bằng ly tâm, lọc, hoặc các phương pháp tương tự. Trong các trường hợp này, L-glutamat vẫn còn được hòa tan trong môi trường nuôi cấy có thể được kết tinh, và L-glutamat đã được kết tinh có thể được phân tách cùng nhau.

Ví dụ về phương pháp sản xuất prolin, leuxin, isoleuxin, valin, arginin, xitruilin, ornithin, axit axetic, axit (poly)3-hydroxybutyric, axit itaconic, axit xitric, axit butyric, hoặc axit polyglutamic bao gồm các phương pháp được mô tả trong Fermentation Handbook (Kyoritsu Shuppan Co., Ltd.).

Ví dụ về phương pháp sản xuất axit 4-aminobutyric bao gồm phương pháp sản xuất sử dụng vi sinh vật thu được bằng cách đưa glutamat decarboxylaza vào vi sinh vật sản xuất glutamat, và được mô tả, ví dụ, JP-A số 2011-167097.

Ví dụ về phương pháp sản xuất axit 4-hydroxybutyric bao gồm phương pháp sản xuất sử dụng vi sinh vật thu được bằng cách đưa glutamat decarboxylaza, aminotransferaza, và aldehyt dehydrogenaza vào vi sinh vật sản xuất glutamat, và được mô tả trong, ví dụ, JP-A số 2009-171960.

Ví dụ về phương pháp sản xuất axit 3-hydroxyisobutyric bao gồm phương pháp sản xuất sử dụng vi sinh vật mà tiến trình mô tả trong, ví dụ, WO 2009/135074 hoặc WO 2008/145737 được đưa vào vi sinh vật này.

Ví dụ về phương pháp sản xuất axit 2-hydroxyisobutyric bao gồm phương pháp sản xuất sử dụng vi sinh vật mà tiến trình mô tả trong, ví dụ, WO 2009/135074 hoặc WO 2009/156214 được đưa vào vi sinh vật này.

Ví dụ về phương pháp sản xuất axit 3-aminoisobutyric hoặc axit metacrylic bao gồm phương pháp sản xuất sử dụng vi sinh vật mà tiến trình mô tả trong, ví dụ, WO 2009/135074 được đưa vào vi sinh vật này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây trong bản mô tả này, các ví dụ về sáng chế được mô tả chi tiết. Tuy nhiên,

sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1

Chuẩn bị biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen *atoD*

Toàn bộ trình tự của ADN hệ gen của *Escherichia coli* MG1655 đã được biết (Số nộp lưu ngân hàng gen U00096), và trình tự bazơ của gen mã hóa cấu trúc siêu phân tử CoA transferaza α (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "*atoD*") của *Escherichia coli* MG1655 cũng đã được báo cáo. Tức là, *atoD* được mô tả trong 2321469 đến 2322131 của trình tự hệ gen của *Escherichia coli* MG1655, mà được mô tả dưới số nộp lưu ngân hàng gen U00096.

Để làm trình tự bazơ của gen khởi đầu cần thiết để biểu hiện gen đã được mô tả ở trên, có thể sử dụng trình tự gen khởi đầu của glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "*GAPDH*") có nguồn gốc từ *Escherichia coli*, mà được mô tả trong 397 đến 440 trong thông tin trình tự bazơ với số nộp lưu ngân hàng gen X02662. Để thu được gen khởi đầu *GAPDH*, tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng ADN hệ gen của *Escherichia coli* MG1655 làm khuôn và sử dụng CGCTCAATTGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO: 1) và ACAGAATTGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO: 2) làm các đoạn mồi và mảnh ADN thu được được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *MfeI* và *EcoRI*, nhờ đó thu được mảnh ADN khoảng 100 bp mã hóa gen khởi đầu *GAPDH*. Trộn mảnh ADN thu được và mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid pUC19 (Số nộp lưu ngân hàng gen X02514) bằng enzym giới hạn *EcoRI* sau đó là xử lý bằng phosphatasa kiềm, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α (DNA-903, do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. 10 khuẩn lạc thu được được nuôi cấy riêng rẽ ở nhiệt độ 37°C qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa 50 μ g/mL ampicilin, và các plasmid được thu hồi, và chọn các plasmid từ đó gen khởi đầu *GAPDH* không được cắt ra khi được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *EcoRI* và *KpnI*. Ngoài ra, trình tự ADN của nó được kiểm tra, và plasmid trong đó gen khởi đầu *GAPDH* được cài xen một cách thích hợp được đặt tên là pGAP. pGAP thu được được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *EcoRI* và *KpnI*.

Ngoài ra, để thu được *atoD*, tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng ADN hệ gen của *Escherichia coli* MG1655 làm khuôn và sử dụng

CGAATTCGCTGGTGGAACATATGAAAACAAAATTGATGACATTACAAGAC (SEQ ID NO: 3) và GCGGTACCTTATTTGCTCTCCTGTGAAACG (SEQ ID NO: 4)

làm các đoạn môi, và mảnh ADN thu được được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *EcoRI* và *KpnI*, nhờ đó thu được mảnh *atoD* khoảng 690 bp. Mảnh ADN này được trộn với pGAP mà trước đây đã được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *EcoRI* và *KpnI*. Các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α (DNA-903, do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Plasmid được thu hồi từ các tế bào vi khuẩn thu được, và xác nhận được rằng *atoD* được cài xen một cách thích hợp. Plasmid thu được được đặt tên là pGAPatoD.

Ở đây, *Escherichia coli* MG1655 có sẵn từ Bộ sưu tập chủng chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection).

Như được mô tả ở trên, trình tự bazơ của *atoD* trong ADN hệ gen của *Escherichia coli* MG1655 cũng đã được báo cáo. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen của *Escherichia coli* MG1655 làm khuôn và sử dụng GCTCTAGATGCTGAAATCCACTAGTCTTGTC (SEQ ID NO: 5) và TACTGCAGCGTTCCAGCACCTTATCAACC (SEQ ID NO: 6) làm các đoạn môi, mà được chuẩn bị dựa trên thông tin về gen của vùng kẹp bên 5' của *atoD* của *Escherichia coli* MG1655, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,1 kbp được khuếch đại.

Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng vectơ biểu hiện pGAPatoD đã được chuẩn bị trên đây làm khuôn, và sử dụng GGTCTAGAGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO: 7) được chuẩn bị dựa trên thông tin trình tự của gen khởi đầu GAPDH của *Escherichia coli* MG1655 và đoạn môi của SEQ ID NO:4 được chuẩn bị dựa trên thông tin trình tự của *atoD* của *Escherichia coli* MG1655, kết quả là, thu được mảnh ADN khoảng 790 bp có gen khởi đầu GAPDH và *atoD*.

Các mảnh thu được trên đây được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *PstI* và *XbaI*, và *XbaI* và *KpnI*, một cách tương ứng, và các mảnh thu được được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid nhạy với nhiệt độ pTH18cs1 (Số nộp lưu ngân hàng gen AB019610) [Hashimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191 (2000)] bằng *PstI* và *KpnI*, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol ở nhiệt độ 30°C. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C

qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và các plasmit được thu hồi từ các tế bào vi khuẩn thu được. *Escherichia coli* B (ATCC 11303) được biến nạp với plasmit, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các thể biến nạp. Các thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường lỏng LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm. Các tế bào vi khuẩn đã được nuôi cấy thu được được cấy vào đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol và được nuôi cấy ở nhiệt độ 42°C, kết quả là, thu được các khuẩn lạc. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy trong môi trường lỏng LB không chứa chất kháng sinh ở nhiệt độ 30°C trong 2 giờ, và giống cấy thu được sau đó được cấy vào đĩa thạch LB không chứa chất kháng sinh, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C.

Từ các khuẩn lạc đã xuất hiện, 100 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên, và mỗi khuẩn lạc được sinh trưởng riêng rẽ trên cả đĩa thạch LB không có chất kháng sinh và đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và các dòng vô tính nhạy với cloramphenicol được chọn. Ngoài ra, mảnh khoảng 790 bp chứa gen khởi đầu GAPDH và atoD được khuếch đại bằng PCR, từ ADN nhiễm sắc thể của các dòng vô tính này, và chọn biến thể trong đó vùng gen khởi đầu atoD được thay thế bằng gen khởi đầu GAPDH. Sau đó, dòng vô tính thỏa mãn các điều kiện nêu trên được đặt tên là biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen atoD (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "Biến thể B::atoDAB").

Ở đây, *Escherichia coli* B (ATCC 11303) có sẵn từ bộ sưu tập chủng chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection), một ngân hàng của các tế bào, vi sinh vật, và gen.

Ví dụ 2

Chuẩn bị biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen *pgi*

Toàn bộ trình tự của ADN hệ gen của *Escherichia coli* MG1655 đã được biết (Số nộp lưu ngân hàng gen U00096), và trình tự bazơ của gen mã hóa phosphoglucose isomerase (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "*pgi*") của *Escherichia coli* cũng đã được báo cáo (Số nộp lưu ngân hàng gen X15196). Để tách dòng vùng kẹp bên trình tự bazơ của gen mã hóa *pgi* (1650 bp), bốn loại đoạn mồi oligonucleotit được biểu thị bởi CAGGAATTCGCTATATCTGGCTCTGCACG (SEQ ID NO: 8), CAGTCTAGAGCAATACTCTTCTGATTTTGAG (SEQ ID NO: 9), CAGTCTAGATCATCGTCGATATGTAGGCC (SEQ ID NO: 10), và

GACCTGCAGATCATCCGTCAGCTGTACGC (SEQ ID NO: 11) được tổng hợp. Đoạn môi của SEQ ID NO: 8 có vùng nhận biết *EcoRI* ở phía đầu 5' của nó, mỗi trong số các đoạn môi của SEQ ID NO: 9 và 10 có vị trí nhận biết *XbaI* ở phía đầu 5' của nó, và đoạn môi của SEQ ID NO: 11 có vị trí nhận biết *PstI* ở phía đầu 5' của nó.

ADN hệ gen của *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 700926) được chuẩn bị, và PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen thu được làm khuôn và sử dụng cặp đoạn môi của SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh pgi-L") được khuếch đại. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cặp đoạn môi của SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh pgi-R") được khuếch đại. Các mảnh ADN này được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, và được thu hồi. Mảnh pgi-L được tiêu hóa bằng *EcoRI* và *XbaI*, và mảnh pgi-R được tiêu hóa bằng *XbaI* và *PstI*. Hai loại mảnh đã được tiêu hóa và mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid nhạy với nhiệt độ pTH18cs1 (Số nộp lưu ngân hàng gen AB019610) bằng *EcoRI* và *PstI* được trộn, và được để cho phản ứng bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5α (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol ở nhiệt độ 30°C. Plasmid được thu hồi từ các thể biến nạp thu được, và xác nhận được rằng hai mảnh — mảnh vùng kẹp bên 5' ở phía trên và mảnh vùng kẹp bên 3' ở phía dưới của gen mã hóa pgi — được cài xen một cách thích hợp trong pTH18cs1. Plasmid thu được được tiêu hóa bằng *XbaI*, và sau đó được thực hiện xử lý làm cùn đầu bằng T4 ADN polymeraza. Mảnh ADN thu được được trộn với gen kháng kanamycin thu được bằng cách tiêu hóa plasmid pUC4K (Số nộp lưu ngân hàng gen X06404) (Pharmacia) bằng *EcoRI* và thực hiện xử lý làm cùn đầu đối với sản phẩm thu được bằng T4 ADN polymeraza, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza. Tiếp theo, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol và 50 µg/ml kanamycin ở nhiệt độ 30°C. Plasmid được thu hồi từ các thể biến nạp thu được, và xác nhận được rằng gen kháng kanamycin được cài xen một cách thích hợp giữa mảnh vùng kẹp bên 5' ở phía trên và mảnh vùng kẹp bên 3' ở phía dưới của gen mã hóa pgi. Plasmid thu được được đặt tên là pTH18cs1-pgi.

Ở đây, *Escherichia coli* MG1655 có thể thu được từ bộ sưu tập chủng chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection).

Biến thể B::atoDAB chuẩn bị được trong Ví dụ 1 được biến nạp với plasmit thu được theo cách như vậy pTH18cs1-pgi, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol và 50 µg/ml kanamycin, kết quả là, thu được các thể biến nạp. Các thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường lỏng LB chứa 50 µg/ml kanamycin, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm. Tiếp theo, một phần chất lỏng nuôi cấy thu được được cấy vào đĩa thạch LB chứa 50 µg/ml kanamycin, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ trong môi trường lỏng LB chứa 50 µg/ml kanamycin, và được cấy vào đĩa thạch LB chứa 50 µg/ml kanamycin, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C.

Từ các khuẩn lạc xuất hiện, 100 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên, và mỗi khuẩn lạc được sinh trưởng riêng rẽ trên đĩa thạch LB chứa 50 µg/ml kanamycin và đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và chọn các dòng vô tính nhạy với cloramphenicol chỉ sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa kanamycin. Ngoài ra, ADN nhiễm sắc thể của các dòng vô tính đích này được khuếch đại bằng PCR, và chọn biến thể từ đó mảnh khoảng 3,3 kbp, mà biểu thị sự thay thế gen pgi bằng gen kháng kanamycin, có thể được khuếch đại. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen pgi (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "biến thể B::atoDABΔpgi").

Ở đây, *Escherichia coli* MG1655 và *Escherichia coli* B có sẵn từ bộ sưu tập chủng chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection).

Ví dụ 3

Chuẩn bị biến thể *Escherichia coli* B :: được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen pgi, được làm khuyết gen gntR

Toàn bộ trình tự của ADN hệ gen của *Escherichia coli* B đã được biết (Số nộp lưu ngân hàng gen CP000819), và trình tự bazơ mã hóa GntR được mô tả trong 3509184 đến 3510179 của trình tự hệ gen của *Escherichia coli* B, mà được mô tả với Số nộp lưu ngân hàng gen CP000819. Để tách dòng vùng kẹp bên trình tự bazơ của gen mã hóa GntR (gntR), bốn loại đoạn mỗi oligonucleotit được biểu thị bởi GGAATTCGGGTCAATTTTCACCCTCTATC (SEQ ID NO: 12), GTGGGCCGTCCTGAAGGTACAAAAGAGATAGATTCTC (SEQ ID NO: 13), CTCTTTTGTACCTTCAGGACGGCCACAAATTTGAAG (SEQ ID NO: 14), và GGAATTCCCAGCCCCGCAAGGCCGATGGC (SEQ ID NO: 15) được tổng hợp. Mỗi

trong số các đoạn mồi của SEQ ID NO: 12 và 13 có vị trí nhận biết *EcoRI* ở phía đầu 5' của nó.

ADN hệ gen của *Escherichia coli* B (Số nộp lưu ngân hàng gen CP000819) được chuẩn bị, và PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen thu được làm khuôn và cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 13, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh gntR-L") được khuếch đại. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh gntR-R") được khuếch đại. Các mảnh ADN này được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, và được thu hồi. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các mảnh gntR-L và gntR-R làm khuôn và sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 15, kết quả là, mảnh ADN khoảng 2,0 kbp (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh gntR-LR") được khuếch đại. Mảnh gntR-LR này được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, được thu hồi, được tiêu hóa bằng *EcoRI*, và được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid nhạy với nhiệt độ pTH18cs1 (Số nộp lưu ngân hàng gen AB019610) bằng *EcoRI*. Các mảnh đã được trộn được để cho phản ứng bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol ở nhiệt độ 30°C. Plasmid được thu hồi từ các thể biến nạp thu được, và xác nhận được rằng mảnh gntLR được cài xen một cách thích hợp trong pTH18cs1. Plasmid thu được được đặt tên là pTH18cs1-gntR.

Biến thể *Escherichia coli* B::atoDAB Δ pgi chuẩn bị được trong Ví dụ 2 được biến nạp với plasmid pTH18cs1-gntR thu được theo cách như vậy, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các thể biến nạp. Các thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường lỏng LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm. Tiếp theo, một phần chất lỏng nuôi cấy được cấp vào đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ trong môi trường lỏng LB, và được cấp vào đĩa thạch LB, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C.

Từ các khuẩn lạc xuất hiện, 100 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên, và mỗi khuẩn lạc được sinh trưởng riêng rẽ trên đĩa thạch LB và đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, và các dòng vô tính nhạy với cloramphenicol được chọn. Ngoài ra, ADN nhiễm sắc thể của

các dòng vô tính đích này được khuếch đại bằng PCR, và chọn biến thể từ đó mảnh khoảng 2,0 kbp, mà biểu thị sự làm khuyết gen *gntR*, có thể được khuếch đại. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen *atoD*, được làm khuyết gen *pgi*, được làm khuyết gen *gntR* (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "biến thể B::atoDABΔ*pgi*Δ*gntR*").

Ví dụ 4

Chuẩn bị biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen *atoD*, được làm khuyết gen *pgi*, được làm khuyết gen *gntR*, được làm khuyết gen *gnd*

Để tách dòng vùng kẹp bên trình tự bazơ của gen mã hóa phosphogluconat dehydrogenaza (*gnd*), bốn loại đoạn mồi oligonucleotit được biểu thị bởi CGCCATATGAATGGCGCGGCGGGGCCGGTGG (SEQ ID NO: 16), TGGAGCTCTGTTTACTCCTGTCAGGGGG (SEQ ID NO: 17), TGGAGCTCTCTGATTTAATCAACAATAAAATTG (SEQ ID NO: 18), và CGGGATCCACCACCATAACCAAACGACGG (SEQ ID NO: 19) được tổng hợp. Đoạn mồi của SEQ ID NO: 16 có vị trí nhận biết *NdeI* ở phía đầu 5' của nó, và mỗi trong số các đoạn mồi của SEQ ID NO: 17 và 18 có vị trí nhận biết *SacI* ở phía đầu 5' của nó. Ngoài ra, đoạn mồi của SEQ ID NO: 19 có vị trí nhận biết *BamHI* ở phía đầu 5' của nó.

ADN hệ gen của *Escherichia coli* B (Số nộp lưu ngân hàng genCP000819) được chuẩn bị, và PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh *gnd*-L ") được khuếch đại. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh *gnd*-R") được khuếch đại. Các mảnh ADN này được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, và được thu hồi. Mảnh *gnd*-L được tiêu hóa bằng *NdeI* và *SacI*, và mảnh *gnd*-R được tiêu hóa bằng *SacI* và *BamHI*. Hai loại mảnh đã được tiêu hóa này được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid nhảy với nhiệt độ pTH18cs1 (Số nộp lưu ngân hàng gen AB019610) bằng *NdeI* và *BamHI*, và các mảnh đã được trộn được để cho phản ứng bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol ở nhiệt độ 30°C. Plasmid được thu hồi từ các thể biến nạp thu được, và xác nhận được rằng hai mảnh — mảnh vùng kẹp bên 5' ở phía trên và mảnh vùng kẹp bên 3' ở phía dưới của gen mã hóa *gnd* — được cài xen một cách thích hợp trong pTH18cs1. Plasmid thu được được

đặt tên là pTH18cs1-gnd.

Biến thể *Escherichia coli* B::atoDABΔpgiΔgntR chuẩn bị được trong Ví dụ 3 được biến nạp với plasmid pTH18cs1-gnd thu được theo cách như vậy, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các thể biến nạp. Các thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường lỏng LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm. Tiếp theo, một phần của chất lỏng nuôi cấy này được cấp vào đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml kanamycin, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ trong môi trường lỏng LB, và được cấp vào đĩa thạch LB, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C.

Từ các khuẩn lạc xuất hiện, 100 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên, và mỗi khuẩn lạc được sinh trưởng riêng rẽ trên đĩa thạch LB và đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và các dòng vô tính nhạy với cloramphenicol được chọn. Ngoài ra, ADN nhiễm sắc thể của các dòng vô tính đích này được khuếch đại bằng PCR, và chọn biến thể từ đó mảnh khoảng 2,0 kbp, mà biểu thị sự làm khuyết gen gnd, có thể được khuếch đại. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen pgi, được làm khuyết gen gntR, được làm khuyết gen gnd (biến thể B::atoDABΔpgiΔgntRΔgnd).

Ví dụ 5

Chuẩn bị biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen pgi, được làm khuyết gen gntR, được làm khuyết gen gnd, được làm khuyết gen ldhA

Để tách dòng vùng kẹp bên trình tự bazơ của gen mã hóa D-lactat dehydrogenaza (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "ldhA") (990 bp), bốn loại đoạn mồi oligonucleotit được biểu thị bởi GGAATTCGACCATCGCTTACGGTCAATTG (SEQ ID NO: 20), GAGCGGCAAGAAAGACTTTCTCCAGTGATGTTG (SEQ ID NO: 21), GGAGAAAGTCTTTCTTGCCGCTCCCCTGCAAC (SEQ ID NO: 22), và GGAATTCTTTAGCAAATGGCTTTCTTC (SEQ ID NO: 23) được tổng hợp. Mỗi trong số các đoạn mồi của SEQ ID NO: 20 và 23 có vị trí nhận biết *EcoRI* ở phía đầu 5' của nó.

ADN hệ gen của *Escherichia coli* B (Số nộp lưu ngân hàng gen CP000819) được chuẩn bị, và PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen thu được làm khuôn và cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 21, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0

kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh ldhA-L") được khuếch đại. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh ldhA-R") được khuếch đại. Các mảnh ADN này được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, và được thu hồi. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các mảnh ldhA-L và ldhA-R làm khuôn và sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 23, kết quả là, mảnh ADN khoảng 2,0 kbp (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh ldhA-LR") được khuếch đại. Mảnh ldhA-LR này được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, được thu hồi, được tiêu hóa bằng *EcoRI*, và được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid nhạy với nhiệt độ pTH18cs1 (Số nộp lưu ngân hàng gen AB019610) bằng *EcoRI*. Các mảnh đã được trộn được để cho phản ứng bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol ở nhiệt độ 30°C. Plasmid được thu hồi từ các thể biến nạp thu được, và xác nhận được rằng mảnh ldhA-LR được cài xen một cách thích hợp trong pTH18cs1. Plasmid thu được được đặt tên là pTH18cs1-ldhA.

Biến thể *Escherichia coli* B::atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd chuẩn bị được trong Ví dụ 4 được biến nạp với plasmid pTH18cs1-ldhA thu được theo cách như vậy, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các thể biến nạp. Các thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường lỏng LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm. Tiếp theo, một phần chất lỏng nuôi cấy được cấp vào đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ trong môi trường lỏng LB, và được cấp vào đĩa thạch LB, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C.

Từ các khuẩn lạc xuất hiện, 100 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên, và mỗi khuẩn lạc được sinh trưởng riêng rẽ trên đĩa thạch LB và đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, và các dòng vô tính nhạy với cloramphenicol được chọn. Ngoài ra, ADN nhiễm sắc thể của các dòng vô tính đích này được khuếch đại bằng PCR, và chọn biến thể từ đó mảnh khoảng 2,0 kbp, mà biểu thị sự làm khuyết gen ldhA, có thể được khuếch đại. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen pgi, được làm khuyết gen gntR, được làm khuyết gen gnd, được làm khuyết gen ldhA (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "biến thể

B::atoDABΔpgiΔgntRΔgndΔldhA").

Ví dụ 6

Chuẩn bị biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen pgi, được làm khuyết gen gntR, được làm khuyết gen gnd, được làm khuyết gen ldhA, được làm khuyết gen aceBA

Để tách dòng vùng kẹp bên trình tự bazơ của gen mã hóa isoxitrat lyaza và gen mã hóa malat synthaza (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "aceBA") (2936 bp), bốn loại đoạn mồi oligonucleotit được biểu thị bởi GGAATTCATTCAGCTGTTGCGCATCGATTC (SEQ ID NO: 24), CGGTTGTTGTTGCCGTGCAGCTCCTCGTCATGGATC (SEQ ID NO: 25), GGAGCTGCACGGCAACAACAACCGTTGCTGACTG (SEQ ID NO: 26), và GGAATTCCAGGCAGGTATCAATAAATAAC (SEQ ID NO: 27) được tổng hợp. Mỗi trong số các đoạn mồi của SEQ ID NO: 24 và 27 có vị trí nhận biết *EcoRI* ở phía đầu 5' của nó.

ADN hệ gen của *Escherichia coli* B (Số nộp lưu ngân hàng gen CP000819) được chuẩn bị, và PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen thu được làm khuôn và cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh aceBA-L") được khuếch đại. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 26 và SEQ ID NO: 27, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh aceBA-R") được khuếch đại. Các mảnh ADN này được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, và được thu hồi. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng mảnh aceBA-L và aceBA-R làm khuôn và sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 27, kết quả là, mảnh ADN khoảng 2,0 kbp (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh aceBA-LR") được khuếch đại. Mảnh aceBA-LR này được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, được thu hồi, được tiêu hóa bằng *EcoRI*, và được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid nhạy với nhiệt độ pTH18cs1 (Số nộp lưu ngân hàng gen AB019610) bằng *EcoRI*. Các mảnh đã được trộn được để cho phản ứng bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5α (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 10 μg/ml cloramphenicol ở nhiệt độ 30°C. Plasmid được thu hồi từ các thể biến nạp thu được, và xác nhận được rằng mảnh aceBA-LR được cài xen một cách thích hợp trong pTH18cs1. Plasmid thu được được đặt tên là pTH18cs1-aceBA.

Biến thể *Escherichia coli* B::atoDABΔpgiΔgntRΔgndΔldhA chuẩn bị được trong Ví dụ 5 được biến nạp với plasmid pTH18cs1-aceBA thu được theo cách như vậy, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các thể biến nạp. Các thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường lỏng LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm. Tiếp theo, một phần chất lỏng nuôi cấy được cấp vào đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ trong môi trường lỏng LB, và được cấp vào đĩa thạch LB, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C.

Từ các khuẩn lạc xuất hiện, 100 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên, và mỗi khuẩn lạc được sinh trưởng riêng rẽ trên đĩa thạch LB và đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và các dòng vô tính nhạy với cloramphenicol được chọn. Ngoài ra, ADN nhiễm sắc thể của các dòng vô tính đích này được khuếch đại bằng PCR, và chọn biến thể từ đó mảnh khoảng 2,0 kbp, mà biểu thị sự làm khuyết gen aceBA, có thể được khuếch đại. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen pgi, được làm khuyết gen gntR, được làm khuyết gen gnd, được làm khuyết gen ldhA, được làm khuyết gen aceBA (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "biến thể B::atoDABΔpgiΔgntRΔgndΔldhAΔaceB").

Ví dụ 7

Chuẩn bị biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen pgi, được làm khuyết gen gntR, được làm khuyết gen gnd, được làm khuyết gen ldhA, được làm khuyết gen aceBA, được làm khuyết gen glcB

Để tách dòng vùng kẹp bên trình tự bazơ của gen mã hóa malat synthaza G (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "glcB") (723 bp), bốn loại đoạn mồi oligonucleotit được biểu thị bởi GGAATTCCAGGAGAAAGGGCTGGCACGGG (SEQ ID NO: 28), CTTTTTTGACGCTATGTTTATCTCCTCGTTTTTCGC (SEQ ID NO: 29), GAGATAAACATAGCGTCAAAAAAGCCCCGGC (SEQ ID NO: 30), và GGAATTCCGTCCATCATTGCTACCAGCC (SEQ ID NO: 31) được tổng hợp. Mỗi trong số các đoạn mồi của SEQ ID NO: 28 và 31 có vị trí nhận biết *EcoRI* ở phía đầu 5' của nó.

ADN hệ gen của *Escherichia coli* B (Số nộp lưu ngân hàng gen CP000819) được chuẩn bị, và PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen thu được làm khuôn và cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0

kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh glcB-L") được khuếch đại. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 30 và SEQ ID NO: 31, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh glcB-R") được khuếch đại. Các mảnh ADN này được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, và được thu hồi. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các mảnh glcB-L và glcB-R làm khuôn và sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 31, kết quả là, mảnh ADN khoảng 2,0 kbp (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh glcB-LR") được khuếch đại. Mảnh glcB-LR được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, được thu hồi, được tiêu hóa bằng *EcoRI*, và được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmit nhạy với nhiệt độ pTH18cs1 (Số nộp lưu ngân hàng gen AB019610) bằng *EcoRI*. Các mảnh đã được trộn được để cho phản ứng bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza. Sau đó, *Escherichia coli* DH5 α các tế bào khả biến (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol ở nhiệt độ 30°C. Plasmit được thu hồi từ các thể biến nạp thu được, và xác nhận được rằng mảnh glcB-LR được cài xen một cách thích hợp trong pTH18cs1. Plasmit thu được được đặt tên là pTH18cs1-glcB.

Biến thể *Escherichia coli* B::atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd Δ ldhA Δ aceB được điều chế trong Ví dụ 6 được biến nạp với plasmit pTH18cs1-glcB thu được theo cách như vậy, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các thể biến nạp. Các thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường lỏng LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm. Tiếp theo, một phần chất lỏng nuôi cấy được cấy vào đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ trong môi trường lỏng LB, và được cấy vào đĩa thạch LB, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C.

Từ các khuẩn lạc xuất hiện, 100 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên, và mỗi khuẩn lạc được sinh trưởng riêng rẽ trên đĩa thạch LB và đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, và các dòng vô tính nhạy với cloramphenicol được chọn. Ngoài ra, ADN nhiễm sắc thể của các dòng vô tính đích này được khuếch đại bằng PCR, và chọn biến thể từ đó mảnh khoảng 2,0 kbp, mà biểu thị sự làm khuyết gen glcB, có thể được khuếch đại. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen pgi, được làm khuyết gen gntR, được làm khuyết gen gnd, được làm khuyết gen ldhA, được làm khuyết gen aceBA, được làm khuyết gen glcB (sau đây trong bản mô tả này đôi

khi được viết tắt là "biến thể B::atoDABΔpgiΔgntRΔgndΔldhAΔaceBAΔglcB").

Ví dụ 8

Chuẩn bị biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen pgi, được làm khuyết gen gntR, được làm khuyết gen gnd, được làm khuyết gen ldhA, được làm khuyết gen aceBA, được làm khuyết gen glcB, được làm khuyết gen fumAC

Để tách dòng vùng kẹp bên trình tự bazơ của gen mã hóa fumarat hydratase A và gen mã hóa fumarat hydratase C (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "fumAC") (3193 bp), bốn loại đoạn mồi oligonucleotit được biểu thị bởi CGCCATATGATCGCCAGCGCGCGGGATTTTC (SEQ ID NO: 32), CGAGCTCTGTTCTCTCACTTACTGCCTGG (SEQ ID NO: 33), ATGAGCTCTCTGCAACATACAGGTGCAG (SEQ ID NO: 34), và CGGGATCCACTACGCGCACGATGGTCAAG (SEQ ID NO: 35) được tổng hợp. Đoạn mồi của SEQ ID NO: 32 có vị trí nhận biết *NdeI* ở phía đầu 5' của nó. Mỗi trong số các đoạn mồi của SEQ ID NO: 33 và 34 có vị trí nhận biết *SacI* ở phía đầu 5' của nó. Đoạn mồi của SEQ ID NO: 35 có vị trí nhận biết *BamHI* ở phía đầu 5' của nó.

ADN hệ gen của *Escherichia coli* B (Số nộp lưu ngân hàng gen CP000819) được chuẩn bị, và PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen thu được làm khuôn và cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh fumA-L") được khuếch đại. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 35, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh fumC-R") được khuếch đại. Các mảnh ADN này được tách riêng bằng cách điện di trên agarose, và được thu hồi. Mảnh fumA-L được tiêu hóa bằng *NdeI* và *SacI*, và mảnh fumC-R được tiêu hóa bằng *SacI* và *BamHI*. Các mảnh đã được tiêu hóa này được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid nhạy với nhiệt độ pTH18cs1 (Số nộp lưu ngân hàng gen AB019610) bằng *NdeI* và *BamHI*. Các mảnh đã được trộn được để cho phản ứng bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5α (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml chloramphenicol ở nhiệt độ 30°C. Plasmid được thu hồi từ các thể biến nạp thu được, và xác nhận được rằng mảnh fumA-L và mảnh fumC-R được cài xen một cách thích hợp trong pTH18cs1. Plasmid thu được được đặt tên là pTH18cs1-fumAC.

Biến thể *Escherichia coli* B::atoDABΔpgiΔgntRΔgndΔldhAΔaceBAΔglcB được điều chế trong Ví dụ 7 được biến nạp với plasmid pTH18cs1-fumAC thu được theo cách như vậy, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các thể biến nạp. Các thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường lỏng LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm. Tiếp theo, một phần chất lỏng nuôi cấy được cấy vào đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ trong môi trường lỏng LB, và được cấy vào đĩa thạch LB, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C.

Từ các khuẩn lạc xuất hiện, 100 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên, và mỗi khuẩn lạc được sinh trưởng riêng rẽ trên đĩa thạch LB và đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và các dòng vô tính nhạy với cloramphenicol được chọn. Ngoài ra, ADN nhiễm sắc thể của các dòng vô tính đích này được khuếch đại bằng PCR, và chọn biến thể từ đó mảnh khoảng 2,0 kbp, mà biểu thị sự làm khuyết gen fumAC, có thể được khuếch đại. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể *Escherichia coli* B, được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen pgi, được làm khuyết gen gntR, được làm khuyết gen gnd, được làm khuyết gen ldhA, được làm khuyết gen aceBA, được làm khuyết gen glcB, được làm khuyết gen fumAC (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "biến thể B::atoDABΔpgiΔgntRΔgndΔldhAΔaceBAΔglcBΔfumAC").

Ví dụ 9

Chuẩn bị plasmid plaz

Axetoaxetat decarboxylaza của vi khuẩn *Clostridium* được mô tả với Số nộp lưu ngân hàng gen M55392, và dehydrogenaza rượu isopropyl của vi khuẩn *Clostridium* được mô tả với Số nộp lưu ngân hàng gen AF157307.

Để làm trình tự bazơ của gen khởi đầu cần thiết để biểu hiện nhóm gen đã được mô tả ở trên, có thể sử dụng trình tự gen khởi đầu của glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "GAPDH") từ *Escherichia coli*, được mô tả ở 397 đến 440 trong thông tin trình tự bazơ với số nộp lưu ngân hàng gen X02662.

Để thu được gen khởi đầu GAPDH, tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng ADN hệ gen của *Escherichia coli* MG1655 làm khuôn và sử dụng CGAGCTACATATGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO: 36) và CGCGCGCATGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO: 37), và mảnh ADN thu

được được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *NdeI* và *SphI*, kết quả là, thu được mảnh ADN khoảng 110 bp tương ứng với gen khởi đầu GAPDH. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid pBR322 (Số nộp lưu ngân hàng gen J01749) bằng các enzym giới hạn *NdeI* và *SphI*, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa 50 μ g/mL ampicilin, và plasmid pBRgapP được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được.

Để thu được gen mã hóa dehydrogenaza rượu isopropyllic, tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng ADN hệ gen của *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 làm khuôn và sử dụng AATATGCATGCTGGTGGAAACATATGAAAGGTTTTGCA ATGCTAGG (SEQ ID NO: 38) và ACGCGTCGACTTATAATATAACTA CTGCTTTAATTAAGTC (SEQ ID NO: 39), và mảnh ADN thu được được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *SphI* và *Sall*, kết quả là, thu được mảnh dehydrogenaza rượu isopropyllic khoảng 1,1 kbp. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid pUC119 bằng các enzym giới hạn *SphI* và *Sall*, và các mảnh này được nối với nhau bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa 50 μ g/mL ampicilin, và plasmid được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được. Sự cài xen đúng của IPAdh được xác nhận, và plasmid thu được được đặt tên là pUC-I.

Mảnh có IPAdh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid pUC-I bằng các enzym giới hạn *SphI* và *EcoRI* được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid pBRgapP bằng các enzym giới hạn *SphI* và *EcoRI*, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa 50 μ g/mL ampicilin, và các plasmid được thu hồi từ các tế bào vi khuẩn thu được, và xác nhận được rằng IPAdh được cài xen một cách thích hợp. Plasmid thu được được đặt tên là pGAP-I.

Để thu được gen mã hóa axetoaxetat decarboxylaza, tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng ADN hệ gen của *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 làm khuôn và sử dụng ACGCGTCGACGCTGGTGGAAACATATGTTA

AAGGATGAAGTAATTAAACAAATTAGC (SEQ ID NO: 40) và GCTCTAGAGGTACCTTACTTAAGATAATCATATATAACTTCAGC (SEQ ID NO: 41), và mảnh ADN thu được được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *SalI* và *XbaI*, kết quả là, thu được mảnh axetoaxetat decarboxylaza khoảng 700 bp. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid pGAP-I đã được chuẩn bị ở trên bằng các enzym giới hạn *SalI* và *XbaI*, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 50 µg/mL ampicilin. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa 50 µg/mL ampicilin, và các plasmid được thu hồi từ các tế bào vi khuẩn thu được, và xác nhận được rằng adc được cài xen đúng. Plasmid thu được được đặt tên là pIa.

Để thu được gen mã hóa glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza (zwf), tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng ADN hệ gen của *Escherichia coli* B (Số nộp lưu ngân hàng gen CP000819) làm khuôn và sử dụng GCTCTAGACGGAGAAAGTCTTATGGCGGTAACGCAAACAGCCCAGG (SEQ ID NO: 42) và CGGGATCCCGGAGAAAGTCTTATGAAGCAAACAGTTTATATCGCC (SEQ ID NO: 43), và mảnh ADN thu được được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *BamHI* và *XbaI*, kết quả là, thu được mảnh glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza khoảng 1500 bp. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid pIa đã được chuẩn bị ở trên bằng các enzym giới hạn *BamHI* và *XbaI*, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 50 µg/mL ampicilin. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa 50 µg/mL ampicilin, và plasmid này được đặt tên là plaz.

Ví dụ 10

Chuẩn bị plasmid pMWGKC

Tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng pBRgapP làm khuôn và sử dụng CCGCTCGAGCATATGCTGTCGCAATGATTGACACG (SEQ ID NO: 44) và GCTATTCCATATGCAGGGTTATTGTCTCATGAGC (SEQ ID NO: 45), và mảnh ADN thu được được phosphoryl hóa bằng cách sử dụng T4 Polynucleotit kinaza (Takara), kết quả là, thu được mảnh AND chứa gen khởi đầu GAPDH. Ngoài ra, plasmid pMW119 (Số nộp lưu ngân hàng gen AB005476) được xử lý bằng enzym giới hạn *NdeI*, và mảnh ADN thu được được thực hiện xử lý làm cùn đầu bằng KOD cộng với ADN polymeraza

(Takara), kết quả là, thu được mảnh ADN chứa gốc sao chép của pMW119 thu được. Mảnh ADN chứa gen khởi đầu GAPDH và mảnh ADN chứa gốc sao chép của pMW119 được trộn, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa 50 μ g/mL ampicilin, và plasmit pMWG được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được.

Để thu được gen kháng cloramphenicol, tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng pTH18cs1 (Số nộp lưu ngân hàng genAB019610) làm khuôn và sử dụng TCGGCACGTAAGAGGTTCC (SEQ ID NO: 46) và CGGGTCGAATTTGCTTTTCG (SEQ ID NO: 47), và mảnh ADN thu được được phosphoryl hóa bằng cách sử dụng T4 Polynucleotit kinaza (Takara), kết quả là, thu được mảnh ADN chứa gen kháng cloramphenicol. Ngoài ra, tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng pMWG làm khuôn và sử dụng CTAGATCTGACAGTAAGACGGGTAAGCC (SEQ ID NO: 48) và CTAGATCTCAGGGTTATTGTCTCATGAGC (SEQ ID NO: 49). Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh ADN chứa gen kháng cloramphenicol, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL cloramphenicol. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa 25 μ g/mL cloramphenicol, và plasmit thu được được đặt tên là pMWGC.

Tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng gen pMWGC làm khuôn và sử dụng CCTTTGGTTAAAGGCTTTAAGATCTTCCAGTGGACAAACTATGCC (SEQ ID NO: 50) và GGCATAGTTTGTCCACTGGAAGATCTTAAAGCCTTTAACCCTAAAGG (SEQ ID NO: 51). Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với mảnh ADN thu được, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL cloramphenicol. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa 25 μ g/mL cloramphenicol, và plasmit pMWGKC được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được.

Ví dụ 11

Tạo cấu trúc plasmit biểu hiện cho Malat Thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylobacterium extorquens* IAM12632

Methylobacterium extorquens IAM 12632 được mua từ IAM Culture Collection, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, the University of Tokyo. IAM 12632 được nuôi cấy trong môi trường (môi trường số: 352, NBRC), và ADN nhiễm sắc thể thu được từ đó bằng cách sử dụng bộ kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN).

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Methylobacterium extorquens* IAM 12632 làm khuôn và sử dụng AAAAGGCGGAATTCACAAAAAGGATAAAACAATGGACGTTACGAGTACCAA GCC (SEQ ID NO: 52) và CATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGCGAGGTTCTTTTCCGGACTC (SEQ ID NO: 53) làm các đoạn mồi, kết quả là, thu được mảnh malat thiokinaza. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Methylobacterium extorquens* làm khuôn và sử dụng

GGATCCTCTAGACTGGTGGGAATATATGAGCTTCACCCTGATCCAGCAG (SEQ ID NO: 54) và GGCATGCAAGCTTTTACTTTCCGCCCATCGCGTC (SEQ ID NO: 55)

làm các đoạn mồi, kết quả là, thu được mảnh maly-CoA lyaza. Mảnh malat thiokinaza và mảnh maly-CoA lyaza của *Methylobacterium extorquens* được nối với pMWGKC, và plasmit thu được được đặt tên là pMWGKC_mtk(Mex)_mcl.

pMWGKC_mtk(Mex)_mcl chứa trình tự bazơ của gen mcl (SEQ ID NO: 66), trình tự bazơ của gen mtkA (SEQ ID NO: 67), và trình tự bazơ của gen mtkB (SEQ ID NO: 68) có nguồn gốc từ *Methylobacterium extorquens*. Trình tự axit amin của mcl, mtkA, và mtkB có nguồn gốc từ *Methylobacterium extorquens* được thể hiện trong SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, và SEQ ID NO: 71, một cách tương ứng.

Ví dụ 12

Tạo cấu trúc plasmit biểu hiện cho Malat Thiokinaza có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium methylovorum* NBRC 14180

Hyphomicrobium methylovorum NBRC 14180 được mua từ NBRC (Biological Resource Center, Biotechnology Field, National Institute of Technology and Evaluation). NBRC 14180 được nuôi cấy trong môi trường (môi trường số: 233, NBRC), và ADN nhiễm sắc thể thu được từ đó bằng cách sử dụng bộ kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN).

Đoạn mồi (SEQ ID NO: 56) được chuẩn bị dựa trên trình tự ADN của vùng đầu tặn

N của serin-glyoxylat aminotransferaza của NBRC 14180 (Số nộp lưu ngân hàng gen D13739).

Dựa trên trình tự axit amin của phosphoenolpyruvat carboxylaza của *Hyphomicrobium denitrificans*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/300021538?from=3218417&to=3221272&report=gbw> ithparts), độ tương đồng trình tự được so sánh bằng cách sử dụng công cụ tìm kiếm độ tương đồng của NCBI (National Center for Biotechnology Information) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

Đoạn mồi (SEQ ID NO: 57) được chuẩn bị dựa trên trình tự axit amin có độ tương đồng cao.

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO:56 và SEQ ID NO:57 thu được như được mô tả ở trên và ADN nhiễm sắc thể thu được ở trên làm khuôn. Mảnh thu được được nối với ADN chuẩn bị được bằng cách tiêu hóa pUC19 bằng *SmaI*, nhờ đó một phần của gen mã hóa phosphoenolpyruvat carboxylaza được tách dòng từ gen mã hóa serin-glyoxylat aminotransferaza có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium methylovorum* NBRC 14180. Sau khi xác nhận trình tự của dòng vô tính, các đoạn mồi (SEQ ID NO: 58 và 59) được chuẩn bị.

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Hyphomicrobium methylovorum* NBRC 14180 làm khuôn và các đoạn mồi của SEQ ID NO: 58 và 59 thu được như được mô tả ở trên, và ADN thu được được tiêu hóa bằng *EcoRI* và *XbaI*, kết quả là, thu được mảnh ADN chứa các gen *mcl* và *mtk* của *Hyphomicrobium*. Ngoài ra, plasmit pMWGKC_mtk(Mex)_mcl đã được mô tả ở trên được tiêu hóa, và mảnh khoảng 4,3 kb chứa *mcl* được thu hồi. Mảnh thu được này được nối với mảnh ADN chứa các gen *mcl* và *mtk* của *Hyphomicrobium*. Plasmit thu được được đặt tên là pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl.

pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl chứa trình tự bazơ của gen *mcl* (SEQ ID NO: 60), trình tự bazơ của gen *mtkA* (SEQ ID NO: 61), và trình tự bazơ của gen *mtkB* (SEQ ID NO: 62) có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium methylovorum*. Trình tự axit amin của *mcl*, *mtkA*, và *mtkB* có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium methylovorum* là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73 và SEQ ID NO: 74, một cách tương ứng.

Ví dụ 13

Tạo cấu trúc plasmit biểu hiện cho Malat Thiokinaza có nguồn gốc từ *Rhizobium* sp. NGR234

Dựa trên thông tin trình tự axit amin của cấu trúc siêu phân tử beta malat thiokinaza (Số nộp lưu ngân hàng gen ACP26381) và cấu trúc siêu phân tử alpha succinyl-CoA synthetaza (Số nộp lưu ngân hàng gen ACP26382) của *Rhizobium* sp. NGR234, chiều dài đầy đủ của gen mã hóa malat thiokinaza được tổng hợp (SEQ ID NO: 63). Gen thu được được tiêu hóa bằng *NdeI* và *XbaI*, và được nối với pMWGKC đã được tiêu hóa bằng *NdeI* và *XbaI*. Plasmit thu được được đặt tên là pMWGKC_mtk(Rhi). Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Methylobacterium extorquens* làm khuôn và các đoạn mồi của SEQ ID NO: 64 và 65, và ADN thu được được tiêu hóa bằng *XbaI* và *HindIII*. Mảnh thu được được thực hiện xử lý làm cùn đầu, và được nối với gen thu được bằng cách tiêu hóa MWGKC_mtk(Rhi) bằng *XbaI* và thực hiện xử lý làm cùn đầu đối với mảnh thu được và xử lý phosphoryl hóa. Plasmit thu được trong đó gen mtk và gen mcl được đưa vào theo cùng hướng được đặt tên là pMWGKC_mtk(Rhi)_mcl. Trình tự axit amin của mtkA và mtkB có nguồn gốc từ *Rhizobium* sp. là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 75 và SEQ ID NO: 76, một cách tương ứng.

Ví dụ 14

Chuẩn bị biến thể sản xuất rượu isopropyllic được đưa vào Malat Thiokinaza và Malyl-CoA Lyaza

Các tế bào khả biến của biến thể *Escherichia coli* B (atoDAB, Δpgi_gntR_gnd_ldhA_aceBA_glcB_fumAC) chuẩn bị được trong Ví dụ 8 được biến nạp với plasmit pIaz chuẩn bị được trong Ví dụ 9 và mỗi trong số các plasmit này biểu hiện mtk và mcl. Các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 25 mg/L cloramphenicol và 100 mg/L ampicilin được đặt tên như sau (xem Bảng 2).

Số biến thể trong Bảng 2 biểu thị biến thể được điều chế bằng cách đưa pIaz và mỗi trong số các plasmit được mô tả trong Bảng 2 vào biến thể *Escherichia coli* B (atoDAB, Δpgi_gntR_gnd_ldhA_aceBA_glcB_fumAC).

Bảng 2

Số biến thể	Plasmid	Nguồn gốc mtk	Nguồn gốc mcl
MT-1	pMWGKC_mtk(Mex)_mcl	Methylobacterium extorquens	Methylobacterium extorquens
MT-2	pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl	Hyphomicrobium methylovorum	Methylobacterium extorquens, Hyphomicrobium methylovorum
MT-3	pMWGKC_mtk(Rhi)_mcl	Rhizobium sp. NGR234	Methylobacterium extorquens
Đối chứng	pMWGKC	Không có	Không có

Ví dụ 15

Xác nhận việc đưa CO₂ được gắn nhãn ¹³C vào rượu isopropyllic

100 ml môi trường LB lỏng được bổ sung vào bình Erlenmeyer dung tích 500 ml được lắp van đổi hướng, và được vô trùng bằng cách hấp ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Ampixilin được bổ sung vào môi trường đã được vô trùng để có nồng độ cuối cùng bằng 50 µg/ml, và cloramphenicol được bổ sung để có nồng độ cuối cùng bằng 34 µg/ml. Tiếp theo, một vòng platin của mỗi trong số các biến thể được thể hiện trong Bảng 2 có tiến trình cố định cacbon dioxid được đưa vào đó được cấy vào môi trường này, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C và 130 vòng/phút trong khoảng 20 giờ. Chỉ có các tế bào vi khuẩn được tách từ chất lỏng nuôi cấy bằng cách ly tâm (5000 G trong 15 phút), và sau đó các tế bào vi khuẩn đã tách được tái tạo huyền phù trong 10 mL nước muối sinh lý, nhờ đó thu được huyền phù vi khuẩn tương ứng.

Trong bình Erlenmeyer dung tích 100mL, 30 mL môi trường tối thiểu M9 chứa 100 mM natri hydro cacbonat được gắn nhãn ¹³C, 50 g/L glucoza, 34 µg/ml cloramphenicol, và 50 µg/ml ampicilin được điều chế. 3 mL huyền phù vi khuẩn thu được ở trên được cấy vào môi trường này, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, 100 vòng/phút trong 24 giờ, trong khi bình được bít kín bằng nút silicon. Chất lỏng nuôi cấy thu được được lọc trong điều kiện áp suất giảm sử dụng thiết bị lọc màng PTFE ưa nước (H050A047A, cỡ lỗ: 0,5 µm; đường kính: 47 mm; do ADVANTEC sản xuất) đặt trong thiết bị giữ bộ lọc để lọc trong điều kiện áp suất giảm (KGS-47; do ADVANTEC sản xuất), nhờ đó tách tế bào vi khuẩn từ dịch nổi bề mặt nuôi cấy.

Thiết bị lọc màng mà tế bào vi khuẩn được gắn vào đó được ngâm ngay trong 1,6

mL metanol (loại LC/MS) đã được làm lạnh xuống nhiệt độ -20°C và được khuấy, và màng được để yên ở nhiệt độ -20°C trong 1 giờ. Sau đó, 1,6 mL cloroform (loại HPLC) đã được làm lạnh xuống nhiệt độ -20°C và 0,64 mL nước tinh khiết đã được làm lạnh xuống nhiệt độ 4°C được bổ sung vào đó, sau đó là trộn-lắc xoáy trong 30 giây. Tiếp theo, dịch nổi bề mặt được thu gom bằng cách phân tách bằng ly tâm ở nhiệt độ 4°C , nhờ đó thu được chất chiết metanol của tế bào vi khuẩn. Chất chiết thu được được phân tích bằng LC-MS/MS và sự phân bố khối lượng phân tử của axetyl-CoA trong tế bào vi khuẩn được xác định. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3. Sự phân bố khối lượng phân tử của axetyl-CoA được tính toán bằng cách xác định tỷ lệ của các đỉnh của phép đo phổ khối ở khối lượng phân tử bằng 808, 809, và 810 là M+0, M+1, và M+2, một cách tương ứng.

Từ dịch nổi bề mặt nuôi cấy thu được ở trên, rượu và axeton được thu hồi một cách riêng rẽ với nồng độ cao bằng cách chưng cất, và được sử dụng làm nguyên liệu thô để xác định sự phân bố khối lượng phân tử. Sự phân bố khối lượng phân tử của rượu isopropylic và etanol trong dịch nổi bề mặt nuôi cấy được phân tích bằng GC-MS. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4 và 5. Sự phân bố khối lượng phân tử của rượu isopropylic (IPA) (Bảng 4) được tính toán bằng cách xác định tỷ lệ của các đỉnh của phép đo phổ khối ở khối lượng phân tử bằng 117, 118, và 119 là M+0, M+1, và M+2, một cách tương ứng. Sự phân bố khối lượng phân tử của etanol (EtOH) (Bảng 5) được tính toán bằng cách xác định tỷ lệ của các đỉnh của phép đo phổ khối ở khối lượng phân tử bằng 103, 104, và 105 là M+0, M+1, và M+2, một cách tương ứng.

Bảng 3

Tên mẫu	M+0	M+1	M+2
MT-1	0,80	0,14	0,06
MT-2	0,76	0,18	0,06
Đối chứng	0,81	0,13	0,06

Bảng 4

Tên mẫu	M+0	M+1	M+2
MT-1	$0,87 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,00$
MT-2	$0,84 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,00$
IPA có sẵn trên thị trường	$0,87 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,00$

Bảng 5

Tên mẫu	M+0	M+1	M+2
MT-1	$0,87 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,00$
MT-2	$0,85 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,00$
EtOH có sẵn trên thị	$0,88 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$

trường			
--------	--	--	--

Như được thể hiện trong Bảng 3, biến thể MT-1 và biến thể MT-2 có tỷ lệ cao của axetyl-CoA mà ^{13}C không được kết hợp vào đó (M+0) và tỷ lệ cao của axetyl-CoA mà một nguyên tử ^{13}C được kết hợp vào đó (M+1), so với chủng đối chứng. Cụ thể, tỷ lệ của M+1 là cao trong biến thể MT-2. Từ kết quả này, đã phát hiện thấy rằng cacbon có nguồn gốc từ cacbonat đã được gắn nhãn ^{13}C được kết hợp vào axetyl-CoA trong biến thể MT-1 và biến thể MT-2, và hiệu quả này là đặc biệt rõ rệt đối với biến thể MT-2.

Hơn nữa, biến thể MT-2 có tỷ lệ thấp của rượu isopropyllic hoặc ethanol mà ^{13}C không được kết hợp vào đó (M+0) và tỷ lệ cao của rượu isopropyllic hoặc ethanol mà một nguyên tử ^{13}C được kết hợp vào đó (M+1), so với rượu isopropyllic hoặc ethanol có sẵn trên thị trường (Bảng 4 và Bảng 5). Từ kết quả này, đã phát hiện thấy rằng cacbon có nguồn gốc từ cacbonat đã được gắn nhãn ^{13}C cũng được kết hợp vào rượu isopropyllic hoặc ethanol trong biến thể MT-2.

Ví dụ 16

Xác định hoạt tính sản xuất glyoxylat sử dụng malat làm cơ chất

Các biến thể biểu hiện mtk và mcl đã được mô tả ở trên được nuôi cấy trong 2 mL môi trường LB chứa 25 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol và 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilin. Dung dịch enzym thô được chiết theo phương pháp sau. Tức là, tế bào vi khuẩn trong pha sinh trưởng hàm số mũ được thu gom bằng cách ly tâm, và được rửa bằng đệm MOPS-K 200 mM (pH 7,7) và sau đó được hòa tan trong đệm MOPS-K, sau đó là khuấy âm. Dịch nổi bề mặt thu được bởi sự phân tách bằng ly tâm (12.000 vòng/phút trong 2 phút) được sử dụng làm dung dịch enzym thô.

Nồng độ protein trong dung dịch enzym thô được xác định dựa trên đường cong hiệu chuẩn được tạo ra với các giá trị OD ở 595 nm được xác định bằng thiết bị đọc đĩa UV (Molecular Devices, SpectraMax 190) sử dụng dung dịch enzym thô và nồng độ đã biết của BSA để tạo ra đường cong hiệu chuẩn, mỗi trong số này đã được cho phản ứng với chất phản ứng Quick Start Bradford Dye Reagent (do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất) và được hiện màu.

Hoạt tính enzym trong dung dịch được xác định theo quy trình sau. Cụ thể, đệm MOPS-K (pH 7,7), phenylhydrazin 3,5 mM, MgCl_2 10 mM, ATP 3 mM, CoA 0,3 mM, và 10% theo khối lượng dung dịch enzym thô được trộn trong vi lỗ và hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Để làm giá trị nền, sự thay đổi của giá trị OD ở 324 nm theo

thời gian được xác định sử dụng thiết bị đọc đĩa UV. Dung dịch natri (S)-L-malat (pH 7,5) được bổ sung vào hỗn hợp này để có nồng độ cuối cùng bằng 5 mM, và sự thay đổi của giá trị OD ở 324 nm theo thời gian được xác định. Để tạo ra đường cong hiệu chuẩn đối với glyoxylat, glyoxylat được bổ sung vào đệm nêu trên và hỗn hợp được để yên trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó các giá trị OD ở 324 nm được xác định. Đối với giá trị của hoạt tính enzym, độ dốc giá trị nền được trừ khỏi độ dốc của giá trị OD ở 324 nm sau khi bổ sung natri (S)-L-malat, và giá trị thu được được chuyển hóa thành tốc độ tiêu thụ glyoxylat dựa trên đường cong hiệu chuẩn đối với glyoxylat. Hoạt tính enzym cho mỗi protein được xác định bằng cách chia tốc độ tiêu thụ glyoxylat cho nồng độ protein (Bảng 6).

Như được thể hiện trong Bảng 6, xác nhận được rằng tất cả các biến thể MT-1, MT-2, và MT-3 đều có hoạt tính enzym. Đã phát hiện thấy rằng biến thể MT-2 và biến thể MT-3 có hoạt tính enzym cao hơn so với biến thể MT-1. Trái lại, không có hoạt tính enzym được thể hiện trong mẫu đối chứng.

Bảng 6

Tên mẫu	Hoạt tính (nmol/phút/mg protein)
MT-1	2 ± 0
MT-2	29 ± 0
MT-3	23 ± 0
Đối chứng	0 ± 0

Ví dụ 17

Số lượng tế bào sống sót và tỷ lệ giữ được plasmit ở biến thể được đưa vào Malat Thiokinaza và Malyl-CoA lyaza

Trong bình Erlenmeyer dung tích 100mL, 30 mL môi trường tối thiểu M9 hoặc môi trường LB mỗi môi trường chứa 50 g/L glucoza, 30 µg/ml cloramphenicol, và 100 µg/ml ampicilin được điều chế. Mỗi trong số các biến thể nêu trên biểu hiện mtk và mcl được cấy vào môi trường tối thiểu M9 hoặc môi trường LB và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, 100 vòng/phút trong 24 giờ, trong khi bình được bít kín bằng nút silicon. Chất lỏng nuôi cấy được pha loãng bằng nước, và 100 µL chất lỏng nuôi cấy đã được pha loãng được cấy vào đĩa LB không có chất kháng sinh. Tổng số lượng tế bào sống sót được đếm. Ngoài ra, chất lỏng nuôi cấy đã được pha loãng được cấy vào đĩa LB chứa 30 µg/ml cloramphenicol, và đếm số lượng tế bào vi khuẩn giữ lại plasmit chứa mtk (smt) và mcl.

Như được thể hiện trong Bảng 7, đã phát hiện thấy rằng mỗi trong số biến thể MT-

2 và biến thể MT-3 có số lượng tế bào sống sót cao hơn trong chất lỏng nuôi cấy và sinh trưởng tốt hơn, so với biến thể MT-1. Các plasmit chứa mtk và mcl được duy trì ổn định trong tất cả các biến thể MT-1, MT-2, và MT-3.

Bảng 7

Tên mẫu	Môi trường	Tổng số lượng tế bào sống sót	Số lượng các tế bào có plasmit mtk-mcl
MT-1	M9	$1,3 \times 10^6$ /mL	$0,8 \times 10^6$ /mL
MT-2	M9	$6,8 \times 10^8$ /mL	$9,1 \times 10^8$ /mL
MT-3	LB	$2,6 \times 10^9$ /mL	$9,2 \times 10^9$ /mL

Ví dụ 18

Tạo cấu trúc plasmit biểu hiện cho malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Granulibacter bethesdensis* BAA-1260

ADN hệ gen của *Granulibacter bethesdensis* BAA-1260D-5 được mua từ ATCC.

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen của *Granulibacter bethesdensis* làm khuôn và sử dụng CCCTGAGGAGGGTCCAAGAGATGGACGTCCATGAGTACCA (SEQ ID NO: 77) và GCTCTAGATCAGGCTGCCTGACGCCCA (SEQ ID NO: 78) làm các đoạn mồi, kết quả là, thu được mảnh mtk của *Granulibacter*. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl chuẩn bị được trong Ví dụ 12 làm khuôn và sử dụng GGAATTCACAAAAAGGATAAAA (SEQ ID NO: 79) và TGGTACTCATGGACGTCCATCTCTTGGACCCTCCTCAGGG (SEQ ID NO: 80) làm các đoạn mồi, kết quả là, thu được mảnh mcl của *Hyphomicrobium*. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng mảnh mtk của *Granulibacter* thu được và mảnh mcl của *Hyphomicrobium* làm khuôn và các đoạn mồi của SEQ ID NO: 79 và SEQ ID NO: 78, nhờ đó thu được mảnh ADN chứa mcl từ *Hyphomicrobium* và gen mảnh mtk từ *Granulibacter*. Mảnh ADN thu được được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *EcoRI* và *XbaI*, và được nối với plasmit pMWGKC được điều chế trong Ví dụ 10. Plasmit thu được được đặt tên là pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Gb).

pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Gb) chứa gen mtkA (SEQ ID NO: 81) và gen mtkB (SEQ ID NO: 82) có nguồn gốc từ *Granulibacter bethesdensis*. Trình tự axit amin của mtkA và mtkB có nguồn gốc từ *Granulibacter bethesdensis* được thể hiện trong SEQ ID NO: 107 và SEQ ID NO: 108, một cách tương ứng.

Ví dụ 19

Tạo cấu trúc plasmit biểu hiện cho malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium denitrificans* DSM 1869

Hyphomicrobium denitrificans DSM 1869 được mua từ DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany). DSM1869 được nuôi cấy trong môi trường (môi trường số: 803, DSMZ), và ADN nhiễm sắc thể thu được từ đó bằng cách sử dụng bộ kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN).

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Hyphomicrobium denitrificans* làm khuôn và sử dụng
ACCAGGGAATTCACAAAAAGGATAAAACAATGAGCTATACCTCTACCCAACC
GTAAGC (SEQ ID NO: 83) và
GCCCACTCTAGATCAGGCAACTTTTTCTGCTTGCCGAGAACC (SEQ ID NO: 84)
làm các đoạn mồi, kết quả là, thu được mảnh mcl-mtk của *Hyphomicrobium*. Mảnh thu được được nối với plasmit pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl được điều chế trong Ví dụ 12. Plasmit thu được được đặt tên là pMWGKC_mcl(Hde)_mtk(Hde)_mcl.

pMWGKC_mcl(Hde)_mtk(Hde)_mcl chứa trình tự bazơ của gen mcl (SEQ ID NO: 85), trình tự bazơ của gen mtkA (SEQ ID NO: 86), và trình tự bazơ của gen mtkB (SEQ ID NO: 87) có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium denitrificans*. Trình tự axit amin của mcl, mtkA, và mtkB có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium denitrificans* được thể hiện trong SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, và SEQ ID NO: 111, một cách tương ứng.

Ví dụ 20

Tạo cấu trúc plasmit biểu hiện cho malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Nitrosomonas europaea* NBRC 14298

Nitrosomonas europaea NBRC 14298 được mua từ NBRC (Biological Resource Center, NITE). NBRC 14298 được nuôi cấy trong môi trường (môi trường số: 829, NBRC), và ADN nhiễm sắc thể thu được từ đó bằng cách sử dụng bộ kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN).

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Nitrosomonas europaea* làm khuôn và sử dụng
GCGGGGAATTCACAAAAAGGATAAAACAATGAGTCATACCTGTATGAACCA
AAACACC (SEQ ID NO: 88) và
CAGGCGTCTAGATTAGAGTCCGGCCAGAACTTTTGCACG (SEQ ID NO: 89) làm
các đoạn mồi, kết quả là, thu được mảnh mtk của *Nitrosomonas europaea*. Mảnh thu được

được nối với plasmit pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl chuẩn bị được trong Ví dụ 12. Plasmit thu được được đặt tên là pMWGKC_mcl(Ne)_mtk(Ne)_mcl.

pMWGKC_mcl(Ne)_mtk(Ne)_mcl chứa trình tự bazơ của gen mcl (SEQ ID NO: 90), trình tự bazơ của gen mtkA (SEQ ID NO: 91), và trình tự bazơ của gen mtkB (SEQ ID NO: 92) có nguồn gốc từ *Nitrosomonas europaea*. Trình tự axit amin của mcl, mtkA, và mtkB có nguồn gốc từ *Nitrosomonas europaea* được thể hiện trong SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, và SEQ ID NO: 114, một cách tương ứng.

Ví dụ 21

Tạo cấu trúc plasmit biểu hiện cho malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylococcus capsulatus* ATCC 33009

ADN hệ gen của *Methylococcus capsulatus* ATCC 33009D-5 được mua từ ATCC.

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Methylococcus capsulatus* làm khuôn và sử dụng GGAATTCCATATGGCTGTAAAAATCGTCTAC (SEQ ID NO: 93) và GCTCTAGATCAGAATCTGATTCCGTGTTC (SEQ ID NO: 94) làm các đoạn mồi, kết quả là, thu được mảnh mcl-mtk của *Methylococcus*. Mảnh thu được được nối với plasmit pMWGKC chuẩn bị được trong Ví dụ 10, hoặc được nối với plasmit pMWGC chuẩn bị được trong Ví dụ 10. Plasmit thu được được đặt tên là pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) or pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc).

Mỗi trong số pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) và pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) chứa trình tự bazơ của gen mcl (SEQ ID NO: 95), trình tự bazơ của gen mtkA (SEQ ID NO: 96), và trình tự bazơ của gen mtkB (SEQ ID NO: 97) có nguồn gốc từ *Methylococcus capsulatus*. Trình tự axit amin của mcl, mtkA, và mtkB có nguồn gốc từ *Methylococcus capsulatus* được thể hiện trong SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, và SEQ ID NO: 117, một cách tương ứng.

Ví dụ 22

Tạo cấu trúc plasmit biểu hiện cho malat thiokinaza có nguồn gốc từ Gamma pProteobacterium chưa được nuôi cấy (GenBank: AP011641.1)

Để thu được mtk có nguồn gốc từ gamma proteobacterium chưa được nuôi cấy, mtk có nguồn gốc từ gamma proteobacterium được thiết kế dựa trên trình tự axit amin của GenBank: AP011641,1, và mảnh ADN (SEQ ID NO: 98) sau được điều chế bởi quy trình tổng hợp ADN.

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng mảnh ADN đã được điều chế làm khuôn và sử dụng GTTGAACGAGGAGATCGTCCATGAACATTCACGAATATCA (SEQ ID NO: 99) và GCTCTAGATTAGCCAGAACTGCAGATCC (SEQ ID NO: 100) làm các đoạn mồi, kết quả là, thu được mảnh mtk của gamma proteobacterium. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) hoặc pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) được điều chế trong Ví dụ 21 làm khuôn và sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 93 và TGATATTCGTGAATGTTTCATGGACGATCTCCTCGTTCAAC (SEQ ID NO: 101), nhờ đó thu được mảnh mcl của *Methylococcus*. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng mảnh mtk gamma proteobacterium thu được và mảnh mcl *Methylococcus* thu được làm khuôn và sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 93 và SEQ ID NO: 100, nhờ đó thu được mảnh ADN chứa gen mcl của *Methylococcus* và gen mảnh mtk của gamma proteobacterium. Mảnh ADN thu được được nối với plasmit pMWGKC được điều chế trong Ví dụ 10. Plasmit thu được được đặt tên là pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(gamma).

pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(gamma) chứa gen mtkA (SEQ ID NO: 102) và gen mtkB (SEQ ID NO: 103) có nguồn gốc từ gamma proteobacterium chưa được nuôi cấy. Trình tự axit amin của mtkA và mtkB có nguồn gốc từ gamma proteobacterium chưa được nuôi cấy được thể hiện trong SEQ ID NO: 118 và SEQ ID NO: 119, một cách tương ứng.

Ví dụ 23

Chuẩn bị biến thể được đưa vào malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza, sản xuất rượu isopropyllic, được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen pgi, được làm khuyết gen gntR, được làm khuyết gen gnd, được làm khuyết gen ldhA, được làm khuyết gen fumAC, được làm khuyết gen aceBA, được làm khuyết gen glcB

Các tế bào khả biến của biến thể *Escherichia coli* B (atoDAB, Δpgi_gntR_gnd_ldhA_aceBA_glcB_fumAC) chuẩn bị được trong Ví dụ 8 được biến nạp với plasmit plaz và mỗi trong số các plasmit biểu hiện mtk và mcl được điều chế trong Ví dụ 18 đến 22. Các thể biến nạp sinh trưởng trên môi trường thạch LB chứa 25 mg/L cloramphenicol và 100 mg/L ampixilin được đặt tên như sau (xem Bảng 8).

Số biến thể được mô tả trong Bảng 8 biểu thị biến thể được chuẩn bị bằng cách đưa plaz và mỗi trong số các plasmit được mô tả trong Bảng 8 vào biến thể *Escherichia coli* B (atoDAB, Δpgi_gntR_gnd_ldhA_aceBA_glcB_fumAC).

Bảng 8

Số biến thể	Plasmid	Nguồn gốc mtk	Nguồn gốc mcl
MT-4	pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Gb)	Granulibacter bethesdensis	Hyphomicrobium methylovorum
MT-5	pMWGKC_mcl(Hde)_mtk(Hde)_mcl	Hyphomicrobium denitrificans	Hyphomicrobium denitrificans, Methylobacterium extorquens
MT-6	pMWGKC_mcl(Ne)_mtk(Ne)_mcl	Nitrosomonas europaea	Nitrosomonas europaea, Methylobacterium extorquens
MT-7	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc)	Methylococcus capsulatus	Methylococcus capsulatus
MT-8	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(gamma)	ADN Gamma proteobacterium chưa được nuôi cấy	Methylococcus capsulatus

Ví dụ 24

Xác định hoạt tính sản xuất glyoxylat sử dụng malat làm cơ chất

Theo cách giống như trong Ví dụ 16, hoạt tính enzym cho mỗi protein được xác định (Bảng 9).

Như được thể hiện trong Bảng 9, xác nhận được rằng mỗi trong số các biến thể MT-4 đến MT-8 có hoạt tính enzym, và hoạt tính enzym là cao hơn so với biến thể MT-1. Cụ thể, đã phát hiện thấy rằng biến thể MT-5, biến thể MT-6, biến thể MT-7, và biến thể MT-8 có hoạt tính tương đương hoặc cao hơn so với biến thể MT-2 và biến thể MT-3 được thể hiện trong Ví dụ 16. Trái lại, không phát hiện thấy hoạt tính enzym trong mẫu đối chứng.

Bảng 9

Tên mẫu	Hoạt tính (nmol/phút/mg protein)
MT-4	7,5 ± 0
MT-5	34,0 ± 0
MT-6	54,0 ± 0
MT-7	68,3 ± 0
MT-8	43,4 ± 0
MT-1	2 ± 0
MT-2	29 ± 0
MT-3	23 ± 0
Đối chứng	0 ± 0

Ví dụ 25

Chuẩn bị biến thể được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen aceB

Để tách dòng vùng kẹp bên trình tự bazơ của gen mã hóa malat synthaza (sau đây

trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "aceB") (1602 bp), bốn loại đoạn môi oligonucleotit được biểu thị bởi GGAATTCATTCAGCTGTTGCGCATCGATTC (SEQ ID NO: 24), GTTATGTGGTGGTCGTGCAGCTCCTCGTCATGG (SEQ ID NO: 104), GAGCTGCACGACCACCACATAACTATGGAG (SEQ ID NO: 105), và GGAATTCCAGTTGAACGACGGCGAGCAG (SEQ ID NO: 106) được tổng hợp. Mỗi trong số các đoạn môi này có vị trí nhận biết *EcoRI* ở phía đầu 5' của nó.

ADN hệ gen của *Escherichia coli* B (accession No. CP000819) được chuẩn bị, và PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen thu được làm khuôn và sử dụng cặp đoạn môi của SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 106, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh aceB-L ") được khuếch đại. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cặp đoạn môi của SEQ ID NO: 105 và SEQ ID NO: 106, kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh aceB-R ") được khuếch đại. Các mảnh ADN này được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, và được thu hồi. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các mảnh aceB-L và aceB-R làm khuôn và sử dụng cặp đoạn môi của SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 108, kết quả là, mảnh ADN khoảng 2,0 kbp (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh aceB-LR ") được khuếch đại. Mảnh aceB-LR được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, và được thu hồi, được tiêu hóa bằng *EcoRI*, và được trộn với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmid nhạy với nhiệt độ pTH18cs1 (Số nộp lưu ngân hàng gen AB019610) bằng *EcoRI* và khử phosphoryl hóa mảnh này. Các mảnh đã trộn được để cho phản ứng bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol ở nhiệt độ 30°C. Plasmid được thu hồi từ các thể biến nạp thu được, và xác nhận được rằng mảnh aceB-LR được cài xen một cách thích hợp trong pTH18cs1. Plasmid thu được được đặt tên là pTH18cs1-aceB.

Biến thể *Escherichia coli* B::atoDAB chuẩn bị được trong Ví dụ 1 được biến nạp với plasmid pTH18cs1-aceB thu được theo cách như vậy, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các thể biến nạp. Các thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường lỏng LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm. Tiếp theo, một phần chất lỏng nuôi cấy được cấy vào đĩa thạch LB chứa 10 μ g/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ trong môi trường lỏng LB, và được cấy vào đĩa thạch LB, kết quả là,

thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C.

Từ các khuẩn lạc xuất hiện, 100 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên, và mỗi khuẩn lạc được sinh trưởng riêng rẽ trên đĩa thạch LB và đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và các dòng vô tính nhạy với cloramphenicol được chọn. Ngoài ra, ADN nhiễm sắc thể của các dòng vô tính đích này được khuếch đại bằng PCR, và chọn biến thể từ đó mảnh khoảng 2,0 kbp, mà biểu thị sự làm khuyết gen *aceB*, có thể được khuếch đại. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể được tăng cường hệ gen *atoD*, được làm khuyết gen *aceB* (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "biến thể B::atoDABΔ*aceB*").

Ví dụ 26

Chuẩn bị biến thể được tăng cường hệ gen *atoD*, được làm khuyết gen *aceB*, được làm khuyết gen *glcB*

Biến thể *Escherichia coli* B::atoDABΔ*aceB* chuẩn bị được trong Ví dụ 25 được biến nạp với plasmit pTH18cs1-*glcB* chuẩn bị được trong Ví dụ 7, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các thể biến nạp. Các thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường lỏng LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm. Tiếp theo, một phần chất lỏng nuôi cấy được cấy vào đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ trong môi trường lỏng LB, và được cấy vào đĩa thạch LB, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C.

Từ các khuẩn lạc xuất hiện, 100 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên, và mỗi khuẩn lạc được sinh trưởng riêng rẽ trên đĩa thạch LB và đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và các dòng vô tính nhạy với cloramphenicol được chọn. Ngoài ra, ADN nhiễm sắc thể của các dòng vô tính đích này được khuếch đại bằng PCR, và chọn biến thể từ đó mảnh khoảng 2,0 kbp, mà biểu thị sự làm khuyết gen *glcB*, có thể được khuếch đại. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể được tăng cường hệ gen *atoD*, được làm khuyết gen *aceB*, được làm khuyết gen *glcB* (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "biến thể B::atoDABΔ*aceB*Δ*glcB*").

Ví dụ 27

Chuẩn bị biến thể được tăng cường hệ gen *atoD*, được làm khuyết gen *ldhA*

Biến thể *Escherichia coli* B::atoDAB chuẩn bị được trong Ví dụ 1 được biến nạp

với plasmid pTH18cs1-ldhA chuẩn bị được trong Ví dụ 5, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các thể biến nạp. Các thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường lỏng LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm. Tiếp theo, một phần chất lỏng nuôi cấy được cấy vào đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ trong môi trường lỏng LB, và được cấy vào đĩa thạch LB, kết quả là, thu được các khuẩn lạc sinh trưởng ở nhiệt độ 42°C.

Từ các khuẩn lạc xuất hiện, 100 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên, và mỗi khuẩn lạc được sinh trưởng riêng rẽ trên đĩa thạch LB và đĩa thạch LB chứa 10 µg/ml cloramphenicol, và các dòng vô tính nhạy với cloramphenicol được chọn. Ngoài ra, ADN nhiễm sắc thể của các dòng vô tính đích này được khuếch đại bằng PCR, và chọn biến thể từ đó mảnh khoảng 2,0 kbp, mà biểu thị sự làm khuyết gen ldhA, có thể được khuếch đại. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể được tăng cường hệ gen atoD, được làm khuyết gen ldhA (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "biến thể B::atoDABΔldhA").

Ví dụ 28

Chuẩn bị biến thể pBRgapP, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B và biến thể pBRgapP, pMWGC/B

Các tế bào khả biến của *Escherichia coli* B được biến nạp với plasmid pBRgapP chuẩn bị được trong Ví dụ 2, và plasmid pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) chuẩn bị được trong Ví dụ 21 hoặc plasmid pMWGC chuẩn bị được trong Ví dụ 21, và được cấy vào đĩa thạch LB chứa 25 mg/L cloramphenicol và 100 mg/L ampicillin. Kết quả là, thu được các thể biến nạp sinh trưởng trên môi trường này.

Ví dụ 29

Chuẩn bị biến thể pIa, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/ B::atoDAB, và biến thể pIa, pMWGC/B::atoDAB

Các tế bào khả biến của biến thể *Escherichia coli* B (B::atoDAB) chuẩn bị được trong Ví dụ 1 được biến nạp với plasmid pIa chuẩn bị được trong Ví dụ 9, và plasmid pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) chuẩn bị được trong Ví dụ 21 hoặc plasmid pMWGC chuẩn bị được trong Ví dụ 21, và được cấy vào đĩa thạch LB chứa 25 mg/L cloramphenicol và 100 mg/L ampicillin. Kết quả là, thu được các thể biến nạp sinh trưởng trên môi trường này.

Ví dụ 30

Chuẩn bị biến thể pIa, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDABΔaceB, và biến thể pIa, pMWGC/B::atoDABΔaceB

Các tế bào khả biến của biến thể *Escherichia coli* B (B::atoDABΔaceB) chuẩn bị được trong Ví dụ 25 được biến nạp với plasmit pIa chuẩn bị được trong Ví dụ 9, và plasmit pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) chuẩn bị được trong Ví dụ 21 hoặc plasmit pMWGC chuẩn bị được trong Ví dụ 21, và được cấy vào môi trường thạch LB chứa 25 mg/L cloramphenicol và 100 mg/L ampicilin, và thu được các thể biến nạp sinh trưởng trên môi trường này.

Ví dụ 31

Chuẩn bị biến thể pIa, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDABΔaceBΔglcB, và biến thể pIa, pMWGC/B::atoDABΔaceBΔglcB

Các tế bào khả biến của biến thể *Escherichia coli* B (B::atoDABΔaceBΔglcB) được điều chế trong Ví dụ 26 được biến nạp với plasmit pIa chuẩn bị được trong Ví dụ 9, và plasmit pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) chuẩn bị được trong Ví dụ 21 hoặc plasmit pMWGC chuẩn bị được trong Ví dụ 21, và được cấy vào môi trường thạch LB chứa 25 mg/L cloramphenicol và 100 mg/L ampicilin. Kết quả là, thu được các thể biến nạp sinh trưởng trên môi trường này.

Ví dụ 32

Chuẩn bị biến thể pIa, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDABΔldhA, và biến thể pIa, pMWGC/B::atoDABΔldhA

Các tế bào khả biến của biến thể *Escherichia coli* B (B::atoDABΔldhA) chuẩn bị được trong Ví dụ 27 được biến nạp với plasmit pIa chuẩn bị được trong Ví dụ 9, và plasmit pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc) chuẩn bị được trong Ví dụ 21 hoặc plasmit pMWGC chuẩn bị được trong Ví dụ 21, và được cấy vào môi trường thạch LB chứa 25 mg/L cloramphenicol và 100 mg/L ampicilin. Kết quả là, thu được các thể biến nạp sinh trưởng trên môi trường này.

Ví dụ 33

Sản xuất rượu isopropyllic

Trong ví dụ này, rượu isopropyllic được sản xuất bằng cách sử dụng thiết bị sản xuất được thể hiện trên Fig. 1 của WO 2009/008377. Thùng nuôi cấy được sử dụng là thùng có dung tích 3 L và được làm từ thủy tinh. Nước là dung dịch thu hồi (nước thu hồi) với lượng

bằng 9 L cho mỗi thùng được bơm vào thùng thu hồi, và hai thùng thu hồi được nối với nhau để sử dụng.

Danh sách các biến thể được sử dụng để đánh giá khả năng sản xuất rượu isopropyllic được thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 10

Tên biến thể	Plasmid/ Biến thể	Đặc điểm	Phần mô tả được viện dẫn
vec/B	pBRgapP, pMWGC/B	Không có hệ sản xuất IPA, không có sự biểu hiện của mtk và mcl	Ví dụ 28
mtk_mcl/B	pBRgapP, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B	Không có hệ sản xuất IPA, có sự biểu hiện của mtk và mcl	Ví dụ 28
vec/atoDAB	pIa, pMWGC/B::atoDAB	Chứa hệ sản xuất IPA, không có sự biểu hiện của mtk và mcl	Ví dụ 29
mtk_mcl/atoDAB	pIa, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDAB	Chứa hệ sản xuất IPA, có sự biểu hiện của mtk và mcl	Ví dụ 29
vec/atoDAB ΔaceB	pIa, pMWGC/B::atoDABΔaceB	Chứa hệ sản xuất IPA, không có sự biểu hiện của mtk và mcl, có sự phá vỡ của gen aceB	Ví dụ 30
mtk_mcl/atoDAB ΔaceB	pIa, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDAB ΔaceB	Chứa hệ sản xuất IPA, có sự biểu hiện của mtk và mcl, có sự phá vỡ của gen aceB	Ví dụ 30
vec/atoDAB ΔaceBΔglcB	pIa, pMWGC/B::atoDABΔaceBΔglcB	Chứa hệ sản xuất IPA, không có sự biểu hiện của mtk và mcl, có sự phá vỡ của gen aceB và glcB	Ví dụ 31
mtk_mcl/atoDAB ΔaceBΔglcB	pIa, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDABΔaceBΔglcB	Chứa hệ sản xuất IPA, có sự biểu hiện của mtk và mcl, có sự phá vỡ của gen aceB và glcB	Ví dụ 31
vec/atoDABΔldhA	pIa, pMWGC/B::atoDABΔldhA	Chứa hệ sản xuất IPA, không có sự biểu hiện của mtk và mcl, có sự phá vỡ của gen ldhA	Ví dụ 32
mtk_mcl/atoDAB ΔldhA	pIa, pMWGC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/B::atoDABΔldhA	Chứa hệ sản xuất IPA, có sự biểu hiện của mtk và mcl, có sự phá vỡ của gen ldhA	Ví dụ 32

Để làm giống cấy sơ bộ, mỗi trong số các biến thể cần được đánh giá được cấy riêng rẽ vào bình Erlenmeyer có dung tích 500 mL và chứa 50 mL canh LB Miller (Difco 244620) chứa 25 mg/L cloramphenicol và 100 mg/L ampicilin, và được nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ nuôi cấy bằng 30°C trong khi khuấy ở tốc độ 120 vòng/phút. Sau đó, 45 mL giống cấy sơ bộ được chuyển vào thùng nuôi cấy (thiết bị nuôi cấy BMS-PI do ABLE corporation sản xuất) có dung tích 3L và chứa 900 g môi trường có thành phần sau, và được nuôi cấy. Việc nuôi cấy được tiến hành ở thể tích thông khí bằng 0,45 L/phút, tốc độ khuấy bằng 490 vòng/phút, nhiệt độ nuôi cấy bằng 30°C, và độ pH bằng 7,0 (được điều chỉnh bằng dung dịch nước NH₃) dưới áp suất khí quyển. 50 % khối lượng dung dịch nước glucoza được bổ sung vào môi trường nuôi cấy này ở tốc độ dòng bằng 20 g/L/giờ trong khoảng thời gian từ thời điểm bắt đầu nuôi cấy đến 8 giờ sau thời điểm bắt đầu nuôi cấy. Sau đó, 50 % khối lượng dung dịch nước glucoza được bổ sung ở tốc độ dòng bằng 20 g/L/giờ, khi thích hợp, sao cho lượng glucoza còn trong thùng nuôi cấy được giảm đến mức tối thiểu. Chất lỏng nuôi cấy vi khuẩn được lấy mẫu một vài lần trong khoảng thời gian từ thời điểm bắt đầu nuôi cấy đến 30 giờ sau thời điểm bắt đầu nuôi cấy, và, sau khi tế bào vi khuẩn được loại bỏ bằng cách tiến hành ly tâm, xác định lượng rượu isopropyllic, axeton, và sản phẩm phụ chính tích lũy trong dịch nổi bề mặt nuôi cấy và nước thu hồi thu được bằng HPLC theo phương pháp thông thường. Mỗi trong số các giá trị xác định là tổng của các lượng trong chất lỏng nuôi cấy và hai thùng thu hồi sau khi nuôi cấy. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 11, và sản phẩm phụ được thể hiện trong Bảng 12.

<Thành phần của môi trường nuôi cấy>

Dịch ngâm ngô (do Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd. sản xuất), 50 g/L

Fe₂SO₄·7H₂O: 0,1 g/L

K₂HPO₄: 2 g/L

KH₂PO₄: 2 g/L

MgSO₄·7H₂O: 2 g/L

(NH₄)₂SO₄: 2 g/L

ADEKANOL LG126 (ADEKA Corporation): 0,1 g/L

(Còn lại: nước)

Bảng 11

Tên biến thể	Lượng sản xuất (g/30 giờ)		Sự sử dụng glucoza (g/30 giờ)	Hiệu suất so với sự tiêu thụ đường (30 giờ)	
	IPA	Axeton		IPA	IPA + Axeton
vec/B	—	—	212,7	—	—
mtk_mcl/B	—	—	257,9	—	—
vec/atoDAB	33,2	6,0	210,0	15,8	18,6
mtk_mcl/atoDAB	34,6	8,8	209,5	16,5	20,7
vec/atoDAB Δ aceB	30,8	6,1	205,3	15,0	18,0
mtk_mcl/atoDAB Δ aceB	32,8	6,6	202,6	16,2	19,5
vec/atoDAB Δ aceB Δ glcB	31,9	5,5	204,1	15,6	18,4
mtk_mcl/atoDAB Δ aceB Δ glcB	31,9	5,6	195,3	16,3	19,1
vec/atoDAB Δ ldhA	32,0	5,3	197,2	16,2	18,9
mtk_mcl/atoDAB Δ ldhA	38,6	6,8	197,9	17,4	21,3

Bảng 12

Tên biến thể	Sản phẩm phụ (g/L/30 giờ)							
	Etanol	Pyruvat	Succinat	Lactat	Format	Axetat	Fumarat	Tổng lượng sản phẩm phụ
vec/B	0,3	0,5	1,8	0,3	0,6	28,1	0,0	31,6
mtk_mcl/B	0,4	0,1	0,5	0,4	0,3	28,2	0,0	29,8
vec/atoDAB	2,5	1,3	5,8	9,2	2,6	4,6	0,2	26,1
mtk_mcl/atoDAB	2,0	0,0	5,0	6,3	5,6	4,5	0,2	23,4
vec/atoDABΔaceB	2,8	0,1	2,4	1,1	4,0	3,8	0,0	14,3
mtk_mcl/atoDABΔaceB	1,7	0,1	1,9	1,3	3,3	3,5	0,1	11,8
vec/atoDABΔaceBΔglcB	2,6	0,1	1,7	0,7	4,0	3,7	0,1	12,8
mtk_mcl/atoDABΔaceBΔglcB	1,3	0,1	2,2	0,9	3,0	3,3	0,1	10,8
vec/atoDABΔldhA	3,3	4,5	4,0	0,0	3,9	3,8	0,3	19,6
mtk_mcl/atoDABΔldhA	1,9	0,7	2,2	0,0	5,7	4,6	0,0	15,2

Kết quả đánh giá cho thấy rằng lượng rượu isopropylic mà chủng đối chứng (vec/atoDAB) sản xuất được là 33,2 g/30 giờ, và lượng mà biến thể được đưa vào mtk (mtk_mcl/atoDAB) sản xuất được là 34,6 g/30 giờ. Lượng axeton mà chủng đối chứng (vec/atoDAB) sản xuất được là 6,0 g/30 giờ, và 8,8 g/30 giờ đối với biến thể được đưa vào mtk (mtk_mcl/atoDAB). Từ các kết quả này, đã phát hiện thấy rằng lượng sản xuất rượu isopropylic và axeton được làm tăng nhờ đưa vào mtk và mcl. Hiệu suất của rượu isopropylic so với sự tiêu thụ đường tại thời điểm 30 giờ sau thời điểm bắt đầu nuôi cấy là 15,8% trong chủng đối chứng (vec/atoDAB), và 16,5% trong biến thể được đưa vào mtk+mcl (mtk_mcl/atoDAB). Hiệu suất của rượu isopropylic và axeton so với sự tiêu thụ đường tại thời điểm 30 giờ sau thời điểm bắt đầu nuôi cấy là 18,6% trong chủng đối chứng (vec/atoDAB), và 20,7% trong biến thể được đưa vào mtk+mcl (mtk_mcl/atoDAB). Từ các kết quả này, đã cho thấy rằng hiệu quả chuyển hóa của đường thành rượu isopropylic hoặc axeton được làm tăng nhờ đưa vào tiến trình mtk+mcl.

Đối với atoDAB Δ ldhA, lượng sản xuất rượu isopropylic và axeton và hiệu suất của rượu isopropylic và axeton so với sự tiêu thụ đường được cải thiện trong biến thể được đưa vào mtk+mcl tương tự với trường hợp của atoDAB. Đối với atoDAB Δ ldhA, atoDAB Δ aceB, và atoDAB Δ aceB Δ glcB, hiệu suất so với sự tiêu thụ đường được làm tăng trong biến thể được đưa vào mtk+mcl, so với hiệu suất của chủng đối chứng (vec) của mỗi biến thể. Do đó, tin rằng sự sản xuất axetyl-CoA và các chất hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA được làm tăng một cách hiệu quả bởi mtk+mcl.

Bảng 12 thể hiện các sản phẩm phụ. So với chủng đối chứng (vec/B), đã phát hiện thấy rằng lượng etanol, pyruvat, và succinat được làm giảm trong biến thể được đưa vào mtk+mcl (mtk_mcl/B) tại thời điểm 30 giờ sau thời điểm bắt đầu nuôi cấy, và tổng lượng sản phẩm phụ cũng được làm giảm một cách bất ngờ trong biến thể được đưa vào mtk+mcl. Tương tự, đối với atoDAB, atoDAB Δ aceB, atoDAB Δ aceB Δ glcB, và atoDAB Δ ldhA, lượng etanol, pyruvat, và succinat và tổng lượng sản phẩm phụ được làm giảm trong biến thể được đưa vào mtk+mcls so với các chủng đối chứng tương ứng. Từ các kết quả này, đã phát hiện thấy rằng mtk+mcl tạo ra các hiệu quả tương tự khi có hoặc không có atoDAB.

Đối với atoDAB Δ aceB và atoDAB Δ aceB Δ glcB, hiệu suất của IPA và hiệu suất của IPA và axeton so với sự tiêu thụ đường gần như giống như trong biến thể atoDAB. Tuy nhiên, tổng lượng sản phẩm phụ được làm giảm trong cả các biến thể được đưa vào vec và biến thể được đưa vào mtk. Bất ngờ là, lượng lactat và succinat tích lũy được làm giảm một cách đáng kể trong biến thể được đưa vào mtk+mcls. Do đó, atoDAB Δ aceB và

atoDAB Δ aceB Δ glcB là được ưu tiên về mặt công nghiệp, vì lượng sản phẩm phụ ít hơn cho phép sự giảm đáng kể chi phí đối với quá trình tinh chế khi rượu isopropyllic hoặc axeton được thu gom từ chất lỏng nuôi cấy.

Đối với atoDAB Δ ldhA, đã cho thấy rằng lượng sản xuất rượu và axeton và hiệu suất của rượu và axeton so với sự tiêu thụ đường được cải thiện trong biến thể được đưa vào mtk+mcl tương tự với trường hợp của atoDAB. Đối với tất cả các biến thể nêu trên, hiệu suất so với sự tiêu thụ đường được cải thiện trong biến thể được đưa vào mtk+mcls so với chủng đối chứng (vec). Do đó, tin rằng axetyl-CoA và các chất hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA được làm tăng một cách hiệu quả.

Đối với atoDAB Δ ldhA, tổng lượng sản phẩm phụ được làm giảm, và lượng pyruvat được tích lũy được làm giảm một cách đáng kể trong biến thể được đưa vào mtk+mcl. Ngoài ra, hiệu suất của rượu isopropyllic và axeton so với sự tiêu thụ đường được làm tăng trong biến thể atoDAB Δ ldhA được đưa vào mtk+mcl, cho thấy rằng rượu isopropyllic và axeton được sản xuất một cách hiệu quả bởi cả tiến trình glucoza và tiến trình mtk+mcl. Lượng sản phẩm phụ trong atoDAB Δ ldhA được làm giảm tương tự với trường hợp của atoDAB Δ aceB và atoDAB Δ aceB Δ glcB. Ngoài ra, hiệu suất của rượu isopropyllic và axeton so với sự tiêu thụ đường được cải thiện trong atoDAB Δ ldhA khi mtk+mcl được đưa vào. Các kết quả này cho thấy rằng, trong quá trình sản xuất rượu isopropyllic và/hoặc axeton trên quy mô công nghiệp, có sự phá vỡ ldhA là được ưu tiên xét về việc làm giảm chi phí đối với quá trình tinh chế khi thu gom rượu isopropyllic và/hoặc axeton và xét về việc làm tăng hiệu suất của chúng.

Tiến trình sản xuất rượu isopropyllic và tiến trình sản xuất axeton không được đưa vào biến thể B. Vì lượng axetat được làm tăng một cách đáng kể trong biến thể B, tin rằng axetyl-CoA chủ yếu được chuyển hóa thành axetat. Ngoài ra, giả định rằng lượng tăng axetyl-CoA được chuyển hóa thành axetat và etanol trong biến thể được đưa vào mtk+mcl (mtk_mcl/B). Các kết quả này cho thấy rằng lượng axetyl-CoA được làm tăng bởi tác động của mtk+mcl ngay cả trong các biến thể B.

Ví dụ 34

Tạo cấu trúc plasmit pGAPS

Để thu được gen kháng spectinomycin, tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng plasmit pIC156 (Steinmetz et. Al., Gene, 1994, 142(1): 79-83) làm khuôn và

CCGCGGTACCGTATAATAAAGAATAATTATTAATCTGTAGACAAATTGTGAAAGG (SEQ ID NO: 120) và CTTTGTGTTTATAAGTGGGTAAACCGTGAATATCGTGTCTTTTCAC (SEQ ID NO: 121), và mảnh ADN thu được được phosphoryl hóa bằng cách sử dụng T4 Polynucleotidyl kinase (Toyobo), kết quả là, thu được mảnh ADN chứa gen kháng spectinomycin. Ngoài ra, plasmid pGAP được xử lý bằng *PvuI*, và mảnh ADN thu được được thực hiện xử lý làm cùn đầu bằng Toyobo BLUNTING HIGH, và được nối với mảnh ADN chứa gen kháng spectinomycin đã được mô tả ở trên. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 120 μ g/mL spectinomycin. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa 120 μ g/mL spectinomycin, và plasmid thu được được đặt tên là pGAPS.

Ví dụ 35

Chuẩn bị plasmid pGAPS_gcl

ADN nhiễm sắc thể thu được từ *Escherichia coli* MG1655 sử dụng bộ kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Dựa trên operon chứa glyoxylat carboligaza (gcl, NCBI-GI: 945394), hai loại đoạn môi được biểu thị bởi AAGAACTCTAGAACAAAAAGGATAAAACAATGGCAAAAATGAGAGCCGTTGACGCGGCAATG (SEQ ID NO: 122) và GACCAGCTGCAGTCAGGCCAGTTTATGGTTAGCCATTAATTCCAGC (SEQ ID NO: 123) được chuẩn bị.

Ngoài ra, hai loại đoạn môi được biểu thị bởi ACACAACTGCAGACAAAAAGGATAAAACAATGAAGATTGTCATTGCGCCAGACTCTTTTAAAGAGAGCT (SEQ ID NO: 124) và GCCCCCAAGCTTTCAGTTTTTAATTCCTGACCTATTTTAATGGCGCAGG (SEQ ID NO: 125) được chuẩn bị.

Sự khuếch đại bằng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Escherichia coli* MG1655 làm khuôn và sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 122 và 123 thu được như được mô tả ở trên, kết quả là, thu được mảnh ADN khoảng 3 kb. Ngoài ra, sự khuếch đại bằng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Escherichia coli* MG1655 làm khuôn và sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 124 và 125 thu được như được mô tả ở trên, kết quả là, thu được mảnh ADN khoảng 1,1 kb. Các ADN thu được này được tiêu hóa bằng *PstI*, và các mảnh này được nối với nhau. Sự khuếch đại

bằng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN đã nối làm khuôn và sử dụng AAGAACTCTAGAACAAAAAGGATAAAACAATGGCAAAAATGAGAGCCGTTGACGCGGCAATG (SEQ ID NO: 126) và GCCCCCAAGCTTTCAGTTTTTAATTCCCTGACCTATTTTAATGGCGCAGG (SEQ ID NO: 127) làm các đoạn mồi, kết quả là, thu được mảnh ADN. Mảnh ADN thu được được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *XbaI* và *HindIII*, và được nối với plasmid pGAPS mà đã được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *XbaI* và *HindIII*. Sau đó, *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với sản phẩm nối, và được nuôi cấy trên đĩa thạch LB chứa spectinomycin, và plasmid được thu hồi từ các thể biến nạp thu được.

Plasmid này được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *ClaI* và *HindIII*, và mảnh ADN khoảng 4 kb chứa pGAPS và gen *gcl* được thu hồi. Mảnh ADN này được thực hiện xử lý làm cùn đầu và tự nối. *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với sản phẩm nối, và được nuôi cấy trên đĩa thạch LB chứa 120 µg/mL spectinomycin. Tế bào vi khuẩn sinh trưởng trên đĩa này được nuôi cấy trong môi trường lỏng LB chứa 120 µg/mL spectinomycin, kết quả là, thu được các thể biến nạp. Plasmid được thu hồi từ các thể biến nạp thu được, kết quả là, thu được plasmid pGAPS_ *gcl*.

Ví dụ 36

Thu được biến thể *Pantoea ananatis* PA

Plasmid RSFCPG được thu hồi từ *Pantoea ananatis* AJ13601 (chủng nộp lưu patent BP-7207). Plasmid RSFCPG là plasmid kháng tetracyclin có các enzym glutamat dehydrogenaza, xitrat synthaza, và phosphoenolpyruvat carboxylaza xúc tác phản ứng của quá trình sinh tổng hợp L-glutamat (JP-A số 2001-333769). *Pantoea ananatis* AJ417 (chủng nộp lưu patent BP-8646) được biến nạp với RSFCPG bằng cách sử dụng phương pháp CaCl_2 (Molecular Cloning, 3rd edition, Cold Spring Harbor press, 2001), và được nuôi cấy trong môi trường lỏng LB chứa 10 µg/mL tetracyclin, kết quả là, thu được *Pantoea ananatis* AJ417/RSFCPG (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "Biến thể PA").

Ví dụ 37

Chuẩn bị biến thể *Pantoea ananatis* được làm khuyết gen *aceB*

Toàn bộ trình tự của ADN hệ gen của *Pantoea ananatis* AJ13355 (chủng nộp lưu patent BP-6614) đã được biết (Số nộp lưu ngân hàng gen AP012032), và trình tự bazơ của gen mã hóa malat synthaza của *Pantoea ananatis* (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "PAceB") cũng đã được báo cáo (Số nộp lưu ngân hàng gen NC_017531). Để tách

dòng vùng kẹp bên trình tự bazơ của gen mã hóa aceB (1,599 bp), bốn loại đoạn mỗi oligonucleotit được biểu thị bởi

GACTCTAGAGGATCCCCGGGATGACAGACTCGGTTATCAACAGTGAATTACTTT
TCAG (SEQ ID NO: 128),

GACGGGACGGCGGCTTTGTTGGCTTCCGCGTTATGAAAAAGTAGAGA
GC (SEQ ID NO: 129),

TTGAGACACAACGTGGCTTTCCCAGCAAGGACAGCGCGCGCAATGAAT
G (SEQ ID NO: 130), và

ATGACCATGATTACGAATTCTCAGGGAAGCAGGCGGTAGCCTGGCAGAG
TCAG (SEQ ID NO: 131) được tổng hợp.

Ngoài ra, để tách dòng gen kháng kanamycin, hai loại đoạn mỗi oligonucleotit được biểu thị bởi

TTTTTCATAACGCGGAAGCCAACAAAGCCGCGTCCCGTCAAGTCAGC
(SEQ ID NO: 132) và

CGCGCGCTGTCCTTGCTGGGAAAGCCACGTTGTGTCTCAAATCTCTGA
TGTTACATTGC (SEQ ID NO: 133) được tổng hợp.

ADN hệ gen của *Pantoea ananatis* AJ417 được điều chế, và sự khuếch đại bằng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen thu được làm khuôn và cặp đoạn mỗi của SEQ ID NO: 128 và SEQ ID NO: 129, kết quả là, thu được mảnh ADN chứa trình tự kẹp bên gen aceB (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh PAaceB-L"). Ngoài ra, sự khuếch đại bằng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi của SEQ ID NO: 130 và SEQ ID NO: 131, kết quả là, thu được mảnh ADN chứa trình tự kẹp bên gen aceB (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh PAaceB-R"). Ngoài ra, sự khuếch đại bằng PCR được tiến hành bằng cách sử dụng plasmid pUC4K có gen kháng kanamycin và sử dụng cặp đoạn mỗi của SEQ ID NO: 132 và SEQ ID NO: 133, kết quả là, mảnh ADN chứa gen kháng kanamycin (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh KanR") được khuếch đại. Plasmid pUC18 được xử lý bằng *EcoRI* và *XmaI*, nhờ đó chuẩn bị được mảnh pUC18. Các mảnh PAaceB-L, mảnh PAaceB-R, mảnh KanR, và mảnh pUC18 này được thu hồi, và các mảnh này được trộn cùng nhau và được xử lý bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng In-fusion HD cloning kit (Invitrogen). Các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5α (NEB5α; New England Biolabs) được biến nạp với sản phẩm phản ứng, và được nuôi cấy trên đĩa LB chứa 30 µg/mL kanamycin. Plasmid được thu hồi từ các

thể biến nạp thu được, và bằng cách giải trình tự ADN đã xác nhận được rằng vector pUC 18 được tạo cấu trúc sao cho trình tự của "trình tự kẹp bên 5' của aceB_gen kháng kanamycin_ trình tự kẹp bên 3' của aceB" được bao gồm. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng plasmit này làm khuôn và sử dụng

GCCGCCGAATTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACC (SEQ ID NO: 134) và

ATGACCATGATTACGAATTCTCAGGGAAGCAGGCGGTAGCCTGGCAGAG TCAG (SEQ ID NO: 135). Sản phẩm khuếch đại được tinh chế và được tiêu hóa bằng *EcoRI*, sau đó là quá trình tự nối của mảnh thu được bằng cách sử dụng ADN ligaza (Takara), kết quả là, thu được plasmit không có gốc sao chép. *Pantoea ananatis* AJ417 được biến nạp với plasmit thu được, và được nuôi cấy trên đĩa LB chứa 30 µg/mL kanamycin. Các khuẩn lạc thu được được thực hiện PCR hệ gen và giải trình tự ADN, và xác nhận được rằng gen aceB được làm khuyết một cách thích hợp. Vi khuẩn thu được được biến nạp với RSFCPG bằng cách sử dụng phương pháp CaCl₂, và được nuôi cấy trong môi trường LB chứa 10 µg/mL tetracyclin. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể *Pantoea ananatis* AJ417 được làm khuyết gen aceB (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "biến thể PAΔaceB").

Ví dụ 38

Chuẩn bị biến thể *Pantoea ananatis* được làm khuyết gen fumA

ADN hệ gen của *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (ATCC 23857) được chuẩn bị, và tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng ADN hệ gen thu được làm khuôn và sử dụng AGTCTAGAGATCCTTTTAAACCCATCAC (SEQ ID NO: 136) và AGTCTAGAAGTCGATAAACAGCAATATT (SEQ ID NO: 137) làm các đoạn mồi. Mảnh ADN thu được được tiêu hóa bằng enzym giới hạn *XbaI*, nhờ đó thu được mảnh ADN khoảng 2,0 kbp chứa gen sacB. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh ADN chuẩn bị được bằng cách tiêu hóa plasmit pHSG298 (Takara) bằng enzym giới hạn *XbaI* và thực hiện xử lý phosphatase kiểm soát với sản phẩm thu được, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5α (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) được biến nạp với sản phẩm nối thu được, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 25 µg/mL kanamycin. Plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được, kết quả là, thu được plasmit pHSG-sacB, trong đó mảnh ADN chứa gen sacB được cài xen trong pHSG298.

Toàn bộ chiều dài của plasmid pEA320, được tìm thấy ban đầu trong *Pantoea ananatis* AJ13355, đã được biết (NCBI Reference Sequence NC_017533,1), và trình tự bazơ của gen mã hóa fumarat hydratase lớp I (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "fumA") cũng đã được báo cáo. Để tách dòng vùng kẹp bên trình tự bazơ của gen mã hóa fumA (1,647 bp), bốn loại đoạn mồi oligonucleotit được biểu thị bởi GCAACGTTGGCTCTCATCT (SEQ ID NO: 138), CGGGATCCAAACACGCGGCGGAAAACA (SEQ ID NO: 139), CGGGATCCGTTAACGCAGGCTGAC (SEQ ID NO: 140), và GCTGCTGGCGTACTGGTTC (SEQ ID NO: 141) được tổng hợp.

ADN hệ gen của *Pantoea ananatis* AJ417 được chuẩn bị, và PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen thu được làm khuôn và sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO:138 và SEQ ID NO:139, kết quả là, mảnh ADN khoảng 0,7 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh fumA-L") được khuếch đại. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO:140 và SEQ ID NO:141, kết quả là, mảnh ADN khoảng 0,9 kb được khuếch đại (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "fumA-R mảnh").

Các mảnh ADN này được tách riêng bằng cách điện di trên agarose và được thu hồi, và mỗi trong số mảnh fumA-L và mảnh fumA-R được tiêu hóa bằng *Bam*HI. Các mảnh thu được được nối bằng cách sử dụng ligaza, và đầu 5' của sản phẩm đã được nối được phosphoryl hóa bằng cách sử dụng T4 Polynucleotid kinase. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh ADN được điều chế bằng cách tiêu hóa pHSB-sacB đã được mô tả ở trên bằng *Bam*HI và tiếp theo thực hiện xử lý làm cùn đầu đối với sản phẩm thu được bằng T4 ADN polymerase và xử lý bằng phosphatase kiềm, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/ml kanamycin ở nhiệt độ 30°C. Plasmid được thu hồi từ các thể biến nạp thu được, và xác nhận được rằng hai mảnh — mảnh vùng kẹp bên 5' ở phía trên và mảnh vùng kẹp bên 3' ở phía dưới của gen mã hóa fumA — được cài xen một cách thích hợp trong pHSB-sacB. Plasmid thu được được đặt tên là psacB-PAfumA.

Plasmid psacB-PAfumA có khả năng sao chép trong *Pantoea ananatis*. Do đó, để thu được plasmid để làm khuyết gen fumA không có gốc sao chép và sẽ không được sao chép trong *Pantoea ananatis*, sự khuếch đại bởi PCR được tiến hành bằng cách sử dụng psacB-PAfumA làm khuôn và cặp đoạn mồi của CTTTACACTTTATGCTTCC (SEQ ID NO: 142)

và TTGAGCTCGAGAGGTCTGCCTCGTGA (SEQ ID NO: 143) có vị trí nhận biết *SacI* ở phía đầu 5' của nó, kết quả là, thu được mảnh ADN khoảng 5 kb. Mảnh ADN thu được được tiêu hóa bằng *SacI* và được để cho nối bằng cách sử dụng ligaza, kết quả là, thu được plasmid pPAfumA. pPAfumA thu được chứa mảnh fumA-L, mảnh fumA-R, gen *sacB*, và gen kháng kanamycin, nhưng không có gốc sao chép. *Pantoea ananatis* AJ417 được biến nạp với pPAfumA bằng cách đục lỗ điện, và được cấy vào đĩa thạch LB chứa 40 µg/ml kanamycin. Dòng vô tính lai chéo đơn sinh trưởng trên môi trường nêu trên được nuôi cấy qua đêm trong môi trường lỏng LB, và một phần chất lỏng nuôi cấy được cấy vào môi trường thạch LB chứa 10% (khối lượng/thể tích) sucroza.

Tiếp theo, trong số các dòng vô tính thu được với môi trường nêu trên, các dòng vô tính nhạy kanamycin sinh trưởng trên môi trường chứa sucroza được chọn. Ngoài ra, ADN nhiễm sắc thể của các dòng vô tính này được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 138 và SEQ ID NO: 141, và chọn biến thể từ đó mảnh khoảng 1,5 kbp, mà biểu thị sự làm khuyết gen fumA, có thể được khuếch đại. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể *Pantoea ananatis* AJ417 được làm khuyết gen fumA (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "biến thể PAΔfumA").

Ví dụ 39

Chuẩn bị biến thể được làm khuyết gen *Pantoea ananatis* fumA, được làm khuyết gen fumC

Để tách dòng vùng kẹp bên trình tự bazơ của gen mã hóa fumarat hydratase lớp II (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "fumC") (1,398 bp), bốn loại đoạn mồi oligonucleotit được biểu thị bởi TCGCCATGATGCTGCTGTG (SEQ ID NO: 144), CGGGATCCGACTTAGCGTCATCGGTTG (SEQ ID NO: 145), CGGGATCCGATGAAGATTGCTAACGACG (SEQ ID NO: 146), và TGATGCCGACAATATTACGC (SEQ ID NO: 147) được tổng hợp.

ADN hệ gen của *Pantoea ananatis* AJ417 được chuẩn bị, và PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen thu được làm khuôn và sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 144 và SEQ ID NO: 145, kết quả là, mảnh ADN khoảng 0,8 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh fumC-L") được khuếch đại. Ngoài ra, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 146 và SEQ ID NO: 147, kết quả là, mảnh ADN khoảng 0,7 kb (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "mảnh fumC-R") được khuếch đại.

Các mảnh ADN này được tách riêng bằng cách điện di trên agarosa, và được thu hồi. Mỗi trong số các mảnh fumC-L và mảnh fumC-R được tiêu hóa bằng *Bam*HI, và các mảnh này được nối bằng cách sử dụng ligaza, sau đó là xử lý phosphoryl hóa đầu 5' bằng cách sử dụng T4 Polynucleotit kinaza. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh ADN chuẩn bị được bằng cách tiêu hóa pHSG-sacB được điều chế trong Ví dụ 38 bằng *Bam*HI và tiếp theo thực hiện xử lý làm cùn đầu đối với sản phẩm thu được bằng T4 ADN polymeraza và xử lý bằng phosphatasa kiềm, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α (do Toyobo Co., Ltd. sản xuất) được biến nạp với sản phẩm nối thu được, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL kanamycin ở nhiệt độ 30°C. Plasmid được thu hồi từ các thể biến nạp thu được, và xác nhận được rằng hai mảnh — mảnh vùng kẹp bên 5' ở phía trên và mảnh vùng kẹp bên 3' ở phía dưới của gen mã hóa fumC — được cài xen một cách thích hợp trong pHSG-sacB. Plasmid thu được được đặt tên là psacB-PAfumC.

Plasmid pPAfumC để làm khuyết gen fumC không có gốc sao chép và sẽ không được sao chép trong *Pantoea ananatis* thu được theo cách giống như trong Ví dụ 38 ngoại trừ là sử dụng plasmid psacB-PAfumC thay cho psacB-PAfumA,. Ngoài ra, các dòng vô tính nhạy kanamycin sinh trưởng trên môi trường chứa sucroza được chọn theo cách giống như trong Ví dụ 38, ngoại trừ là sử dụng plasmid pPAfumC thay cho pPAfumA và sử dụng biến thể PA Δ fumA thay cho *Pantoea ananatis* AJ417. ADN nhiễm sắc thể của các dòng vô tính này được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi của SEQ ID NO: 138 và SEQ ID NO: 141, và chọn biến thể từ đó mảnh khoảng 1,5 kbp, mà biểu thị sự làm khuyết gen fumC, có thể được khuếch đại. Biến thể thu được được biến nạp với RSFCPG bằng phương pháp CaCl₂, và được nuôi cấy trong môi trường LB chứa 10 μ g/mL tetracyclin. Biến thể thu được được đặt tên là biến thể *Pantoea ananatis*, được làm khuyết gen fumA, được làm khuyết gen fumC (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được viết tắt là "biến thể PA Δ fumAC").

Ví dụ 40

Tạo cấu trúc biến thể *Pantoea ananatis* để đánh giá

Mỗi trong số biến thể *Pantoea ananatis* PA chuẩn bị được trong Ví dụ 36, biến thể PA Δ aceB chuẩn bị được trong Ví dụ 37, và biến thể PA Δ fumAC chuẩn bị được trong Ví dụ 39, được biến nạp với pGAPS chuẩn bị được trong Ví dụ 34, pGAPS_gcl chuẩn bị được trong Ví dụ 35, pMWGKC chuẩn bị được trong Ví dụ 10, và/hoặc pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) trong Ví dụ 21 bằng phương pháp CaCl₂ hoặc đục lỗ điện,

và được cấy vào đĩa thạch LB chứa 30µg/mL cloramphenicol, 120µg/mL spectinomycin, và 15µg/mL tetracyclin. Khuẩn lạc sinh trưởng trên đĩa được sử dụng làm biến thể để đánh giá. Các biến thể thu được được tóm tắt trong Bảng 13.

Bảng 13

Tên biến thể	Plasmid/Biến thể	Đặc điểm
PA/vec	pMWGKC/pGAPS/RSFCPG/P. ananatis	Không có sự biểu hiện của mtk, mcl, và gcl
PA/mtk_mcl	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/pGAPS/RSFCPG/P. ananatis	Có sự biểu hiện của mtk và mcl, không có sự biểu hiện của gcl
PA/mtk_mcl/gcl	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/pGAPS_gcl/RSFCPG/P. ananatis	Có sự biểu hiện của mtk, mcl, và gcl
PAΔaceB/mtk_mcl/gcl	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/pGAPS_gcl/RSFCPG/P. ananatisΔaceB	Có sự biểu hiện của mtk, mcl, và gcl, có sự phá vỡ của gen aceB
PAΔfumAC/mtk_mcl/gcl	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/pGAPS_gcl/RSFCPG/P. ananatisΔfumAC	Có sự biểu hiện của mtk, mcl, và gcl, có sự phá vỡ của gen fumAC

Ví dụ 41

Xác nhận sự kết hợp của CO₂ được gắn nhãn ¹³C vào glutamat ở biến thể *Pantoea*

Mỗi trong số các biến thể *Pantoea* đích được nuôi cấy sơ bộ trong môi trường LB chứa 30 µg/mL cloramphenicol, 120 µg/mL spectinomycin, và 15 µg/mL tetracyclin ở nhiệt độ 30°C, 220 vòng/phút. Các tế bào vi khuẩn được thu gom từ quá trình nuôi cấy sơ bộ bằng cách phân tách bằng ly tâm (5000 vòng/phút trong 5 phút). Chuẩn bị 2 mL môi trường tối thiểu cho *Pantoea* (17 g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 3 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L NaCl, 1 g/L NH₄Cl, 10 mM MgSO₄, 10 µM CaCl₂, 50 mg/L L-lysin, 50 mg/L L-Methionin, pH 6,0) chứa 100 nM natri hydro cacbonat (được đánh dấu bằng ¹³C), 20 g/L glucoza, 30 µg/mL cloramphenicol, 120 µg/mL spectinomycin, và 15 µg/mL tetracyclin, và tế bào vi khuẩn thu được được bổ sung vào đó sao cho OD được điều chỉnh trong khoảng từ 1 đến 5. Sau khi bít kín bình nuôi cấy, tế bào vi khuẩn được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, 220 vòng/phút trong 1 ngày. Chất lỏng nuôi cấy được lấy mẫu một cách định kỳ, và các tế bào vi khuẩn được loại bỏ bằng cách phân tách bằng ly tâm (12.000 vòng/phút trong 3 phút). Dịch nổi bề mặt thu được được lọc qua thiết bị lọc màng PTFE ưa nước (Millipore Corporation, MSGVN2B50), nhờ đó thu được mẫu nuôi cấy. Các biến thể được sử dụng làm mẫu nuôi cấy được tóm tắt trong Bảng 13.

Để xác định hàm lượng ¹³C của glutamat trong mỗi mẫu nuôi cấy, 500 µL MTBSTFA với 1% TBDMSCl (do Sigma-Aldrich Co. sản xuất, 375934) và 500 µL DMF khô được bổ sung vào lượng mẫu thích hợp, mà được làm khô bằng cách, ví dụ, sấy đông khô hoặc làm khô bằng chân không. Hỗn hợp thu được được gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 2 giờ, và sau đó được tách bằng cách ly tâm (14.000 vòng/phút trong 5 phút). Dịch nổi bề mặt thu được được phân tích bởi GC-MS (Agilent 7890A và 5975c). Tiến hành xác định diện tích tương ứng của các đỉnh phổ khối ở khối lượng phân tử bằng 432, 433, và 434, mỗi trong số này được giả định là tương ứng với cấu trúc trong đó một nhóm butyl được loại bỏ khỏi dẫn xuất glutamat. Ở đây, giả sử rằng khối lượng phân tử bằng 432 tương ứng với cấu trúc trong đó tất cả các nguyên tử được tạo thành từ các chất đồng vị dồi dào nhất, khối lượng phân tử bằng 433 tương ứng với cấu trúc chứa một notron, và khối lượng phân tử bằng 434 tương ứng với cấu trúc chứa hai notron. Các đỉnh ở khối lượng phân tử bằng 432, 433, và 434 được xác định là [M+0], [M+1], và [M+2], một cách tương ứng. Giá trị của [M+1]/[M+0] được vẽ đồ thị trên trục x và giá trị của [M+2]/[M+0] được vẽ đồ thị trên trục y. Các kết quả phân tích được thể hiện trong Bảng 4.

Trong quá trình lên men glutamat thông thường, ¹³C có nguồn gốc từ NaH¹³CO₃

được kết hợp thông qua oxaloacetat vào glutamat chỉ ở vị trí C1 hoặc C5. Do đó, các giá trị đã được mô tả ở trên sẽ được đặt trên đường tham chiếu. Đường tham chiếu được xác định theo các phương trình sau.

$$x = (x_0 - x_0 \times \alpha + \alpha)/(1 - \alpha).$$

$$y = (y_0 - y_0 \times \alpha + x_0 \times \alpha)/(1 - \alpha).$$

α biểu thị tỷ lệ của chất đồng vị ^{13}C trong cacbon có nguồn gốc từ CO_2 (ở vị trí C1 hoặc vị trí C5) trong glutamat [$\approx^{13}\text{C}/(^{13}\text{C}+^{12}\text{C})$]. x và y biểu thị tọa độ của điểm bất kỳ trên đường tham chiếu. x_0 và y_0 biểu thị các giá trị của x và y , giả định rằng tỷ lệ chất đồng vị của ^{12}C trong cacbon có nguồn gốc từ CO_2 (ở một trong số vị trí 1 và vị trí 5 của glutamat) trong glutamat là 100% và tỷ lệ chất đồng vị của các nguyên tử khác là giống như tỷ lệ chất đồng vị tự nhiên của chúng (tức là, giá trị của x và y , nếu $\alpha=0$). x_0 và y_0 được đặt ở giá trị bằng 0,358527 và 0,16822084314, một cách tương ứng. Bằng cách giải phương trình nêu trên, đường tham chiếu được biểu thị bằng phương trình sau.

$$y = x_0 \cdot x + y_0 - x_0^2$$

Trong tiến trình sản xuất glutamat nội tại, ^{13}C có nguồn gốc từ $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ được cố định bởi enzyme cố định cacbon dioxit như phosphoenolpyruvat carboxylaza (ppc), pyruvat carboxylaza (pyc), hoặc phosphoenolpyruvat carboxykinaza (pck), và được kết hợp thông qua oxaloacetat vào glutamat ở vị trí C1 hoặc vị trí C5. Mặc dù các giá trị của $[M+1]$ và $[M+2]$ thay đổi tùy thuộc vào tỷ lệ của $^{12}\text{CO}_2$ và $^{13}\text{CO}_2$ được kết hợp bởi ppc, các giá trị này luôn được vẽ đồ thị trên đường tham chiếu trong trường hợp trong đó sự kết hợp xảy ra ở một vị trí. Mặt khác, trong trường hợp trong đó tiến trình cố định cacbon dioxit dự định sẽ thực hiện chức năng, ^{13}C được kết hợp vào glutamat thông qua cả oxaloacetat và axetyl-CoA. Trong trường hợp này, có khả năng là ^{13}C được kết hợp vào glutamat cả ở vị trí C1 và vị trí C5, kết quả là, giá trị $[M+2]$ phải được làm tăng để tạo ra giá trị được vẽ đồ thị ở trên đường tham chiếu.

Như được thể hiện trên Fig. 4, mỗi trong số biến thể PA/mtk_mcl_gcl, biến thể PA Δ aceB/mtk_mcl_gcl, và biến thể PA Δ fumAC/mtk_mcl_gcl tạo ra giá trị được vẽ đồ thị chủ yếu bên trên đường tham chiếu. Tức là, tin rằng CO_2 đã được cố định được kết hợp vào glutamat thông qua axetyl-CoA. Mặt khác, chủng đối chứng (PA/vec) tạo ra giá trị được vẽ đồ thị trên đường tham chiếu, và sự kết hợp của ^{13}C thông qua axetyl-CoA không được quan sát thấy. Tương tự, sự kết hợp của ^{13}C thông qua axetyl-CoA không được quan sát thấy trong biến thể mà chỉ được đưa vào mtk+mcl (PA/mtk_mcl). Tin rằng, vì *Pantoea ananatis*

không có gcl, việc chỉ truyền mtk và mcl là không đủ để cho phép sự chuyển hóa tiếp của glyoxylat, và, do đó, phản ứng không diễn ra tiếp. Từ các kết quả này, đã cho thấy rằng, như được thể hiện trên Fig. 1, không chỉ có việc đưa vào mtk và mcl mà cả việc liên kết với tiến trình gcl ở phía dưới là cần thiết cho sự chuyển hóa CO₂ thành axetyl-CoA.

Ví dụ 42

Sản xuất glutamat bởi biến thể *Pantoea*

Lượng glutamat và lượng sản phẩm phụ trong chất lỏng nuôi cấy trong Ví dụ 41 được xác định. Lượng glutamat trong mẫu nuôi cấy được xác định bằng cách sử dụng HPLC (2695, Waters) được lắp cột NN-814 (Showa Denko K.K.) và bộ dò UV/Vis (2489, Waters). Lượng glucoza và các sản phẩm khác trong phần dịch lọc được xác định bằng cách sử dụng HPLC (2695, Waters) được lắp cột ULTRON PS-80H (Shinwa Chemical Industries Ltd.) và bộ dò RI (2414, Waters). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 14 và 15.

Bảng 14

Tên biến thể	Hiệu suất so với sự tiêu thụ đường (24 giờ)	Xác nhận sự kết hợp ¹³ C
PA/vec	9%	-
PA/mtk_mcl	10%	-
PA/mtk_mcl/gcl	11%	+
PAΔaceB/mtk_mcl/gcl	16%	+
PAΔfumAC/mtk_mcl/gcl	16%	+

Bảng 15

Tên biến thể	Sản phẩm phụ (g/L/24 giờ)						
	Etanol	Pyruvat	Sucxinat	Lactat	Axetat	2,3-BDO	Tổng lượng sản phẩm phụ
PA/vec	0,0	0,0	4,3	0,8	0,0	0,7	5,8
PA/mtk_mcl	0,0	0,0	3,0	0,5	1,7	0,1	5,2
PA/mtk_mcl/gcl	0,0	0,0	3,2	0,5	1,2	0,1	5,0
PAΔaceB/mtk_mcl/gcl	0,0	0,0	0,3	0,4	0,0	0,0	0,7
PAΔfumAC/mtk_mcl/gcl	0,1	0,0	0,0	0,7	3,7	0,0	4,6

Biến thể được cảm ứng mtk+mcl+gcl (PA/mtk_mcl/gcl) cho thấy hiệu suất được cải

thiện so với sự tiêu thụ đường, so với chủng đối chứng (PA/vec) và biến thể được cảm ứng mtk+mcl (PA/mtk_mcl). Trong trường hợp có sự phá vỡ của gen aceB hoặc gen fumAC (PA Δ aceB/mtk_mcl/gcl, PA Δ fumAC/mtk_mcl/gcl), hiệu suất so với sự tiêu thụ đường được làm tăng tiếp.

Đối với lượng sản phẩm phụ, so với chủng đối chứng (PA/vec), đã bất ngờ phát hiện thấy rằng, lượng succinat và 2,3-butandiol (2,3-BDO) được làm giảm và tổng lượng sản phẩm phụ được làm giảm trong biến thể được đưa vào mtk+mcl+gcl (PA/mtk_mcl/gcl). Ngoài ra, so với biến thể không bị phá vỡ gen aceB (PA/mtk_mcl/gcl), đã bất ngờ cho thấy rằng, lượng succinat và axetat được làm giảm, và tổng lượng sản phẩm phụ cũng được làm giảm một cách rõ rệt trong biến thể bị phá vỡ gen aceB (PA Δ aceB/mtk_mcl/gcl). Trong biến thể bị phá vỡ gen fumAC (PA Δ fumAC/mtk_mcl/gcl), lượng succinat được làm giảm một cách rõ rệt so với biến thể không bị phá vỡ gen fumAC (PA/mtk_mcl/gcl), nhưng lượng axetat được làm tăng và tổng lượng sản phẩm phụ được làm giảm. Các biến thể này là được ưu tiên về mặt công nghiệp, vì lượng sản phẩm phụ ít hơn làm giảm đáng kể chi phí đối với quá trình tinh chế khi glutamat được thu gom từ chất lỏng nuôi cấy.

Hiệu quả làm giảm sản phẩm phụ nêu trên được quan sát thấy một cách tương tự trong biến thể PA không có RSFCPG.

Ví dụ 43

Chuẩn bị plasmit pCASET

Tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng pHSG298 (Takara) làm khuôn và sử dụng CGCCTCGAGTGACTCATACCAGGCCTG (SEQ ID NO: 148) và CGCCTCGAGGCAACACCTTCTTCACGAG (SEQ ID NO: 149) làm các đoạn mồi, và mảnh ADN thu được được tiêu hóa bằng enzym giới hạn *Xho*I và được để cho nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL kanamycin. Các plasmit được thu hồi từ các tế bào vi khuẩn thu được, và plasmit trong đó vị trí nhận biết của *Xho*I được cài xen trong pHSG298 được đặt tên là pHSG298-*Xho*I.

Để thu được gen khởi đầu tac, tiến hành khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng pKK223-3 (Pharmacia) làm khuôn và sử dụng ATCATCCAGCTGTCAGGCAGCCATCGGAAG (SEQ ID NO: 150) và ATCCCCGGGAATTCTGT (SEQ ID NO: 151) làm các đoạn mồi, và mảnh ADN thu được

được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *PvuII* và *SmaI*, kết quả là, thu mảnh ADN khoảng 0,2 kbp mã hóa gen khởi đầu tac. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh ADN khoảng 2,4 kbp chuẩn bị được bằng cách tiêu hóa plasmid pHSG298-*XhoI* bằng enzym giới hạn *PvuII* và thực hiện xử lý phosphatase kiềm đối với sản phẩm thu được, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL kanamycin. Plasmid được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được, nhờ đó thu được plasmid pHSGT1 trong đó gen khởi đầu lac của pHSG298-*XhoI* được thay thế bằng gen khởi đầu tac và gen khởi đầu tac được cài xen theo cùng hướng như gen khởi đầu lac ban đầu.

Để nối vị trí đa tách dòng của pHSG298 với vị trí ở phía dưới của gen khởi đầu tac của pHSGT1, pHSG298 được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *EcoRI* và *ClaI*, nhờ đó thu được mảnh ADN khoảng 1,0 kbp chứa vị trí đa tách dòng của pHSG298. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh ADN khoảng 1,7 kbp chuẩn bị được bằng cách tiêu hóa plasmid pHSGT1 bằng các enzym giới hạn *EcoRI* và *ClaI* và thực hiện xử lý phosphatase kiềm đối với sản phẩm thu được, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL kanamycin. Plasmid được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được, nhờ đó thu được plasmid pHSGT2 trong đó vị trí đa tách dòng của pHSG298 được nối với vị trí ở phía dưới của gen khởi đầu tac.

Mảnh ADN sau (SEQ ID NO:152) chứa gốc sao chép, repA, và repB của pCASE1(Appl Microbiol Biotechnol (2009) 81:1107-1115) tách được từ *Corynebacterium casei* JCM 12072 được chuẩn bị bởi quy trình tổng hợp ADN. Trình tự của mảnh này được thể hiện dưới đây.

```
CGCCTCGAGCACTGGAAGGGTTCTTCAGGGGAACCCCCGGAACCGGG
GAAACATCTGACTTGGTTAAATGTCGTATTATGAACACGCCGAGGAATGAAAAC
CGACCGTGACGCTCGTGTGAGAAAGTCAGCTACATGAGACCAACTACCCGCC
CTGAGGGACGCTTTGAGCAGCTGTGGCTGCCGCTGTGGCCATTGGCAAGCGAT
GACCTCCGTGAGGGCATTACCGCACCTCACGGAAGAACGCGCTGGATAAGCG
CTACGTCGAAGCCAATCCCGACGCGCTCTCTAACCTCCTGGTCGTTGACATCGA
CCAGGAGGACGCGCTTTTTCGCTCTTTGTGGGACAGGGAGGACTGGAGACCT
AACGCGGTGGTTGAAAACCCCTTAAACGGGCACGCACACGCTGTCTGGGCGC
```

TCGCGGAGCCATTTACCCGCACCGAATACGCCAAACGCAAGCCTTTGGCCTATG
 CCGCGGCTGTCACCGAAGGCCTACGGCGCTCTGTCGATGGCGATAGCGGATAC
 TCCGGGCTGATACCAAAAACCCCGAGCACACTGCATGGGATAGTCACTGGAT
 CACCGATAAGCTGTATACGCTCGATGAGCTGCGCTTTTGGCTCGAAGAAACCG
 GCTTTATGCCGCTGCGTCCTGGAGGAAAACGCGGCGGTTTCTCGCCAGTTGGT
 CTAGGTCGTAATTGCGCACTCTTTGAAAGCGCACGTACGTGGGCATATCGGGAG
 GTCAGAAAGCATTTTGGAGACGCTGACGGCCTAGGCCGCGCAATCCAAACCAC
 CGCGCAAGCACTTAACCAAGAGCTGTTTGATGAACCACTACCTGTGGCCGAAG
 TTGACTGTATTGCCAGGTCAATCCATAAATGGATCATCACCAAGTCACGCATGT
 GGACAGACGGCGCCGCGTCTACGACGCCACATTCACCGCAATGCAATCCGCA
 CGCGGGAAGAAAGGCTGGCAACGAAGCGCTGAGGTGCGTCGTGAGGCTGGAC
 ATACTCTTTGGAGGAACATTGGCTAAGGTTTATGCACGTTATCCACGCAACGGA
 AAAACAGCCCGCGAGCTGGCAGAACGTGCCGGTATGTCGGTGAGAACAGCTC
 AACGATGGACTTCCGAACCGCGTGAAGTGTTTCAATAACGTGCCAACGAGAAG
 CGTGCTCGCGTCCAGGAGCTGCGCGCCAAAGGTCTGTCCATGCGCGCTATCGC
 GGCAGAGATTGGTTGCTCGGTGGGCACGGTTCACCGCTACGTCAAAGAAGTTG
 AAGAGAAGAAAACCGCGTAAATCCAGCGGTTTAGTCACCCTCGGCGTGTTCAA
 AGTCCATCGTAACCAAGTCAGCTCGAGGCG

Mảnh ADN chuẩn bị được được tiêu hóa bằng enzym giới hạn *Xho*I. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh ADN chuẩn bị được bằng cách tiêu hóa plasmit pHSGT2 bằng enzym giới hạn *Xho*I và thực hiện xử lý phosphataza kiểm đối với sản phẩm thu được, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL kanamycin. Các plasmit được thu hồi từ các tế bào vi khuẩn thu được, và plasmit trong đó mảnh ADN chứa gốc sao chép, repA, và repB của pCASE1 được cài xen ở vị trí nhận biết *Xho*I của pHSGT2 được đặt tên là pCASET. Trong pCASET được thu hồi, repA có nguồn gốc từ pCASE1 được cài xen theo hướng ngược so với gen khởi đầu tac.

Ví dụ 44

Tạo cấu trúc plasmit pCASEL

Mảnh ADN được tổng hợp trong Ví dụ 43 (SEQ ID NO: 152) chứa gốc sao chép, repA, và repB của pCASE1 được tiêu hóa bằng enzym giới hạn *Xho*I. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh ADN chuẩn bị được bằng cách tiêu hóa plasmit pHSG298-*Xho*I được

điều chế trong Ví dụ 43 bằng enzym giới hạn *XhoI* và thực hiện xử lý phosphatase kiềm đối với sản phẩm thu được, và các mảnh đã trộn được nối bằng cách sử dụng ligaza. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL kanamycin. Các plasmid được thu hồi từ các tế bào vi khuẩn thu được, và plasmid trong đó mảnh ADN chứa gốc sao chép, repA, và repB của pCASE1 được cài xen ở vị trí nhận biết *XhoI* của pHSG298-*XhoI* được đặt tên là pCASEL. Trong pCASEL được thu hồi, repA có nguồn gốc từ pCASE1 được cài xen theo hướng ngược so với gen khởi đầu lac có nguồn gốc từ pHSG298.

Ví dụ 45

Tạo cấu trúc plasmid biểu hiện cho mtk và mcl có nguồn gốc từ *Methylococcus capsulatus*

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) làm khuôn và sử dụng cặp đoạn mỗi của GGAATTCACAAAAAGGATAAAACAATGGCTGTCAAGAACCGTCTAC (SEQ ID NO: 153) và CGAATTCTCAGAATCTGATTCCGTGTTCTG (SEQ ID NO: 154), kết quả là, thu được mảnh ADN chứa mcl-mtk của *Methylococcus*. Mỗi trong số các đoạn mỗi của SEQ ID NO: 153 và 154 có vị trí nhận biết *EcoRI* ở phía đầu 5'. Mỗi trong số mảnh ADN thu được và plasmid pCASET được tiêu hóa bằng *EcoRI* và được khử phosphoryl hóa, và các mảnh thu được được để cho nối. Tương tự, mảnh ADN thu được và plasmid pCASEL được tiêu hóa. Bằng cách giải trình tự ADN, xác nhận được rằng mảnh mcl-mtk được cài xen trong theo hướng thích hợp cho sự biểu hiện với gen khởi đầu của plasmid. Plasmid thu được được đặt tên là pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc) hoặc pCASEL_mcl(Mc)_mtk(Mc).

Ví dụ 46

Tạo cấu trúc plasmid biểu hiện cho mtk có nguồn gốc từ *Granulibacter bethesdensis*, *Nitrosomonas europaea*, và *Hyphomicrobium methylovorum*

Các tế bào *Escherichia coli* khả biến *dam⁻/dcn⁻* (New England Biolabs) được biến nạp với mỗi trong số pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Gb), pMWGKC_mcl(Hme)_mtk(Hme)_mcl, và pMWGKC_mcl(Ne)_mtk(Ne), và được sinh trưởng trên môi trường LB chứa 30 μ g/mL cloramphenicol. Plasmid thu hồi từ đó được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *EcoRI* và *XbaI*, kết quả là, thu được mảnh ADN khoảng 3 kb chứa mtk và mcl. Mảnh ADN chứa mtk và mcl được nối với plasmid pCASEL mà đã được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *EcoRI* và *XbaI*, nhờ đó điều chế được các vector

pCASEL_mcl(Hme)_mtk(Gb), pCASEL_mcl(Hme)_mtk(Hme), và pCASEL_mcl(Ne)_mtk(Ne) để biểu hiện mtk và mcl trong *Corynebacterium*. Mỗi trong số các vectơ này có mtk của *Granulibacter bethesdensis*, *Nitrosomonas europaea*, hoặc *Hyphomicrobium methylovorum*.

Các plasmit đối với *Corynebacterium* đã chuẩn bị được tóm tắt trong Bảng 16.

Bảng 16

Số biến thể	Plasmit	Nguồn gốc mtk	Nguồn gốc mcl
MT-9	pCASEL_mcl(Hme)_mtk(Gb)	<i>Granulibacter bethesdensis</i>	<i>Hyphomicrobium methylovorum</i>
MT-10	pCASEL_mcl(Hme)_mtk(Hme)	<i>Hyphomicrobium methylovorum</i>	<i>Hyphomicrobium methylovorum</i>
MT-11	pCASEL_mcl(Ne)_mtk(Ne)	<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Nitrosomonas europaea</i>
MT-12	pCASEL_mcl(Mc)_mtk(Mc)	<i>Methylococcus capsulatus</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i>
MT-13	pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)	<i>Methylococcus capsulatus</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i>

Ví dụ 47

Xác định hoạt tính mtk ở *Corynebacterium*

Corynebacterium glutamicum ATCC 13012 được biến nạp với mỗi trong số các plasmit được điều chế trong Ví dụ 45 và Ví dụ 46 bằng cách đục lỗ điện. Sản phẩm thu được được cấy vào đĩa thạch LB chứa 15 µg/mg kanamycin, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong từ 1 đến 4 ngày. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong từ 1 đến 4 ngày trong môi trường lỏng LB chứa 15 µg/mg kanamycin, và tế bào vi khuẩn được thu gom bằng cách phân tách bằng ly tâm. Các tế bào vi khuẩn được tạo huyền phù trong đệm MOPS-K (pH 7,7), và huyền phù thu được được nghiền bằng các hạt thủy tinh 0,1 mm sử dụng thiết bị Beads Shocker (MB5000, Yasui Kikai Corporation). Sau đó, dịch nổi bề mặt thu được bằng cách phân tách bằng ly tâm (13.000 vòng/phút trong 2 phút) được sử dụng làm chất chiết enzym thô đột biến. Hoạt tính trong tế bào vi khuẩn được xác định bằng cách sử dụng chất chiết này theo cách giống như trong Ví dụ 16. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 17.

Bảng 17

Số biến thể	Plasmid	Hoạt tính (nmolphút/mg)
MT-9	pCASEL_mcl(Hme)_mtk(Gb)	5,5
MT-10	pCASEL_mcl(Hme)_mtk(Hme)	8,3
MT-11	pCASEL_mcl(Ne)_mtk(Ne)	11,0
MT-12	pCASEL_mcl(Mc)_mtk(Mc)	51,3
MT-13	pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)	99,1

Trong trường hợp trong đó plasmid pCASEL được sử dụng làm vector biểu hiện, plasmid biểu hiện mtk có nguồn gốc từ *Methylococcus capsulatus* tạo ra giá trị hoạt tính cao nhất. Ngoài ra, so với Bảng 9, hầu như quan sát thấy mối tương quan giống như vậy giữa mtk có hoạt tính cao và mtk có hoạt tính thấp. Việc đánh giá hoạt tính của mtk có nguồn gốc từ *Methylococcus capsulatus* được đưa vào pCASEL và được đưa vào pCASET cho thấy hoạt tính cao hơn trong biến thể có mtk được đưa vào pCASET.

Ví dụ 48

Tạo cấu trúc plasmid biểu hiện cho mtk, mcl, gcl, và glxR trong *Corynebacterium*

Rhodococcus jostii NBRC16295 được mua từ NBRC (Biological Resource Center, Biotechnology Field, National Institute of Technology and Evaluation). NBRC16295 được nuôi cấy trong môi trường (môi trường số: 802, NBRC), và ADN hệ gen thu được từ đó bằng cách sử dụng bộ kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN hệ gen này làm khuôn và sử dụng CGAGCTCAAGCTTACAAAAAGGATAAAACAATGAGCACCATTGCATTCATCGG (SEQ ID NO: 155) và CGGGATCCCTAGTCCAGCAGCATGAGAG (SEQ ID NO: 156) làm các đoạn mồi, kết quả là, thu được mảnh glxR-gcl của *Rhodococcus* (SEQ ID NO: 157). Mảnh thu được được tiêu hóa bằng *SacI* và *BamHI*, và sản phẩm thu được được nối với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc) bằng *SacI* và *BamHI*. Plasmid thu được được đặt tên là pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)_glxR(Rj)_gcl(Rj).

Ví dụ 49

Tạo cấu trúc biến thể *Corynebacterium glutamicum* để đánh giá sự sản xuất glutamat và sự kết hợp của ^{13}C

Corynebacterium glutamicum DSM1412 (sau đây trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "chủng CG") được biến nạp với mỗi trong số các plasmid đã được tạo cấu trúc trong

Ví dụ 43, 45, và 48 bằng cách đục lỗ điện, và được cấy vào đĩa thạch LB chứa 15 µg/mL kanamycin. Khuẩn lạc sinh trưởng trên đĩa này được sử dụng làm biến thể để đánh giá. Các biến thể thu được được tóm tắt trong Bảng 18.

Bảng 18

Tên biến thể	Plasmid/Biến thể	Đặc điểm
CG/vec	pCASET / C. glutamicam	Không có mtk, mcl, gcl, và glxR
CG/mtk_mcl	pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc) / C. glutamicam	Có sự biểu hiện của mtk và mcl, không có gcl và glxR
CG/mtk_mcl/gcl-glxR	pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)_glxR(Rj)_gcl(Rj) / C. glutamicam	Có sự biểu hiện của mtk, mcl, gcl, và glxR

Ví dụ 50

Xác nhận việc đưa CO₂ được gắn nhãn ¹³C vào glutamat trong các biến thể *Corynebacterium*

Mỗi trong số các biến thể vi sinh vật cần được phân tích được nuôi cấy trong 2 mL môi trường LB lỏng chứa 15 µg/mL kanamycin ở nhiệt độ 30°C và 280 vòng/phút cho đến khi đạt được sự sinh trưởng đủ. Trong bình Erlenmeyer dung tích 100 mL được lắp lưới khuấy, 10 mL môi trường tối thiểu [30 g/L (NH₄)₂SO₄, 3 g/L Na₂HPO₄, 6 g/L KH₂PO₄, 2 g/L NaCl, 84 mg/L CaCl₂, 3,9 mg/L FeCl₃, 0,9 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 0,3 mg/L CuCl₂·H₂O, 5,56 mg/L MnSO₄·5H₂O, 0,1 mg/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0,3 mg/L Na₂B₄O₇·10H₂O, 0,4 g/L MgSO₄·7H₂O, 40 mg/L FeSO₄·7H₂O, 500 µg/L Vitamin B1·HCl, 0,1 g/L EDTA, 10 µg/L Biotin] cho *Corynebacterium* chứa 20 g/L glucoza và 15 µg/mL kanamycin được điều chế. 1 mL giống cấy trong môi trường LB lỏng ở trên được bổ sung vào đó, và hỗn hợp được nuôi cấy trong từ 1 đến 4 ngày cho đến khi đạt đến sự sinh trưởng đủ, nhờ đó thu được giống cấy sơ bộ. Từ giống cấy sơ bộ này, tế bào vi khuẩn được thu gom bằng cách phân tách bằng ly tâm (5000 vòng/phút trong 5 phút).

2 mL môi trường nuôi cấy cho *Corynebacterium* (nồng độ cuối cùng của Biotin được thay đổi đến 2 µg/L) chứa 100 mM natri hydro cacbonat (được gắn nhãn ¹³C), 20 g/L glucoza, 1,5% (khối lượng/thể tích) Tween 60 (do Sigma-Aldrich Co. sản xuất), và 15 µg/mL kanamycin được điều chế, và tế bào vi khuẩn từ giống cấy sơ bộ được bổ sung vào đó sao cho OD được bổ sung vào đó sao cho OD được điều chỉnh trong khoảng từ 1 đến 5. Sau khi bít kín bình nuôi cấy, tế bào vi khuẩn được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C và 150 vòng/phút trong từ 1 đến 2 ngày. Chất lỏng nuôi cấy được lấy mẫu một cách định kỳ, và tế bào vi khuẩn được loại bỏ bằng cách phân tách bằng ly tâm (Millipore Corporation, 12.000 vòng/phút trong 3 phút). Dịch nổi bề mặt thu được được lọc qua thiết bị lọc màng PTFE ra nước (Millipore Corporation, MSGVN2B50), nhờ đó thu được mẫu nuôi cấy. Hàm lượng ¹³C của mẫu nuôi cấy được phân tích theo cách giống như trong Ví dụ 41. Tức là, diện tích tương ứng của các đỉnh ở khối lượng phân tử bằng 432, 433, và 434 trong phân tích GC-MS được xác định là [M], [M+1], và [M+2], một cách tương ứng, và giá trị của [M+1]/[M] được vẽ đồ thị trên trục x và giá trị của [M+2]/[M] được vẽ đồ thị trên trục y. Đường tham chiếu thu được bằng cách tính toán theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 41.

Dựa trên Fig. 5, biến thể được đưa vào mtk+mcl+gcl+glxR (CG/mtk_mcl_gcl_glxR) tạo ra giá trị được vẽ đồ thị bên trên đường tham chiếu, và tin rằng CO₂ đã được cố định được kết hợp vào glutamat thông qua axetyl-CoA. Mặt khác, chủng đối chứng (CG/vec),

tạo ra giá trị được vẽ đồ thị hầu như nằm trên đường tham chiếu, và sự kết hợp của ^{13}C thông qua axetyl-CoA không được quan sát thấy. Tương tự, biến thể được đưa vào mtk+mcl (CG/mtk_mcl) tạo ra giá trị được vẽ đồ thị hầu như nằm trên đường tham chiếu, và không quan sát thấy sự kết hợp của ^{13}C thông qua axetyl-CoA. Tin rằng, vì *Corynebacterium glutamicum* không có gcl và glxR, việc chỉ truyền mtk và mcl là không đủ để cho phản ứng diễn ra, như trong trường hợp của *Pantoea ananatis*.

Ví dụ 51

Thử nghiệm sản xuất glutamat ở các biến thể *Corynebacterium*

Lượng glutamat và lượng sản phẩm phụ trong chất lỏng nuôi cấy trong Ví dụ 50 được xác định. Theo cách giống như trong Ví dụ 42, glutamat, glucoza, và các hợp chất hữu cơ khác trong chất lỏng nuôi cấy được phân tích. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 19 và 20.

Bảng 19

Tên biến thể	Hiệu suất so với sự tiêu thụ đường (24 giờ)	Kết quả của phân tích ^{13}C
CG/vec	2%	-
CG/mtk_mcl	3%	-
CG/mtk_mcl_gcl_glxR	6%	+

Bảng 20

Tên biến thể	Sản phẩm phụ (g/L/24 giờ)					
	Etanol	Pyruvat	Sucxinat	Lactat	Axetat	Tổng lượng sản phẩm phụ
CG/vec	0,0	0,0	0,2	1,6	0,3	2,1
CG/mtk_mcl	0,0	0,0	0,3	1,6	0,3	2,2
CG/mtk_mcl_gcl_glxR	0,0	0,0	0,1	0,6	0,2	0,9

Biến thể được đưa vào mtk+mcl+gcl+glxR (CG/mtk_mcl_gcl_glxR) cho thấy hiệu suất được cải thiện so với sự tiêu thụ đường, so với chủng đối chứng (CG/vec) và biến thể (CG/mtk_mcl) trong đó chỉ có mtk+mcl được đưa vào.

Đối với lượng sản phẩm phụ, so với chủng đối chứng (CG/vec), đã bất ngờ phát hiện thấy rằng, lượng lactat được làm giảm chủ yếu và tổng lượng sản phẩm phụ được làm giảm trong biến thể được đưa vào mtk+mcl+gcl+glxR (CG/mtk_mcl_gcl_glxR). Trong biến thể

(CG/mtk_mcl) trong đó chỉ có mtk+mcl được đưa vào, lượng sản phẩm phụ là hầu như giống như lượng sản phẩm phụ trong chủng đối chứng.

Ví dụ 52

Tăng cường hoạt tính bằng cách đưa các đột biến vào gen mã hóa malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylobacterium extorquens*

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng pMWGKC_mtk(Mex)_mcl làm khuôn và mỗi trong số các cặp đoạn mồi được thể hiện trong Bảng 21. Khuôn được tiêu hóa bằng enzym giới hạn *DpnI*. Sau đó, các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với sản phẩm thu được, và thu các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/mL cloramphenicol. Các khuẩn lạc thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa 10 µg/mL cloramphenicol. Plasmid được thu hồi từ một phần chất lỏng nuôi cấy, và trình tự ADN của nó được kiểm tra. Plasmid trong đó đột biến dự định được đưa vào một cách thích hợp được sử dụng làm mẫu đột biến. Mẫu này được nuôi cấy sơ bộ trong môi trường lỏng LB chứa 10 µg/mL cloramphenicol, và sau đó được cấy vào 3 mL môi trường LB lỏng chứa 10 µg/mL cloramphenicol và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C và 280 vòng/phút qua đêm. Hai mililit của giống cấy được tách bằng cách ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ dịch nổi bề mặt, và 2 mL đệm phosphat 10 mM (pH 7,0) được bổ sung vào đó, sau đó là rửa các tế bào. Bước rửa được lặp lại một lần, và các tế bào được tạo huyền phù trong 500 µL đệm phosphat 10 mM (pH 7,0). Huyền phù thu được được nghiền bằng các hạt thủy tinh 0,1 mm sử dụng thiết bị Beads Shocker (MB5000, Yasui Kikai Corporation), và dịch nổi bề mặt thu được bằng cách phân tách bằng ly tâm (13.000 vòng/phút trong 2 phút) được sử dụng làm chất chiết enzym thô đột biến.

Hoạt tính của mỗi chất chiết enzym thô đột biến được đánh giá theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 16. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 21. Kết quả là, đột biến Q244E trong mtkB và đột biến L144I trong mtkB cải thiện giá trị hoạt tính so với mtkB không được đột biến. Ngoài ra, hoạt tính được cải thiện bằng cách đưa axit amin khác vào vị trí Q244 của mtkB, khi axit amin được đưa vào là A, L, I, M, N, Y, K, hoặc R. Ngoài ra, hoạt tính được cải thiện bằng cách đưa đột biến vào vị trí L144 của mtkB, khi axit amin được đưa vào là N, D, K, R, H, Q, hoặc P.

Bảng 21

Loại đột biến (Kiểu đại)	Hoạt tính tương đối (1)	Vị trí —
mtkB_Q244E	1,9	158,159
mtkB_Q244A	1,2	160,161
mtkB_Q244L	1,1	162,163
mtkB_Q244I	1,2	164,165
mtkB_Q244M	1,1	166,167
mtkB_Q244N	1,2	168,169
mtkB_Q244Y	1,1	170,171
mtkB_Q244K	1,3	172,173
mtkB_Q244R	1,3	174,175
mtkB_L144I	1,1	176,177
mtkB_L144N	2,1	178,179
mtkB_L144D	1,8	180,181
mtkB_L144K	1,5	182,183
mtkB_L144R	1,9	184,185
mtkB_L144H	1,4	186,187
mtkB_L144Q	1,4	188,189
mtkB_L144P	2,4	190,191

Theo sáng chế, CO₂ có thể được chuyển hóa thành axetyl-CoA. Ngoài ra, theo sáng chế, chất có nguồn gốc từ axetyl-CoA như rượu isopropyllic, axeton, và axit glutamic có thể được sản xuất một cách hiệu quả.

Phần bộc lộ của đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2011-167808 nộp ngày 29 tháng 7 năm 2011 được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Tất cả các tài liệu công bố, đơn yêu cầu cấp patent, và các tiêu chuẩn kỹ thuật nêu trong bản mô tả này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có chu trình sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền ít nhất một loại hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, cho vi sinh vật mà không thể hiện chức năng nào trong số các chức năng của chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ các phản ứng enzym từ (a) đến (d) sau:

- (a) malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat;
- (b) axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat;
- (c) crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA; và
- (d) CO₂ thành format;

trong đó vi sinh vật này không có hoạt tính malat thiokinaza và/hoặc malyl-CoA lyaza nội sinh bất kỳ.

2. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này có chu trình sản xuất axetyl-CoA trong đó phosphoenolpyruvat hoặc pyruvat được chuyển hóa thành oxaloacetat, và sau đó thành 2-hydroxy-3-oxopropionat do các tác động của malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, và sau đó lại thành phosphoenolpyruvat thông qua 2-phosphoglyxerat.

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

- (f) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

pyruvat kinaza và pyruvat carboxylaza;

phosphoenolpyruvat carboxylaza; và

phosphoenolpyruvat carboxykinaza;

- (g) malat dehydrogenaza;

- (h) malat thiokinaza;

- (i) malyl-CoA lyaza;

- (j) glyoxylat carboligaza;

- (k) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza; và

hydroxypyruvat isomeraza và hydroxypyruvat reductaza;

(l) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

glyxerat 2-kinaza; và

phosphoglyxerat mutaza và glyxerat 3-kinaza; và

(m) enolaza.

4. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vi sinh vật này là vi sinh vật thuộc Enterobacteriaceae hoặc vi sinh vật thuộc vi khuẩn coryneform.

5. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Escherichia* hoặc vi khuẩn *Pantoea* thuộc Enterobacteriaceae, hoặc vi sinh vật này là vi khuẩn *Corynebacterium* thuộc vi khuẩn coryneform.

6. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Escherichia* trong đó hoạt tính của lactat dehydrogenaza sở hữu bởi vi khuẩn *Escherichia* được làm bất hoạt hoặc được làm giảm.

7. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Escherichia* trong đó hoạt tính của ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm isoxitrat lyaza và malat synthaza sở hữu bởi vi khuẩn *Escherichia* được làm bất hoạt hoặc được làm giảm.

8. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Escherichia* trong đó hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, và hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza được truyền hoặc được tăng cường.

9. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Escherichia* trong đó hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza, và hoạt tính dehydrogenaza rượu isopropyllic được truyền hoặc được tăng cường.

10. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó vi sinh vật này là vi khuẩn *Pantoea* trong đó:

(i) hoạt tính của fumarat hydrataza A và fumarat hydrataza C sở hữu bởi vi khuẩn *Pantoea* được làm bất hoạt hoặc được làm giảm; hoặc

(ii) hoạt tính của malat synthaza sở hữu bởi vi khuẩn *Pantoea* được làm bất hoạt hoặc được làm giảm.

11. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó malat thiokinaza được sử dụng là malat thiokinaza thu được bằng cách cải biến mtkB có nguồn gốc từ *Methylobacterium extorquens* để biến đổi axit amin tương ứng với axit amin thứ 144 thành isoleuxin, asparagin, axit aspartic, lysin, arginin, histidin, glutamin, hoặc prolin, và/hoặc để biến đổi axit amin thứ 244 thành axit glutamic, alanin, leuxin, isoleuxin, methionin, asparagin, tyrosin, lysin, hoặc arginin.

12. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA, bao gồm bước sản xuất axetyl-CoA từ nguyên liệu nguồn cacbon sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.

13. Phương pháp sản xuất axeton, bao gồm bước sản xuất axeton từ nguyên liệu nguồn cacbon sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm 8, điểm 9 hoặc điểm 11.

14. Phương pháp sản xuất rượu isopropylic, bao gồm bước sản xuất rượu isopropylic từ nguyên liệu nguồn cacbon sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm 9 hoặc điểm 11.

15. Phương pháp sản xuất glutamat, bao gồm bước sản xuất glutamat từ nguyên liệu nguồn cacbon sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm 5, điểm 10, hoặc điểm 11.

FIG. 1

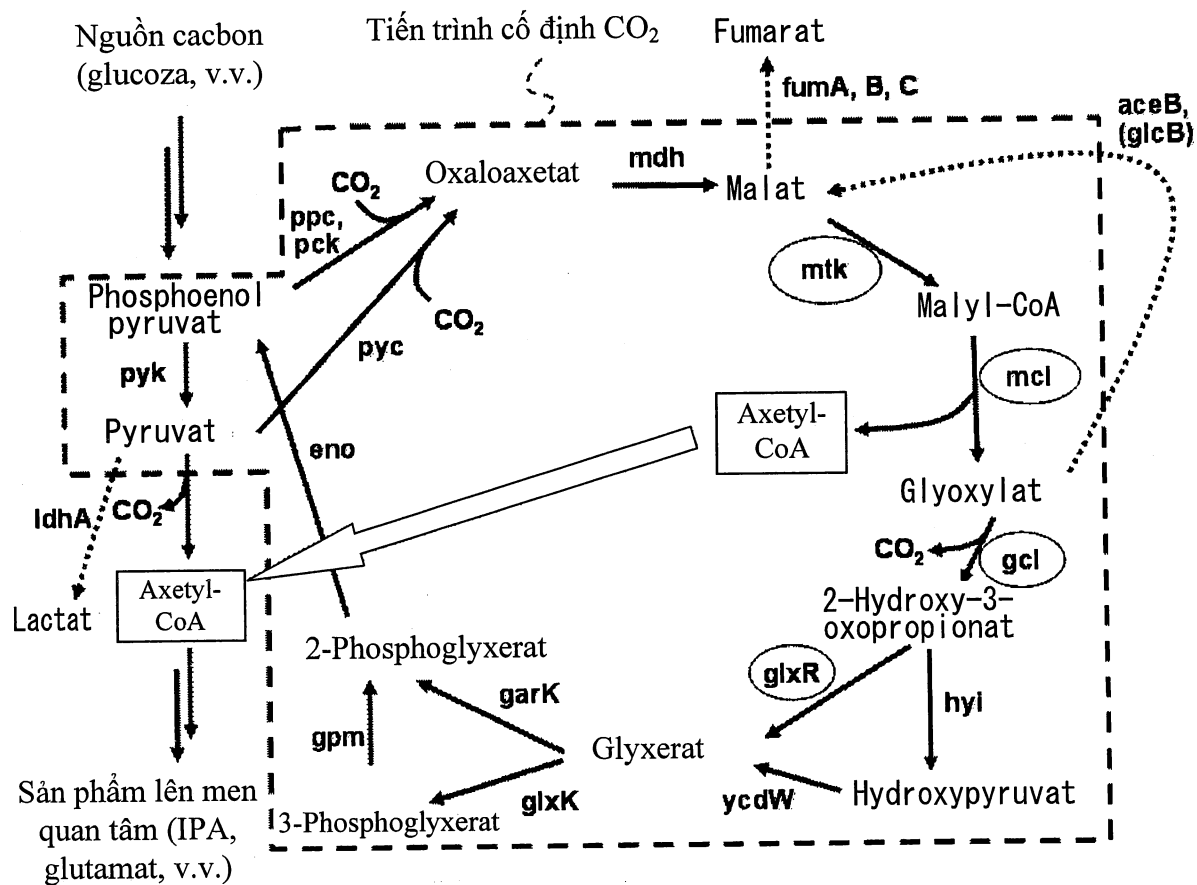
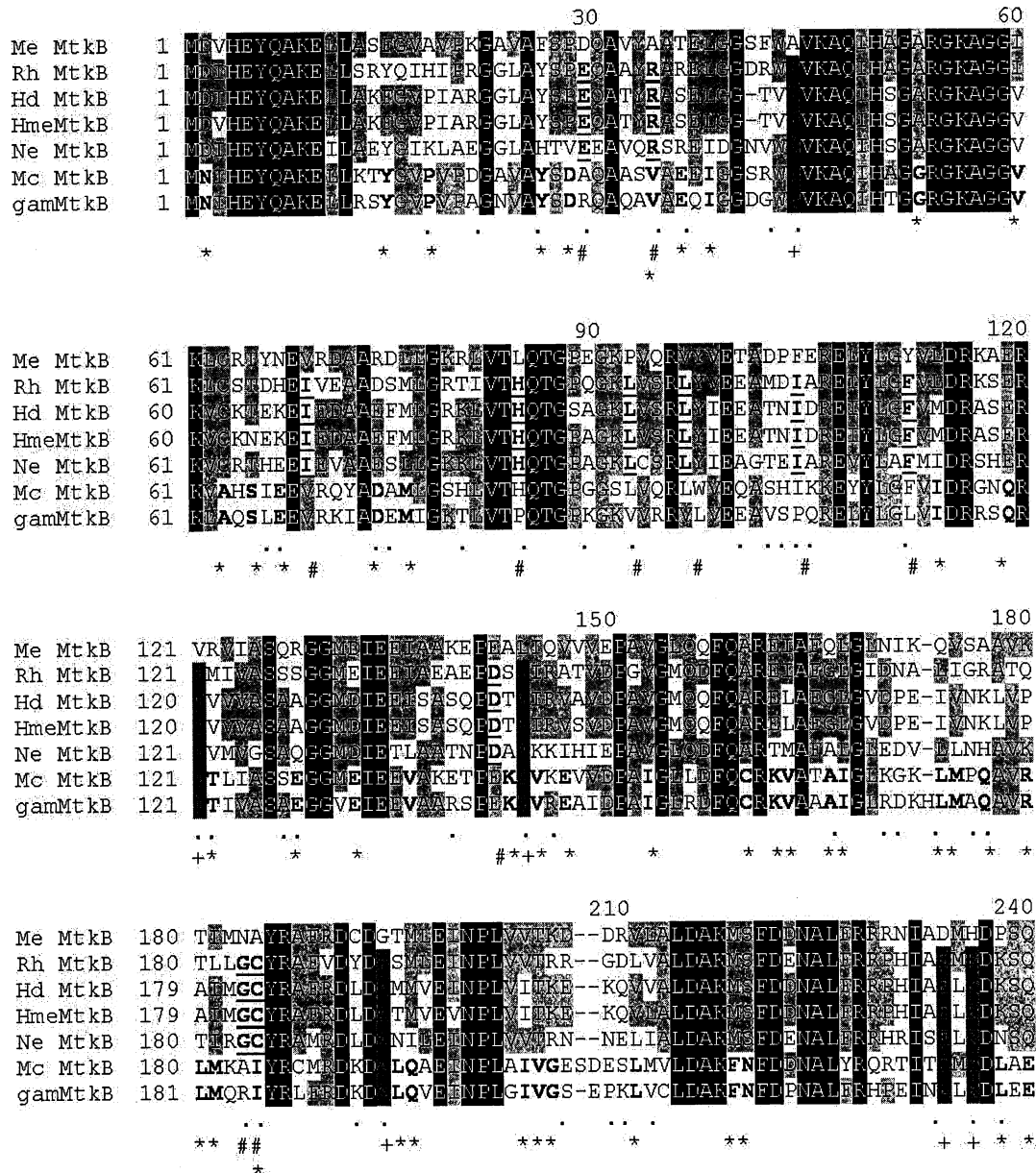


FIG.2A



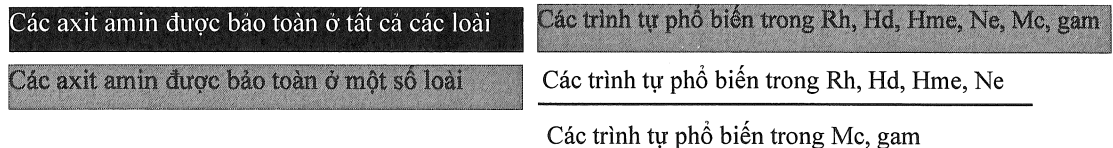


FIG.3A

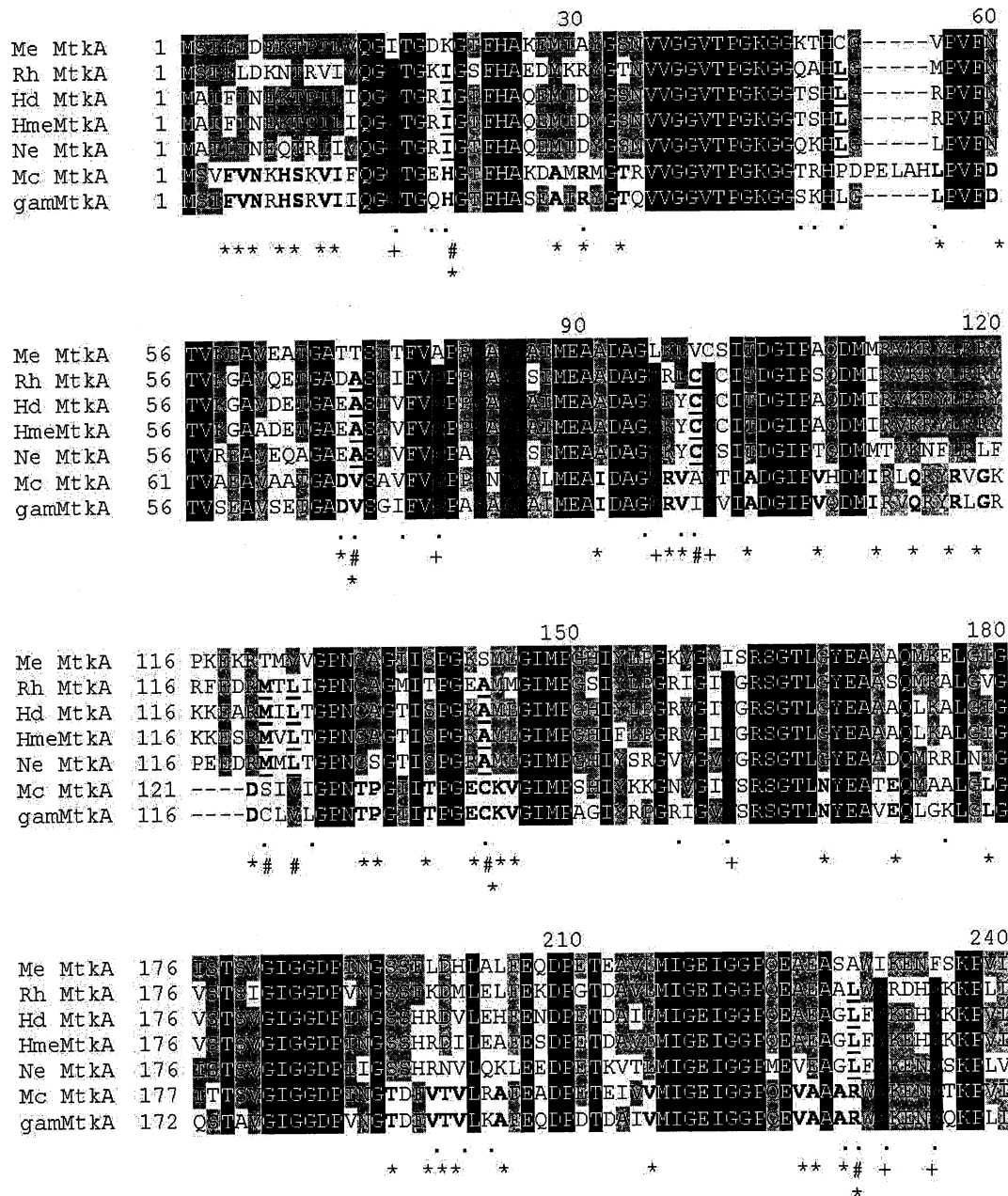


FIG.3B

Me MtkA 236 **GEVAGLTAPKGRRMGHAGATISATGDSAAENAEIMRSYGLTVAPDEGSEFGSTVADVLARA** 300
 Rh MtkA 236 **AYIAGLSAPKGRRMGHAGATISAFGESAQERVEILKSAGVTIVPTESSEGETVADVLSAM**
 Hd MtkA 236 **AYIAGLSAPKGRRMGHAGATVSAFGESAAENVEILKGC GVAIAPTSEMGSTVAQVLGKQ**
 HmeMtkA 236 **AYIAGLSAPKGRRMGHAGATVSAFGESAAENVEILKGCNVTIAATSEMGSTVAQVLNQR**
 Ne MtkA 236 **AYIAGLTAPPGRRMGHAGATISSAGESAAENVERLKELGVTICPTPSLMGETVAKVLAGL**
 Mc MtkA 237 **GEVAGLAAPTGRRMGHAGATISSEADTAGAKMDAMEALGLYVARNEAQISQTVLRRAQEH**
 gamMtkA 232 **GEVAGASAPPGRRMGHAGATIEGEEDTAKAMDAMEELGVYVVRNPARIGETVLRALKER**

* ## * ### * ## * # * *** *
 * *

Me MtkA 296 A-----
 Rh MtkA 296 SKAA---
 Hd MtkA 296 KKVA---
 HmeMtkA 296 KKVA---
 Ne MtkA 296 -----
 Mc MtkA 297 GIRF---
 gamMtkA 292 LGSVAVSG

Các axit amin được bảo toàn ở tất cả các loài

Các trình tự phổ biến trong Rh, Hd, Hme, Ne, Mc, gam

Các axit amin được bảo toàn ở một số loài

Các trình tự phổ biến trong Rh, Hd, Hme, Ne

Các trình tự phổ biến trong Mc, gam

FIG.4

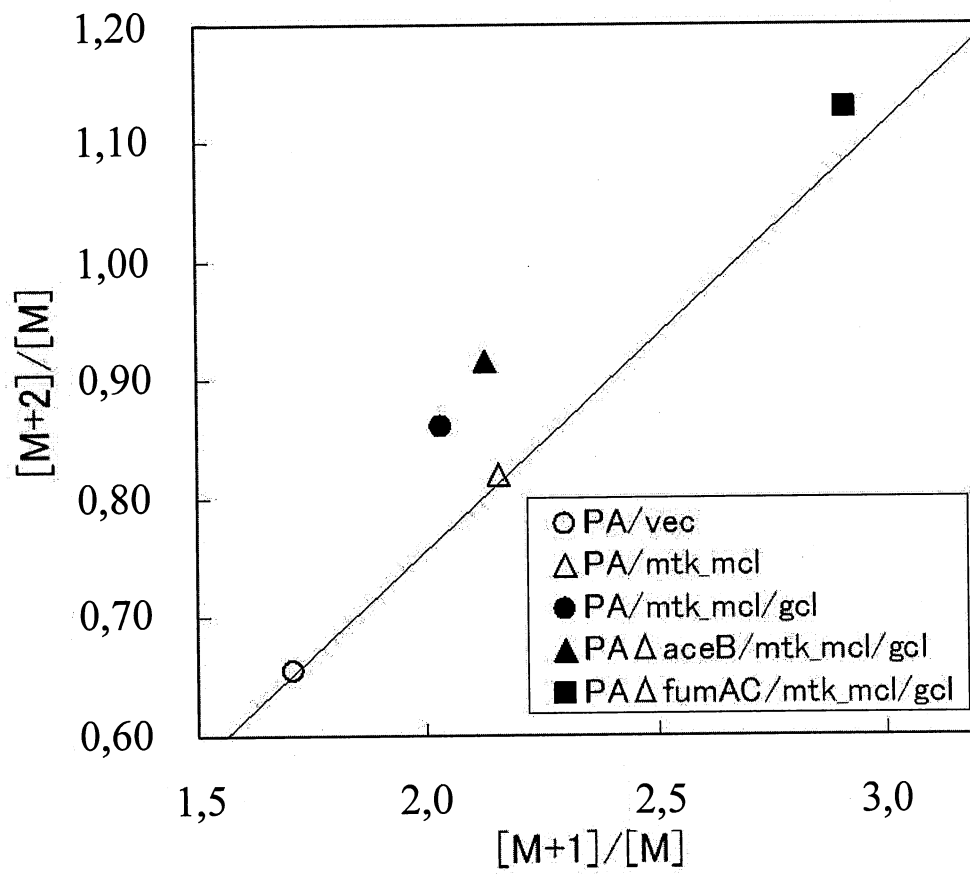
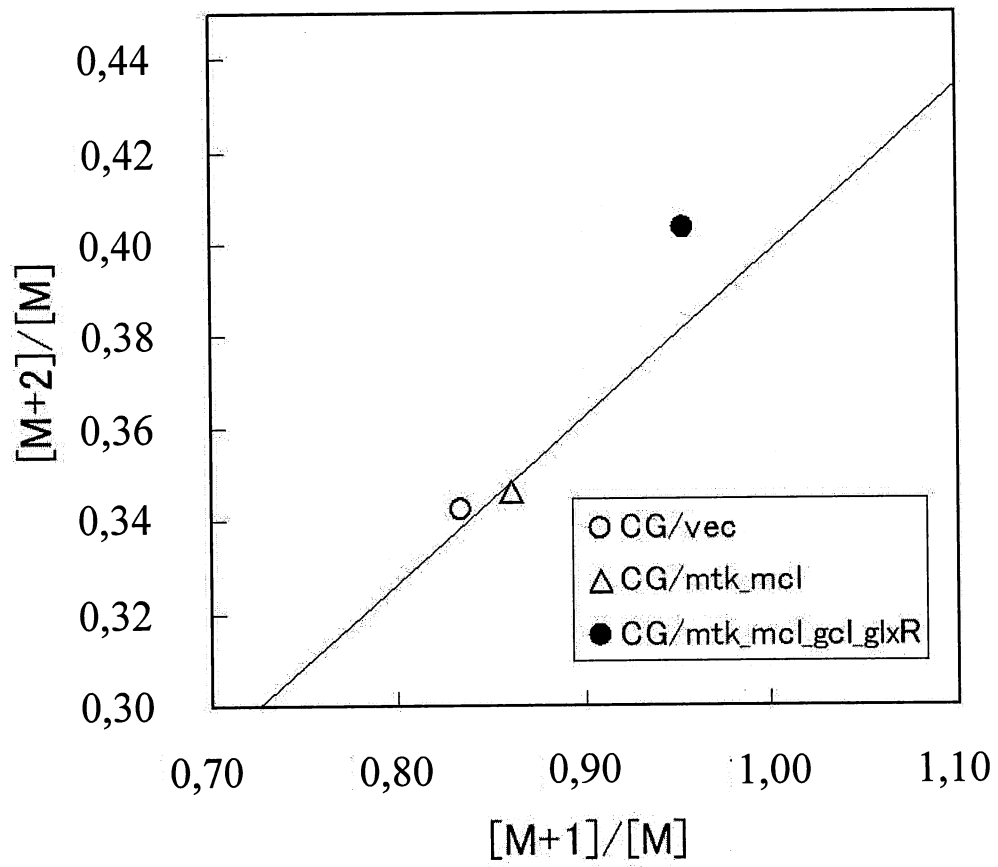


FIG.5



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Mitsui Chemicals, Inc.

<120> Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA và phương pháp sản xuất axetyl-CoA bằng cách sử dụng vi sinh vật này

<130> P0011000634

<140> PCT/JP2012/069247

<141> 2012-07-27

<150> JP2011-167808

<151> 2011-07-29

<160> 191

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 1

cgctcaattg caatgattga cacgattccg

30

<210> 2

<211> 32

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 2

acagaattcg ctatttggtta gtgaataaaa gg

32

<210> 3

<211> 50

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 3

cgaattcgct ggtggaacat atgaaaacaa aattgatgac attacaagac

50

<210> 4

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 4
 gcggtacctt atttgctctc ctgtgaaacg 30

 <210> 5
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 5
 gctctagatg ctgaaatcca ctagtcttgt c 31

 <210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 6
 tactgcagcg ttccagcacc ttatcaacc 29

 <210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 7
 ggtctagagc aatgattgac acgattccg 29

 <210> 8
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 8
 caggaattcg ctatatctgg ctctgcacg 29

 <210> 9
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 9
 cagtctagag caatactctt ctgattttga g 31

 <210> 10
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 10
 cagtctagat catcgatcgat atgtagggc 29

 <210> 11
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 11
 gacctgcaga tcatccgtca gctgtacgc 29

 <210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 12
 ggaattcggg tcaattttca ccctctatc 29

 <210> 13
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 13
 gtgggccgtc ctgaaggtac aaaagagata gattctc 37

 <210> 14
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 14
 ctctttttgta ccttcaggac ggcccacaaa tttgaag 37

 <210> 15
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 15
 ggaattccca gccccgcaag gccgatggc 29

 <210> 16
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 16
 cgccatatga atggcgcggc ggggccggtg g 31

 <210> 17
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 17
 tggagctctg tttactcctg tcaggggg 28

 <210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 18
 tggagctctc tgatttaatc aacaataaaa ttg 33

 <210> 19
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 19
 cgggatccac caccataacc aaacgacgg 29

 <210> 20
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 20
 ggaattcgac catcgcttac ggtcaattg 29

 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 21
 gagcggcaag aaagactttc tccagtgatg ttg 33

 <210> 22
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 22
 ggagaaagtc tttcttgccg ctccccctgca ac 32

 <210> 23
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 23
 ggaattcttt agcaaattggc tttcttc 27

 <210> 24
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 24
 ggaattcatt cagctgttgc gcatcgattc 30

 <210> 25
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 25
 cgggtgttgt tgccgtgcag ctctctgtca tggatc 36

 <210> 26
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 26
 ggagctgcac ggcaacaaca accgttgctg actg 34

 <210> 27
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 27
 ggaattccag gcaggtatca ataaataac 29

 <210> 28
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 28
 ggaattccag gagaaagggc tggcacggg 29

 <210> 29
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 29
 ctttttttgac gctatgttta tctcctcggt ttcgc 35

 <210> 30
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 30
 gagataaaca tagcgtcaaa aaagccccgg c 31

 <210> 31
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

 <220>
 <223> nhân tạo

 <400> 31
 ggaattccgt ccatcattgc taccagcc 28

 <210> 32
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

 <220>
 <223> nhân tạo

 <400> 32
 cgccatatga tcgccagcgc gcgggatttt tc 32

 <210> 33
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

 <220>
 <223> nhân tạo

 <400> 33
 cgagctctgt tctctcactt actgcctgg 29

 <210> 34
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> nhân tạo

<400> 34
 atgagctctc tgcaacatac aggtgcag 28

<210> 35
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> nhân tạo

<400> 35
 cgggatccac tacgcgcacg atggtcaag 29

<210> 36
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> nhân tạo

<400> 36
 cgagctacat atgcaatgat tgacacgatt ccg 33

<210> 37
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> nhân tạo

<400> 37
 cgcgcgcacg ctatttggtta gtgaataaaa gg 32

<210> 38
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mới

<400> 38
 aatatgcatg ctggtggaac atatgaaagg ttttgcaatg ctagg 45

<210> 39
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 39

 <400> 39
 acgcgtcgac ttataatata actactgctt taattaagtc 40

 <210> 40
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 40

 <400> 40
 acgcgtcgac gctggtggaa catatgttaa aggatgaagt aattaaacaa attagc 56

 <210> 41
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi

 <400> 41
 gctctagagg taccttactt aagataatca tatataactt cagc 44

 <210> 42
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 44

 <400> 42
 gctctagacg gagaaagtct tatggcggta acgcaaacag cccagg 46

 <210> 43
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 45

 <400> 43
 cgggatcccg gagaaagtct tatgaagcaa acagtttata tcgcc 45

 <210> 44
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 46

 <400> 44
 ccgctcgagc atatgctgtc gcaatgattg acacg 35

 <210> 45
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 47

 <400> 45
 gctattccat atgcagggtt attgtctcat gacg 34

 <210> 46
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 48

 <400> 46
 tcggcacgta agagggtcc 19

 <210> 47
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 49

 <400> 47
 cgggtcgaat ttgctttcg 19

 <210> 48
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 50

 <400> 48
 ctagatctga cagtaagacg ggtaagcc 28

 <210> 49
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 51

 <400> 49
 ctagatctca gggttattgt ctcattgagc 29

 <210> 50
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 52

 <400> 50
 ccgctcgagc atatgctgtc gcaatgattg acacg 35

 <210> 51
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 53

 <400> 51
 gctattccat atgcagggtt attgtctcat gacg 34

 <210> 52
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 54

 <400> 52
 aaaaggcgga attcacaaaa aggataaaac aatggacgtt cacgagtacc aagcc 55

 <210> 53
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 55

 <400> 53
 catgcctgca ggtcgactct agaggcgagg ttctttttcc ggactc 46

 <210> 54
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 56

 <400> 54
 ggatcctcta gactggtgga atatatgagc ttcaccctga tccagcag 48

 <210> 55
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 57

 <400> 55
 ggcatgcaag cttttacttt ccgcccacgc cgtc 34

 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 58

 <400> 56
 atgaccgtca cgcctcacct 20

 <210> 57
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 59

 <400> 57
 gaagcggccg gcatccgaga agccggtctg gat 33

 <210> 58
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 60

 <400> 58
 ggaattcaca aaaaggataa aacaatgagc tacacgcttt acccg 45

 <210> 59
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 61

<400> 59

gctctagatt acgcgacttt cttacgctgg ttg

33

<210> 60

<211> 963

<212> ADN

<213> Hyphomicrobium methylovorum

<400> 60

atgagctaca cgctttaccc gacccgcaag cagcgcctgc agcgctcgta cctcgagtg 60

ccgggctcca acccgagcat gatcgatcgc gcactcaaga gcgcagccga ctatgtgttt 120

ctcgattgog aagacgccgt cgcgcgccc gagaaagaac aggctcgcaa gaacatcatt 180

caggcgctga acgatctcga ctggaagggc gcaggcaaga gcgtctcggg tcgcatcaac 240

ggcctcgaca cgcactacat gtaccgcgac gttgtcgaca tcgtggagca ggctggctcc 300

aagctcgaca cgatcctcat tcccaaggtc ggcgttccgg ctgacgtcta cagggtcgaa 360

tgcacgtgga gccagatcga agtcgcgaag ggtcttccgc accagatcgg caccgaagcg 420

ctcatcgaaa cgccgctcgg catggcaaac gtcgaagcca tcgcgtcggc aagcagccgc 480

ctcgagtcca tgcacttcgg cgttgctgac tactccgcct tcaacaaggc acgcaccgtc 540

gtcatcggcg gcttgaaccc tgattaccgc ggtgaccagt ggcacttccc gctgtcgcgt 600

atgaccgttg cctgccgcgc attcggcctt cgtccgatcg acggcccgtt cgggtggcatc 660

gacgatccgg aaggctacaa ggccgccgct cgccgtggcg ctgctctcgg catggaaggc 720

aagtgggcca tccatccgtc gcagatcgaa ctgcgcaacg aaatctattc gccgacggcg 780

aaggaagtgc aacgcgctga acgcatcctc gttgcaactga aggaagctga agctcaaggt 840

aagggcgag cgctcgttga cggcaagatg atcgacgccg catctgaaaa gatggcgcg 900

aacctgctct cgactgccga gcagatcaag aaggccgagg ccgctcacgc agctcagaag 960

aaa 963

<210> 61

<211> 1161

<212> ADN

<213> Hyphomicrobium methylovorum

<400> 61

atggacgttc acgagtatca ggccaaagag cttctcgcga agttcggcgt gccgatcgcg 60

cgcgggcgggc ttgcttacag cccggagcag gcaacatatc gtgcaagcga gcttggcggc 120

accgtcgtcg tcaaggcgca gattcactct ggcgcgcgcg gcaaagctgg cggcgtcaaa 180

gtctgcaaga acgagaaaga gatcgaagac gcggctgagt tcatgctcgg ccgcaagctg 240
 gtcacgcatac agaccggccc ggcgggcaag ctctgtctcgc gtctttacat cgaagaagcg 300
 accaacatcg atcgcgagat ctatctcggc ttcgtgatgg atcgcgcctc cgagcgtatc 360
 gtcgtcgttg catccgccgc tggcggcatac gacatcgagg aaatctctgc gagccagccc 420
 gacacgatca tccgcgtgag cgttgatccg gccgtcggca tgcagcagtt ccaggcgcgt 480
 gaactcgcgt tcggtctcgg cgtcgatccg gagatcgtca acaagctcgt tccggcgatc 540
 atgggatgct accgcgcatt ccgcgatctc gacgcgacca tggttgaggt caaccgcctc 600
 gtcataacca aggaaaagca ggttctcgcg ctcgacgcta agatgtcgtt cgatgacaac 660
 gcgctgttcc gccgtccgca catcgcagag ctgcgggaca agagccagga agaccgcgc 720
 gaaacctacg cgtcggatcg tggcctctcc tacgttggtc tcgatggcga catcggctgc 780
 atcgtcaacg gcgcaggtct cgccatggcg acgctcgaca tgatcaagct cgcaggcgg 840
 gagccggcga acttcctcga cattggcggc ggagcgtctc cggaacgcgt caccaagtcg 900
 ttcaaggctg ttcttcgcga caagaacgtc aaggcgatcc tcgtgaacgt cttcgccggt 960
 atcaaccgtt gcgactgggt tgccaagggc gtggctgatg ccgtgaagga actcgagatc 1020
 aagatgccga tcgtcgttcg cctcgcaggc acgaacgtcg aagaaggccg caagatcatc 1080
 gacaacagcg gcttgaccgt catcagtga gatactctcg ctgacgcggc caagcaggcc 1140
 gtcgacgctg cgaaaaaagc g 1161

<210> 62

<211> 897

<212> ADN

<213> Hyphomicrobium methylovorum

<400> 62

atggctatct tcatcaatga aaagacgccg atcctgatcc agggcttcac cggacgtatc 60
 ggcacctttc acgctcaaga aatgatcgac tacggctcca atgttgtcgg cgggtgttacg 120
 cccggcaaag gcggtacctc gcacctcggc cgtccgggtg tcaacaccgt gaagggcgcg 180
 gccgatgaaa cggcgccga agcctcgatc gtattcgtgc cgccgccgtt cgcggcggac 240
 gcgatcatgg aagcagcaga cgctggcatac aaatactgcg tctgcatcac ggacggcatt 300
 cctgctcagg atatgatccg cgtgaagcgc tacatgcgcc gctacaagaa agagagccgc 360
 atggtttctca cgggcccga ctgcgcggc acgatctcgc ccggaaggc gatgctcggc 420
 attatgccgg gacacatctt cttccgggt cgcgtcggca tcgtcggacg ctccggcacg 480
 ctgggctatg aagccgcagc gcagctcaag gcgctgggca tcggcgtttc gacctcggtc 540
 ggtatcggcg gcgatccgat caacggttcg tcgcatcgtg acattctcga agcgttcgag 600

agcgatcccg agaccgatgc ggtgctcatg atcggtgaaa tcggcggacc gcaggaagcg 660
gaagccggtc tcttcgcgaa agagcacatg aagaagccgg tcatcgcta catcgagggc 720
ctttcggcac cgaagggctg ccgcatgggc cacgcaggcg ctatcgtttc ggcattcggc 780
gaatcggccg ctgagaaggt cgagatcctg aaaggctgca acgtgacgat cgccgcgacg 840
ccgtcggaga tgggttcgac ggtcgcgcag gttctcaacc agcgtaagaa agtcgcg 897

<210> 63
<211> 2105
<212> ADN
<213> Rhizobium sp. NGR234

<400> 63
catatggaca ttcacgaata tcaagcgaaa gaactgctga gccgttatca aattcacatc 60
ccgcgtggtg gtctggccta ctccccgaa caagctgcct atcgtgcacg cgaaatcggc 120
ggtgatcgct gggtggttaa agctcagatt catagcggcg cacgtggcaa agctggcggc 180
atcaaactgt gctctaccga tcacgaaatt gttgaagcgg ccgacagtat gctgggccgc 240
accatcgtga cgcacgagac cggtcgcgaa ggcaaactgg tttctcgcct gtatgtcgaa 300
gaagcgatgg atattgcccg tgaaatttac atcggttttg ttctggaccg taaaagttaa 360
cgcattatga tcgtcgcgag ctctagtggc ggtatggaaa ttgaagaaat cgcagaagct 420
gaaccggata gcattatccg cgccacggcg gatccgggtg ttggcatgca ggactttcaa 480
gcacgtgaaa ttgctttcgg tctgggcatc gataacgcgc tgattggccg cgccacccaa 540
acgctgctgg gttgttatcg tgcattcggt gattacgacg cttctatgct ggaaattaac 600
ccgctggctg tgaccgcgcg cggatgctg gtggcgctgg acgccaaaat gtcgtttgat 660
gaaaatgcac tgttcgcgcg cccgcacatc gctgaaatgc gcgataaaag ccaggaagac 720
caacgcgaaa cgtatgcac cgatcgtggt ctgtcatagc ttggtctgga cggcaacatt 780
ggttgcatc tcaatgggtg cggcctggcg atggccacca tggatatgat taaaatcgca 840
ggcgggtaac cggctaattt tctggatcgc ggcgggtggcg catcgccgga ccgtgtcgca 900
aaaagcttcc gcgccgtgct gacggatcgt cagggtgaaa ccattctggt taacatcttt 960
gcgggcatta atcgttgtga ctgggtcgcg gaaggcgtga tcaaagcact gctgaagtg 1020
ggtgttcggg tcccgcgtgt tgtccgtctg tccggtacga acatggaaga aggtcgtcgc 1080
attctggcgg aatcaggtga aaatattatc gtggccgaaa ccctggcaga agctgctgat 1140
aaagcagtgg ctgcgtggcg ttcgttcacc gctaataaag ctgcgtaagg tcgcctccca 1200
tgtccattct gctggataaa aataccctg tgatcgtgca aggctttacc ggcaaaatcg 1260

gctcattcca tgctgaagat atgaaacgct acggcaccaa cgtgggtggc ggtggttacgc 1320
 cgggcaaagg cggtcaggca catctgggta tgccgggtgt taataccgtt aaaggcgcg 1380
 tccaagaaac ggggtgcggat gccagtatta tctttgtccc gccgccgttc gcggccgatt 1440
 ccattatgga agcagctgac gcgggcatcc gtctgtgcgt gtgtattacc gatggtatcc 1500
 cgagtcagga catgattcgt gttaaacgct atatgcgtcg ctaccgtttc gaagaccgca 1560
 tgaccctgat tgggtccgaac tgcgcaggca tgatcacgcc ggggtgaagct atgatgggta 1620
 ttatgccggg ctctatctat ctgccggggc gtattggtat cgttggtcgt agcggtagcc 1680
 tgggttacga agcagcctct caaatgaaag cgctgggcgt cgggtgtgagt acgtccattg 1740
 gcatcggcgg tgatccggtc aatggtagct cttttaaaga catgctggaa ctgttcgaaa 1800
 aagatccggg caccgacgcc gtgctgatga ttgggtgaaat cggcgggtccg caggaagcgg 1860
 aagcagctct gtgggcccgc gatcacatga aaaaaccgct gatcgcgtat atcgcaggtc 1920
 tgtcagcacc gaaaggctcg cgcattgggtc acgcaggcgc tattatctca gcatttggcg 1980
 aatcggtcga agaaaaagtg gaaattctga aatcggcagg tgttacgata gtcccgaacc 2040
 cgtcctcttt tgggtgaaacc gttgcggatg tgctgtcggc tatgagtaaa gcggcttaat 2100
 ctaga 2105

<210> 64
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 66

<400> 64
 ggaattccat atggcaaaag cgtcacgcct 30

<210> 65
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 67

<400> 65
 gctctagact atatcaccgc ctttgaacg 29

<210> 66
 <211> 975
 <212> ADN
 <213> Methylobacterium extorquens

<400> 66

atgagcttca ccctgatcca gcaggccacc ccgcgcctgc accgctcgga actcgcggtt	60
cccggctcca acccgacctt catggagaag tcggctgcct cgaaggccga cgtgatcttc	120
ctcgacctcg aggacgcggt cgcgcccgc gacaaggagc aggcccgcaa gaacatcatc	180
caggctctta acgacctgga ttggggcaac aagaccatga tgatccgcat caacgggtctc	240
gacacccact acatgtaccg cgacgtggtg gacatcgtgg aggcctgccc gcgcctcgac	300
atgatcctga tccccaaagg cggcgtgccc gccgacgtct acgccatcga cgtgctgacg	360
acgcagatcg agcaggccaa gaagcgcgag aagaagatcg gcttcgaggt gctgatcgag	420
accgcgctcg gcatggccaa tgtcgaggcg atcgcgacct cgtccaagcg cctcgaggcg	480
atgtccttcg gtgtcgccga ctacgcgcgc tccactcgcg ccgctccac cgtgatcggc	540
ggcgtcaacg ccgattacag cgtgctcacc gacaaggacg aggcgggcaa ccgccagacc	600
cactggcagg atccgtggct gttcgcccag aaccgcatgc tggtcgcctg ccgcgcctac	660
ggcctgcgcc cgatcgacgg tcccttcggc gacttctccg atccggacgg ctacacctcg	720
gccgctcgcc gctgcgccgc gctcggttc gagggcaagt gggcgatcca cccctcgag	780
atcgatctgg ccaacgaggt gttcaccccc tccgaggccg aggtcaccaa ggcccgcgcg	840
atcctggaag ccatggaaga ggccgccaag gccggccgcg gcgccgtctc gctcgacggc	900
cgcctcatcg acatcgctc gatccgcatg gccgaggcgc tgatccagaa ggccgacgcg	960
atgggcggga agtaa	975

<210> 67

<211> 891

<212> ADN

<213> *Methylobacterium extorquens*

<400> 67

atgagcattc tcatcgacga gaagacccc atcctggtcc agggcatcac gggcgacaag	60
ggcaccttcc acgccaagga gatgatcgcc tacggctcga acgtcgtcgg cggcgtcacc	120
ccgggcaagg gcggcaagac ccattgcggc gtgccggtgt tcaacaccgt caaggaggcc	180
gtggaggcga ccggcgccac cacctcgatc accttcgtgg cccccctt cgcggcggac	240
gcgatcatgg aggcggccga cgccggcctc aagctcgtct gctcgatcac cgacggcatc	300
cccgtcagg acatgatgcg ggtgaaacgc tacctccggc gctatccgaa ggagaagcgc	360
acgatggtgg tgggcccga ctgcgcgggc atcatctcgc ccggcaagtc gatgctcggc	420
atcatgcccg gccacatcta cctcccgggc aaggtcggcg tcatctcccg ttccggcacg	480
ctgggctacg aggcgcgcgc gcagatgaag gagctcggca tcggcatctc gacctccgtc	540

ggcatcggcg gcgatccgat caacggctcc tccttcctcg accacctcgc tctgttcgag 600
caggatcccc agacggaagc cgtgctgatg atcggcgaga tcggcgggcc gcaggaggcc 660
gaggcctcgg cctggatcaa ggagaacttt tccaagcccc tgatcggctt cgtggcgggc 720
ctcaccgccc ccaagggccg ccgcatgggg catgccggcg cgatcatctc ggcgaccggc 780
gacagcgccg cggagaaggc cgagatcatg cgctcctatg gcctgaccgt ggcgcccgat 840
ccgggctcct tcggcagcac cgtggccgac gtgctcgccc gcgcggcgta a 891

<210> 68
<211> 1173
<212> ADN
<213> *Methylobacterium extorquens*

<400> 68
atggacgttc acgagtacca agccaaggag ctgctcgcca gcttcggggg cgccgtcccc 60
aagggcgccg tggctttcag cccggatcaa gcggtctatg cggcgaccga gctcggcggc 120
tcgttctggg cgggtgaaggc tcagatccat gccggcgcg cgggcaaggc gggcgggata 180
aagctttgcc gcacctata tgaagtgcgc gacgccgccc gcgacctgct gggaaaacgc 240
ctcgtgacgc tccagaccgg ccccgagggc aagccggtgc agcgcgtcta cgtcgagacc 300
gccgaccgtc tcgagcgtga actctatctc ggctacgtgc tcgatcggaa ggcgagcg 360
gtccgtgtca tcgcctccca gcgcggcggc atggatatcg aggagatcgc cgccaaggag 420
cccgagggcg tgatccaggt cgtggtcgag ccggcggtgg gcctgcagca gttccaggcc 480
cgcgagatcg cgttccagct cggcctcaac atcaagcagg tctcggccgc ggtgaagacc 540
atcatgaacg cctaccgggc gttccgcgac tgcgacggca ccatgctgga gatcaacccg 600
ctcgtcgtca ccaaggacga ccgggttctg gactcgcgc ccaagatgtc cttcgacgac 660
aacgccctgt tccgcgcgg caacatcgcg gacatgcacg atccatcgca ggcgatccc 720
cgcgaggccc aggctgccga gcacaatctc agctatatcg gcctcgaggg cgaaattggc 780
tgcatcgtca acggcgcggg tctggccatg gcgaccatgg acatgatcaa gcacgcgggc 840
ggcgagccgg caaacttcct ggatgtgggc ggcggtgcca gcccgaccg cgtcgccacg 900
gccttcgcgc tcgttctgtc ggaccgcaac gtgaaggcga tcctcgtcaa catcttcgcc 960
ggcatcaacc gctgcgactg ggtcgcgag ggcgtggtca aggcgcgcg cgaggtgaag 1020
atcgacgtgc cgctcatcgt gcggctcgcc ggcacgaacg tcgatgaagg caagaagatc 1080
ctcgccgaga gcgggctcga cctcatcacc gccgacccc ttacggaagc cgcgcgcaag 1140
gctgtcgaag cctgccacgg cgccaagcac tga 1173

<210> 69
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Methylobacterium extorquens

<400> 69

Met Ser Phe Thr Leu Ile Gln Gln Ala Thr Pro Arg Leu His Arg Ser
 1 5 10 15

Glu Leu Ala Val Pro Gly Ser Asn Pro Thr Phe Met Glu Lys Ser Ala
 20 25 30

Ala Ser Lys Ala Asp Val Ile Phe Leu Asp Leu Glu Asp Ala Val Ala
 35 40 45

Pro Asp Asp Lys Glu Gln Ala Arg Lys Asn Ile Ile Gln Ala Leu Asn
 50 55 60

Asp Leu Asp Trp Gly Asn Lys Thr Met Met Ile Arg Ile Asn Gly Leu
 65 70 75 80

Asp Thr His Tyr Met Tyr Arg Asp Val Val Asp Ile Val Glu Ala Cys
 85 90 95

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

Val Tyr Ala Ile Asp Val Leu Thr Thr Gln Ile Glu Gln Ala Lys Lys
 115 120 125

Arg Glu Lys Lys Ile Gly Phe Glu Val Leu Ile Glu Thr Ala Leu Gly
 130 135 140

Met Ala Asn Val Glu Ala Ile Ala Thr Ser Ser Lys Arg Leu Glu Ala
 145 150 155 160

Met Ser Phe Gly Val Ala Asp Tyr Ala Ala Ser Thr Arg Ala Arg Ser
 165 170 175

Thr Val Ile Gly Gly Val Asn Ala Asp Tyr Ser Val Leu Thr Asp Lys
 180 185 190

Asp Glu Ala Gly Asn Arg Gln Thr His Trp Gln Asp Pro Trp Leu Phe
 195 200 205

Ala Gln Asn Arg Met Leu Val Ala Cys Arg Ala Tyr Gly Leu Arg Pro

210 215 220
 Ile Asp Gly Pro Phe Gly Asp Phe Ser Asp Pro Asp Gly Tyr Thr Ser
 225 230 235 240
 Ala Ala Arg Arg Cys Ala Ala Leu Gly Phe Glu Gly Lys Trp Ala Ile
 245 250 255
 His Pro Ser Gln Ile Asp Leu Ala Asn Glu Val Phe Thr Pro Ser Glu
 260 265 270
 Ala Glu Val Thr Lys Ala Arg Arg Ile Leu Glu Ala Met Glu Glu Ala
 275 280 285
 Ala Lys Ala Gly Arg Gly Ala Val Ser Leu Asp Gly Arg Leu Ile Asp
 290 295 300
 Ile Ala Ser Ile Arg Met Ala Glu Ala Leu Ile Gln Lys Ala Asp Ala
 305 310 315 320
 Met Gly Gly Lys

<210> 70
 <211> 296
 <212> PRT
 <213> Methylobacterium extorquens

<400> 70

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

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

Arg Arg Tyr Pro Lys Glu Lys Arg Thr Met Val Val Gly Pro Asn Cys
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Asp Val Leu Ala Arg Ala Ala
 290 295

<210> 71
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Methylobacterium extorquens
 <400> 71

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys His Gly Ala Lys His
385 390

```
<210> 72
<211> 321
<212> PRT
<213> Hyphomicrobium methylovorum
```

<400> 72

Met Ser Tyr Thr Leu Tyr Pro Thr Arg Lys Gln Arg Leu Gln Arg Ser
1 5 10 15

Tyr Leu Ala Val Pro Gly Ser Asn Pro Ser Met Ile Asp Arg Ala Leu
20 25 30

Lys Ser Ala Ala Asp Tyr Val Phe Leu Asp Cys Glu Asp Ala Val Ala
35 40 45

Pro Pro Glu Lys Glu Gln Ala Arg Lys Asn Ile Ile Gln Ala Leu Asn
 50 55 60

Asp Leu Asp Trp Lys Gly Ala Gly Lys Ser Val Ser Val Arg Ile Asn
 65 70 75 80

Gly Leu Asp Thr His Tyr Met Tyr Arg Asp Val Val Asp Ile Val Glu
 85 90 95

Gln Ala Gly Ser Lys Leu Asp Thr Ile Leu Ile Pro Lys Val Gly Val
 100 105 110

Pro Ala Asp Val Tyr Thr Val Glu Cys Ile Val Ser Gln Ile Glu Val
 115 120 125

Ala Lys Gly Leu Pro His Gln Ile Gly Thr Glu Ala Leu Ile Glu Thr
 130 135 140

Pro Leu Gly Met Ala Asn Val Glu Ala Ile Ala Ser Ala Ser Ser Arg
 145 150 155 160

Leu Glu Ser Met His Phe Gly Val Ala Asp Tyr Ser Ala Phe Asn Lys
 165 170 175

Ala Arg Thr Val Val Ile Gly Gly Leu Asn Pro Asp Tyr Pro Gly Asp
 180 185 190

Gln Trp His Phe Pro Leu Ser Arg Met Thr Val Ala Cys Arg Ala Phe
 195 200 205

Gly Leu Arg Pro Ile Asp Gly Pro Phe Gly Gly Ile Asp Asp Pro Glu
 210 215 220

Gly Tyr Lys Ala Ala Ala Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly Met Glu Gly
 225 230 235 240

Lys Trp Ala Ile His Pro Ser Gln Ile Glu Leu Ala Asn Glu Ile Tyr
 245 250 255

Ser Pro Thr Ala Lys Glu Val Glu Arg Ala Glu Arg Ile Leu Val Ala
 260 265 270

Leu Lys Glu Ala Glu Ala Gln Gly Lys Gly Ala Ala Ser Leu Asp Gly
 275 280 285

Lys Met Ile Asp Ala Ala Ser Glu Lys Met Ala Arg Asn Leu Leu Ser
 290 295 300

Thr Ala Glu Gln Ile Lys Lys Ala Glu Ala Ala His Ala Ala Gln Lys
 305 310 315 320

Lys

<210> 73
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> Hyphomicrobium methylovorum

<400> 73

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

Val Pro Ile Ala Arg Gly Gly Leu Ala Tyr Ser Pro Glu Gln Ala Thr
 20 25 30

Tyr Arg Ala Ser Glu Leu Gly Gly Thr Val Val Val Lys Ala Gln Ile
 35 40 45

His Ser Gly Ala Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Cys Lys Asn
 50 55 60

Glu Lys Glu Ile Glu Asp Ala Ala Glu Phe Met Leu Gly Arg Lys Leu
 65 70 75 80

Val Thr His Gln Thr Gly Pro Ala Gly Lys Leu Val Ser Arg Leu Tyr
 85 90 95

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

Met Asp Arg Ala Ser Glu Arg Ile Val Val Val Ala Ser Ala Ala Gly
 115 120 125

Gly Met Asp Ile Glu Glu Ile Ser Ala Ser Gln Pro Asp Thr Ile Ile
 130 135 140

Arg Val Ser Val Asp Pro Ala Val Gly Met Gln Gln Phe Gln Ala Arg
 145 150 155 160

Glu Leu Ala Phe Gly Leu Gly Val Asp Pro Glu Ile Val Asn Lys Leu

<210> 74

<211> 299

<212> PRT

<213> Hyphomicrobium methylovorum

<400> 74

Met Ala Ile Phe Ile Asn Glu Lys Thr Pro Ile Leu Ile Gln Gly Phe
 1 5 10 15

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

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

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

Gly Ala Glu Ala Ser Ile Val Phe Val Pro Pro Pro Phe Ala Ala Asp
 65 70 75 80

Ala Ile Met Glu Ala Ala Asp Ala Gly Ile Lys Tyr Cys Val Cys Ile
 85 90 95

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

Arg Arg Tyr Lys Lys Glu Ser Arg Met Val Leu Thr Gly Pro Asn Cys
 115 120 125

Ala Gly Thr Ile Ser Pro Gly Lys Ala Met Leu Gly Ile Met Pro Gly
 130 135 140

His Ile Phe Leu Pro Gly Arg Val Gly Ile Val Gly Arg Ser Gly Thr
 145 150 155 160

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

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

Arg Asp Ile Leu Glu Ala Phe Glu Ser Asp Pro Glu Thr Asp Ala Val
 195 200 205

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

Phe Ala Lys Glu His Met Lys Lys Pro Val Ile Ala Tyr Ile Ala Gly
 225 230 235 240

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

Ser Ala Phe Gly Glu Ser Ala Ala Glu Lys Val Glu Ile Leu Lys Gly
 260 265 270

Cys Asn Val Thr Ile Ala Ala Thr Pro Ser Glu Met Gly Ser Thr Val
 275 280 285

Ala Gln Val Leu Asn Gln Arg Lys Lys Val Ala
 290 295

<210> 75
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> Rhizobium sp.

<400> 75

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

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

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

Leu Gly Met Pro Val Phe Asn Thr Val Lys Gly Ala Val Gln Glu Thr
 50 55 60

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

Ser Ile Met Glu Ala Ala Asp Ala Gly Ile Arg Leu Cys Val Cys Ile
 85 90 95

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

Arg Arg Tyr Arg Phe Glu Asp Arg Met Thr Leu Ile Gly Pro Asn Cys
 115 120 125

Ala Gly Met Ile Thr Pro Gly Glu Ala Met Met Gly Ile Met Pro Gly
 130 135 140

Ser Ile Tyr Leu Pro Gly Arg Ile Gly Ile Val Gly Arg Ser Gly Thr
 145 150 155 160

Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Ser Gln Met Lys Ala Leu Gly Val Gly Val
 165 170 175

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

Lys Asp Met Leu Glu Leu Phe Glu Lys Asp Pro Gly Thr Asp Ala Val
 195 200 205

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

Trp Ala Arg Asp His Met Lys Lys Pro Leu Ile Ala Tyr Ile Ala Gly
 225 230 235 240

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

Ser Ala Phe Gly Glu Ser Ala Gln Glu Lys Val Glu Ile Leu Lys Ser
 260 265 270

Ala Gly Val Thr Ile Val Pro Thr Pro Ser Ser Phe Gly Glu Thr Val
 275 280 285

Ala Asp Val Leu Ser Ala Met Ser Lys Ala Ala
 290 295

<210> 76
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Rhizobium sp.

<400> 76

Met Asp Ile His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Ser Arg Tyr Gln
 1 5 10 15

Ile His Ile Pro Arg Gly Gly Leu Ala Tyr Ser Pro Glu Gln Ala Ala
 20 25 30

Tyr Arg Ala Arg Glu Ile Gly Gly Asp Arg Trp Val Val Lys Ala Gln
 35 40 45

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

Thr Asp His Glu Ile Val Glu Ala Ala Asp Ser Met Leu Gly Arg Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Val Glu Glu Ala Met Asp Ile Ala Arg Glu Ile Tyr Ile Gly Phe
 100 105 110

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

Gly Gly Met Glu Ile Glu Glu Ile Ala Glu Ala Glu Pro Asp Ser Ile
 130 135 140

Ile Arg Ala Thr Val Asp Pro Gly Val Gly Met Gln Asp Phe Gln Ala
 145 150 155 160

Arg Glu Ile Ala Phe Gly Leu Gly Ile Asp Asn Ala Leu Ile Gly Arg
 165 170 175

Ala Thr Gln Thr Leu Leu Gly Cys Tyr Arg Ala Phe Val Asp Tyr Asp
 180 185 190

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

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

Arg Arg Pro His Ile Ala Glu Met Arg Asp Lys Ser Gln Glu Asp Gln
 225 230 235 240

Arg Glu Thr Tyr Ala Ser Asp Arg Gly Leu Ser Tyr Val Gly Leu Asp
 245 250 255

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

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

Ile Gly Gly Gly Ala Ser Pro Asp Arg Val Ala Lys Ser Phe Arg Ala
 290 295 300

Val Leu Thr Asp Arg Gln Val Glu Thr Ile Leu Val Asn Ile Phe Ala
 305 310 315 320

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

Arg Glu Val Gly Val Pro Val Pro Leu Val Val Arg Leu Ser Gly Thr
 340 345 350

Asn Met Glu Glu Gly Arg Arg Ile Leu Ala Glu Ser Gly Glu Asn Ile
 355 360 365

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

Trp Arg Ser Phe Thr Ala Asn Lys Ala Ala
 385 390

<210> 77
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 77
 ccctgaggag ggtccaagag atggacgtcc atgagtacca

40

<210> 78
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 78
 gctctagatc aggctgcctg acgccc

27

<210> 79
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 79

ggaattcaca aaaaggataa aa

22

<210> 80

<211> 40

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 80

tgggtactcat ggacgtccat ctcttggacc ctccctcaggg

40

<210> 81

<211> 897

<212> ADN

<213> Granulibacter bethesdensis

<400> 81

atgagcattc tgatcaataa gcagaccaag atcatcattc agggcttcac cggcgacaag

60

ggcaggttcc acggtcgcga gatgatcgat tacggcacca atgtcgtcgg tggcgtgacg

120

cccggtaaag gcggccagac ccatctgggt cgtcccgtgt tcaacacgggt cgaggacgcg

180

gtgctgaaa ccggtgcca ggcgtcgatc acctttgtgg cacctgcctt ttgcgccgat

240

gcatcatgg aaggcgccga tgcggggctg gagctgatct gcaccatcac ggacggtatt

300

ccggcgagcgc atatgatgcg cgtgaagcgt tatctgcgcc gctaccagaa ggatcgtcgc

360

acgcgtctgg tggggccgaa ctgcgcgggc atcatcagcc cgggccaggc catgctgggc

420

atcatgccgg gccatatcta caaggaaggc catgtcggca ttgtttcccg ctcaggcacg

480

ctcggctatg aagccgccgc gcagctgaag gagctgggca tcggtgtgtc caccagtgtg

540

ggtatcgggtg gtgacccgat caatgggtct tccttccttg atcaccttca gctgttcgaa

600

gccgaccccc agactcatgc cgtgctgatg atcggcgaga tcggtggccc gcaggaagcc

660

gaagcggcga agtggatcag cgagaacatg tcgaagccgg tggttggcta cgttgccggc

720

ctgaccgctc cgaaggggag tcgtatgggc catgccggtg cgatcatctc tggcgaaggc

780

gacagcgccg ccgaaaagag cgagatcatg cgctcctacg gtctgacggt tgctcccagc

840

ccgggtgaac tcggctcgac cgttgccgcg gtgctggctg ggcgtcaggc agcctga

897

<210> 82

<211> 1170

<212> ADN

<213> Granulibacter bethesdensis

<400> 82

```

atggacgtcc atgagtacca ggcaaaagaa ttgcttgcca ggcgcggtgt ggccgtgccc      60
cgcggtgcaa tcgctttcag cgctgatcag gccgtgtatg ccgcgaccga actgggtggc      120
tggcactggg cggtgaaagc ccagattcat gccggtgcgc gcggcaaggc cggcggcatc      180
aagctgtgca agacgtatca tgaagtgcgc gaggtgctg ccggtatgct cggcaagcgt      240
ctggtcacgc atcagaccgg tccggaaggc aagcctgtcc agcgcgtgta tgtcgaggtc      300
gccgatccct tcgagaaaga attctatctg ggctttgtgc tggatcgtaa gctggagcgc      360
gtgcgtgtga tcgcctccgc cgagggcggc atggagatcg aggaaatcgc ttccaagcat      420
ccggaaaagc tgatccaggt gatcgtggag ccggcggttg gtcttcagca gttccaggcc      480
cgccagatcg cttcaagct gggcctgtcc agccgtcagg tacagcgtgc ggtgaccagc      540
atcatgggcg cttatcggc attccgcgat cagcagcga ccatgctgga aatcaatcct      600
ctggttctga ccaaggatga ccgtattctg gcgctcgatg cgaagatgag cttcgacgac      660
aacgccttgt tccgtcgcaa caacgtcgcc aacatgcatg acccctctca ggacgatccg      720
cgtgaggcgc aggctgccga gcacaacctc aactatgtgg gtctggaagg cgatatcggc      780
tgctgtgtga atggcgccgg cctggcgatg gcgaccatgg acgtcatcaa atatgcgggt      840
ggtgagcctg ccaacttcct cgatgtcggc ggcggggcaa gcccgcgagc taccgcgacg      900
gcgttccgtc tgggtgctgtc cgacaagaac gtgaagggtt ttctggtcaa catcttcgcc      960
ggcatcaacc gctgcgactg gatcgcgaa ggctgtgtgc acgcggtgaa agaagtcgat      1020
ctgaagcttc cgctgggtgt gcgtctggca ggcaccaatg tggaggaagg ccgccgtatt      1080
ctgaaagaaa gcggcatttc cgtcatcatg gccgaaagcc tgaccgaagc ggccgaaaag      1140
gccgtcgagg ccgcgaaggc cgcggcgtaa      1170

```

<210> 83

<211> 59

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 83

```

accaggaat tcacaaaaag gataaaacaa tgagctatac cctctaccca accgtaagc      59

```

<210> 84

<211> 43

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 84

gccccactcta gatcaggcaa cttttttctg cttgccgaga acc

43

<210> 85

<211> 963

<212> ADN

<213> *Hyphomicrobium denitrificans*

<400> 85

atgagctata ccctctaccc gaaccgtaag cagcgtctgc agcgttctta tctcgccgtg 60

ccgggctcca acccgacgat gatcgaccgc gccctcaaga gcgccgccga ctacgttttc 120

cttgattgcg aagacgccgt cgcgccgcc gagaaagagc aggctcgaa gaacatcatc 180

caggctctga acgatctcga ctggaagggc gcgggcaaga gcgtctcggt ccgcacaaac 240

ggcctcgaca cgcattattg ctaccgcgac gtcgtcgaca tgcgtcgagca ggctgggtgcc 300

aagctcgata cgatcctcat tccgaaggtc ggcgttccgg ccgacgtcta cgccatcgaa 360

agcttcgtca gccagatcga agtcgcgaag ggtctcccgc accagatcgg catggaagcc 420

ctcatcgaaa cgccgctcgg catggccaac gtcgaagcca tcgcgtctgc caacagccgc 480

cttgagtcga tgcacttcgg cgttgccgac tactccgcat tcaacaaggc ccgcaccgtc 540

gtcatcggcg gcttgaaccc cgactatccg ggtgaccagt ggcacttccc gctgtcgcgc 600

atgacggtcg cctgccgcgc attcgggtctc cgtccgatcg acggcccgtt cggcggcatc 660

gacgatccgg aaggctacaa ggccgctgcg cgccgtgggtg ccgctctcgg catggaaggc 720

aagtgggcga tccaccctc gcagatcgaa ctgcgcaacg aaatctactc tccgacggcg 780

aaggaaatcg aacgcgccga gcgcactctg gtcgcactca aggaagccga agcgcagggc 840

aagggcgag catcgctcga cggcaagatg atcgacgcgg catctgaaaa gatggcgaag 900

aacctgctgg tcacggcagc ggcgatcaag gcaggcgaag aagctcgcgc aaagagcaaa 960

taa 963

<210> 86

<211> 900

<212> ADN

<213> *Hyphomicrobium denitrificans*

<400> 86

atggcaatct ttatcaatga aaagacgccg atcctgatcc agggctttac cggtcgcatc 60

ggcacgttcc acgcccagga aatgatcgac tacggctcca acgtcggttg cggcgtgacg 120

cccggtaaag gcggcacctc gcatctcggc cgtccggtgt tcaacaccgt caagggcgcc 180

gtcgacgaga cgggcgctga agcctccatc gtgttcgtgc cgccgccgtt cgcggctgac 240
gcatcatgg aagcggccga cgctgggatc aaatactgcg tctgcatcac ggacggcatt 300
cctgctcagg atatgatccg cgtgaagcgc tacatgcgcc gctacaagaa agaagcgcgc 360
atgatcctga ccggccccgaa ctgcgccggc acgatctcgc caggcaaggc gatgctcggc 420
atcatgccgg gacacatcta ccttcggggc cgcgtcggca tcgtcggccg ctccgggtacg 480
ctcgggtacg aagccgcgcg gcagctcaag gcccttggca tcggcgtctc gacgtcgggtt 540
ggtatcggcg gcgacccgat caacggctcg tcgcatcgtg acgtcctcga gcacttcgag 600
aacgatcccg agaccgacgc gatcctgatg atcggcgaaa tcgggtgggtcc gcaggaagcc 660
gaagccggcc tcttcgcca agagcacatg aagaagcctg tcatcgcta catcgccgtt 720
ctgtcggccc cgaagggccg ccgcatgggc cagcgtggcg ccatcgtttc ggcattcggc 780
gagtcggctg ctgagaaggt cgagatcctg aagggtcgcg gcgtcgctat cgcgccgacg 840
ccgtcggaaa tgggctcgac cgtcgcgcag gttctcggca agcagaaaaa agttgctga 900

<210> 87

<211> 1164

<212> ADN

<213> *Hyphomicrobium denitrificans*

<400> 87

atggacattc atgaatacca ggccaaagag cttcttgcca agttcggcgt gccgatcgcc 60
cgcggcggac ttgcctacag ccctgaacag gccacctatc gcgccagcga gcttggcggc 120
acggtcgtcg tcaaggcgca gattcactcc ggcgcgcgcg gtaaagccgg cggcgtcaag 180
gtctgcaaga cggaaaagga aatcgaggat gcagccgagt tcatgctcgg ccgcaagctc 240
gtcacgcacc aaacgggatc ggccggcaag ctgggtctcgc gcctctacat cgaagaagcg 300
acgaacatcg atcgcgaaat ctatctcgggt ttcgtgatgg accgcgcttc ggagcgcacg 360
gtcgtcgtgg cctcggccgc gggcggcatg gacatcgagg aaatctcggc gtcgcagccc 420
gacacgatca tccgcgtcgc cgtcgacccg gcggtcggca tgcagcagtt ccaggcacgt 480
gagctggcat tcggacttgg cgtcgatcct gagatcgtca acaagctcgt gcccgcgatc 540
atgggctgct atcgcgcctt ccgcgatctc gatgcgatga tgggtgaaat caaccgcgtc 600
gtcatcacca aggaaaagca ggtcgttgcg ctcgacgcca agatgtcgtt cgacgacaac 660
gcgctgttcc gccgtccgca catcgccgag ctgcgcgaca agagccagga agatccccgc 720
gaaacctacg cgtcggatcg tggctctcgc tacgtcggtc tcgatggcga catcggctgc 780
atcgtcaacg gtgccggtct cgcgatggcg acgctcgaca tgatcaagct tgcgggcggc 840

gagcctgcga acttctctga catcgccggc ggcgcctctc ccgagcgcggt caccaagtcg 900
 ttcaaggcgg ttctgcgcga caagaacgtc aaggccatcc tggtaaacgt cttcgccggc 960
 atcaaccggt gcgactgggt tgccaagggt gtcgtcgacg ccgtcaagga actcgatatc 1020
 aagctgccga tcgtcggttcg cctcgcaggc accaacgtcg aagaaggccg caagatcatc 1080
 gacaacagcg gcctgacgggt catcagcgcg gaaactctcg ccgatgctgc caagcaggcg 1140
 gtcgaagcgg ccaaaaaagc ctaa 1164

<210> 88
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 88
 gcgggggaat tcacaaaaag gataaaacaa tgagtcatac cctgtatgaa ccaaaacacc 60

<210> 89
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 89
 caggcgtcta gattagagtc cggccagaac ttttgcgacg 40

<210> 90
 <211> 951
 <212> ADN
 <213> Nitrosomonas europaea

<400> 90
 atgagtcata ccctgtatga aacaaaaaca ccgcgtgtac agcgtgcga actggctggt 60
 ccgggttccc gtcccgaaat gtttgaaaaa gcgctgaaaa gcggagtgga cttcatatct 120
 ctggatctgg aggatgcagt cgcaccagat gacaagatcc aggcaagaaa aaatatcatt 180
 caggcaatca atgatctgga ctggaaaagt cacgggtgtca cgctttctgt acgcatcaat 240
 ggtctcgata cccaatatat ggtgcgtgat gtggtcgatc tggtagagca ggccgggcac 300
 aagatcgata cgttgctgat tcccaaagta ggtgtttatg ctgatgttta catggctgaa 360
 gccatgctca gccagcttga aatgcagcag gggctgaaaa accgaattgg tgtggaagca 420
 ctgatcgaaa cggcactggg gatggccaat gttgaagata tcgcccgcag aggaacggcc 480
 gggcgtctgg aagcattgca tttcgggtgta gctgactacg ctgccagcaa tcgtgcacgt 540

accaccaata tcggcgggct caatccggat tatccagggg atcagtggca cgcagccatc 600
 agcagaatga ccgttgccctg ccgcgcattc ggcctgcgac caatcgatgg cccatttggt 660
 gacattcagg atcccgaagg ttacaaacag gcagccagac gtgctgcagc actggggtgt 720
 gaaggtaaatt gggcaattca tccgacacag atcgcgctgg ccaatgaagt ctttacgccg 780
 cccacagcag aagtcgacaa agccaaacgc attctgacag cattgaagga agctgcagct 840
 caaggtaaag gtgcagcctc acttgatggc cgcctgatcg atgccgcttc ggaaagaatg 900
 gcaaataaca tcgtcaaaat ggcggaagca attgctgcca aaagcaaata a 951

<210> 91
 <211> 888
 <212> ADN
 <213> Nitrosomonas europaea

<400> 91
 gtggcaattc tcatcaatga gcagacgcgg atcatcgtag agggctttac cggccggatc 60
 ggcaccttcc atgctcagga aatgatcgat tacggatcta atgtagtggg aggcgtaacg 120
 cccggcaaag gcgggcagaa acacctgggg ctgccagtat tcaataccgt ccgggaagca 180
 gtcgagcagg caggtgcgga agccagcatt gtattcgtcc cgccggcatt tgcggctgat 240
 tcgattatgg aagcagccga tgccggtatc aaatattgcy tatccatcac cgatggcatt 300
 ccaaccagg acatgatgac cgtcaaaaac ttcttacgcc tcttccctga ggaggacaga 360
 atgatgctga ccggcccca ctgttcaggc actatcagcc ccggacgggc gatgttgggc 420
 atcatgccgg ggcataattta cagccgtggg gtcgttggtg tcgtcggccg ttccggtaca 480
 ctgggttatg aagctgccga ccagatgcga cggctgaata tcgggatttc gacttcggta 540
 ggtattggcg gagaccgat catcggcagt tcgcaccgga atgtgctgca aaagctggaa 600
 gaagatccgg aaaccaaagt cacgctgatg attggtgaaa ttggtggccc aatggaagta 660
 gaagccggac tgttcgcaaa ggaaaacatg agcaaaccgc tggttgccta cattgccggc 720
 ctgactgcac ctcccgaag acggatgggg cacgccggag caatcatctc ttcagccggg 780
 gaaagcgcag cagaaaaagt ggaaagactg aaagaactgg gcgtcaccat ctgcccgact 840
 ccgtctctga tgggtgaaac cgtcgcaaaa gttctggccg gactctaa 888

<210> 92
 <211> 1173
 <212> ADN
 <213> Nitrosomonas europaea

<400> 92
 ttggatatcc atgaatatca ggccaaggaa atcctggctg aatacggat caagctggct 60

gaaggcggat tggcgcacac tgtggaagaa gcggtacaac gcagccggga aatcgatggc 120
 aatgtgtggg tCGTcaaggc acaaattccat tccggcgccc gtggtaaagc aggcgggtgtc 180
 aaagtatgcc ggacacatga agaaatcgaa gtcgcagctg aatcactgct ggggaaaaaa 240
 ctggtcacac accaaaccgg cccggcgggt aaactctgct ccagactgta tatcgaagcc 300
 ggtaccgaaa ttgcccggga agtgtatctc gctttcatga tcgatcgag tcatgaacgt 360
 atcgtcatgg tgggttccgc acagggggga atggatatcg agaccctggc agccacgaat 420
 cctgatgcc tcaaaaaaat tcacatcgag cctgctgtcg gcctgcagga tttccaggca 480
 agaaccatgg cttttgact ggggtctgga gatgttctgc tcaatcacgc cgtcaagacg 540
 atcagagggt gctaccgcgc catgcgcgat ctggatgcga acatactcga aatcaaccgg 600
 ctggttgtca cgcgcaacaa cgagctgatc gcaactggatg cgaagatgag ctttgatgaa 660
 aatgcactgt tccggcgcca ccggatttcc gaattgcgtg acaactcaca aatcgattcg 720
 cgcgaaattg ctgcagcgga agcaggcttg agctacgtcg ggctggatgg agacatcggc 780
 tgcgatgatca atggcgccgg gctggcaatg gccaccatgg acatgatcaa actggccggc 840
 gggaaccgg ccaattttct ggatgtcggc ggcggcgcgt ctgccgagcg aactgaaaaa 900
 gcattccggc tgggtactggc ggataacaac gtaaaagcca tgctgggtcaa tatctttgcc 960
 ggtattaacc gctgtgactg gattgccgaa ggtgtggttc aggctgtacg gaatatcgga 1020
 atgacgggtc ctctggtcgt gcgcctgtct ggcaccaacg tggaagaagg ccgccgtatc 1080
 atcgtgaca gcgggttgcc gatcattact gcagaaaccc tggccgatgc agcagagaaa 1140
 gtagtgcacg ctcgcaacca ggctgcagtt tga 1173

<210> 93
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 93
 ggaattccat atggctgtta aaaatcgtct ac

32

<210> 94
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 94
gctctagatc agaatctgat tccgtgttc

29

<210> 95
<211> 963
<212> ADN
<213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 95
atggctgtca agaaccgtct acaccgcagc gaactcgcgg tgccgggcag caatccacgc 60
atgctcgaga aagcgccgga agccggcgcc gacatcgtct ttctggacct ggaagatgcg 120
gttgcgccgg atgacaagga gcaagcgcg cggaacatcg tcttcgcgct caacacctac 180
gactgggtcca gatgcgcggt ctccgtccgc atcaacggcc tcgacacca ttacgcctac 240
cgggacctcg ttgagatcgt cgagtcctgc ggcgacaagc tcgacaccat tctggtgccg 300
aaagtcggca gcgcctcgga cgttctgttc gtcgcgactt tactttccca gatcgaggcc 360
tacaaagggt tcaaaccgat caatatccac gtgctgatcg aaacggccat gggcatggcc 420
aacgtggagg agatcgcccg cacctgtcct gaacgcattg aggccatggt gttcggcggtg 480
gccgactacg ctgcgtcggg gcgcgcccgc acgaccaaca tcggcggcgc caaccggat 540
tacggcatgc tgaccgacct tgacgaaagc ggtaccgcgc cctatcactg ggccgaccag 600
tggcatttcg gcatttcccg catggtcgcg gcctgccgcg cctatgggct tcgccccatc 660
gacggcccct tcggcgattt cagcgatccg gaaggattcc gcgccgcagc ccgccgtgcc 720
gcggcactgg gctgcgaagg gaagtgggcg atccatccct cccagattcc actgtgcaac 780
gaaatcttca caccacgga aaaagaggtc acgcgggcct accgcatcct ggaagccatg 840
gagcaggcgg caaaggaggg caaaggcgcg gtgtctctgg atgggcgggt gatcgatgcc 900
gcctcgatcc ggatggcgga gaacgtggtc cgccagatga agcagatcga gtcgcgtcgg 960
tag 963

<210> 96
<211> 903
<212> ADN
<213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 96
atgagcgtat tcgttaacaa gactccaag gtcattctcc agggcttcac cggcgagcac 60
gccaccttcc acgccaagga cgccatgcgg atgggcaccc ggggtggcgg cgggtgtcac 120
cctggcaaag gcggcaccgc ccatcccgat cccgaactcg ctcatctgcc ggtgttcgac 180
accgtggctg aagccgtggc cgccaccggc gccgacgtct ccgccgtggt cgtgccgcgc 240
cccttcaatg cggacgcggt gatggaagcc atagacgcgc gcatccgggt cgccgtgacc 300

atcgccgacg gcatcccgtt acacgacatg atccgactgc agcgctaccg ggtgggtaag 360
gattccatcg tgatcggacc gaacaccccc ggcatcatca cgccgggcca gtgcaagggtg 420
ggcatcatgc cttcgcacat ttacaagaag ggcaacgtcg gcatcgtgtc gcgctccggc 480
accctcaatt acgaggcgac ggaacagatg gccgcgcttg ggctgggcat caccacctcg 540
gtcgggtatcg gcggtgaccc catcaacgga accgatttcg tctactgtcct gcgcgcttc 600
gaagccgacc cggaaaccca gatcgtggtg atgatcggcg aaatcggcgg cccccaggaa 660
gtcgccgccc cccgctgggc caaggaaaac atgacaaagc cggatcatcg cttcgtcgca 720
ggccttgccc caccgaccgg ccgacgcgat ggccatgccg gcgccatcat ctccagcgag 780
gccgacaccg ccggagccaa gatggacgcc atggaagcct tggggctgta tgtcgcccg 840
aaccggcac agatcggcca gaccgtgcta cgcgccgcgc aggaacacgg aatcagattc 900
tga 903

<210> 97
<211> 1170
<212> ADN
<213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 97
gtgaatatcc atgagtacca ggccaaggag ctgctcaaga cctatggcgt gcccggtgcc 60
gacggcgccc ttgcctattc cgacgcgcag gccgccagcg tcgccgagga gatcggcggc 120
agccgctggg tggtaaggc gcagatccat gccggcggtc gcggcaaggc cgggggcgta 180
aaggtcgccc actccatcga ggaagtccgc caatacgccc acgccatgct cggcagccac 240
ctcgtcacc atcagaccgg cccgggaggg tcgctggttc agcgtctgtg ggtggaacag 300
gccagccata tcaaaaagga atactacctg ggcttcgtga tcgatcgcg caatcaacgc 360
atcacctga tcgcctccag cgaggcggc atggaaatcg aggaagtcgc aaaggaaacc 420
ccggagaaaa tcgtcaagga agtcgtcgat ccggccatag gcctgctgga cttccagtgc 480
cgcaaggctc ccacggcgat cggcctgaaa ggcaaaactga tgccccaggc cgtcaggctg 540
atgaaggcca tctaccgctg catgcgcgac aaagatgcc tgaggccga aatcaatcct 600
ctggccatcg tgggcgaaag cgacgaatcg tcatgggtcc tggatgcaa gttcaacttc 660
gacgacaacg ccctgtaccg gcagcgcacc atcaccgaga tgcgcgacct ggccgaggaa 720
gacccgaaag aggtcgaagc ctccggccac ggtctcaatt acatcgccct cgacggcaac 780
atcggctgca tcgtcaatgg cgcggcctc gccatggctt cgctcgacgc catcacctg 840
catggcgccc gtccggccaa cttcctcgac gtggcgggcg gcgcctcccc cgagaaggtc 900

accaatgcct gccgcatcgt actggaagat cccaacgtcc gctgcatcct ggtcaacatc 960
 tttgccggca tcaaccgctg tgactggatc gccaaaggcc tgatccaggc ctgcgacagc 1020
 ctgcagatca aggtgccgct gatcgtgcgc ctggccggga cgaacgtcga cgagggccgc 1080
 aagatcctgg ccgaatccgg cctctccttc atcaccgcgg aaaatctgga cgacgcggcc 1140
 gccaaaggccg tcgccatcgt caagggataa 1170

<210> 98
 <211> 2072
 <212> ADN
 <213> Uncultured gamma proteobacterium

<400> 98
 atgaacattc acgaatatca ggccaaggag ctgcttcgtt cttacggtgt ccccgttcca 60
 gccgggaacg tcgcctattc cgatcgccaa gcgcaggcag tggccgaaca gatcggcggg 120
 gacggatggg tagtaaaagc gcaaattccat accggcgggc gaggcaaggc cggcggcggtt 180
 aaactcggcc aatccttggg ggaagtccgc aagatagccg acgaaatgat cggcaaaact 240
 ttggtgactc ctcaaaccgg gcccaaaggc aaagtgggtcc ggcgcggtatt ggtggaagaa 300
 gcggttagtc cgcaacggga attgtacctt gggttgggtca tcgaccggcg cagccaacgc 360
 atcaccatcg tggcttccgc ggaaggaggg gtagagatcg aggaagtggc ggccaggagt 420
 ccggagaaaa tcgtgcggga ggcatcgac ccggccatcg gtctgcgcga ttttcaatgc 480
 cgtaaggteg ccgccgccat tggcctgcgc gacaaacatc taatggcgca ggcggtgcgc 540
 ctcatgcagc gcatctatcg cctgtttcgt gacaaggatg ccctccagggt ggagatcaat 600
 cctctaggca tcgtcggcag cgagccaaag ctggtttggt tggacgcaa attcaatttc 660
 gacccaacg cccttttcg acatccggaa atcaacgagc tcgcgattt ggaagaggaa 720
 gaccgcggg aggtggaagc cttaggtcac gggctcaact acatcgcttt agacggcgat 780
 atcggctgca tcgtcaacgg cgccggcctg gccatggcga ccatggacgc catcgtgttt 840
 catggtggtt ggccggcgaa tttcctggat atcgggggtg gggcctcgcc ggagaaagtg 900
 caaaacgctt gtcggatcgt gattcaggac cagaacgtca agactttggt ggtcaatatc 960
 tttgccggca tcaaccgctg cgattggatc gctaccggtc tagtccaggc ttacaccagc 1020
 ttgcgcatcg acaagccctg cgtcgtgcgc cttgcaggaa cgaatgtaga ggaggggcta 1080
 aggattttga ccgactcggg tcttgctttc gtaaaagcga gcaatctgga cgatgcggca 1140
 gctaaagccg tcgccatcgc tcatgggagg aacgtatgag tatttttgtc aaccgccatt 1200
 cgcggtgat catccaggga ttcaccggcc aacacgctac gtttcacgcc agcaggcgca 1260
 ttcggtacgg cactcaagtg gtcggcggcg tcacccggg caagggagga agtaagcacc 1320

ttggattgcc ggtgttcgat acagtttctg aagcggtttc agagacgggc gccgatgtct 1380
 ctgggatttt tgtgccccca gcgtttgctg ccgacgccat catggaagcg atcgaagccg 1440
 ggatccgggt aatcgtggtg attgccgatg gcatcccggg gcaagacatg attcgagtgc 1500
 agcgctaccg gctcggacgc gactgtctgg tgcttggggc aaacacgcct ggaatcatca 1560
 ctcttgagga gtgcaaggtg gggatcatgc ctgctggaat ttaccgtcca ggaagaattg 1620
 gggtagtgtc gcggtccgga acgctgaatt acgaggccgt cgaacaattg ggcaaactgg 1680
 gtttggggtca atccaccgcg gttggcatcg gtggggatcc ggtcaacggc accgactttg 1740
 tgactgtgct caaagccttc gaacaagatc cggacaccga tgcgatcgtc atgatcggcg 1800
 aaatcggcgg gccgcaagaa gtcgccgctg cccgctgggc caaagaaaat atgcaaaagc 1860
 cgctcatcgg ttttgtggcg ggggcctcgg ctccaccggg gcggcgcatg gggcatgctg 1920
 gggcgatcat cgaagggtgag gaagacaccg ccaaagccaa gatggacgcg atggaggagc 1980
 ttgggggtata cgtgggtcaga aatcccgcgc ggatcggcga aacgggtttta agggcgctca 2040
 aggagcgcct gggatctgca gtttctggct aa 2072

<210> 99
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 99
 gttgaacgag gagatcgtcc atgaacattc acgaatatca 40

<210> 100
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 100
 gctctagatt agccagaaac tgcagatcc 29

<210> 101
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 101	
tgatattcgt gaatgttcat ggacgatctc ctcgttcaac	40
<210> 102	
<211> 897	
<212> ADN	
<213> Uncultured gamma proteobacterium	
<400> 102	
atgagtattt ttgtcaaccg ccattcgcgg gtgatcatcc agggattcac cggccaacac	60
gctacgtttc acgccagcga ggcgattcgg tacggcactc aagtggtcgg cggcgtcacc	120
ccgggcaagg gaggaagtaa gcaccttga ttgccgggtgt tcgatacagt ttctgaagcg	180
gtttcagaga cgggcgccga tgtctctggg atttttgtgc cccagcgtt tgctgccgac	240
gccatcatgg aagcgatcga agccgggac cgggtaatcg tggtgattgc cgatggcatc	300
ccggtgcaag acatgattcg agtgcagcgc taccggctcg gacgcgactg tctggtgctt	360
gggccaacaa cgcttgaat catcactcct ggagagtgc aggtggggat catgcctgct	420
ggaatttacc gtccaggaag aattggggta gtgtcgcggg ccggaacgct gaattacgag	480
gccgtcgaac aattgggcaa actgggtttg ggtcaatcca ccgcggttgg catcggtggg	540
gatccggtca acggcaccga ctttgtgact gtgctcaaag cttcgaaca agatccggac	600
accgatgcga tcgtcatgat cggcgaaatc ggcgggccgc aagaagtcgc cgctgcccgc	660
tgggccaaag aaaatatgca aaagccgctc atcggttttg tggcgggggc ctcggctcca	720
ccggggcggc gcatggggca tgctggggcg atcatcgaag gtgaggaaga caccgcaaaa	780
gccaaagtgg acgcgatgga ggagcttggg gtatactggt tcagaaatcc cgcccggatc	840
ggcgaaacgg ttttaagggc gctcaaggag cgctgggat ctgcagtttc tggctaa	897
<210> 103	
<211> 1179	
<212> ADN	
<213> Uncultured gamma proteobacterium	
<400> 103	
atgaacattc acgaatatca ggccaaggag ctgcttcgtt cttacggtgt ccccggtcca	60
gccgggaacg tcgcctattc cgatcgccaa gcgcaggcag tggccgaaca gatcggcggg	120
gacggatggg tagtaaaagc gcaaatccat accggcgggc gaggcaaggc cggcggcgtt	180
aaactcgccc aatccttga ggaagtccgc aagatagccg acgaaatgat cggcaaaact	240
ttggtgactc ctcaaaccgg gcccaaaggc aaagtgggtc ggcgcgtatt ggtggaagaa	300
gcggttagtc cgcaacggga attgtacctt ggggttggtc tcgaccggcg cagccaacgc	360
atcaccatcg tggcttcgc ggaaggagg gtagagatcg aggaagtggc ggccaggagt	420

ccggagaaaa tcgtgcggga ggcatcgac ccggccatcg gtctgcgcga ttttcaatgc 480
 cgtaaggctcg ccgcccccat tggcctgcgc gacaaacatc taatggcgca ggcggtgcgc 540
 ctcatgcagc gcatctatcg cctgtttcgt gacaaggatg ccctccaggt ggagatcaat 600
 cctctaggca tcgtcggcag cgagccaaag ctggtttggt tggacgcaa attcaatttc 660
 gacccaacg cccttttccg acatccggaa atcaacgagc tgcgcgattt ggaagaggaa 720
 gacccgcggg aggtggaagc cttaggtcac gggctcaact acatcgcttt agacggcgat 780
 atcggctgca tcgtcaacgg cgccggcctg gccatggcga ccatggacgc catcgtgttt 840
 catggtggtt ggccggcgaa tttcctggat atcgggggtg gggcctcgcc ggagaaagtg 900
 caaaacgctt gtcggatcgt gattcaggac cagaacgtca agactttgtt ggtcaatatc 960
 tttgccggca tcaaccgctg cgattggatc gctaccggtc tagtccaggc ttacaccagc 1020
 ttgcgcacgc acaagccctg cgtcgtgcgc cttgcaggaa cgaatgtaga ggaggggcta 1080
 aggattttga ccgactcggg tcttgctttc gtaaaagcga gcaatctgga cgatgcggca 1140
 gctaaagccg tcgccatcgc tcatgggagg aacgtatga 1179

<210> 104
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 104
 gttatgtggt ggctcgtcag ctcctcgtca tgg 33

<210> 105
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 105
 gagctgcacg accaccacat aactatggag 30

<210> 106
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 106
ggaattccag ttgaacgacg gcgagcag

28

<210> 107
<211> 298
<212> PRT
<213> Granulibacter bethesdensis

<400> 107

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asp His Leu Gln Leu Phe Glu Ala Asp Pro Glu Thr His Ala Val

195 200 205
 Leu Met Ile Gly Glu Ile Gly Gly Pro Gln Glu Ala Glu Ala Ala Lys
 210 215 220
 Trp Ile Ser Glu Asn Met Ser Lys Pro Val Val Gly Tyr Val Ala Gly
 225 230 235 240
 Leu Thr Ala Pro Lys Gly Arg Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile Ile
 245 250 255
 Ser Gly Glu Gly Asp Ser Ala Ala Glu Lys Ser Glu Ile Met Arg Ser
 260 265 270
 Tyr Gly Leu Thr Val Ala Pro Ser Pro Gly Glu Leu Gly Ser Thr Val
 275 280 285
 Ala Ala Val Leu Ala Gly Arg Gln Ala Ala
 290 295

 <210> 108
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Granulibacter bethesdensis

 <400> 108
 Met Asp Val His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Ala Val Pro Arg Gly Ala Ile Ala Phe Ser Ala Asp Gln Ala Val
 20 25 30
 Tyr Ala Ala Thr Glu Leu Gly Gly Trp His Trp Ala Val Lys Ala Gln
 35 40 45
 Ile His Ala Gly Ala Arg Gly Lys Ala Gly Gly Ile Lys Leu Cys Lys
 50 55 60
 Thr Tyr His Glu Val Arg Glu Ala Ala Ala Gly Met Leu Gly Lys Arg
 65 70 75 80
 Leu Val Thr His Gln Thr Gly Pro Glu Gly Lys Pro Val Gln Arg Val
 85 90 95
 Tyr Val Glu Val Ala Asp Pro Phe Glu Lys Glu Phe Tyr Leu Gly Phe
 100 105 110

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

Gly Gly Met Glu Ile Glu Glu Ile Ala Ser Lys His Pro Glu Lys Leu
 130 135 140

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

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

Ala Val Thr Ser Ile Met Gly Ala Tyr Arg Ala Phe Arg Asp His Asp
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Val Glu Glu Gly Arg Arg Ile Leu Lys Glu Ser Gly Ile Ser Val
 355 360 365

Ile Met Ala Glu Ser Leu Thr Glu Ala Ala Glu Lys Ala Val Glu Ala
 370 375 380

Ala Lys Ala Ala Ala
 385

<210> 109
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Hyphomicrobium denitrificans

<400> 109

Met Ser Tyr Thr Leu Tyr Pro Asn Arg Lys Gln Arg Leu Gln Arg Ser
 1 5 10 15

Tyr Leu Ala Val Pro Gly Ser Asn Pro Thr Met Ile Asp Arg Ala Leu
 20 25 30

Lys Ser Ala Ala Asp Tyr Val Phe Leu Asp Cys Glu Asp Ala Val Ala
 35 40 45

Pro Pro Glu Lys Glu Gln Ala Arg Lys Asn Ile Ile Gln Ala Leu Asn
 50 55 60

Asp Leu Asp Trp Lys Gly Ala Gly Lys Ser Val Ser Val Arg Ile Asn
 65 70 75 80

Gly Leu Asp Thr His Tyr Cys Tyr Arg Asp Val Val Asp Ile Val Glu
 85 90 95

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

Pro Ala Asp Val Tyr Ala Ile Glu Ser Phe Val Ser Gln Ile Glu Val
 115 120 125

Ala Lys Gly Leu Pro His Gln Ile Gly Met Glu Ala Leu Ile Glu Thr
 130 135 140

Pro Leu Gly Met Ala Asn Val Glu Ala Ile Ala Ser Ala Asn Ser Arg
 145 150 155 160

Leu Glu Ser Met His Phe Gly Val Ala Asp Tyr Ser Ala Phe Asn Lys
 165 170 175

Ala Arg Thr Val Val Ile Gly Gly Leu Asn Pro Asp Tyr Pro Gly Asp
 180 185 190

Gln Trp His Phe Pro Leu Ser Arg Met Thr Val Ala Cys Arg Ala Phe
 195 200 205

Gly Leu Arg Pro Ile Asp Gly Pro Phe Gly Gly Ile Asp Asp Pro Glu
 210 215 220

Gly Tyr Lys Ala Ala Ala Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly Met Glu Gly
 225 230 235 240

Lys Trp Ala Ile His Pro Ser Gln Ile Glu Leu Ala Asn Glu Ile Tyr
 245 250 255

Ser Pro Thr Ala Lys Glu Ile Glu Arg Ala Glu Arg Ile Leu Val Ala
 260 265 270

Leu Lys Glu Ala Glu Ala Gln Gly Lys Gly Ala Ala Ser Leu Asp Gly
 275 280 285

Lys Met Ile Asp Ala Ala Ser Glu Lys Met Ala Lys Asn Leu Leu Val
 290 295 300

Thr Ala Ala Ala Ile Lys Ala Gly Glu Glu Ala Arg Ala Lys Ser Lys
 305 310 315 320

<210> 110

<211> 299

<212> PRT

<213> Hyphomicrobium denitrificans

<400> 110

Met Ala Ile Phe Ile Asn Glu Lys Thr Pro Ile Leu Ile Gln Gly Phe
 1 5 10 15

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

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

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

Gly Ala Glu Ala Ser Ile Val Phe Val Pro Pro Phe Ala Ala Asp
65 70 75 80

Ala Ile Met Glu Ala Ala Asp Ala Gly Ile Lys Tyr Cys Val Cys Ile
85 90 95

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

Arg Arg Tyr Lys Lys Glu Ala Arg Met Ile Leu Thr Gly Pro Asn Cys
115 120 125

Ala Gly Thr Ile Ser Pro Gly Lys Ala Met Leu Gly Ile Met Pro Gly
130 135 140

His Ile Tyr Leu Pro Gly Arg Val Gly Ile Val Gly Arg Ser Gly Thr
145 150 155 160

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

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

Arg Asp Val Leu Glu His Phe Glu Asn Asp Pro Glu Thr Asp Ala Ile
195 200 205

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

Phe Ala Lys Glu His Met Lys Lys Pro Val Ile Ala Tyr Ile Ala Gly
225 230 235 240

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

Ser Ala Phe Gly Glu Ser Ala Ala Glu Lys Val Glu Ile Leu Lys Gly
260 265 270

Cys Gly Val Ala Ile Ala Pro Thr Pro Ser Glu Met Gly Ser Thr Val
275 280 285

Ala Gln Val Leu Gly Lys Gln Lys Lys Val Ala
 290 295

<210> 111
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> *Hyphomicrobium denitrificans*

<400> 111

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

Val Pro Ile Ala Arg Gly Gly Leu Ala Tyr Ser Pro Glu Gln Ala Thr
 20 25 30

Tyr Arg Ala Ser Glu Leu Gly Gly Thr Val Val Val Lys Ala Gln Ile
 35 40 45

His Ser Gly Ala Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Cys Lys Thr
 50 55 60

Glu Lys Glu Ile Glu Asp Ala Ala Glu Phe Met Leu Gly Arg Lys Leu
 65 70 75 80

Val Thr His Gln Thr Gly Ser Ala Gly Lys Leu Val Ser Arg Leu Tyr
 85 90 95

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

Met Asp Arg Ala Ser Glu Arg Ile Val Val Val Ala Ser Ala Ala Gly
 115 120 125

Gly Met Asp Ile Glu Glu Ile Ser Ala Ser Gln Pro Asp Thr Ile Ile
 130 135 140

Arg Val Ala Val Asp Pro Ala Val Gly Met Gln Gln Phe Gln Ala Arg
 145 150 155 160

Glu Leu Ala Phe Gly Leu Gly Val Asp Pro Glu Ile Val Asn Lys Leu
 165 170 175

Val Pro Ala Ile Met Gly Cys Tyr Arg Ala Phe Arg Asp Leu Asp Ala
 180 185 190

Met Met Val Glu Ile Asn Pro Leu Val Ile Thr Lys Glu Lys Gln Val

195	200	205
Val Ala Leu Asp Ala Lys Met Ser Phe Asp Asp Asn Ala Leu Phe Arg		
210	215	220
Arg Pro His Ile Ala Glu Leu Arg Asp Lys Ser Gln Glu Asp Pro Arg		
225	230	235
Glu Thr Tyr Ala Ser Asp Arg Gly Leu Ser Tyr Val Gly Leu Asp Gly		
	245	250
Asp Ile Gly Cys Ile Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met Ala Thr Leu		
	260	265
Asp Met Ile Lys Leu Ala Gly Gly Glu Pro Ala Asn Phe Leu Asp Ile		
	275	280
Gly Gly Gly Ala Ser Pro Glu Arg Val Thr Lys Ser Phe Lys Ala Val		
	290	300
Leu Arg Asp Lys Asn Val Lys Ala Ile Leu Val Asn Val Phe Ala Gly		
305	310	315
Ile Asn Arg Cys Asp Trp Val Ala Lys Gly Val Val Asp Ala Val Lys		
	325	330
Glu Leu Asp Ile Lys Leu Pro Ile Val Val Arg Leu Ala Gly Thr Asn		
	340	345
Val Glu Glu Gly Arg Lys Ile Ile Asp Asn Ser Gly Leu Thr Val Ile		
	355	360
Ser Ala Glu Thr Leu Ala Asp Ala Ala Lys Gln Ala Val Glu Ala Ala		
	370	375
Lys Lys Ala		
385		
<210> 112		
<211> 316		
<212> PRT		
<213> Nitrosomonas europaea		
<400> 112		
Met Ser His Thr Leu Tyr Glu Thr Lys Thr Pro Arg Val Gln Arg Cys		
1	5	10
		15

Glu Leu Ala Val Pro Gly Ser Arg Pro Glu Met Phe Glu Lys Ala Leu
 20 25 30

Lys Ser Gly Val Asp Phe Ile Phe Leu Asp Leu Glu Asp Ala Val Ala
 35 40 45

Pro Asp Asp Lys Ile Gln Ala Arg Lys Asn Ile Ile Gln Ala Ile Asn
 50 55 60

Asp Leu Asp Trp Lys Ser His Gly Val Thr Leu Ser Val Arg Ile Asn
 65 70 75 80

Gly Leu Asp Thr Gln Tyr Met Val Arg Asp Val Val Asp Leu Val Glu
 85 90 95

Gln Ala Gly His Lys Ile Asp Thr Leu Leu Ile Pro Lys Val Gly Val
 100 105 110

Tyr Ala Asp Val Tyr Met Val Glu Ala Met Leu Ser Gln Leu Glu Met
 115 120 125

Gln Gln Gly Leu Lys Asn Arg Ile Gly Val Glu Ala Leu Ile Glu Thr
 130 135 140

Ala Leu Gly Met Ala Asn Val Glu Asp Ile Ala Arg Arg Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Gly Arg Leu Glu Ala Leu His Phe Gly Val Ala Asp Tyr Ala Ala Ser
 165 170 175

Asn Arg Ala Arg Thr Thr Asn Ile Gly Gly Leu Asn Pro Asp Tyr Pro
 180 185 190

Gly Asp Gln Trp His Ala Ala Ile Ser Arg Met Thr Val Ala Cys Arg
 195 200 205

Ala Phe Gly Leu Arg Pro Ile Asp Gly Pro Phe Gly Asp Ile Gln Asp
 210 215 220

Pro Glu Gly Tyr Lys Gln Ala Ala Arg Arg Ala Ala Ala Leu Gly Cys
 225 230 235 240

Glu Gly Lys Trp Ala Ile His Pro Thr Gln Ile Ala Leu Ala Asn Glu
 245 250 255

Val Phe Thr Pro Pro Thr Ala Glu Val Asp Lys Ala Lys Arg Ile Leu
 260 265 270

Thr Ala Leu Lys Glu Ala Ala Ala Gln Gly Lys Gly Ala Ala Ser Leu
 275 280 285

Asp Gly Arg Leu Ile Asp Ala Ala Ser Glu Arg Met Ala Asn Asn Ile
 290 295 300

Val Lys Met Ala Glu Ala Ile Ala Ala Lys Ser Lys
 305 310 315

<210> 113
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Nitrosomonas europaea

<400> 113

Met Ala Ile Leu Ile Asn Glu Gln Thr Arg Ile Ile Val Gln Gly Phe
 1 5 10 15

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

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

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

Gly Ala Glu Ala Ser Ile Val Phe Val Pro Pro Ala Phe Ala Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Ile Met Glu Ala Ala Asp Ala Gly Ile Lys Tyr Cys Val Ser Ile
 85 90 95

Thr Asp Gly Ile Pro Thr Gln Asp Met Met Thr Val Lys Asn Phe Leu
 100 105 110

Arg Leu Phe Pro Glu Glu Asp Arg Met Met Leu Thr Gly Pro Asn Cys
 115 120 125

Ser Gly Thr Ile Ser Pro Gly Arg Ala Met Leu Gly Ile Met Pro Gly
 130 135 140

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

Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Asp Gln Met Arg Arg Leu Asn Ile Gly Ile
 165 170 175

Ser Thr Ser Val Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Ile Gly Ser Ser His
 180 185 190

Arg Asn Val Leu Gln Lys Leu Glu Glu Asp Pro Glu Thr Lys Val Thr
 195 200 205

Leu Met Ile Gly Glu Ile Gly Gly Pro Met Glu Val Glu Ala Gly Leu
 210 215 220

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

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

Ser Ser Ala Gly Glu Ser Ala Ala Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys Glu
 260 265 270

Leu Gly Val Thr Ile Cys Pro Thr Pro Ser Leu Met Gly Glu Thr Val
 275 280 285

Ala Lys Val Leu Ala Gly Leu
 290 295

<210> 114
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Nitrosomonas europaea

<400> 114

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

Ile Lys Leu Ala Glu Gly Gly Leu Ala His Thr Val Glu Glu Ala Val
 20 25 30

Gln Arg Ser Arg Glu Ile Asp Gly Asn Val Trp Val Val Lys Ala Gln
 35 40 45

Ile His Ser Gly Ala Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Cys Arg
 50 55 60

Thr His Glu Glu Ile Glu Val Ala Ala Glu Ser Leu Leu Gly Lys Lys
 65 70 75 80

Leu Val Thr His Gln Thr Gly Pro Ala Gly Lys Leu Cys Ser Arg Leu
 85 90 95

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

Met Ile Asp Arg Ser His Glu Arg Ile Val Met Val Gly Ser Ala Gln
 115 120 125

Gly Gly Met Asp Ile Glu Thr Leu Ala Ala Thr Asn Pro Asp Ala Ile
 130 135 140

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

Arg Thr Met Ala Phe Ala Leu Gly Leu Glu Asp Val Leu Leu Asn His
 165 170 175

Ala Val Lys Thr Ile Arg Gly Cys Tyr Arg Ala Met Arg Asp Leu Asp
 180 185 190

Ala Asn Ile Leu Glu Ile Asn Pro Leu Val Val Thr Arg Asn Asn Glu
 195 200 205

Leu Ile Ala Leu Asp Ala Lys Met Ser Phe Asp Glu Asn Ala Leu Phe
 210 215 220

Arg Arg His Arg Ile Ser Glu Leu Arg Asp Asn Ser Gln Ile Asp Ser
 225 230 235 240

Arg Glu Ile Ala Ala Ala Glu Ala Gly Leu Ser Tyr Val Gly Leu Asp
 245 250 255

Gly Asp Ile Gly Cys Met Ile Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met Ala Thr
 260 265 270

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

Val Gly Gly Gly Ala Ser Ala Glu Arg Thr Glu Lys Ala Phe Arg Leu
 290 295 300

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

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

Arg Asn Ile Gly Met Thr Val Pro Leu Val Val Arg Leu Ser Gly Thr
 340 345 350

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

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

Arg Asn Gln Ala Ala Val
 385 390

<210> 115
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Methylococcus capsulatus

<400> 115

Met Ala Val Lys Asn Arg Leu His Arg Ser Glu Leu Ala Val Pro Gly
 1 5 10 15

Ser Asn Pro Arg Met Leu Glu Lys Ala Pro Glu Ala Gly Ala Asp Ile
 20 25 30

Val Phe Leu Asp Leu Glu Asp Ala Val Ala Pro Asp Asp Lys Glu Gln
 35 40 45

Ala Arg Arg Asn Ile Val Phe Ala Leu Asn Thr Tyr Asp Trp Ser Arg
 50 55 60

Cys Ala Val Ser Val Arg Ile Asn Gly Leu Asp Thr His Tyr Ala Tyr
 65 70 75 80

Arg Asp Leu Val Glu Ile Val Glu Ser Cys Gly Asp Lys Leu Asp Thr
 85 90 95

Ile Leu Val Pro Lys Val Gly Ser Ala Ser Asp Val Leu Phe Val Ala

100	105	110
Thr Leu Leu Ser Gln Ile Glu Ala Tyr Lys Gly Phe Lys Pro Ile Asn		
115	120	125
Ile His Val Leu Ile Glu Thr Ala Met Gly Met Ala Asn Val Glu Glu		
130	135	140
Ile Ala Arg Thr Cys Pro Glu Arg Met Glu Ala Met Val Phe Gly Val		
145	150	155
Ala Asp Tyr Ala Ala Ser Val Arg Ala Arg Thr Thr Asn Ile Gly Gly		
	165	170
Ala Asn Pro Asp Tyr Gly Met Leu Thr Asp Pro Asp Glu Ser Gly Thr		
	180	185
Arg Ala Tyr His Trp Ala Asp Gln Trp His Phe Gly Ile Ser Arg Met		
	195	200
Val Ala Ala Cys Arg Ala Tyr Gly Leu Arg Pro Ile Asp Gly Pro Phe		
210	215	220
Gly Asp Phe Ser Asp Pro Glu Gly Phe Arg Ala Ala Ala Arg Arg Ala		
225	230	235
Ala Ala Leu Gly Cys Glu Gly Lys Trp Ala Ile His Pro Ser Gln Ile		
	245	250
Pro Leu Cys Asn Glu Ile Phe Thr Pro Thr Glu Lys Glu Val Thr Arg		
	260	265
Ala Tyr Arg Ile Leu Glu Ala Met Glu Gln Ala Ala Lys Glu Gly Lys		
	275	280
Gly Ala Val Ser Leu Asp Gly Arg Leu Ile Asp Ala Ala Ser Ile Arg		
290	295	300
Met Ala Glu Asn Val Val Arg Gln Met Lys Gln Ile Glu Ser Arg Arg		
305	310	315
<210> 116		
<211> 300		
<212> PRT		
<213> Methylococcus capsulatus		

<400> 116

Met Ser Val Phe Val Asn Lys His Ser Lys Val Ile Phe Gln Gly Phe
 1 5 10 15

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

Thr Arg Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Thr Arg His
 35 40 45

Pro Asp Pro Glu Leu Ala His Leu Pro Val Phe Asp Thr Val Ala Glu
 50 55 60

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

Pro Phe Asn Ala Asp Ala Leu Met Glu Ala Ile Asp Ala Gly Ile Arg
 85 90 95

Val Ala Val Thr Ile Ala Asp Gly Ile Pro Val His Asp Met Ile Arg
 100 105 110

Leu Gln Arg Tyr Arg Val Gly Lys Asp Ser Ile Val Ile Gly Pro Asn
 115 120 125

Thr Pro Gly Ile Ile Thr Pro Gly Glu Cys Lys Val Gly Ile Met Pro
 130 135 140

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

Thr Leu Asn Tyr Glu Ala Thr Glu Gln Met Ala Ala Leu Gly Leu Gly
 165 170 175

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

Phe Val Thr Val Leu Arg Ala Phe Glu Ala Asp Pro Glu Thr Glu Ile
 195 200 205

Val Val Met Ile Gly Glu Ile Gly Gly Pro Gln Glu Val Ala Ala Ala
 210 215 220

Arg Trp Ala Lys Glu Asn Met Thr Lys Pro Val Ile Gly Phe Val Ala
 225 230 235 240

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

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

Ala Leu Gly Leu Tyr Val Ala Arg Asn Pro Ala Gln Ile Gly Gln Thr
275 280 285

Val Leu Arg Ala Ala Gln Glu His Gly Ile Arg Phe
290 295 300

<210> 117

<211> 389

<212> PRT

<213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 117

Met Asn Ile His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Lys Thr Tyr Gly
1 5 10 15

Val Pro Val Pro Asp Gly Ala Val Ala Tyr Ser Asp Ala Gln Ala Ala
20 25 30

Ser Val Ala Glu Glu Ile Gly Gly Ser Arg Trp Val Val Lys Ala Gln
35 40 45

Ile His Ala Gly Gly Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Ala His
50 55 60

Ser Ile Glu Glu Val Arg Gln Tyr Ala Asp Ala Met Leu Gly Ser His
65 70 75 80

Leu Val Thr His Gln Thr Gly Pro Gly Gly Ser Leu Val Gln Arg Leu
85 90 95

Trp Val Glu Gln Ala Ser His Ile Lys Lys Glu Tyr Tyr Leu Gly Phe
100 105 110

Val Ile Asp Arg Gly Asn Gln Arg Ile Thr Leu Ile Ala Ser Ser Glu
115 120 125

Gly Gly Met Glu Ile Glu Glu Val Ala Lys Glu Thr Pro Glu Lys Ile
130 135 140

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

Arg Lys Val Ala Thr Ala Ile Gly Leu Lys Gly Lys Leu Met Pro Gln
 165 170 175

Ala Val Arg Leu Met Lys Ala Ile Tyr Arg Cys Met Arg Asp Lys Asp
 180 185 190

Ala Leu Gln Ala Glu Ile Asn Pro Leu Ala Ile Val Gly Glu Ser Asp
 195 200 205

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

Leu Tyr Arg Gln Arg Thr Ile Thr Glu Met Arg Asp Leu Ala Glu Glu
 225 230 235 240

Asp Pro Lys Glu Val Glu Ala Ser Gly His Gly Leu Asn Tyr Ile Ala
 245 250 255

Leu Asp Gly Asn Ile Gly Cys Ile Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met
 260 265 270

Ala Ser Leu Asp Ala Ile Thr Leu His Gly Gly Arg Pro Ala Asn Phe
 275 280 285

Leu Asp Val Gly Gly Gly Ala Ser Pro Glu Lys Val Thr Asn Ala Cys
 290 295 300

Arg Ile Val Leu Glu Asp Pro Asn Val Arg Cys Ile Leu Val Asn Ile
 305 310 315 320

Phe Ala Gly Ile Asn Arg Cys Asp Trp Ile Ala Lys Gly Leu Ile Gln
 325 330 335

Ala Cys Asp Ser Leu Gln Ile Lys Val Pro Leu Ile Val Arg Leu Ala
 340 345 350

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

Ser Phe Ile Thr Ala Glu Asn Leu Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ala Val
 370 375 380

Ala Ile Val Lys Gly
385

<210> 118
<211> 298
<212> PRT
<213> Uncultured gamma proteobacterium

<400> 118

Met Ser Ile Phe Val Asn Arg His Ser Arg Val Ile Ile Gln Gly Phe
1 5 10 15

Thr Gly Gln His Ala Thr Phe His Ala Ser Glu Ala Ile Arg Tyr Gly
20 25 30

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

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

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

Ala Ile Met Glu Ala Ile Glu Ala Gly Ile Arg Val Ile Val Val Ile
85 90 95

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

Leu Gly Arg Asp Cys Leu Val Leu Gly Pro Asn Thr Pro Gly Ile Ile
115 120 125

Thr Pro Gly Glu Cys Lys Val Gly Ile Met Pro Ala Gly Ile Tyr Arg
130 135 140

Pro Gly Arg Ile Gly Val Val Ser Arg Ser Gly Thr Leu Asn Tyr Glu
145 150 155 160

Ala Val Glu Gln Leu Gly Lys Leu Gly Leu Gly Gln Ser Thr Ala Val
165 170 175

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

Lys Ala Phe Glu Gln Asp Pro Asp Thr Asp Ala Ile Val Met Ile Gly
 195 200 205

Glu Ile Gly Gly Pro Gln Glu Val Ala Ala Ala Arg Trp Ala Lys Glu
 210 215 220

Asn Met Gln Lys Pro Leu Ile Gly Phe Val Ala Gly Ala Ser Ala Pro
 225 230 235 240

Pro Gly Arg Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile Ile Glu Gly Glu Glu
 245 250 255

Asp Thr Ala Lys Ala Lys Met Asp Ala Met Glu Glu Leu Gly Val Tyr
 260 265 270

Val Val Arg Asn Pro Ala Arg Ile Gly Glu Thr Val Leu Arg Ala Leu
 275 280 285

Lys Glu Arg Leu Gly Ser Ala Val Ser Gly
 290 295

<210> 119
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Uncultured gamma proteobacterium

<400> 119

Met Asn Ile His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Arg Ser Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Pro Val Pro Ala Gly Asn Val Ala Tyr Ser Asp Arg Gln Ala Gln
 20 25 30

Ala Val Ala Glu Gln Ile Gly Gly Asp Gly Trp Val Val Lys Ala Gln
 35 40 45

Ile His Thr Gly Gly Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Leu Ala Gln
 50 55 60

Ser Leu Glu Glu Val Arg Lys Ile Ala Asp Glu Met Ile Gly Lys Thr
 65 70 75 80

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

Leu Val Glu Glu Ala Val Ser Pro Gln Arg Glu Leu Tyr Leu Gly Leu

100	105	110
Val Ile Asp Arg Arg Ser Gln Arg Ile Thr Ile Val Ala Ser Ala Glu 115 120 125		
Gly Gly Val Glu Ile Glu Glu Val Ala Ala Arg Ser Pro Glu Lys Ile 130 135 140		
Val Arg Glu Ala Ile Asp Pro Ala Ile Gly Leu Arg Asp Phe Gln Cys 145 150 155 160		
Arg Lys Val Ala Ala Ala Ile Gly Leu Arg Asp Lys His Leu Met Ala 165 170 175		
Gln Ala Val Arg Leu Met Gln Arg Ile Tyr Arg Leu Phe Arg Asp Lys 180 185 190		
Asp Ala Leu Gln Val Glu Ile Asn Pro Leu Gly Ile Val Gly Ser Glu 195 200 205		
Pro Lys Leu Val Cys Leu Asp Ala Lys Phe Asn Phe Asp Pro Asn Ala 210 215 220		
Leu Phe Arg His Pro Glu Ile Asn Glu Leu Arg Asp Leu Glu Glu Glu 225 230 235 240		
Asp Pro Arg Glu Val Glu Ala Leu Gly His Gly Leu Asn Tyr Ile Ala 245 250 255		
Leu Asp Gly Asp Ile Gly Cys Ile Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met 260 265 270		
Ala Thr Met Asp Ala Ile Val Phe His Gly Gly Trp Pro Ala Asn Phe 275 280 285		
Leu Asp Ile Gly Gly Gly Ala Ser Pro Glu Lys Val Gln Asn Ala Cys 290 295 300		
Arg Ile Val Ile Gln Asp Gln Asn Val Lys Thr Leu Leu Val Asn Ile 305 310 315 320		
Phe Ala Gly Ile Asn Arg Cys Asp Trp Ile Ala Thr Gly Leu Val Gln 325 330 335		
Ala Tyr Thr Ser Leu Arg Ile Asp Lys Pro Cys Val Val Arg Leu Ala		

340

345

350

Gly Thr Asn Val Glu Glu Gly Leu Arg Ile Leu Thr Asp Ser Gly Leu
 355 360 365

Ala Phe Val Lys Ala Ser Asn Leu Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ala Val
 370 375 380

Ala Ile Ala His Gly Arg Asn Val
 385 390

<210> 120
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 120
 ccgcgtacc gtataataaa gaataattat taatctgtag acaaattgtg aaagg

55

<210> 121
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 121
 cttttgttta taagtgggta aaccgtgaat atcgtgttct tttcac

46

<210> 122
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 122
 aagaactcta gaacaaaaag gataaaacaa tggcaaaaat gagagccgtt gacgcggcaa

60

tg

62

<210> 123
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 123
 gaccagctgc agtcaggcca gtttatggtt agccattaat tccagc 46

<210> 124
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 124
 acacaactgc agacaaaaag gataaaacaa tgaagattgt cattgcgcca gactctttta 60
 aagagagct 69

<210> 125
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 125
 gcccccaagc tttcagtttt taattccctg acctatttta atggcgcagg 50

<210> 126
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 126
 aagaactcta gaacaaaaag gataaaacaa tggcaaaaat gagagccgtt gacgcggcaa 60
 tg 62

<210> 127
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 127
 gcccccaagc tttcagtttt taattccctg acctatttta atggcgcagg 50

<210> 128
 <211> 58
 <212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 128

gactctagag gatccccggg atgacagact cggttatcaa cagtgaatta cttttcag

58

<210> 129

<211> 50

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 129

gacgggacgg cggctttggt ggcttccgcg ttatgaaaaa agtagagagc

50

<210> 130

<211> 49

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 130

ttgagacaca acgtggcttt cccagcaagg acagcgcgcg caatgaatg

49

<210> 131

<211> 53

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 131

atgaccatga ttacgaattc tcagggaagc aggcggtagc ctggcagagt cag

53

<210> 132

<211> 48

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 132

tttttcataa cgcggaagcc aacaaagccg ccgtcccgtc aagtcagc

48

<210> 133

<211> 60

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 133

cgcgcgctgt ccttgctggg aaagccacgt tgtgtctcaa aatctctgat gttacattgc

60

<210> 134

<211> 43

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 134

gccgccgaat tcccgaagaa tgccacctga cgtctaagaa acc

43

<210> 135

<211> 53

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 135

atgaccatga ttacgaattc tcaggggaagc aggcggtagc ctggcagagt cag

53

<210> 136

<211> 28

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 136

agtctagaga tccttttttaa cccatcac

28

<210> 137

<211> 28

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 137

agtctagaag tcgataaaca gcaatatt

28

<210> 138

<211> 19

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 138

gcaacggttg ctctcatct

19

<210> 139

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 139

cgggatccaa acacgcggcg gaaaaca

27

<210> 140

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 140

cgggatccgt taacgcaggc tgac

24

<210> 141

<211> 19

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 141

gctgctggcg tactggttc

19

<210> 142

<211> 19

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 142

ctttacactt tatgcttcc

19

<210> 143

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 143

ttgagctcga gaggtctgcc tcgtga

26

<210> 144

<211> 19

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 144

tcgccatgat gctgctgtg

19

<210> 145

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 145

cgggatccga cttagcgtca tcggttg

27

<210> 146

<211> 28

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 146

cgggatccga tgaagattgc taacgacg

28

<210> 147

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 147

tgatgccgac aatattacgc

20

<210> 148

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 148

cgcctcgagt gactcatacc aggctg

27

<210> 149

<211> 28

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 149

cgcctcgagg caacaccttc ttcacgag

28

<210> 150

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 150

atcatccagc tgtcaggcag ccatcggaag

30

<210> 151

<211> 18

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 151

atccccggga attctgtt

18

<210> 152

<211> 1352

<212> ADN

<213> Corynebacterium casei

<400> 152

cgcctcgagc actggaaggg ttcttcaggg gaacccccgg aaaccgggga aacatctgac

60

ttgggttaaat gtcgtattat gaacacgccg aggaatgaaa accgaccgtg cacgctcgtg

120

tgagaaagtc agctacatga gaccaactac ccgccctgag ggacgctttg agcagctgtg

180

gctgccgctg tggccattgg caagcgatga cctccgtgag ggcatttacc gcacctcacg

240

gaagaacgcg ctggataagc gctacgtcga agccaatccc gacgcgctct ctaacctcct

300

ggctggttgac atcgaccagg aggacgcgct tttgcgctct ttgtgggaca gggaggactg 360
 gagacctaac gcggtggttg aaaacccctt aaacgggcac gcacacgctg tctgggcgct 420
 cgcggagcca tttaccgca ccgaatacgc caaacgcaag cctttggcct atgccgcggc 480
 tgtcaccgaa ggccctacggc gctctgtcga tggcgatagc ggatactccg ggctgatcac 540
 caaaaacccc gagcacactg catgggatag tctactggatc accgataagc tgtatacgct 600
 cgatgagctg cgcttttggc tcgaagaaac cggctttatg ccgcctgctg cctggaggaa 660
 aacgcggcgg ttctcgccag ttggtctagg tcgtaattgc gcactctttg aaagcgcacg 720
 tacgtgggca tatcgggagg tcagaaagca ttttgagac gctgacggcc taggccgcgc 780
 aatccaaacc accgcgcaag cacttaacca agagctgttt gatgaaccac tacctgtggc 840
 cgaagttgac tgtattgcca ggtcaatcca taaatggatc atcaccaagt cacgcatgtg 900
 gacagacggc gccgccgtct acgacgccac attcaccgca atgcaatccg cacgcgggaa 960
 gaaaggctgg caacgaagcg ctgaggtgcg tcgtgaggct ggacatactc tttggaggaa 1020
 cattggctaa ggtttatgca cgttatccac gcaacggaaa aacagcccgc gagctggcag 1080
 aacgtgccgg tatgtcgggtg agaacagctc aacgatggac ttccgaaccg cgtgaagtgt 1140
 tcattaaacg tgccaacgag aagcgtgctc gcgtccagga gctgcgcgcc aaaggtctgt 1200
 ccatgcgcgc tatcgcgga gagattggtt gtcggtggg cacggttcac cgctacgtca 1260
 aagaagttga agagaagaaa accgcgtaaa tccagcggtt tagtcaccct cggcgtgttc 1320
 aaagtccatc gtaaccaagt cagctcgagg cg 1352

<210> 153
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 153
 ggaattcaca aaaaggataa aacaatggct gtcaagaacc gtctac 46

<210> 154
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 154
 cgaattctca gaattctgatt ccgtgttcct g 31

<210> 155
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 155
 cgagctcaag cttacaaaaa ggataaaaca atgagcacca ttgcattcat cgg 53

<210> 156
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 156
 cgggatccct agtccagcag catgagag 28

<210> 157
 <211> 2727
 <212> ADN
 <213> Rhodococcus jostii

<400> 157
 atgagcacca ttgcattcat cggactcgga atcatgggca gccccatggc cgttcattctc 60
 gccaaaggccg gccaccaggt ggtcggatac aaccgctcgc ccgagcgcac cgcggcgctc 120
 gtcgacgccg ggggcaccgc ggccgactcc atcgccaagg ccgttgccgg cgccgacgtc 180
 gtggccgtga tgggtcccga ctccccggac gtccaggccg tactcgccgg cgaggacgga 240
 gtcttcgagc acgccccggc cggcgccctg atcatcgact tctccagcat ccggccccgac 300
 gtcaccaccg ccctcgccgc gcaggcaacc gagcggggct tccggctgat cgacgccccg 360
 gtatcgggtg gcgaggccgg tgcggtcaac gccgcactgt cgatcatggt cggcggcgcg 420
 ccggaggatt tcgaggcggc caagccgatc ctcgacaccg tcggcaagac cgtggtgcac 480
 gtggggccga acggttccgg gcagacgggt aaggccgcga accagctgat cgtcgcgggc 540
 aacatccaac tcctcgccga ggcgatcatc ttctcgagg cctacggtgt cgacaccgcg 600
 gctgcggtcg aggtgctcgg cggcgggctg gccggatcgg ccgtcctgaa ccagaaggca 660
 cagaagatgc tggaccggtc cttcgaaccg ggattccgca tcgaactgca ccacaaggac 720
 ctcggcatcg tgaccagcgc cgctcgcgag gccgggtgctg tgacaccctt cggcgcgggtc 780
 gtcgcccagc tgatggcctc cgcccgtgcg aacgggtgatg gtggcctgga ccattcgggc 840

ctgctgcgtg	gagtggagcg	gctgtccggc	cgccctccc	agtgacctcg	tccaactcgt	900
aatcctcgat	ggagaagtga	tatgcctcgt	atgcgcgccg	ctgacgcagc	ggtcaagatt	960
ctggaactcg	aaggtgccac	tcaggccttc	ggccttccc	gtgcggcgat	caaccgcttc	1020
tacgcagcaa	tgcgtaacca	cggaggaatc	aagcacatcc	tcgcccgcga	cgtcgagggc	1080
gcctcccaca	tggccgaggg	attcaccgcg	gccaaaggccg	gaaacatcgg	agtctgcac	1140
ggcacctccg	ggcccgcggg	aaccgacatg	atcacccggtc	tgtattcggc	catggcggac	1200
tcgatcccga	tcctcgcgat	caccggccaa	gctcccgtgg	cgcgcctgca	caaggaagac	1260
ttccaggccg	tcgacatcgc	ctcgatcgca	ggcccgggtca	cgaagatggc	gatgacgggtg	1320
ctcgagccgg	cccagggttc	gggagcgcttc	gcgcaggcat	ttcacttgat	gcggctctggt	1380
cggccaggac	cgggtgctcat	cgacctgccg	atcgacgtgc	agttggcgga	gatcgacttc	1440
gacccggata	cctaccagcc	gctgcccgtg	tacaagccgg	ccgcgacccg	cgcgcaggcg	1500
gagaaggcac	tcgacatgct	gggtgccgcc	gaacgcccgc	tgatcgttgc	gggcgggtggc	1560
atcatcaacg	ccgacgccgc	ggacctgctg	gtggaactgg	ccgaactgct	ggacattccg	1620
gtcgtgccga	cgctgatggg	ctggggcacc	atcccggacg	accaccgtct	cgccgcccggg	1680
atggtcggac	tgcagaccgc	ccaccgatac	ggcaacgcca	cgatgctggc	gtcggacttc	1740
gtcctcggca	tcggcaaccg	gtgggccaac	cggcacacgg	gcggtctcga	cacctaccgg	1800
aagggccgca	agttcggttc	cgtcgacatc	gaaccacccc	agatcggtcg	cgtgttcgcg	1860
cccgactacg	ggatcggttc	cgacgccaa	gctgcgctcg	aactgttcgt	cgccgtcgcg	1920
aaggagcgca	aggccgccc	aaccctggcg	gaccgcagca	cctgggtcga	ggactgtgcc	1980
acccggaagc	ggaccatgca	gcgcaagacc	cacttcgacg	acgtcccggg	caaaccgcag	2040
cgcgtgtacg	aggagatgaa	ccgcgtcttc	gggcgcgaca	cccgttacgt	gagcacgatc	2100
gggctctcgc	agatcgccgg	cggccagttc	ctgcacgtct	acaaggcccc	caactggatc	2160
aactgcgggc	aggccggggc	gctcggctgg	acgatccccg	ccgctctcgg	agtgggtgcc	2220
gcggagccgg	agacgcccgt	cgtggcgctg	tccgggtgact	acgacttcca	gttcatgatc	2280
gaggaactgg	ccgtggggcg	ccagttcaac	ctgccgtaca	tccacgtcgt	ggtgaacaac	2340
tcctacctgg	gactgatccg	tcaggcacag	cgcgcgttcg	acatggactt	ctgcgtgcaa	2400
ctgggcttcg	acaacatcaa	caccagggag	cggagcgagc	acgagacgat	gcccgcggtc	2460
ccgaaggggt	acggcgtcga	tcacgtcaag	gtcgcggagg	gcctgggctg	caaggccctg	2520
cgggtcaccg	agccggggcg	gatcgccggc	gccctggaga	aggcccgcg	actcgccgga	2580
gaacacaagg	tgccgggtgg	cgtcgaggtc	ttcctcgagc	gggtcaccaa	catcgcgatg	2640

ggcaccgaac tgcacaacgt cgccgagttc gaggatctgg cggagagctg ggagcacgct 2700

cccacagccc tcatgctgct ggactag 2727

<210> 158

<211> 31

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 158

ccccgcgagg ccgaagctgc cgagcacaat c 31

<210> 159

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 159

gtgctcggca gcttcggcct cgcggggatc 30

<210> 160

<211> 31

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 160

ccccgcgagg ccgccgctgc cgagcacaat c 31

<210> 161

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 161

gtgctcggca gcggcggcct cgcggggatc 30

<210> 162

<211> 31

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 162
 ccccgcgagg ccctggctgc cgagcacaat c 31

<210> 163
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 163
 gtgctcggca gccagggcct cgcggggatc 30

<210> 164
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 164
 ccccgcgagg ccattgctgc cgagcacaat c 31

<210> 165
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 165
 gtgctcggca gcaatggcct cgcggggatc 30

<210> 166
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 166
 ccccgcgagg ccatggctgc cgagcacaat c 31

<210> 167
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 167
 gtgctcggca gccatggcct cgcgggggatc 30

<210> 168
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 168
 ccccgcgagg ccaatgctgc cgagcacaat c 31

<210> 169
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 169
 gtgctcggca gcattggcct cgcgggggatc 30

<210> 170
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 170
 ccccgcgagg cctacgctgc cgagcacaat c 31

<210> 171
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 171
 gtgctcggca gcgtaggcct cgcgggggatc 30

<210> 172
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 172
 ccccgcgagg ccaaagctgc cgagcacaat c 31

<210> 173
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 173
 gtgctcggca gctttggcct cgcggggatc 30

<210> 174
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 174
 ccccgcgagg cccgcgctgc cgagcacaat c 31

<210> 175
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 175
 gtgctcggca gcgcgggcct cgcggggatc 30

<210> 176
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 176
 gagcccgagg cgattattca ggtcgtggtc 30

<210> 177
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 177
 cacgacctga ataatcgctt cgggctcctt g 31

<210> 178
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 178
 gagccccgagg cgaatattca ggtcgtgggc g 31

<210> 179
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 179
 cacgacctga atattcgctt cgggctcctt 30

<210> 180
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 180
 gagccccgagg cggatattca ggtcgtgggc g 31

<210> 181
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 181
 cacgacctga atatccgctt cgggctcctt 30

<210> 182
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 182
 gagcccgagg cgaaaattca ggtcgtggtc g 31

<210> 183
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 183
 cacgacctga attttcgcct cgggctcctt 30

<210> 184
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 184
 gagcccgagg cgcgcattca ggtcgtggtc g 31

<210> 185
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 185
 cacgacctga atgcgcgcct cgggctcctt 30

<210> 186
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 186
 gagcccgagg cgcacattca ggtcgtggtc g 31

<210> 187
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 187
 cacgacctga atgtg'gcct cgggctcctt 30

<210> 188
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 188
 gagcccgagg cgcagattca ggtcgtggtc g 31

<210> 189
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 189
 cacgacctga atctg'gcct cgggctcctt 30

<210> 190
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 190
 gagcccgagg cgccgattca ggtcgtggtc g 31

<210> 191
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 191
 cacgacctga atcgg'gcct cgggctcctt 30