



(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)



1-0023700

(51)⁷ C12P 7/42; C12R 1/19; C08J 11/16; (13) B
C12N 15/09

(21) 1-2014-00192

(22) 27/01/2012

(86) PCT/JP2012/051854 27/01/2012

(87) WO2013/111332A1 01/08/2013

(45) 25/05/2020 386

(43) 25/03/2014 312A

(73) KAO CORPORATION (JP)

14-10, Nihonbashi Kayabacho 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-8210 Japan

(72) NUKUI, Noriyuki (JP); KOMAKI, Maki (JP); NISHIZAWA, Akito (JP); NISHI, Tatsunari (JP)

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ TEREPTHALAT 1,2-CIS-DIHYDRODIOL, AXIT
PROTocatechuic VÀ AXIT GALIC TỪ MUỐI KALI CỦA AXIT
TEREPHTALIC

(57) Sáng chế đề cập đến các phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol, axit protococatechuic và axit galic. Cụ thể là terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol (TPA-DHD) có thể được sản xuất bằng cách sử dụng muối của axit terephthalic mà chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic và bằng cách sử dụng vi sinh vật biểu hiện terephthalat 1,2-dioxygenaza làm nguyên liệu. Hơn nữa, TPA-DHD có thể được chuyển hoá thành axit protococatechuic bằng dehydrogenaza TPA-DHD và axit protococatechuic có thể được chuyển hoá thành axit galic bằng para-hydroxybenzoat hydroxylaza. Ngoài ra, bằng cách xử lý nhiệt các polyeste thải trong dung môi etylen glycol hoặc dung môi 1-butanol chứa kali hydroxit, các polyeste này có thể bị khử trùng hợp một cách hiệu quả, và có thể tạo ra kali terephthalat thích hợp cho việc sản xuất hoá chất nhờ vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol (dưới đây được viết tắt là TPA-DHD, nếu cần) từ nguyên liệu muối kali của axit terephthalic sử dụng vi sinh vật biểu hiện terephthalat 1,2-dioxygenaza, phương pháp chuyển hoá tiếp TPA-DHD thành axit protocatechuic hoặc axit galic, và phương pháp thu được kali terephthalat để làm nguyên liệu bằng cách khử trùng hợp các polyeste thải. Lưu ý rằng, theo sáng chế, kali terephthalat liên quan đến hợp chất trong đó axit terephthalic trong dikali terephthalat, 1-kali 4-natri terephthalat, 1-kali 4-amoni terephthalat, hoặc tương tự tạo thành muối với ion kali thông qua ít nhất một nhóm carboxyl còn lại của axit terephthalic.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit terephthalic là hóa chất giá thấp được sản xuất với số lượng lớn chủ yếu làm nguyên liệu để sản xuất polyeste trên cơ sở axit terephthalic bao gồm polyetylen terephthalat (dưới đây được viết tắt là PET), polytrimetylen terephthalat (dưới đây được viết tắt là PTT), và polybutylen terephthalat (dưới đây được viết tắt là PBT). Bởi vì axit terephthalic là hóa chất giá thấp, các kỹ thuật sản xuất các hóa chất hữu ích như TPA-DHD, 2-pyron-4,6-axit dicarboxylic, axit protocatechuic, hoặc axit galic từ nguyên liệu axit terephthalic, sử dụng các vi sinh vật đã được phát triển (các tài liệu từ 1 đến 5). Đã biết rằng axit 2-hydroxy terephthalic là nguyên liệu để sản xuất các dược phẩm hoặc các vật liệu nhựa có thể được sản xuất bằng phản ứng tách nước TPA-DHD (các tài liệu sáng chế 1 và 2).

Trong các trường hợp trong đó các hóa chất hữu ích được tạo ra từ nguyên liệu axit terephthalic sử dụng các vi sinh vật, cần phải bổ sung muối của axit terephthalic mà có độ tan trong nước tốt, chứ không phải chính axit terephthalic, vào môi trường nuôi cấy. Bởi vì natri hydroxit không đắt như kali hydroxit, nên các muối natri của axit terephthalic thường được sử dụng làm nguyên liệu. Không có báo cáo nào mô tả về việc sản xuất các hóa chất hữu ích với nguyên liệu muối kali của axit terephthalic sử dụng các vi sinh vật hoặc không có báo cáo cho thấy rằng khả năng của muối natri của axit

terephthalic trong việc sản xuất hợp chất mong muốn là tốt hơn so với khả năng của muối kali của axit terephthalic.

Về việc tái chế polyeste trên cơ sở axit terephthalic, số công nghệ tái chế đã phát triển đặc biệt tập trung vào việc tái chế các chai PET thải và đang tiến tới việc thương mại hóa. Tuy nhiên, chi phí cho việc tái chế cao, và đòi hỏi phải có công nghệ tái chế sinh lợi nhiều hơn. Như nêu trên, việc sử dụng axit terephthalic thu được từ các polyeste thải làm nguyên liệu trong việc sản xuất hóa chất là giải pháp cho các vấn đề môi trường và giảm chi phí sản xuất, và do đó là vấn đề nghiên cứu và triển khai quan trọng.

Như một phương pháp tái chế các polyeste thải, ngoài phương pháp tái chế nguyên liệu mà nhờ đó thu được các polyeste ban đầu, đã biết đến phương pháp tái chế hóa học mà nhờ đó thu được axit terephthalic, bis-2-hydroxyethyl terephthalat, hoặc tương tự thông qua phản ứng khử trùng hợp hóa học polyeste (các tài liệu sáng chế từ 6 đến 11). Đã biết rằng phản ứng khử trùng hợp là khả thi bằng cách gia nhiệt các polyeste như PET trong dung môi phản ứng etylen glycol hoặc dung môi phản ứng rượu chứa hydroxit của kim loại kiềm như natri hydroxit. Trong trường hợp này, vì natri hydroxit là hóa chất giá thấp, nên natri hydroxit thường được dùng như hydroxit của kim loại kiềm. Nhưng hiện không có các ứng dụng để sử dụng terephthalat của kim loại kiềm thu được, nên hoạt động tái chế tất yếu là tiếp tục xử lý terephthalat của kim loại kiềm bằng axit để thu được axit terephthalic. Tuy nhiên, hoạt động tái chế như vậy khó thực hiện được vì chi phí sản xuất ngày càng cao và axit terephthalic thu được là hóa chất giá thấp.

Mặc dù đã biết rằng PET có thể được khử trùng hợp trong dung môi etylen glycol chứa kali hydroxit (tài liệu phi sáng chế 1), nhưng không có báo cáo về các kết quả so sánh sự khác biệt trong phản ứng khử trùng hợp PET giữa kali hydroxit và natri hydroxit trong dung môi etylen glycol. Hơn nữa, không có báo cáo về các công nghệ tái chế polyeste thải trong đó, sau khi PET, PTT, hoặc PBT bị khử trùng hợp trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa kali hydroxit để nhờ đó thu được các kali terephthalat, các kali terephthalat được chuyển hóa thành các hóa chất hữu ích khác sử dụng các vi sinh vật.

Ví dụ của một thử nghiệm đã được báo cáo, trong đó thu được axit terephthalic bằng cách khử trùng hợp PET thải trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa natri hydroxit và bổ sung axit sulfuric (tài liệu sáng chế 12). Cho đến nay, không có báo cáo

nào cho thấy PET thải bị khử trùng hợp trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa kali hydroxit, và sự khác biệt đối với phản ứng khử trùng hợp polyeste trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa kiềm được so sánh giữa kali hydroxit và natri hydroxit.

Trong các trường hợp nếu các polyeste thải bị khử trùng hợp trong etylen glycol chứa kali hydroxit, nếu cố gắng để thu được kali terephtalat có độ tinh khiết cao, chi phí cho việc tái chế tăng. Vì vậy, khi sử dụng kali terephtalat có độ tinh khiết thấp chứa etylen glycol làm nguyên liệu, mong muốn là chuyển hóa chúng thành các hóa chất hữu ích sử dụng các vi sinh vật. Tuy nhiên, không có báo cáo về việc sản xuất các hóa chất sử dụng các vi sinh vật trong điều kiện trong đó terephtalat và etylen glycol có mặt cùng nhau. Lưu ý rằng *Escherichia coli* (dưới đây, nếu cần, được gọi là *E.coli*) dòng K-12 mà thường được sử dụng trong lĩnh vực nghiên cứu cơ bản và lĩnh vực sản xuất công nghiệp được biết đến là có khả năng chuyển hóa etylen glycol thành axit glycolic nhờ lactaldehyt reductaza và lactaldehyt dehydrogenaza của nó. Hơn thế nữa, việc đưa đột biến vào lactaldehyt reductaza được báo cáo là làm tăng cường khả năng trao đổi chất etylen glycol (các tài liệu phi sáng chế từ 2 đến 4).

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Patent Mỹ số 5,068,414

Tài liệu sáng chế 2: Patent Mỹ số 5,124,479

Tài liệu sáng chế 3: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm số 2007-104942

Tài liệu sáng chế 4: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm số 2009-65839

Tài liệu sáng chế 5: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm số 2009-213392

Tài liệu sáng chế 6: Patent số 3715812

Tài liệu sáng chế 7: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm số 2000-169623

Tài liệu sáng chế 8: Patent Mỹ số 3,544,622

Tài liệu sáng chế 9: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm số 2002-60542

Tài liệu sáng chế 10: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm số 11-21374

Tài liệu sáng chế 11: Patent Mỹ số 4,542,239

Tài liệu sáng chế 12: WO2005/082826

Các tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Polym.-Plastics Tech. Eng., 43, 369 (2004)

Tài liệu phi sáng chế 2: J. Bacteriol., 153, 134 (1983)

Tài liệu phi sáng chế 3: J. Bacteriol., 171, 6097 (1989)

Tài liệu phi sáng chế 4: J. Biol. Chem., 273, 8308 (1998)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế TPA-DHD sử dụng các muối terephthalat của kim loại kiềm làm nguyên liệu và, phương pháp chuyển hóa TPA-DHD thành axit protocatechuic sử dụng các vi sinh vật và tăng cường khả năng tạo ra các hợp chất này; và sáng chế còn đề xuất phương pháp thu được các terephthalat của kim loại kiềm như vậy bằng cách khử trùng hợp các polyeste thải.

Để giải quyết các mục đích nêu trên, trong quá trình tiến hành các nghiên cứu về phản ứng khử trùng hợp polyeste trên cơ sở axit terephthalic PET trong dung dịch kiềm để thu được axit terephthalic, các tác giả sáng chế đã so sánh khả năng của thể tái tổ hợp *Escherichia coli* trong việc sản xuất axit protocatechuic và đã nhận thấy rằng khả năng trong việc tạo ra axit protocatechuic khi sử dụng nguyên liệu kali terephthalat (dikali terephthalat, muối 1-kali 4-amoni hoặc 1-kali 4-natri terephthalat) là cao hơn so với khi sử dụng dinatri terephthalat, vì thế đã tập trung vào việc sử dụng kali terephthalat.

Khi độ tan trong nước của muối của axit terephthalic cần sử dụng làm nguyên liệu thấp, thể tích lỏng được cấp từ thùng chứa nguyên liệu tăng và vì thế lượng hợp

chất mong muốn được tạo ra cho thùng nuôi cấy giảm. Do đó, tốt hơn nếu sử dụng muối của axit terephthalic có độ tan trong nước cao làm nguyên liệu. Xét về điều này, độ tan của dinatri terephthalat, 1-kali 4-natri terephthalat, và dikali terephthalat trong nước ở nhiệt độ 30°C được đánh giá; và đã phát hiện ra rằng độ tan của dikali terephthalat khoảng 1,0 M; độ tan của 1-kali 4-natri terephthalat khoảng 0,96 M; độ tan của dinatri terephthalat khoảng 0,63 M; và kali terephthalat có độ tan trong nước cao. Hơn nữa, cũng phát hiện ra rằng kali terephthalat như dikali terephthalat hoặc 1-kali 4-natri terephthalat đã tạo ra khả năng của vi sinh vật như *Escherichia coli* trong việc sản xuất hợp chất mong muốn, so với dinatri terephthalat.

Hơn nữa, trên thực tế, giá của một mol amoniac là thấp hơn giá của một mol kali hydroxit hoặc natri hydroxit, độ tan của các amoni terephthalat khác nhau trong nước ở nhiệt độ 30°C được đánh giá; và đã phát hiện ra rằng độ tan của 1-kali 4-amoni terephthalat khoảng 0,85 M; độ tan của 1-natri 4-amoni terephthalat khoảng 0,61 M; độ tan của diamoni terephthalat khoảng 0,51 M; và 1-kali 4-amoni terephthalat có độ tan trong nước cao. Ngoài ra, cũng phát hiện ra rằng khả năng của vi sinh vật như *Escherichia coli* trong việc sản xuất hợp chất mong muốn là tuyệt vời khi sử dụng 1-kali 4-amoni terephthalat được, do đó giải quyết được mục đích của sáng chế.

Tiếp theo, các tác giả sáng chế nghiên cứu chuyên sâu về phản ứng khử trùng hợp của từng PET, PTT và PBT trong dung dịch kiềm bằng cách gia nhiệt để tìm ra rằng, khi phản ứng khử trùng hợp được thực hiện trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa hydroxit của kim loại kiềm, việc sử dụng kali hydroxit như hydroxit của kim loại kiềm dẫn đến tốc độ khử trùng hợp của polyeste nhanh hơn và hơn thế nữa, hiệu quả thu gom muối của axit terephthalic cao hơn, so với việc sử dụng natri hydroxit. Kết quả, họ đã phát hiện ra rằng phản ứng khử trùng hợp sản xuất polyeste trên cơ sở axit terephthalic trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa kali hydroxit là tuyệt vời như phương pháp điều chế muối của axit terephthalic bằng cách khử trùng hợp các polyeste thải.

Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã nhận ra rằng, sự thay đổi dung môi phản ứng dùng cho phản ứng khử trùng hợp từ etylen glycol sang 1-butanol cho phép làm giảm nhiệt độ phản ứng của phản ứng khử trùng hợp và bất ngờ mang lại hiệu quả thu muối của axit terephthalic tuyệt vời. Hơn thế nữa, ở phản ứng khử trùng hợp trong 1-butanol, việc không sử dụng natri hydroxit mà sử dụng kali hydroxit làm hydroxit của kim loại

kiềm bất ngờ mang lại hiệu quả khử trùng hợp muối của axit terephthalic tuyệt vời.

Như nêu trên, các tác giả sáng chế đã nhận ra rằng việc không sử dụng natri mà là kali làm kim loại kiềm được sử dụng được ưu tiên không chỉ trong việc sản xuất hợp chất mong muốn bằng vi sinh vật sử dụng muối kim loại kiềm của axit terephthalic làm nguyên liệu mà cả trong phản ứng khử trùng hợp các polyeste trong dung môi etylen glycol hoặc dung môi 1-butanol nhằm thu được kali terephthalat làm nguyên liệu.

Do đó, sáng chế đề xuất các khía cạnh từ (1) đến (24) dưới đây.

(1) Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol bao gồm việc cho vi sinh vật hoặc sản phẩm giống nuôi cấy đã được xử lý của nó phản ứng với axit terephthalic trong môi trường nước chứa muối của axit terephthalic để tạo ra terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol, trong đó muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic; và trong đó vi sinh vật có ADN được nêu ở các mục (a), (b), (c), hoặc (d) dưới đây; ADN được nêu ở các mục (e), (f), (g); hoặc (h) dưới đây, và ADN được nêu ở các mục (i), (j), (k), hoặc (l) dưới đây; và có thể tạo ra terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol từ axit terephthalic;

(a) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

(b) ADN chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol;

(c) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1;

(d) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol;

(e) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4;

(f) ADN chứa trình tự axit amin giống như nêu trong SEQ ID NO: 4 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành

terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol;

(g) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3;

(h) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol;

(i) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6;

(j) ADN chứa trình tự axit amin giống như nêu trong SEQ ID NO: 6 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol;

(k) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5;

(l) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol.

(2) Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo mục (1), trong đó môi trường nước chứa muối của axit terephthalic là dung dịch nước chứa một hoặc nhiều kali terephthalat được chọn từ nhóm bao gồm dikali terephthalat, 1-kali 4-natri terephthalat, và 1-kali 4-amoni terephthalat.

(3) Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo mục (1) hoặc (2), trong đó muối của axit terephthalic được bổ sung dưới dạng dung dịch nước, dạng bột hoặc dạng hỗn dịch, với vi sinh vật hoặc sản phẩm giống nuôi cấy đã được xử lý của nó để vi sinh vật hoặc sản phẩm đã được xử lý này phản ứng với axit terephthalic.

(4) Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), trong đó vi sinh vật nêu trong mục (1) còn có khả năng vận chuyển nội bào axit terephthalic được tăng cường bằng cách đưa vào ADN được nêu ở các mục (m), (n), (o), hoặc (p) dưới đây:

(m) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8;

(j) ADN chứa trình tự axit amin giống như nêu trong SEQ ID NO: 8 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có hoạt tính vận chuyển axit terephthalic;

(o) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7;

(p) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có hoạt tính vận chuyển axit terephthalic.

(5) Phương pháp điều chế axit protocatechuic bao gồm việc tạo ra terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol từ muối của axit terephthalic bằng phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) và sau đó chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit protocatechuic, trong đó vi sinh vật còn có ADN nêu ở mục (q), (r), (s), hoặc (t) dưới đây và có thể tạo ra axit protocatechuic từ axit terephthalic:

(q) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10;

(r) ADN chứa trình tự axit amin giống như nêu trong SEQ ID NO: 10 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có hoạt tính chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit protocatechuic;

(s) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9;

(t) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có hoạt tính chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit protocatechuic.

(6) Phương pháp điều chế axit protocatechuic bao gồm việc tạo ra terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol từ muối của axit terephthalic bằng phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), và sau đó chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit protocatechuic bằng cách sử dụng vi sinh vật thu được bằng cách đưa vào ADN được thể hiện ở các mục (q), (r), (s), hoặc (t) bằng cách biến nạp, hoặc sản phẩm giống nuôi cấy đã được xử lý của nó.

(7) Phương pháp điều chế axit galic bao gồm việc tạo ra terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol từ muối của axit terephthalic bằng phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) và sau đó chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit galic, trong đó vi sinh vật còn có ADN nêu ở mục (q), (r), (s), hoặc (t) dưới đây, ADN nêu ở mục (u), (v), (w), hoặc (x) dưới đây và có thể tạo ra axit galic từ axit terephthalic:

(q) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10;

(r) ADN chứa trình tự axit amin giống như nêu trong SEQ ID NO: 10 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có hoạt tính chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit protocatechuic;

(s) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9;

(t) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có hoạt tính chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit protocatechuic;

(u) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12;

(v) ADN chứa trình tự axit amin giống như nêu trong SEQ ID NO: 12 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có hoạt tính chuyển hoá axit protocatechuic thành axit galic;

(w) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 11;

(x) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 11 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có hoạt tính chuyển hoá axit protocatechuic thành axit galic.

(8) Phương pháp điều chế axit galic bao gồm việc tạo ra terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol từ muối của axit terephthalic bằng phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), và sau đó chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit galic bằng cách sử dụng vi sinh vật thu được bằng cách đưa vào ADN nêu ở mục (u), (v), (w), hoặc (x), ngoài ADN nêu ở mục (q), (r), (s), hoặc (t) bằng cách biến nạp, hoặc sản phẩm giống nuôi cấy đã được xử lý của nó.

(9) Phương pháp điều chế terephtalat 1,2-cis-dihydrodiol theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) còn bao gồm bước thu được muối của axit terephtalic theo các bước từ (A) đến (D) dưới đây:

(A) gia nhiệt vật liệu thải bằng polyeste chứa polyetylen terephtalat, polytrimetylen terephtalat, hoặc polybutylen terephtalat như thành phần chính và chứa tạp chất trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa kali hydroxit hoặc trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa cả kali hydroxit và natri hydroxit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 196°C trong 10 phút hoặc lâu hơn để nhờ đó làm bay hơi nước trong dung dịch phản ứng và đồng thời khử trùng hợp polyetylen terephtalat, polytrimetylen terephtalat, hoặc polybutylen terephtalat chứa trong vật liệu thải này;

(B) loại bỏ tạp chất rắn nổi ra khỏi dung dịch phản ứng khử trùng hợp vật liệu thải thu được ở bước (A) bằng phương pháp tuyển nổi các tạp chất rắn chứa trong dung dịch;

(C) thu gom các chất rắn không phải tạp chất nổi từ dung dịch đã xử lý ở bước (B) bằng phương pháp tách rắn-lỏng;

(D) xử lý các chất rắn thu gom được ở bước (C) bằng cách sấy nhiệt, sấy dưới áp suất giảm, hoặc ly tâm để nhờ đó làm giảm hàm lượng glycol trong các chất rắn này và thu được chất rắn còn lại là muối của axit terephtalic.

(10) Phương pháp điều chế terephtalat 1,2-cis-dihydrodiol theo mục (9) bao gồm việc thu gom dung môi phản ứng etylen glycol sau khi thu gom các chất rắn bằng phương pháp tách rắn-lỏng ở bước (C), và sử dụng dung môi này làm dung môi phản ứng etylen glycol ở bước (A).

(11) Phương pháp điều chế axit protocatechuic theo mục (5) hoặc (6) còn bao gồm bước thu được muối của axit terephtalic theo các bước từ (A) đến (D) dưới đây:

(A) gia nhiệt vật liệu thải bằng polyeste chứa polyetylen terephtalat, polytrimetylen terephtalat, hoặc polybutylen terephtalat như thành phần chính và chứa tạp chất trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa kali hydroxit hoặc trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa cả kali hydroxit và natri hydroxit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 196°C trong 10 phút hoặc lâu hơn để nhờ đó làm bay hơi nước trong dung dịch phản ứng và đồng thời khử trùng hợp polyetylen terephtalat,

polytrimetylen terephtalat, hoặc polybutylen terephtalat chứa trong vật liệu thải;

(B) loại bỏ tạp chất rắn nổi ra khỏi dung dịch phản ứng khử trùng hợp vật liệu thải thu được ở bước (A) bằng phương pháp tuyển nổi các tạp chất rắn chứa trong dung dịch;

(C) thu gom các chất rắn không phải tạp chất nổi từ dung dịch đã xử lý ở bước (B) bằng phương pháp tách rắn-lỏng;

(D) xử lý các chất rắn thu gom được ở bước (C) bằng cách sấy nhiệt, sấy dưới áp suất giảm, hoặc ly tâm để nhờ đó làm giảm hàm lượng glycol trong các chất rắn này và thu được chất rắn còn lại là muối của axit terephtalic.

(12) Phương pháp điều chế axit protocatechuic theo mục (11) bao gồm việc thu gom dung môi phản ứng etylen glycol sau khi thu gom các chất rắn bằng phương pháp tách rắn-lỏng ở bước (C); sử dụng dung môi này làm dung môi phản ứng etylen glycol ở bước (A); và nhờ đó sử dụng muối của axit terephtalic thu được bằng cách sử dụng lại, mà không bỏ đi, dung môi phản ứng etylen glycol.

(13) Phương pháp điều chế axit galic theo mục (7) hoặc (8) còn bao gồm bước thu được muối của axit terephtalic theo các bước từ (A) đến (D) dưới đây:

(A) gia nhiệt vật liệu thải bằng polyeste chứa polyetylen terephtalat, polytrimetylen terephtalat, hoặc polybutylen terephtalat như thành phần chính và chứa tạp chất trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa kali hydroxit hoặc trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa cả kali hydroxit và natri hydroxit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 196°C trong 10 phút hoặc lâu hơn để nhờ đó làm bay hơi nước trong dung dịch phản ứng và đồng thời khử trùng hợp polyetylen terephtalat, polytrimetylen terephtalat, hoặc polybutylen terephtalat chứa trong vật liệu thải;

(B) loại bỏ tạp chất rắn nổi ra khỏi dung dịch phản ứng khử trùng hợp vật liệu thải thu được ở bước (A) bằng phương pháp tuyển nổi các tạp chất rắn chứa trong dung dịch;

(C) thu gom các chất rắn không phải tạp chất nổi từ dung dịch đã xử lý ở bước (B) bằng phương pháp tách rắn-lỏng;

(D) xử lý các chất rắn thu gom được ở bước (C) bằng cách sấy nhiệt, sấy dưới

áp suất giảm, hoặc ly tâm để nhờ đó làm giảm hàm lượng glycol trong các chất rắn này và thu được chất rắn còn lại là muối của axit terephthalic.

(14) Phương pháp điều chế axit galic theo mục (13) bao gồm việc thu gom dung môi phản ứng etylen glycol sau khi thu gom các chất rắn bằng phương pháp tách rắn-lỏng ở bước (C); sử dụng dung môi này làm dung môi phản ứng etylen glycol ở bước (A); và nhờ đó sử dụng muối của axit terephthalic thu được bằng cách sử dụng lại, mà không bỏ đi, dung môi phản ứng etylen glycol.

(15) Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo mục (9) hoặc (10), trong đó vi sinh vật nêu ở mục (1) hoặc (4) có thể phân huỷ etylen glycol chứa trong muối của axit terephthalic thu được từ các bước từ (A) đến (D) bằng cách tăng cường lượng biểu hiện của lactaldehyt reductaza và lactaldehyt dehydrogenaza.

(16) Phương pháp điều chế axit protocatechuic theo mục (11) hoặc (12), trong đó vi sinh vật nêu ở mục (5) có thể phân huỷ etylen glycol chứa trong muối của axit terephthalic thu được từ các bước từ (A) đến (D) bằng cách tăng cường lượng biểu hiện của lactaldehyt reductaza và lactaldehyt dehydrogenaza.

(17) Phương pháp điều chế axit galic theo mục (13) hoặc (14), trong đó vi sinh vật nêu ở mục (7) có thể phân huỷ etylen glycol chứa trong muối của axit terephthalic thu được từ các bước từ (A) đến (D) bằng cách tăng cường lượng biểu hiện của lactaldehyt reductaza và lactaldehyt dehydrogenaza.

(18) Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) còn bao gồm bước thu được muối của axit terephthalic theo các bước từ (E) đến (H) dưới đây:

(E) gia nhiệt vật liệu thải bằng polyeste chứa polyetylen terephthalat, polytrimetylen terephthalat, hoặc polybutylen terephthalat như thành phần chính và chứa tạp chất trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa kali hydroxit hoặc trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa cả kali hydroxit và natri hydroxit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 116°C trong 10 phút hoặc lâu hơn để nhờ đó làm bay hơi nước trong dung dịch phản ứng và đồng thời khử trùng hợp polytrimetylen terephthalat hoặc polybutylen terephthalat chứa trong vật liệu thải;

(F) loại bỏ tạp chất rắn nổi ra khỏi dung dịch phản ứng khử trùng hợp vật liệu

thải thu được ở bước (E) bằng phương pháp tuyển nổi các tạp chất rắn chứa trong dung dịch;

(G) thu gom các chất rắn không phải tạp chất nổi từ dung dịch đã xử lý ở bước (F) bằng phương pháp tách rắn-lỏng;

(H) cho các chất rắn thu gom được ở bước (G) xử lý sấy nhiệt, xử lý sấy dưới áp suất giảm, hoặc xử lý ly tâm để nhờ đó làm giảm hàm lượng 1-butanol và các glycol trong các chất rắn và thu được chất rắn còn lại là muối của axit terephthalic.

(19) Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo mục (18) bao gồm bước thu gom dung môi phản ứng 1 butanol sau khi thu gom các chất rắn bằng phương pháp tách rắn-lỏng ở bước (G); sử dụng dung môi này làm dung môi phản ứng 1-butanol ở bước (E); và nhờ đó sử dụng muối của axit terephthalic thu được bằng cách sử dụng lại, mà không bỏ đi, dung môi phản ứng etylen glycol.

(20) Phương pháp điều chế axit protocatechuic theo mục (5) hoặc (6) còn bao gồm bước thu được muối của axit terephthalic theo các bước từ (E) đến (H) dưới đây:

(E) gia nhiệt vật liệu thải bằng polyeste chứa polyetylen terephthalat, polytrimetylen terephthalat, hoặc polybutylen terephthalat như thành phần chính và chứa tạp chất trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa kali hydroxit hoặc trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa cả kali hydroxit và natri hydroxit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 116°C trong 10 phút hoặc lâu hơn để nhờ đó làm bay hơi nước trong dung dịch phản ứng và đồng thời khử trùng hợp polytrimetylen terephthalat hoặc polybutylen terephthalat chứa trong vật liệu thải;

(F) loại bỏ tạp chất rắn nổi ra khỏi dung dịch phản ứng khử trùng hợp vật liệu thải thu được ở bước (E) bằng phương pháp tuyển nổi các tạp chất rắn chứa trong dung dịch;

(G) thu gom các chất rắn không phải tạp chất nổi từ dung dịch đã xử lý ở bước (F) bằng phương pháp tách rắn-lỏng;

(H) cho các chất rắn thu gom được ở bước (G) xử lý sấy nhiệt, xử lý sấy dưới áp suất giảm, hoặc xử lý ly tâm để nhờ đó làm giảm hàm lượng 1-butanol và các glycol trong các chất rắn và thu được chất rắn còn lại là muối của axit terephthalic.

(21) Phương pháp điều chế axit protocatechuic theo mục (20) bao gồm bước thu gom dung môi phản ứng 1 butanol sau khi thu gom các chất rắn bằng phương pháp tách rắn-lỏng ở bước (G); sử dụng dung môi này làm dung môi phản ứng 1-butanol ở bước (E); và nhờ đó sử dụng muối của axit terephthalic thu được bằng cách sử dụng lại, mà không bỏ đi, dung môi phản ứng etylen glycol.

(22) Phương pháp điều chế axit galic theo mục (7) hoặc (8) còn bao gồm bước thu được muối của axit terephthalic theo các bước từ (E) đến (H) dưới đây:

(E) gia nhiệt vật liệu thải bằng polyeste chứa polyetylen terephthalat, polytrimetylen terephthalat, hoặc polybutylen terephthalat như thành phần chính và chứa tạp chất trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa kali hydroxit hoặc trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa cả kali hydroxit và natri hydroxit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 116°C trong 10 phút hoặc lâu hơn để nhờ đó làm bay hơi nước trong dung dịch phản ứng và đồng thời khử trùng hợp polytrimetylen terephthalat hoặc polybutylen terephthalat chứa trong vật liệu thải;

(F) loại bỏ tạp chất rắn nổi ra khỏi dung dịch phản ứng khử trùng hợp vật liệu thải thu được ở bước (E) bằng phương pháp tuyển nổi các tạp chất rắn chứa trong dung dịch;

(G) thu gom các chất rắn không phải tạp chất nổi từ dung dịch đã xử lý ở bước (F) bằng phương pháp tách rắn-lỏng;

(H) cho các chất rắn thu gom được ở bước (G) xử lý sấy nhiệt, xử lý sấy dưới áp suất giảm, hoặc xử lý ly tâm để nhờ đó làm giảm hàm lượng 1-butanol và các glycol trong các chất rắn và thu được chất rắn còn lại là muối của axit terephthalic.

(23) Phương pháp điều chế axit galic theo mục (22) bao gồm bước thu gom dung môi phản ứng 1 butanol sau khi thu gom các chất rắn bằng phương pháp tách rắn-lỏng ở bước (G); sử dụng dung môi này làm dung môi phản ứng 1-butanol ở bước (E); và nhờ đó sử dụng muối của axit terephthalic thu được bằng cách sử dụng lại, mà không bỏ đi, dung môi phản ứng etylen glycol.

(24) Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (23) trong đó vi sinh vật là *Escherichia coli*.

Theo sáng chế, khi muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic được sử dụng làm nguyên liệu, TPA-DHD có thể được tạo ra một cách hiệu quả bằng cách sử dụng vi sinh vật. Ngoài ra, theo sáng chế, TPA-DHD thu được có thể được chuyển hoá một cách hiệu quả thành axit protocatechuic hoặc axit galic. Hơn nữa, bằng cách khử trùng hợp các polyeste thải, kali terephthalat thích hợp để làm nguyên liệu để tạo ra các dẫn xuất terephthalat nhờ vi sinh vật có thể được tạo ra.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện quá trình mà axit protocatechuic và axit galic được tạo ra từ axit terephthalic thông qua TPA-DHD.

Fig.2 là đồ thị thể hiện hiệu suất tạo ra axit terephthalic khi PET thải bị khử trùng hợp trong dung môi etylen glycol chứa kali hydroxit và/hoặc kali hydroxit.

Fig.3 là đồ thị thể hiện hiệu suất tạo ra axit terephthalic khi phản ứng khử trùng hợp được thực hiện trong dung môi etylen glycol chứa hạt kali hydroxit hoặc dung dịch natri hydroxit.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết.

Như một phương pháp điều chế axit terephthalic được sử dụng làm nguyên liệu để sản xuất hợp chất bằng vi sinh vật, các muối của axit terephthalic thường được ưu tiên hơn so với chính axit terephthalic vì chúng có độ tan trong nước cao hơn. Các ví dụ về các muối của axit terephthalic được sử dụng cho mục đích này bao gồm dikali terephthalat, 1-kali 4-natri terephthalat, 1-kali 4-amoni terephthalat, dinatri terephthalat, 1-natri 4-amoni terephthalat, và diamoni terephthalat.

Trong bản mô tả này, dikali terephthalat liên quan đến muối trong đó nhóm carboxyl còn lại ở các vị trí số 1 và 4 của axit terephthalic được liên kết ion với các ion kali.

1-kali 4-natri terephthalat liên quan đến muối trong đó nhóm carboxyl còn lại ở vị trí số 1 của axit terephthalic được liên kết ion với ion kali và nhóm carboxyl còn lại ở vị trí số 4 của axit terephthalic được liên kết ion với ion natri.

1-kali 4-amoni terephthalat liên quan đến muối trong đó nhóm carboxyl còn lại ở vị trí số 1 của axit terephthalic được liên kết ion với ion kali và nhóm carboxyl còn lại ở vị trí số 4 của axit terephthalic được liên kết ion với ion amoni.

Dinatri terephthalat liên quan đến muối trong đó nhóm carboxyl còn lại ở các vị trí số 1 và 4 của axit terephthalic được liên kết ion với các ion natri.

1-natri 4-amoni terephthalat liên quan đến muối trong đó nhóm carboxyl còn lại ở vị trí số 1 của axit terephthalic được liên kết ion với ion natri và nhóm carboxyl còn lại ở vị trí số 4 của axit terephthalic được liên kết ion với ion amoni.

Diamoni terephthalat liên quan đến muối trong đó nhóm carboxyl còn lại ở các vị trí số 1 và 4 của axit terephthalic được liên kết ion với các ion amoni.

Dung dịch nước của mỗi muối của axit terephthalic, cụ thể là dikali terephthalat, 1-kali 4-natri terephthalat, 1-kali 4-amoni terephthalat, dinatri terephthalat, 1-natri 4-amoni terephthalat, và diamoni terephthalat, có thể thu được bằng cách bổ sung, tính theo axit terephthalic dạng bột, hai lần lượng kali hydroxit tính theo tỷ số mol, một lần lượng kali hydroxit và một lần lượng natri hydroxit tính theo tỷ số mol, một lần lượng kali hydroxit và dung dịch amoni chứa một lần lượng amoniac tính theo tỷ số mol, hai lần lượng natri hydroxit tính theo tỷ số mol, một lần lượng natri hydroxit và dung dịch amoni chứa một lần lượng amoniac tính theo tỷ số mol, và dung dịch amoni chứa hai lần lượng amoniac tính theo tỷ số mol, tương ứng, vào một lượng nước thích hợp; và sau đó khuấy đồng thời gia nhiệt. Bột muối của axit terephthalic có thể thu được bằng cách sấy bằng nhiệt, sấy dưới áp suất giảm, hoặc kết tinh dung dịch muối của axit terephthalic.

Muối của axit terephthalic được sử dụng theo sáng chế liên quan đến muối của axit terephthalic mà chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic. Tốt hơn nếu là muối của axit terephthalic chứa 0,6 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic.

Trong bản mô tả này, lượng kali được xác định là chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic liên quan đến lượng kali thu được từ kali terephthalat, tức là, kali tạo ra liên kết ion với nhóm carboxyl còn lại của axit terephthalic. Tức là, trong các trường hợp sử dụng muối

của axit terephthalic thô, ngay cả khi kali thu được từ kali hydroxit hoặc tương tự được chứa trong đó như tạp chất, lượng kali được tính bằng cách loại trừ kali này. Lúc phản ứng, kali (ion) thu được từ kali terephthalat chỉ cần chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol tính theo tất cả các axit terephthalic trong dung môi nước.

Đối với muối của axit terephthalic, dạng bất kỳ của bột muối của axit terephthalic, dung dịch nước trong đó muối của axit terephthalic được hoà tan, hoặc hỗn dịch của muối của axit terephthalic trong đó bột muối của axit terephthalic được trộn và tồn tại trong dung dịch muối của axit terephthalic ở trạng thái huyền phù đặc có thể được sử dụng theo sáng chế. Sau đây, muối của axit terephthalic, trừ khi có quy định khác, sẽ bao gồm dạng bất kỳ của muối của axit terephthalic.

Tốt hơn, theo sáng chế, nếu sử dụng muối của axit terephthalic mà chứa một hoặc nhiều kali terephthalat được chọn từ nhóm bao gồm dikali terephthalat, 1-kali 4-natri terephthalat, và 1-kali 4-amoni terephthalat; và chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic.

Theo sáng chế, muối của axit terephthalic được chọn từ dikali terephthalat, 1-kali 4-natri terephthalat, và 1-kali 4-amoni terephthalat như thành phần riêng rẽ có thể được sử dụng. Mặt khác, muối của axit terephthalic được sử dụng theo sáng chế có thể chứa, ngoài kali terephthalat nêu trên, dinatri terephthalat, 1-natri 4-amoni terephthalat, diamoni terephthalat và tương tự miễn là thoả mãn hàm lượng kali nêu trên.

Ví dụ, trong các trường hợp nếu hỗn hợp gồm hai loại muối của axit terephthalic, 1-kali 4-natri terephthalat và dinatri terephthalat, thì 1-kali 4-natri terephthalat chứa một hoặc nhiều lần lượng tính theo dinatri terephthalat tính theo tỷ số mol, có thể được sử dụng. Hơn nữa, trong các trường hợp nếu hỗn hợp gồm hai loại terephthalat, dikali terephthalat và dinatri terephthalat, thì dikali terephthalat chứa 1/3 lần hoặc lớn hơn lượng tính theo dinatri terephthalat tính theo tỷ số mol có thể được sử dụng.

Theo sáng chế, hỗn hợp gồm 3 loại hoặc nhiều hơn muối của axit terephthalic cũng có thể được sử dụng. Trong trường hợp này, hỗn hợp như vậy cần chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic. Tốt hơn, nếu muối của axit terephthalic chứa một hoặc nhiều loại kali

terephthalat được chọn từ nhóm bao gồm dikali terephthalat, 1-kali 4-natri terephthalat, và 1-kali 4-amoni terephthalat; và 2 hoặc lớn hơn 2 loại muối của axit terephthalic được chọn từ nhóm bao gồm dinatri terephthalat, 1-natri 4-amoni terephthalat và diamoni terephthalat có thể được sử dụng. Các ví dụ cụ thể của chúng bao gồm dung dịch nước được tạo ra bằng cách trộn dikali terephthalat, dinatri terephthalat, và diamoni terephthalat với tỷ lệ 1:2:1 tính theo tỷ số mol. Dung dịch nước như vậy chứa 0,5 lần lượng kali cho tổng lượng các axit terephthalic, và cũng có thể thu được bằng cách bổ sung, tính theo 1 mol axit terephthalic, 0,5 mol kali hydroxit, 1,0 mol natri hydroxit, và 0,5 mol amoniac vào nước để hoà tan.

Theo sáng chế, muối của axit terephthalic chứa dikali terephthalat hoặc 1-kali 4-natri terephthalat thu được bằng cách khử trùng hợp các polyeste thải trong dung môi etylen glycol hoặc dung môi 1-butanol chứa kali hydroxit hoặc hỗn hợp gồm kali hydroxit và natri hydroxit có thể được sử dụng làm nguyên liệu để sản xuất hợp chất bằng vi sinh vật.

Trong trường hợp này, vì giá của một mol natri hydroxit hoặc dung dịch amoni là thấp hơn giá của kali hydroxit, nên chi phí sản xuất trong một số trường hợp có thể thấp hơn khi sử dụng muối của axit terephthalic được tạo ra bằng cách bổ sung axit terephthalic có độ tinh khiết cao và natri hydroxit hoặc dung dịch amoni vào muối của axit terephthalic thu được bằng cách khử trùng hợp các polyeste thải. Các ví dụ cụ thể của chúng bao gồm sử dụng dung dịch muối của axit terephthalic thu được bằng cách trộn lần lượt dikali terephthalat thu được bằng cách khử trùng hợp các polyeste thải, axit terephthalic có độ tinh khiết cao, và dung dịch amoni với tỷ lệ 6:4:8. Do đó dung dịch muối của axit terephthalic thu được tương đương với dung dịch nước thu được bằng cách trộn dikali terephthalat và diamoni terephthalat với tỷ lệ 6:4 tính theo tỷ số mol.

Trong các trường hợp nếu kali terephthalat được tạo ra từ các polyeste thải bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế, ngoài các ion kali, các ion natri, và các ion amoni, các ion kim loại khác như các ion canxi hoặc các ion lithi có thể bị lẫn vào như các tạp chất. Trong trường hợp này, miễn là muối của axit terephthalic được sử dụng theo sáng chế là muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic, sẽ có vấn đề gì ngay cả khi một lượng nhỏ muối của axit terephthalic như canxi terephthalat hoặc lithi

terephthalat được trộn lẫn.

Sau đây, các bước sản xuất TPA-DHD, axit protocatechuic, và axit galic từ axit terephthalic theo sáng chế sẽ được mô tả. Như được thể hiện trên Fig.1, axit terephthalic bị oxy hoá bởi terephthalat 1,2-dioxygenaza để chuyển hoá thành TPA-DHD. Hơn nữa, TPA-DHD có thể được chuyển hoá thành axit protocatechuic bởi dehydrogenaza TPA-DHD. Hơn thế nữa, axit protocatechuic có thể được chuyển hoá thành axit galic bởi para-hydroxybenzoat hydroxylaza hoặc para-hydroxybenzoat hydroxylaza đã cải tiến (ví dụ, thể đột biến có cùng trình tự axit amin như para-hydroxybenzoat hydroxylaza trừ leuxin ở vị trí số 199 hoặc leuxin ở vị trí số 200 được thế bằng valin hoặc glyxin; và tyrosin ở vị trí số 385 hoặc 386 được thế phenyl alanin, valin, hoặc alanin).

Terephthalat 1,2-dioxygenaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm thành phần oxygenaza và thành phần reductaza. Hơn nữa, thành phần oxygenaza bao gồm hai nhóm con: các nhóm lớn và nhỏ. Các ví dụ về protein nhóm con oxygenaza lớn bao gồm protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, trong đó trình tự axit amin thu được từ *Comamonas testosteroni* dòng 72W2. Dòng vi khuẩn được lưu trữ quốc tế tại Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms Depositary (NPMD) (2-5-8, Kazusakamatar, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Japan) dưới mã lưu giữ NITE ABP-1209 ngày 24/01/2012 và sẵn có để cung cấp. Hơn nữa, các ví dụ về protein nhóm con oxygenaza lớn được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, hoặc thêm đoạn, và có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành TPA-DHD. Ngoài ra, các ví dụ về protein này bao gồm protein có trình tự axit amin giống 75% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2, và có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành TPA-DHD. Trong bản mô tả này, "chức năng liên quan đến sự chuyển hoá từ axit terephthalic thành TPA-DHD" có nghĩa là chức năng mà nhờ đó TPA-DHD có thể được tạo ra khi axit terephthalic phản ứng với protein nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza và protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza.

Các ví dụ về protein nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza bao gồm protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, trong đó trình tự axit amin thu được từ *Comamonas testosteroni* dòng 72W2 nêu trên. Hơn nữa, các ví dụ về protein

nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, hoặc thêm đoạn, và chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành TPA-DHD. Ngoài ra, các ví dụ về protein như vậy bao gồm protein có trình tự axit amin giống 75% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4, và có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành TPA-DHD. Trong bản mô tả này, "chức năng liên quan đến sự chuyển hoá từ axit terephthalic thành TPA-DHD" có nghĩa là chức năng mà nhờ đó TPA-DHD có thể được tạo ra khi axit terephthalic được cho phản ứng với protein nhóm con lớn terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza và protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza.

Các ví dụ về protein nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6, trong đó trình tự axit amin thu được từ *Comamonas testosteroni* dòng 72W2 nêu trên. Hơn nữa, các ví dụ về protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, hoặc thêm đoạn, và chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành TPA-DHD. Ngoài ra, các ví dụ về protein như vậy bao gồm protein có trình tự axit amin giống 75% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6, và có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành TPA-DHD. Trong bản mô tả này, "chức năng liên quan đến sự chuyển hoá từ axit terephthalic thành TPA-DHD" có nghĩa là chức năng mà nhờ đó TPA-DHD có thể được tạo ra khi axit terephthalic được cho phản ứng với protein nhóm con lớn terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza và protein nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza.

Các ví dụ về protein vận chuyển axit terephthalic được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8, trong đó trình tự axit amin thu được từ *Rhodococcus jostii* dòng RHA1. Hơn nữa, các ví dụ về protein vận chuyển axit terephthalic được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, hoặc thêm đoạn, và có khả năng vận chuyển nội bào axit terephthalic. Ngoài ra,

các ví dụ về protein như vậy bao gồm protein có trình tự axit amin giống 75% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8, và có hoạt tính vận chuyển axit terephthalic vào trong tế bào.

Các ví dụ về protein dehydrogenaza TPA-DHD được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, trong đó trình tự axit amin này thu được từ *Comamonas testosteroni* dòng 72W2 nêu trên. Hơn nữa, các ví dụ về protein dehydrogenaza TPA-DHD được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, hoặc thêm đoạn, và có hoạt tính chuyển hoá TPA-DHD thành axit protocatechuic. Ngoài ra, các ví dụ về protein như vậy bao gồm protein có trình tự axit amin giống 75% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, và có hoạt tính chuyển hoá TPA-DHD thành axit protocatechuic.

Các ví dụ về para-hydroxybenzoat hydroxylaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein của GenBank (dưới đây, GenBank được viết tắt là GB) có mã lưu giữ GB là AAG03636 đối với *Pseudomonas aeruginosa* dòng PAO, protein có mã lưu giữ GB là AAN69138 đối với *Pseudomonas putida* dòng KT2440, và protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12, trong đó trình tự axit amin này thu được từ *Corynebacterium glutamicum* dòng ATCC13032. Hơn nữa, các ví dụ về protein para-hydroxybenzoat hydroxylaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, hoặc thêm đoạn, và hoạt tính chuyển hoá axit protocatechuic thành axit galic. Đặc biệt, thể đột biến có trình tự axit amin như mã lưu giữ GB là AAG03636 trừ leuxin ở vị trí số 199 được thế bằng valin hoặc glyxin và tyrosin ở vị trí số 385 được thế bằng phenyl alanin, valin, hoặc alanin; thể đột biến có trình tự axit amin như mã lưu giữ GB là AAN69138 trừ leuxin ở vị trí số 199 được thế bằng valin hoặc glyxin và tyrosin ở vị trí số 386 được thế bằng phenyl alanin, valin, hoặc alanin; hoặc thể đột biến có trình tự axit amin như mã lưu giữ GB là BAB98470 trừ leuxin ở vị trí số 200 được thế bằng valin hoặc glyxin và tyrosin ở vị trí số 385 được thế bằng phenyl alanin, valin, hoặc alanin được ưu tiên sử dụng. Ngoài ra, các ví dụ về protein như vậy bao gồm protein có trình tự axit amin giống 75% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12,

và có hoạt tính chuyển hoá axit protocatechuic thành axit galic.

Các ví dụ về lactaldehyt reductaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có mã lưu giữ GB là AAB40449 đối với *Escherichia coli* dòng K-12. Hơn nữa, các ví dụ về protein lactaldehyt reductaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin của mã lưu giữ GB là AAB40449 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, hoặc thêm đoạn, và có hoạt tính chuyển hoá etylen glycol thành glycoaldehyt. Ngoài ra, các ví dụ về protein như vậy bao gồm protein có trình tự axit amin giống 75% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn với trình tự axit amin của mã lưu giữ GB là AAB40449, và có hoạt tính chuyển hoá etylen glycol thành glycoaldehyt.

Các ví dụ về lactaldehyt dehydrogenaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có mã lưu giữ GB là AAC74497 đối với *Escherichia coli* dòng K-12. Hơn nữa, các ví dụ về protein lactaldehyt dehydrogenaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin của mã lưu giữ GB là AAC74497 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, hoặc thêm đoạn, và có hoạt tính chuyển hoá glycoaldehyt thành axit glycolic. Ngoài ra, các ví dụ về protein như vậy bao gồm protein có trình tự axit amin giống 75% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn với trình tự axit amin của mã lưu giữ GB là AAC74497, và có hoạt tính chuyển hoá glycoaldehyt thành axit glycolic.

Các dòng vi khuẩn này có thể thu được từ ATCC, Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation, Biological Resource Center (dưới đây được viết tắt là NBRC), Incorporated Administrative Agency RIKEN Tsukuba Campus, Biological Resource Center, National Institute of Genetics, National BioResource Project (dưới đây được viết tắt là NBRP), The Coli Genetic Stock Center (dưới đây được viết tắt là CGSC, nếu cần), hoặc tương tự.

Protein bao gồm trình tự axit amin như protein nhóm con lớn terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza, protein nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza, protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza, protein dehydrogenaza TPA-DHD, protein vận chuyển axit terephthalic, protein lactaldehyt reductaza, hoặc protein lactaldehyt dehydrogenaza trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, hoặc thêm đoạn nêu trên và có một trong số các hoạt tính của enzym mong muốn có thể thu được bằng cách cho các đột biến điểm đặc hiệu vào ADN vì thế mà

sự mất đoạn, thế đoạn, hoặc thêm đoạn được vào các vị trí đặc hiệu trong mỗi protein bằng cách sử dụng phương pháp gây đột biến điểm đặc hiệu được mô tả trong Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (dưới đây được viết gọn là Molecular Cloning Second Edition), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (dưới đây được viết gọn là Current Protocols in Molecular Biology), Nucleic Acids Res., 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982), Gene, 34, 315 (1985), Nucleic Acids Res., 13, 4431 (1985), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 488 (1985) hoặc tương tự. Số lượng axit amin trong cụm từ "một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, hoặc thêm đoạn" không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là từng hoạt tính enzym được duy trì. mong muốn là số lượng axit amin khác với trình tự axit amin ban đầu; và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 20, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 10, và đặc biệt là nằm trong khoảng từ 1 đến 5.

Các ví dụ về ADN mã hoá protein nhóm con lớn terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1.

Các ví dụ về ADN mã hoá protein nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3.

Các ví dụ về ADN mã hoá protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5.

Các ví dụ về ADN mã hoá protein vận chuyển axit terephthalic được sử dụng trong sáng chế bao gồm ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7.

Các ví dụ về ADN mã hoá protein dehydrogenaza TPA-DHD được sử dụng trong sáng chế bao gồm ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9.

Các ví dụ về ADN mã hoá protein para-hydroxybenzoat hydroxylaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 11.

Các ví dụ về ADN mã hoá protein lactaldehyt reductaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm ADN có trình tự nucleotit ở các vị trí từ 13420 đến 14571 của mã lưu giữ GB là U2958.

Các ví dụ về ADN mã hoá protein lactaldehyt dehydrogenaza được sử dụng trong sáng chế bao gồm ADN có trình tự nucleotit ở các vị trí từ 1486256 đến 1487695 của mã lưu giữ GB là NC_000913.

ADN được sử dụng trong sáng chế còn bao gồm ADN trong đó đột biến như đột biến thế đoạn, đột biến mất đoạn, hoặc đột biến thêm đoạn được đưa vào cho đến khi protein được mã hoá bởi mỗi ADN không làm mất hoạt tính enzym mong muốn; và ADN mà có thể lai với toàn bộ hoặc một phần ADN nêu trong, ví dụ, SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 hoặc 11 như một đoạn dò dưới các điều kiện nghiêm ngặt bằng phương pháp lai. Cụ thể, ADN mà có thể lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt có nghĩa là ADN có thể được nhận dạng bằng cách, sử dụng bộ lọc được cố định với ADN, rửa bộ lọc ở nhiệt độ 65°C trong dung dịch SSC có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 lần nồng độ đến 2 lần nồng độ (thành phần của dung dịch SSC có 1 lần nồng độ là NaCl 150 mM và natri xitrat 15 mM) sau khi tiến hành lai trong sự có mặt của NaCl 0,7 đến 1,0 M ở nhiệt độ 65°C. Lưu ý rằng các phương pháp lai thử nghiệm được mô tả trong *Molecular Cloning: A laboratory manual, Second Edition* (xuất bản bởi Sambrook, Fritsch, và Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Về vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế để tạo ra TPA-DHD sử dụng muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic làm nguyên liệu, vi sinh vật bất kỳ có thể được sử dụng miễn là vi sinh vật có ADN mã hoá nhóm con lớn terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza nêu trên, ADN mã hoá nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza nêu trên, và ADN mã hoá terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza reductaza nêu trên; và có khả năng tạo ra TPA-DHD từ axit terephthalic. Tức là, có thể sử dụng vi sinh vật có ADN được mô tả trong tài liệu (1) nêu trên và có khả năng tạo ra TPA-DHD từ axit terephthalic. Vi sinh vật có tính chất như vậy có thể là thể biến nạp thu được bằng cách cho một hoặc nhiều ADN trong số các ADN được mô tả trong tài liệu (1) nêu trên vào các tế bào chủ bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp.

Hơn nữa, khi TPA-DHD được tạo ra sử dụng muối của axit terephthalic làm nguyên liệu sử dụng vi sinh vật nêu trên, tốt hơn nếu sử dụng, vi sinh vật có ADN mã hoá tác nhân vận chuyển axit terephthalic và khả năng vận chuyển axit terephthalic của nó tăng. Vi sinh vật có tính chất như vậy có thể là thể biến nạp thu được bằng cách cho,

ngoài một hoặc nhiều ADN trong số các ADN được mô tả trong tài liệu (1) nêu trên, một hoặc nhiều ADN trong số các ADN được mô tả trong tài liệu (4) nêu trên vào các tế bào chủ bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp.

Về vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế để tạo ra axit protocatechuic, vi sinh vật bất kỳ có thể được sử dụng miễn là vi sinh vật này có ADN mã hoá protein có hoạt tính của dehydrogenaza TPA-DHD và có khả năng tạo ra axit protocatechuic từ TPA-DHD, ngoài khả năng tạo ra TPA-DHD nêu trên từ axit terephthalic. Tức là, vi sinh vật được mô tả trong tài liệu (1) hoặc (4) nêu trên, vi sinh vật có ADN được mô tả trong tài liệu (5) nêu trên và có khả năng tạo ra axit protocatechuic từ TPA-DHD có thể được sử dụng. Vi sinh vật có tính chất như vậy có thể là thể biến nạp thu được bằng cách cho, ngoài một hoặc nhiều ADN trong số các ADN được mô tả trong tài liệu (1) nêu trên, một hoặc nhiều ADN trong số các ADN được mô tả trong tài liệu (5) nêu trên vào các tế bào chủ bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp. Hơn nữa, khi axit protocatechuic được tạo ra sử dụng muối của axit terephthalic làm nguyên liệu bằng cách sử dụng vi sinh vật nêu trên, tốt hơn nếu sử dụng, vi sinh vật có ADN mã hoá tác nhân vận chuyển axit terephthalic và khả năng vận chuyển axit terephthalic của nó tăng. Về vi sinh vật có tính chất như vậy, thể biến nạp thu được bằng cách cho, ngoài các ADN được mô tả trong tài liệu (1) và (4) nêu trên, một hoặc nhiều ADN trong số các ADN được mô tả trong tài liệu (5) nêu trên vào các tế bào chủ bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp có thể được sử dụng.

Về vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế để tạo ra axit galic, vi sinh vật bất kỳ có thể được sử dụng miễn là vi sinh vật này có ADN mã hoá protein có hoạt tính của dehydrogenaza TPA-DHD và ADN mã hoá protein có para-hydroxybenzoat hydroxylaza; và có khả năng tạo ra axit galic từ TPA-DHD, ngoài khả năng tạo ra TPA-DHD nêu trên từ axit terephthalic. Tức là, vi sinh vật có, ngoài ADN được mô tả trong tài liệu (5) nêu trên, ADN được mô tả trong tài liệu (7) nêu trên và có khả năng tạo ra axit galic từ axit terephthalic có thể được sử dụng. Vi sinh vật có tính chất như vậy có thể là thể biến nạp thu được bằng cách cho, ngoài một hoặc nhiều ADN trong số các ADN được mô tả trong tài liệu (1) và (5) nêu trên, một hoặc nhiều ADN trong số các ADN được mô tả trong tài liệu (7) nêu trên vào các tế bào chủ bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp. Hơn nữa, khi axit galic được tạo ra sử dụng terephthalat làm nguyên liệu bằng cách sử dụng vi sinh vật nêu trên, tốt hơn nếu sử dụng, vi sinh vật có ADN mã hoá tác nhân vận chuyển axit terephthalic và khả năng vận chuyển axit

terephthalic của nó tăng. Vi sinh vật có tính chất như vậy có thể là thể biến nạp thu được bằng cách cho, ngoài các ADN được mô tả trong tài liệu (1), (4), và (5) nêu trên, một hoặc nhiều ADN trong số các ADN được mô tả trong tài liệu (7) nêu trên vào các tế bào chủ bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp.

Về vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế mà phân huỷ etylen glycol lẫn trong muối của axit terephthalic khi các polyeste bị khử trùng hợp trong dung môi etylen glycol, loại có thể được sử dụng là vi sinh vật mà có khả năng phân huỷ etylen glycol tăng bằng cách đưa đột biến vào lactaldehyt reductaza và lactaldehyt dehydrogenaza, và/hoặc tăng cường lượng biểu hiện của lactaldehyt reductaza và lactaldehyt dehydrogenaza trong vi sinh vật nêu trên mà tạo ra TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic từ axit terephthalic.

Sau đây, việc tách dòng ADN và phương pháp điều chế dòng biến nạp sẽ được mô tả một cách chi tiết.

Vi khuẩn như *Escherichia coli* dòng K-12 nêu trên, *Comamonas testosteroni* dòng 72W2, *Rhodococcus jostii* dòng RHA1, hoặc *Corynebacterium glutamicum* dòng ATCC13032 được nuôi cấy dưới các điều kiện nuôi cấy được đưa ra bởi viện lưu trữ vi sinh vật hoặc phương pháp đã biết mà thường được sử dụng. Sau khi nuôi cấy, ADN nhiễm sắc thể của vi sinh vật như vậy được phân lập và tinh chế bằng phương pháp đã biết (ví dụ, phương pháp được mô tả trong Current Protocols in Molecular Biology). Mảnh chứa ADN mã hoá protein mong muốn có thể thu được từ ADN nhiễm sắc thể này bằng cách sử dụng ADN tổng hợp bằng phương pháp lai, phương pháp PCR, hoặc tương tự.

ADN mã hoá protein mong muốn cũng có thể thu được bằng phương pháp tổng hợp hoá học. ADN tổng hợp như vậy có thể được thiết kế trên cơ sở, ví dụ, trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 mã hoá protein nhóm con lớn terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza thu được từ *Comamonas testosteroni* dòng 72W2, trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3 mã hoá protein nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza thu được từ *Comamonas testosteroni* dòng 72W2, và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5 mã hoá protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza thu được từ *Comamonas testosteroni* dòng 72W2.

ADN tổng hợp mã hoá protein vận chuyển axit terephthalic có thể được thiết kế

trên cơ sở trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7 của ADN mã hoá protein vận chuyển axit terephthalic thu được từ *Rhodococcus jostii* dòng RHA1.

ADN tổng hợp mã hoá dehydrogenaza TPA-DHD có thể được thiết kế trên cơ sở trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9 của ADN mã hoá protein dehydrogenaza TPA-DHD thu được từ *Comamonas testosteroni* dòng 72W2.

ADN tổng hợp mã hoá para-hydroxybenzoat hydroxylaza có thể được thiết kế trên cơ sở trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 11 của ADN mã hoá protein para-hydroxybenzoat hydroxylaza (protein trong đó tyrosin ở vị trí số 385 được thế bằng phenyl alanin) thu được từ *Corynebacterium glutamicum* dòng ATCC13032.

ADN tổng hợp mã hoá lactaldehyt reductaza có thể được thiết kế trên cơ sở trình tự nucleotit ở các vị trí từ 13420 đến 14571 của mã lưu giữ GB là U2958 của ADN mã hoá protein lactaldehyt reductaza thu được từ *Escherichia coli* dòng K-12.

ADN tổng hợp mã hoá lactaldehyt dehydrogenaza có thể được thiết kế trên cơ sở trình tự nucleotit ở các vị trí từ 1486256 đến 1487695 của mã lưu giữ GB là NC_000913 của ADN mã hoá protein lactaldehyt dehydrogenaza thu được từ *Escherichia coli* dòng K-12.

Về vectơ mà and nêu trên được liên kết, vectơ bất kỳ bao gồm vectơ plasmit và vectơ thể thực khuẩn có thể được sử dụng miễn là vectơ này có khả năng tự sao chép trong *Escherichia coli* dòng K12 hoặc tương tự. Cụ thể, pUC19 (Gene, 33, 103 (1985)), pUC18, pBR322, pHelix1 (được sản xuất bởi Roche Diagnostics), ZAP Express (được sản xuất bởi Stratagene, Strategies, 5, 58 (1992)), pBluescript II SK(+) (được sản xuất bởi Stratagene, Nucleic Acids Res., 17, 9494 (1989)), pUC118 (được sản xuất bởi Takara Bio Inc.), hoặc tương tự có thể được sử dụng.

Về *Escherichia coli* được sử dụng làm vật chủ cho ADN tái tổ hợp thu được bằng cách liên kết ADN thu được nêu trên với vectơ như vậy, vi sinh vật bất kỳ có thể được sử dụng miễn là vi sinh vật này thuộc *Escherichia coli*. Các ví dụ cụ thể của chúng bao gồm *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (được sản xuất bởi Stratagene, Strategies, 5, 81 (1992)), *Escherichia coli* C600 (Genetics, 39, 440 (1954)), *Escherichia coli* Y1088 (Science, 222, 778 (1983)), *Escherichia coli* Y1090 (Science, 222, 778 (1983)), *Escherichia coli* NM522 (J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)), *Escherichia coli* K802 (J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)), *Escherichia coli* JM105 (Gene, 38, 275

(1985)), và *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* BL21.

Khi ADN nêu trên được đưa vào vi sinh vật được đưa vào giống *Rhodococcus*, giống *Comamonas*, giống *Corynebacterium*, giống *Pseudomonas*, giống *Polaromonas*, giống *Ralstonia*, hoặc giống *Burkholderia*, vector có khả năng tự sao chép trong các vi sinh vật này được sử dụng. Tốt hơn, nếu sử dụng vector con thoi có khả năng tự sao chép trong cả các vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật này và *Escherichia coli* dòng K12, ADN tái tổ hợp có thể được đưa vào vi sinh vật như vậy có vai trò như vật chủ.

Về phương pháp đưa ADN tái tổ hợp, có thể sử dụng phương pháp bất kỳ miễn là phương pháp này đưa ADN vào các tế bào chủ nêu trên, và các ví dụ của nó bao gồm phương pháp sử dụng các ion canxi (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)), phương pháp mở lỗ bằng điện (Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)), phương pháp chuyển tiếp hợp (J. G. C. Ottow, Ann. Rev. Microbiol., Vol.29, p.80 (1975)), và phương pháp dung hợp tế bào (M.H. Gabor, J. Bacteriol., Vol.137, p.1346 (1979)).

ADN tái tổ hợp được chiết từ thể biến nạp thu được như nêu trên, và trình tự nucleotit của ADN sử dụng theo sáng chế mà chứa trong ADN tái tổ hợp như vậy có thể được xác định. Để xác định trình tự nucleotit, phương pháp phân tích trình tự nucleotit thường được sử dụng bao gồm, ví dụ, phương pháp ngắt mạch dideoxy (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)); hoặc thiết bị phân tích trình tự nucleotit 3730xl loại thiết bị phân tích ADN (được sản xuất bởi Applied Biosystems) có thể được sử dụng.

Hơn nữa, trên cơ sở trình tự nucleotit của ADN được xác định trên đây, ADN mong muốn cũng có thể được tạo ra bằng phương pháp tổng hợp hoá học bằng cách sử dụng thiết bị tổng hợp ADN loại 8905 được sản xuất bởi PerSeptive Biosystems hoặc tương tự.

Thể biến nạp nêu trên biểu hiện protein nhóm con lớn terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza, protein nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza, protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza, protein vận chuyển axit terephthalic, protein dehydrogenaza TPA-DHD, protein para-hydroxybenzoat hydroxylaza, protein lactaldehyt reductaza, và/hoặc protein lactaldehyt dehydrogenaza có thể thu được bằng cách biểu hiện ADN nêu trên trong các tế bào chủ sử dụng phương pháp sau.

Khi sử dụng ADN mã hoá protein nêu trên, mảnh ADN với độ dài thích hợp có thể được tạo ra, nếu cần, trong đó mảnh ADN chứa phần mã hoá protein được sử dụng trong sáng chế. Hơn nữa, các nucleotit có thể được thể vì thế mà trình tự nucleotit của phần mã hoá protein như vậy có condon tối ưu cho việc biểu hiện trong vật chủ để nhờ đó tăng cường tốc độ tạo ra protein như vậy. Thể biến nạp mà biểu hiện ADN được sử dụng trong sáng chế có thể thu được bằng cách bổ sung mảnh ADN nêu trên sau gen khởi đầu của vector biểu hiện thích hợp để tạo ra ADN tái tổ hợp và đưa ADN tái tổ hợp này vào các tế bào chủ thích hợp làm vector biểu hiện như vậy.

Về vật chủ trong đó protein được sử dụng trong sáng chế được biểu hiện, vật chủ bất kỳ bao gồm vi khuẩn, nấm men, tế bào động vật, tế bào côn trùng, và tế bào thực vật có thể được sử dụng miễn là vật chủ này có khả năng biểu hiện gen mong muốn. Tốt hơn, nếu vi sinh vật mà bản chất không có khả năng trao đổi chất TPA-DHD có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên hơn bao gồm vi khuẩn thuộc giống *Escherichia* hoặc vi khuẩn thuộc giống *Pseudomonas*, cả hai giống này bản chất không có khả năng trao đổi chất TPA-DHD. Các ví dụ còn được ưu tiên hơn bao gồm *Escherichia coli* dòng K-12 và *Pseudomonas putida* dòng KT2440.

Về vector biểu hiện, vector có khả năng tự sao chép trong các tế bào chủ nêu trên hoặc có thể được kết hợp trong nhiễm sắc thể của nó, và có khả năng chứa gen khởi đầu ở vị trí trong đó ADN được sử dụng trong sáng chế có thể được phiên mã.

Trong các trường hợp nếu các sinh vật chưa có nhân điển hình như vi khuẩn được sử dụng làm các tế bào chủ, ADN tái tổ hợp bao gồm ADN được sử dụng trong sáng chế tốt hơn là ADN tái tổ hợp chứa gen khởi đầu, trình tự bám ribosom, ADN được sử dụng trong sáng chế, và trình tự ngắt phiên mã đồng thời có khả năng tự sao chép sinh vật chưa có nhân điển hình. Gen mà kiểm soát gen khởi đầu có thể bị kiểm chế.

Vector để đưa ADN mã hoá protein được sử dụng trong sáng chế hoặc protein dung hợp của protein như vậy với protein khác vào vi sinh vật như *Escherichia coli* để biểu hiện tốt hơn là được gọi là loại sao chép nhiều lần; và các ví dụ của nó bao gồm các plasmid có có nguồn gốc sao chép thu được từ ColE1 bao gồm, ví dụ, các plasmid trên cơ sở pUC và các plasmid trên cơ sở pBR322; và các dẫn xuất của nó. Trong bản mô tả này, "dẫn xuất" có nghĩa là plasmid trong đó gốc bị cải biến bằng cách thế đoạn, làm mất đoạn, chèn đoạn, bổ sung đoạn, đảo đoạn, và/hoặc tương tự. Việc cải biến

được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm xử lý gây đột biến bởi tác nhân gây đột biến, chiếu xạ tia tử ngoại, hoặc tương tự; và cải biến bằng đột biến tự nhiên hoặc tương tự. Để cụ thể hơn, pUC19 (Gene, 33, 103 (1985)), pUC18, pBR322, pHelix1 (được sản xuất bởi Roche Diagnostics), pKK233-2 (được sản xuất bởi Amersham Pharmacia Biotech), pSE280 (được sản xuất bởi Invitrogen), pGEMEX-1 (được sản xuất bởi Promega), pQE-8 (được sản xuất bởi QIAGEN), pET-3 (được sản xuất bởi Novagen), pBluescript II SK(+), pBluescript II KS(+) (được sản xuất bởi Stratagene), pSTV28 (được sản xuất bởi Takara Bio Inc.), pUC118 (được sản xuất bởi Takara Bio Inc.), hoặc tương tự có thể, ví dụ, được sử dụng làm vector.

về gen khởi đầu, có thể sử dụng gen khởi đầu bất kỳ miễn là gen khởi đầu này có khả năng biểu hiện trong các tế bào chủ như *Escherichia coli*. Ví dụ, các gen khởi đầu thu được từ *Escherichia coli*, thể thực khuẩn, hoặc tương tự như gen khởi đầu trp (Ptrp), gen khởi đầu lac (Plac), gen khởi đầu PL, gen khởi đầu PR, gen khởi đầu T7, hoặc tương tự, hoặc gen khởi đầu tac; các gen khởi đầu mà được thiết kế và biến đổi giả tạo giống như gen khởi đầu lacT7; hoặc gen khởi đầu Pm mà được kiểm soát bởi protein XylS của plasmid TOL trong *Pseudomonas putida* có thể được sử dụng.

Tốt hơn, nếu sử dụng plasmid trong đó khoảng cách giữa trình tự Shine-Dalgarno mà là trình tự bám ribosom và condon khởi đầu được điều chỉnh với khoảng cách thích hợp (ví dụ 5 đến 18 gốc). Ở ADN tái tổ hợp được sử dụng trong sáng chế, mặc dù trình tự ngắt phiên mã không cần thiết để biểu hiện ADN sử dụng trong sáng chế, tốt hơn nếu bố trí trình tự ngắt phiên mã ngay sau gen cấu trúc.

Vi sinh vật trong đó lượng sản xuất một hoặc nhiều protein bất kỳ nêu trên của nó tăng, so với bản sao của dòng bố mẹ, có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp hoặc tương tự để làm tăng lượng sản xuất TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic. Cụ thể, các ví dụ bao gồm việc sử dụng gen khởi đầu mà có hoạt tính phiên mã mạnh hơn so với gen khởi đầu tự nhiên làm gen khởi đầu cho việc biểu hiện gen mã hoá protein bất kỳ trong số các protein nêu trên, sử dụng nhân tố kết thúc mà có hoạt tính ngắt phiên mã mạnh hơn so với nhân tố kết thúc tự nhiên làm nhân tố kết thúc cho việc kết thúc phiên mã của gen mã hoá protein như vậy, sử dụng vector có số lượng bản sao nhiều làm vector biểu hiện, hoặc kết hợp vào nhiễm sắc thể bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng.

Bằng cách sử dụng vi sinh vật biểu hiện protein nhóm con lớn terephthalat 1,2-

dioxygenaza oxygenaza, protein nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza, và protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza, mà thu được như nêu trên, TPA-DHD có thể được sản xuất từ muối của axit terephthalic. Ví dụ, bằng cách nuôi cấy vi sinh vật như vậy trong môi trường lỏng và sau đó bổ sung muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic vào dung dịch nuôi cấy vi sinh vật như vậy sao cho nồng độ của nó nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 1 M, TPA-DHD có thể được tạo ra và được tích lại, và sau đó TPA-DHD có thể được gom lại từ dung dịch nuôi cấy như vậy. Về phương pháp nuôi cấy vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế trong môi trường, việc nuôi cấy có thể được thực hiện theo phương pháp thường được sử dụng trong lĩnh vực nuôi cấy vi sinh vật.

Hơn nữa, TPA-DHD cũng có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy vi sinh vật nêu trên và sau đó bổ sung các tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy của vi sinh vật như vậy hoặc sản phẩm đã qua xử lý của các tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy như vậy vào môi trường nước chứa muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic để tạo ra và tích lại TPA-DHD và sau đó thu gom TPA-DHD từ môi trường như vậy.

Bằng cách sử dụng vi sinh vật biểu hiện protein nhóm con lớn terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza, protein nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza, protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza, và dehydrogenaza TPA-DHD, axit protocatechuic có thể được sản xuất từ terephthalat. Ví dụ, bằng cách nuôi cấy vi sinh vật như vậy trong môi trường lỏng và sau đó bổ sung muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic trong dung dịch nuôi cấy của vi sinh vật như vậy sao cho nồng độ của nó nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 1 M, axit protocatechuic có thể được tạo ra và được tích lại, và sau đó axit protocatechuic có thể được gom lại từ dung dịch nuôi cấy như vậy. Về phương pháp nuôi cấy vi sinh vật sử dụng trong sáng chế trong môi trường, việc nuôi cấy có thể được thực hiện theo phương pháp thường được sử dụng trong lĩnh vực nuôi cấy vi sinh vật.

Hơn nữa, axit protocatechuic cũng có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy vi sinh vật nêu trên và sau đó bổ sung các tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy của vi sinh vật như vậy hoặc sản phẩm đã qua xử lý của các tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy như vậy trong môi

trường nước chứa muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic để tạo ra và tích lại axit protocatechuic và sau đó thu gom axit protocatechuic từ môi trường như vậy.

Hơn nữa, axit protocatechuic cũng có thể được tạo ra bằng cách tạo ra TPA-DHD từ muối của axit terephthalic bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu từ (1) đến (4) nêu trên, sau đó chuyển hoá TPA-DHD thành axit protocatechuic bằng cách sử dụng giống nuôi cấy của vi sinh vật khác thu được bằng cách đưa ADN nêu trong mục (q), (r), (s) hoặc (t) nêu trên bằng phương pháp biến nạp hoặc sản phẩm đã qua xử lý của giống nuôi cấy như vậy, và thu lại axit protocatechuic từ dung dịch nuôi cấy như vậy hoặc môi trường như vậy.

Bằng cách sử dụng vi sinh vật biểu hiện protein nhóm con lớn terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza, protein nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza, protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza, dehydrogenaza TPA-DHD, và para-hydroxybenzoat hydroxylaza, axit galic có thể được sản xuất từ muối của axit terephthalic. Ví dụ, bằng cách nuôi cấy vi sinh vật như vậy trong môi trường lỏng và sau đó bổ sung muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic vào dung dịch nuôi cấy của vi sinh vật như vậy sao cho nồng độ của nó nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 1 M, axit galic có thể được tạo ra và được tích lại, và sau đó axit galic có thể được gom lại từ dung dịch nuôi cấy như vậy. Về phương pháp nuôi cấy vi sinh vật sử dụng trong sáng chế trong môi trường, việc nuôi cấy có thể được thực hiện theo phương pháp thường được sử dụng trong lĩnh vực nuôi cấy vi sinh vật.

Hơn nữa, axit galic cũng có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy vi sinh vật nêu trên và sau đó bổ sung các tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy của vi sinh vật như vậy hoặc sản phẩm đã qua xử lý của các tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy như vậy vào môi trường nước chứa muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic để tạo ra và tích lại axit galic và sau đó thu gom axit galic từ môi trường như vậy.

Hơn nữa, axit galic cũng có thể được tạo ra bằng cách tạo ra TPA-DHD từ muối của axit terephthalic bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu từ (1) đến (4) nêu trên, sau đó chuyển hoá TPA-DHD thành axit galic bằng cách sử dụng giống nuôi cấy của vi sinh vật khác thu được bằng cách đưa ADN nêu trong mục (q), (r), (s), hoặc (t) nêu

trên và ADN nêu trong mục (u), (v), (w), hoặc (x) nêu trên bằng phương pháp biến nạp hoặc sản phẩm đã qua xử lý của giống nuôi cấy như vậy, và thu lại axit galic từ dung dịch nuôi cấy như vậy hoặc môi trường như vậy.

Là muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic, muối của axit terephthalic có độ tinh khiết cao chứa kali terephthalat như dikali terephthalat, 1-kali 4-natri terephthalat, hoặc 1-kali 4-amoni terephthalat có thể được sử dụng. Muối thu được từ các polyeste thải cũng có thể được sử dụng. Sau đây, phương pháp thu được muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic that được sử dụng làm nguyên liệu để tạo ra hợp chất sử dụng vi sinh vật từ các polyeste thải sẽ được mô tả.

Về dạng polyeste thải, có thể sử dụng polyeste ở dạng bất kỳ bao gồm ống, màng, tấm, phần, sợi, sản phẩm được nghiền thành hạt, và sản phẩm được nghiền thành bột. Vật liệu polyeste thải có các polyeste này làm thành phần chính (làm thành phần chính có nghĩa là chứa, ví dụ, 80% PET và/hoặc PTT và/hoặc PBT hoặc lớn hơn) và chứa các chất ngoại lai (các thành phần chính của nó bao gồm polyetylen và polypropylen) được thu lại. Tạp chất như kim loại và chất dẻo không phải các polyeste được loại bỏ, nếu cần và sau đó vật liệu polyeste thải được nghiền bằng máy nghiền. Về sản phẩm nghiền của vật liệu polyeste thải, các vảy của chai PET có thể được sử dụng làm nguyên liệu đầu, trong đó các vảy được chế biến và xử lý bởi người cung cấp tái chế chai PET. Bằng cách xử lý sản phẩm nghiền thu được như vậy từ vật liệu polyeste thải bằng phương pháp phân loại bằng trọng lực, phương pháp tách kim loại bằng nam châm, phương pháp rửa bằng nước, phương pháp loại bỏ các chất ngoại lai nổi bằng nước, hoặc tương tự, các chất ngoại lai và/hoặc các tạp chất như kim loại, thủy tinh, đá, thức ăn hoặc đồ uống thừa, chất dẻo không phải tấm polyeste, hoặc polyetylen hoặc polypropylen được tách ra khỏi sản phẩm polyeste nghiền.

Sản phẩm polyeste nghiền thu được được cân để đo hàm lượng (số mol) của axit terephthalic và được cho vào thùng phản ứng bằng kim loại. Hơn nữa, kali hydroxit hoặc hỗn hợp gồm kali hydroxit và natri hydroxit, và dung môi phản ứng chứa hoặc etylen glycol hoặc 1-butanol được bổ sung vào thùng phản ứng; sau đó gia nhiệt hỗn hợp thu được chỉ trong một khoảng thời gian thích hợp để nhờ đó thực hiện phản ứng khử trùng hợp sản phẩm polyeste nghiền. Việc tính cả lượng nước thích hợp trong

dung dịch của phản ứng khử trùng hợp làm cho phản ứng xảy ra nhanh hơn, và, trên hết, làm nâng hiệu suất tạo ra muối của axit terephthalic.

Kali hydroxit hoặc natri hydroxit bổ sung có thể được bổ sung ở dạng hoặc là hạt rắn hoặc dung dịch; và tốt hơn là bổ sung khoảng hai lần theo lượng mol, tốt hơn là tổng lượng bổ sung nằm trong khoảng từ 2 đến 2,2 lần theo lượng mol tính theo lượng mol của axit terephthalic trong sản phẩm polyeste nghiền cho vào thùng phản ứng. Tốt hơn, nếu tổng lượng kiềm bổ sung có thể là 2,10 lần theo lượng mol tính theo hàm lượng của axit terephthalic trong sản phẩm polyeste nghiền.

Etylen glycol hoặc 1-butanol được bổ sung tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 3 đến 10 lần thể tích của sản phẩm polyeste nghiền như vậy. Tốt hơn, nếu lượng dung môi bổ sung là 5 lần. Mong muốn bổ sung một lượng nước thích hợp vào dung dịch của phản ứng khử trùng hợp như vậy. Tổng lượng nước chứa trong dung dịch của phản ứng khử trùng hợp như vậy cần nằm trong khoảng từ 1 đến 5 lần số mol của axit terephthalic trong sản phẩm polyeste nghiền.

Áp suất trong thùng phản ứng tốt hơn là áp suất gần với áp suất khí quyển, ví dụ, 0,9 đến 1,1 atm (91,193 đến 111,458 kPa). Nhiệt độ phản ứng khi etylen glycol được sử dụng làm dung môi phản ứng là nhiệt độ mà ở đó nước bay hơi trong khi etylen glycol không bay hơi. Khi áp suất trong thùng phản ứng bằng 1 atm, nhiệt độ tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100 đến 196°C. Khi phản ứng được thực hiện ở áp suất thấp hơn 1 atm, phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ mà ở đó nước bay hơi trong khi etylen glycol không bay hơi nằm trong khoảng từ 100 đến 196°C. Hơn nữa, khi phản ứng được thực hiện ở áp suất cao hơn 1 atm, phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ mà ở đó nước bay hơi trong khi etylen glycol không bay hơi nằm trong khoảng từ 100 đến 196°C. Nhiệt độ phản ứng khi 1-butanol được sử dụng làm dung môi phản ứng là nhiệt độ mà ở đó nước bay hơi trong khi 1-butanol không bay hơi. Khi áp suất trong thùng phản ứng bằng 1 atm, nhiệt độ này tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100 đến 116°C. Khi phản ứng được thực hiện ở áp suất thấp hơn 1 atm, phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ mà ở đó nước bay hơi trong khi 1-butanol không bay hơi nằm trong khoảng từ 100 đến 116°C. Hơn nữa, khi phản ứng được thực hiện ở áp suất cao hơn 1 atm, phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ mà ở đó nước bay hơi trong khi 1-butanol không bay hơi nằm trong khoảng từ 100 đến 116°C.

Thời gian gia nhiệt tốt hơn là khoảng thời gian phân huỷ hoàn toàn sản phẩm

polyeste nghiền, và thường nằm trong khoảng từ 10 đến 240 phút. Cho đến nay, vì tốc độ phân huỷ từ cao nhất đến thấp nhất là PET, PTT, và PBT, nên, khi PTT hoặc PBT bị khử trùng hợp, mong muốn là làm tăng thời gian gia nhiệt và phân huỷ. Các chất dễ bay hơi như nước mà bay hơi trong phản ứng gia nhiệt được thu lại nhờ thiết bị ngưng tụ.

Sau khi kết thúc phản ứng khử trùng hợp, khi tạp chất là chất dẻo không phải polyeste bao gồm, ví dụ, polyetylen, polypropylen, polystyren, và vinyl clorua, ngoài dung dịch etylen glycol hoặc 1-butanol và các chất rắn thu được từ các terephthalat, có mặt như các chất nổi, các chất nổi này sẽ được loại bỏ. Sau đó, chất rắn của các axit terephthalic được tách ra khỏi dung môi etylen glycol hoặc dung môi 1-butanol bằng phương pháp tách rắn-lỏng như lọc hoặc ly tâm.

Vì lượng đáng kể các muối của axit terephthalic bị hoà tan trong dung môi etylen glycol được tách bằng phương pháp tách rắn-lỏng nêu trên, nên tốt hơn nếu sử dụng dung môi như vậy làm dung môi cho phản ứng khử trùng hợp PET, PTT, hoặc PBT nêu trên. Hơn nữa, mặc dù độ tan của muối của axit terephthalic trong dung môi 1-butanol thấp, việc tái sử dụng dung môi 1-butanol dùng trong phản ứng khử trùng hợp làm dung môi cho phản ứng khử trùng hợp PET, PTT, hoặc PBT nêu trên được ưu tiên vì chi phí sản xuất có thể giảm nhiều hơn. Như nêu trên, dung môi etylen glycol và dung môi 1-butanol dùng trong phản ứng khử trùng hợp PET, PTT, hoặc PBT có thể được dùng lại trong phản ứng khử trùng hợp polyeste bằng cách tách các terephthalat được tạo ra.

Sau đó, trong các trường hợp nếu một lượng lớn tạp chất chứa trong các phần chất rắn của các muối của axit terephthalic, các phần chất rắn của các muối của axit terephthalic thu được có thể được rửa bằng một lượng etylen glycol hoặc 1-butanol thích hợp. Cụ thể là, trong các trường hợp nếu vật liệu polyeste thải chứa PTT hoặc PBT bị khử trùng hợp, 1,3-propandiol hoặc 1,4-butandiol được trộn trong các phần chất rắn này và do đó tốt hơn là rửa bằng etylen glycol hoặc 1-butanol. Hơn nữa, trong các trường hợp nếu nhựa PET bị khử trùng hợp trong dung môi phản ứng 1-butanol, etylen glycol được trộn các phần chất rắn này. Mặc dù etylen glycol có thể được loại bỏ bằng cách sấy dưới áp suất giảm mà được mô tả dưới đây, nhưng etylen glycol có thể được loại bỏ bằng cách rửa bằng 1-butanol.

Vì các phần chất rắn của các muối của axit terephthalic thu được chứa một lượng

đáng kể etylen glycol hoặc 1-butanol, nên việc xử lý để làm giảm etylen glycol hoặc 1-butanol trong phần chất rắn của các muối của axit terephthalic này bằng cách sử dụng máy sấy giảm áp hoặc tương tự, hoặc việc tách các chất lỏng bằng cách sử dụng phương pháp ly tâm hoặc tương tự được thực hiện, nếu cần. Muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong các muối của axit terephthalic thu được có thể được sử dụng trong việc sản xuất TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic. Hơn nữa, trong các trường hợp nếu các tạp chất rắn có độ tan trong nước kém được trộn vào muối của axit terephthalic này, dung dịch muối của axit terephthalic thu được bằng cách hoà tan muối của axit terephthalic này trong một lượng nước thích hợp và sau đó loại bỏ tạp chất bằng phương pháp lọc có thể được sử dụng trong việc sản xuất hợp chất sử dụng vi sinh vật.

Lưu ý rằng, để phân huỷ etylen glycol trộn trong các muối của axit terephthalic thu được bằng cách khử trùng hợp các polyeste thải trong dung môi etylen glycol, bằng cách nuôi cấy vi sinh vật sử dụng trong sáng chế mà lượng biểu hiện lactaldehyt reductaza và lactaldehyt dehydrogenaza của nó được tăng cường trong môi trường lỏng và sau đó bổ sung muối của axit terephthalic chứa etylen glycol và chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic trong dung dịch nuôi cấy sao cho nồng độ của nó nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 1 M, TPA-DHD, có thể tạo ra axit protocatechuic, hoặc axit galic trong khi phân huỷ etylen glycol.

Bằng cách nuôi cấy vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế và sau đó bổ sung các tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy của vi sinh vật như vậy hoặc sản phẩm đã qua xử lý của các tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy như vậy trong môi trường nước chứa muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic, TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic cũng có thể được tạo ra và được tích lại và sau đó TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic có thể được gom lại từ môi trường như vậy.

Việc nuôi cấy vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế có thể được thực hiện trong môi trường dinh dưỡng thông thường chứa các nguồn cacbon, các nguồn nitơ, các muối vô cơ, các vitamin khác nhau hoặc tương tự. Về nguồn cacbon, ví dụ, các đường như glucoza, sucroza, hoặc fructoza, các rượu như etanol hoặc metanol, các axit hữu cơ như axit xitric, axit malic, hoặc axit suxinic, rỉ đường blackstrap, hoặc tương tự

được sử dụng. Về nguồn nitơ, ví dụ, amoniac, amoni sulfat, amoni clorua, amoni nitrat, ure, hoặc tương tự được sử dụng riêng rẽ; hoặc hỗn hợp của nó được sử dụng. Ngoài ra, về muối vô cơ, ví dụ, kali monohydro phosphat, kali dihydro phosphat, magie sulfat, hoặc tương tự được sử dụng. Ngoài ra, các chất dinh dưỡng bao gồm pepton, nước thịt, nước men, nước ngô ngâm, axit casamino, và các vitamin khác nhau như biotin có thể được bổ sung vào môi trường này. Về nguyên liệu để tạo ra TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic, muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic, được chuẩn bị như nêu trên, được bổ sung.

Việc nuôi cấy được thực hiện dưới các điều kiện ưa khí như khuấy hoặc lắc sục khí. Nhiệt độ nuôi cấy không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nhiệt độ mà ở đó vi sinh vật sử dụng trong sáng chế có thể sinh trưởng. Hơn nữa, độ pH trong quá trình nuôi cấy cũng không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là độ pH mà ở đó vi sinh vật sử dụng trong sáng chế có thể sinh trưởng. Việc điều chỉnh độ pH trong quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện bằng cách bổ sung axit hoặc kiềm.

Đối với sản phẩm đã qua xử lý của các tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy như vậy, sản phẩm thu được bằng cách cố định vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế vào chất mang có thể được sử dụng. Trong trường hợp đó, các tế bào vi khuẩn được thu lại từ dịch nuôi cấy có thể được sử dụng y như vậy; hoặc các tế bào vi khuẩn được rửa bằng chất đệm thích hợp như dung dịch đệm phosphat 0,02 đến 0,2 M (độ pH từ 6 đến 10) có thể được sử dụng. Hơn nữa, sản phẩm nghiền thu được bằng cách nghiền các tế bào vi khuẩn được thu từ dịch nuôi cấy bằng sóng siêu âm hoặc nén; dịch chiết chứa protein được sử dụng trong sáng chế, mà là dịch chiết thu được bằng cách chiết sản phẩm nghiền bằng nước; hoặc dịch chiết thu được bằng cách cố định thành phần được tinh chế một phần hoặc tương tự chứa protein được sử dụng trong sáng chế vào chất mang, thành phần được tinh chế một phần này thu được bằng cách tiếp tục xử lý dịch chiết này như kết tủa bằng amoni sulfat hoặc phép sắc ký cột, cũng có thể được sử dụng trong việc sản xuất TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic theo sáng chế.

Việc cố định các tế bào vi khuẩn, các sản phẩm nghiền chứa các tế bào vi khuẩn, các dịch chiết hoặc các enzym đã tinh chế này có thể được thực hiện, theo phương pháp đã biết rõ và thường được sử dụng, bằng phương pháp cố định các tế bào vi khuẩn hoặc tương tự vào chất mang thích hợp như monome acrylamit, axit alginic,

hoặc tảo caragen.

Đối với môi trường nước cần dùng trong phản ứng, dung dịch nước hoặc dung dịch đệm thích hợp, ví dụ, dung dịch đệm phosphat 0,02 đến 0,2M (độ pH từ 6 đến 10), mà chứa các muối của axit terephthalic có thể được sử dụng. Khi tính thẩm của màng plasma của các tế bào vi khuẩn cần được tăng lên, toluen, xylen, chất hoạt động bề mặt không ion, hoặc tương tự có thể được bổ sung vào môi trường nước này ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,05 đến 2,0% (w/v).

Tốt hơn, nếu nồng độ của muối của axit terephthalic mà có vai trò như nguyên liệu cho phản ứng trong môi trường nước nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 1 M. Nhiệt độ và độ pH của phản ứng enzym trong môi trường nước nêu trên không bị giới hạn một cách cụ thể. Tốt hơn, nếu nhiệt độ này thường nằm trong khoảng từ 10 đến 60°C và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 15 đến 50°C; và độ pH của dung dịch phản ứng có thể thiết lập nằm trong khoảng từ 5 đến 10 và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6 đến 9. Việc điều chỉnh độ pH có thể được thực hiện bằng cách bổ sung axit hoặc kiềm.

Enzym được dùng trong sáng chế có thể thu được bằng cách tạo hỗn dịch dịch chỉ chiết tế bào vi khuẩn hoặc enzym thu được bằng cách ly tâm, lọc hoặc tương tự dịch chiết tế bào vi khuẩn trong nước hoặc dung dịch đệm. Enzym thu được được cho phản ứng trong sự có mặt của các muối của axit terephthalic. Tốt hơn, nếu nồng độ của muối của axit terephthalic trong dung dịch phản ứng được thiết lập cao có thể trong khoảng trong đó hoạt tính của enzym không bị giới hạn. Phản ứng này có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ như để yên, khuấy, và lắc. Hơn nữa, phương pháp bao gồm nạp enzym mà được cố định vào chất mang thích hợp vào cột và cho chảy dung dịch chứa các terephthalat này cũng có thể được sử dụng. Phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ thường nằm trong khoảng từ 10 đến 60°C và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 15 đến 50°C, độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 9 và tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 9.

Hơn nữa, việc bổ sung chất chống oxy hoá hoặc chất khử vào môi trường nước nêu trên khi phản ứng trong một số trường hợp có thể tăng cường hơn hiệu suất tạo ra TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic. Các ví dụ về chất chống oxy hoá/chất khử bao gồm axit ascorbic, axit isoascorbic, cystein, các sulfit như natri sulfit hoặc natri hydrosulfit, và các muối thiosulfat như natri thiosulfat. Nồng độ bổ sung thay đổi tùy theo loại chất chống oxy hoá/chất khử. Mong muốn bổ sung tại nồng độ mà ở đó

tạo ra TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic không bị giới hạn. Nồng độ này thường nằm trong khoảng từ 0,001 đến 5% (w/v) và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,005 đến 1%.

Hơn nữa, việc bổ sung chất oxy hoá vào môi trường nước nêu trên khi phản ứng trong một số trường hợp có thể tăng cường hơn hiệu suất tạo ra TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic. Các ví dụ về chất oxy hoá này bao gồm nitrat như natri nitrit hoặc kali nitrit, các muối kim loại như sắt (III) clorua hoặc sắt (III) sulfat, halogen, và axit peroxy. Tốt hơn là natri nitrit, sắt (III) clorua, hoặc sắt (III) sulfat. Nồng độ bổ sung thay đổi tùy theo loại chất oxy hoá. Mong muốn bổ sung tại nồng độ mà ở đó tạo ra TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic không bị giới hạn. Nồng độ này thường nằm trong khoảng từ 0,001 đến 0,05% (w/v) và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,02%.

TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic trong dung dịch nuôi cấy sau khi kết thúc việc nuôi cấy hoặc dung dịch phản ứng có thể, sau khi loại bỏ, nếu cần, các chất không hoà tan như các tế bào vi khuẩn khỏi dung dịch nuôi cấy như vậy bằng cách ly tâm hoặc tương tự, được xử lý bằng các phương pháp bao gồm, ví dụ, phương pháp chiết bằng dung môi hữu cơ như etyl axetat, phương pháp sử dụng cacbon hoạt tính, phương pháp sử dụng nhựa trao đổi ion, phương pháp kết tủa như phương pháp kết tinh hoặc khử bỏ bằng muối, và phương pháp chưng luyện theo cách riêng rẽ hoặc kết hợp để nhờ đó thu lại TPA-DHD, axit protocatechuic hoặc axit galic. Khi TPA-DHD, axit protocatechuic, hoặc axit galic cần được thu lại không phải ở dạng muối mà ở trạng thái axit, axit carboxylic mà tạo ra muối có thể trở thành dạng axit tự do trong đó bằng cách bổ sung axit sulfuric, axit clohydric, hoặc tương tự ở bước tinh chế nêu trên để làm giảm độ pH.

Sau đây, phương pháp theo sáng chế sẽ được mô tả một cách cụ thể thông qua các ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Đo độ tan của các muối của axit terephthalic khác nhau

2,99g (0,018 mol) axit terephthalic (dạng bột, được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Japan; sau đây, trừ khi có quy định khác, các thuốc thử được sử dụng là thuốc thử được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Japan) và 0,036 mol kali hydroxit (dạng hạt) được

cho vào cốc mở bằng thủy tinh dung tích 50 mL. Rót nước tinh khiết vào để thu được thể tích khoảng 15 mL. Đậy hỗn hợp tạo thành bằng lá nhôm như chiếc nắp, gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C trong 60 phút trong khi khuấy bằng máy khuấy nóng (được sản xuất bởi AS ONE Corporation), và cho làm nguội đến nhiệt độ 30°C. Sau khi khuấy ở nhiệt độ 30°C trong 120 phút hoặc lâu hơn và xác nhận kết tủa còn lại trong dung dịch, lấy 1 mL dung dịch này và cho ly tâm bằng cách sử dụng máy ly tâm vi lượng tốc độ cao (được sản xuất bởi Tomy Seiko Co., Ltd.) (30°C, 14000 rpm (17800 g), 30 giây) để thu phần nổi ở trên.

Nồng độ axit terephthalic trong phần nổi này được đo và được xem là độ tan của dikali terephthalat. Về việc đo nồng độ axit terephthalic, mẫu được pha loãng 16,000 lần bằng dung dịch nước axetonitril 2,5% và được phân tích dưới các điều kiện riêng rẽ nêu ở Bảng 1 bằng cách sử dụng phép sắc ký lỏng tính năng cao (Waters Corporation, LCT Premier XE). Sau đây, nồng độ này được tính theo tỷ lệ diện của các đỉnh của axit terephthalic bằng cách sử dụng dung dịch axit terephthalic có nồng độ đã biết làm đối chứng.

Bảng 1. Điều kiện phân tích HPLC bằng cách sử dụng LCT Premier XE

Cột tách HPLC	ACQUITY UPLC HSS T3 (được sản xuất bởi Waters, đường kính trong 2,1 mm, chiều dài 50 mm)
Nhiệt độ cột	40°C
Lưu lượng dung môi	0,4 ml/phút
Pha động A	Nước
Pha động B	Axetonitril
Điều kiện gradien	0 phút (bắt đầu) 2% pha động B 0,75 phút 5% pha động B 1,75 phút 30% pha động B 1,76 phút 5% pha động B 2,50 phút 5% pha động B

Ở phương pháp tương tự như phương pháp điều chế dung dịch dikali terephthalat nêu trên, bổ sung 0,036 mol natri hydroxit (dạng hạt); 0,036 mol dung dịch amoni 28%; 0,018 mol kali hydroxit và 0,018 mol natri hydroxit; 0,018 mol kali hydroxit và 0,018 mol dung dịch amoni 28%; hoặc 0,018 mol natri hydroxit và 0,018 mol dung dịch amoni 28% vào 2,99g (0,018 mol) axit terephthalic (dạng bột) để điều chế dung dịch nước của dinatri terephthalat, diamoni terephthalat, 1-kali 4-natri terephthalat, 1-kali 4-amoni terephthalat, hoặc 1-natri 4-amoni terephthalat và sau đó đo độ tan của từng muối của axit terephthalic.

Độ tan của từng muối của axit terephthalic thu được được thể hiện ở Bảng 2. Từ các kết quả nêu ở Bảng 2, nhận thấy rằng độ tan trong nước theo thứ tự từ cao nhất đến thấp nhất là: dikali terephthalat, 1-kali 4-natri terephthalat, 1-kali 4-amoni terephthalat, dinatri terephthalat, 1-natri 4-amoni terephthalat, và diamoni terephthalat; và muối trong đó ít nhất một nhóm carboxyl còn lại của axit terephthalic tạo ra muối cùng với kali có độ tan tuyệt vời.

Bảng 2. Độ tan của muối của axit terephthalic trong nước

Loại terephthalat	Kiểm	Độ tan(mol/L)
Dikali terephthalat	Kali hydroxit	1,011
Dinatri terephthalat	Natri hydroxit	0,630
Diamoni terephthalat	Amoniac	0,512
1-kali 4-natri terephthalat	Kali hydroxit, natri hydroxit	0,956
1-kali 4-amoni terephthalat	Kali hydroxit, amoniac	0,845
1-natri-amoni terephthalat	Kali hydroxit, amoniac	0,612

Ví dụ 2. Sự khác nhau về khả năng trong việc tạo ra TPA-DHD theo sự khác nhau giữa các muối của axit terephthalic

Tính theo các kết quả của Ví dụ 1, trên cơ sở axit terephthalic, kali hydroxit, natri hydroxit, dung dịch amoni 28% và nước cất, chuẩn bị riêng rẽ 500 ml dung dịch dikali terephthalat 0,6 M, dung dịch 1-kali 4-natri terephthalat 0,6 M, dung dịch 1-kali 4-amoni terephthalat 0,6 M, và dung dịch dinatri terephthalat 0,6 M. Trộn 30 ml của các dung

dịch muối của axit terephthalic này với 7g glucoza để điều chế glucoza và dung dịch đã trộn chất nền.

Plasmid sản xuất TPA-DHD pUXPEaLT_tphA2A3A1_tpaK được tạo cấu trúc ở Ví dụ tham khảo 3 được đưa vào *Escherichia coli* dòng M7032 (thu được từ CGSC thuộc Yale University) bằng phương pháp biến nạp để thu được tái tổ hợp *Escherichia coli* dòng M7032 (pUXPEaLT_tphA2A3A1_tpaK).

Thể biến nạp này được nuôi cấy trong 1 ml môi trường lỏng LB (10 g/l trypton (được sản xuất bởi Difco), 5 g/l nước men khô (được sản xuất bởi Difco), 10 g/l natri clorua) chứa ampicilin ở nồng độ cuối bằng 100 mg/l qua đêm. Tiếp theo, chỉ 1% dịch nuôi cấy qua đêm này được cấy vào 10 ml môi trường F6,6W/P100/G2 chứa ampicilin ở nồng độ cuối bằng 100 mg/l và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Lưu ý rằng môi trường F6,6W/P100/G2 liên quan đến dung dịch nước chứa kali dihydro phosphat 13,6 g/L, axit xitric monohydrat 2,1 g/L, amoni sulfat 9,9 g/L, sắt sulfat (II) heptahydrat 1,703 g/L, glucoza 20 g/L, magie sulfat heptahydrat 246 mg/ml, canxi clorua dihydrat 12,9 mg/L, thiamin hydroclorua 10 mg/L, magie oxit 10,75 mg/L, canxi cacbonat 2 mg/L, kẽm sulfat heptahydrat 4,5 mg/ml, mangan sulfat (II) tetrahydrat 1,12 mg/L, đồng sulfat (II) pentahydrat 0,25 mg/L, coban sulfat (II) heptahydrat 0,28 g/L, và axit boric 0,06 mg/L.

Tiếp theo, để thực hiện nuôi cấy chính tính theo dịch nuôi cấy trước này, 65 ml môi trường F6,6W/P10/G1 mà là môi trường nuôi cấy chính được cho vào thiết bị lên men octuple mini jar (được sản xuất bởi ABLE Corporation) và được điều chỉnh ở nhiệt độ 30,2°C±0,2 và độ pH 6,9±0,1. Lưu ý rằng môi trường F6,6W/P10/G1 liên quan đến dung dịch nước chứa kali dihydro phosphat 1,36 g/L, axit xitric monohydrat 2,1 g/L, amoni sulfat 9,9 g/L, sắt sulfat (II) heptahydrat 1,703 g/L, glucoza 20 g/L, magie sulfat heptahydrat 246 mg/ml, canxi clorua dihydrat 12,9 mg/L, thiamin 10 mg/L, magie oxit 10,75 mg/L, canxi cacbonat 2 mg/L, kẽm sulfat heptahydrat 4,5 mg/ml, mangan sulfat tetrahydrat 1,12 mg/L, đồng sulfat pentahydrat 0,2 5mg/L, coban sulfat heptahydrat 0,28 g/L, và axit boric 0,06 mg/L.

Điều kiện sục khí trong dịch nuôi cấy trong thiết bị lên men dạng vại được điều chỉnh ở 1 vvm và việc điều chỉnh độ pH của quá trình nuôi cấy được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch amoni và axit sulfuric. Hơn nữa, oxy hoà tan trong dung dịch nuôi cấy được điều chỉnh khi nồng độ oxy bão hoà bằng 100% và được điều chỉnh

bằng tốc độ quay của cánh khuấy sao cho oxy hoà tan được duy trì ở nồng độ 15%, trong đó oxy hoà tan giảm khi các tế bào vi khuẩn sinh trưởng.

Trong môi trường nuôi cấy chính, 0,1% dịch nuôi cấy trước được cấy và nuôi cấy trong điều kiện nêu trên. Khi độ đục của tế bào vi khuẩn đạt khoảng 7 ở hệ số hấp thụ 600 nm, tác nhân gây cảm ứng, axit m-toluic được bổ sung sao cho nồng độ cuối của nó bằng 1 mM để biểu hiện protein terephthalat 1,2-dioxygenaza, protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza, và protein vận chuyển axit terephthalic. Nồng độ glucoza được đo theo thời gian. Khi nồng độ glucoza đạt 0, glucoza và dung dịch đã trộn chất nền được sử dụng.

Việc lấy mẫu được thực hiện 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy chính. Mỗi mẫu này được phân tích dưới các điều kiện được thể hiện ở Bảng 1 bằng máy phân tích khối phổ loại LC-TOF (Waters Corporation, LCT Premier XE). Việc xác định axit terephthalic được thực hiện với sự kết hợp thời gian lưu của phép sắc ký lỏng tính năng cao và giá trị khối lượng chính xác từ máy phân tích khối phổ, so với mẫu axit terephthalic tiêu chuẩn. Trong số các chất xuất hiện khi axit terephthalic giảm, TPA-DHD được xác định tính theo giá trị khối lượng chính xác đã dự đoán của TPA-DHD. Hơn nữa, việc định lượng TPA-DHD được thực hiện tính theo đường chuẩn được tạo ra từ lượng axit terephthalic giảm và sự tăng diện tích đỉnh của TPA-DHD.

Kết quả, nhận thấy rằng TPA-DHD tăng khi axit terephthalic giảm. Bảng 3 cho thấy tỷ lệ với lượng TPA-DHD được tạo ra từ từng muối của axit terephthalic 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy là 100%. Từ các kết quả được thể hiện ở Bảng 3, rõ ràng rằng cả 3 loại kali terephthalat có khả năng trong việc tạo ra TPA-DHD để tạo ra dinatri terephthalat cao hơn.

Bảng 3. Sự khác nhau về khả năng trong việc tạo ra TPA-DHD giữa các muối của axit terephthalic

Terephthalat được sử dụng làm nguyên liệu	TPA-DHD (g/L)	Tỷ lệ về khả năng trong việc tạo ra
Dinatri terephthalat	9,7	100%
Dikali terephthalat	11,3	116%

1-kali 4-natri terephtalat	10,7	110%
1-kali 4-amoni terephtalat	12,2	126%

Ví dụ 3. Sự khác nhau về khả năng trong việc tạo ra TPA-DHD trong số các nồng độ của ion kali trong các muối của axit terephtalic.

Các kết quả của Ví dụ 2 đã cho thấy rằng việc sử dụng kali terephtalat làm nguyên liệu đã đem lại khả năng tuyệt vời trong việc sản xuất TPA-DHD. Để khẳng định điều này, tác dụng của nồng độ của ion kali trong muối của axit terephtalic đối với TPA-DHD được kiểm tra như sau:

Đầu tiên, dung dịch dikali terephtalat 0,6 M và dung dịch dinatri terephtalat 0,6 M, đều được điều chế ở Ví dụ 2, được trộn với nhau theo tỷ lệ 0:100, 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, và 50:50 để điều chế từng dung dịch muối của axit terephtalic. Trộn 30 ml các dung dịch muối của axit terephtalic này với 7g glucoza để thu được glucoza và các dung dịch đã trộn chất nền.

Bằng cách sử dụng glucoza và các dung dịch đã trộn chất nền này, khả năng của tái tổ hợp *Escherichia coli* dòng M7032 (pUXPEaLT_tphA2A3A1_tpaK) trong việc sản xuất TPA-DHD được kiểm tra bằng phương pháp giống như phương pháp của Ví dụ 2. Các kết quả kiểm tra được thể hiện ở Bảng 4.

Kết quả, như được thể hiện ở Bảng 4, thấy rằng hiện tượng trong đó khả năng trong việc tạo ra TPA-DHD tăng khi hàm lượng ion kali trong muối của axit terephtalic tăng; và điều đó cho thấy rằng khả năng trong việc tạo ra TPA-DHD là cao hơn khi muối của axit terephtalic chứa 0,5 lần hoặc lớn hơn lượng mol kali tính theo tất cả các axit terephtalic chứa trong muối của axit terephtalic được sử dụng, so với khả năng trong việc tạo ra khi dinatri terephtalat được sử dụng làm nguyên liệu.

Bảng 4. Sự khác nhau về khả năng trong việc tạo ra TPA-DHD giữa các nồng độ của ion kali trong các muối của axit terephtalic

Tỷ lệ trộn giữa dikali terephthalat và dinatri terephthalat	51 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy chính		73 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy chính	
	TPA-DHD (g/L)	Tỷ lệ về khả năng trong việc tạo ra	TPA-DHD (g/L)	Tỷ lệ về khả năng trong việc tạo ra
0:100	15,2	100%	17,4	100%
20:80	15,0	99%	18,1	104%
25:75	15,6	103%	18,0	103%
30:70	16,5	109%	19,6	113%
35:65	16,9	111%	19,4	111%
50:50	17,2	113%	20,5	118%

Ví dụ 4. Sự khác nhau về khả năng trong việc tạo ra axit protocatechuic theo sự khác nhau giữa các muối của axit terephthalic

Plasmid tạo ra axit protocatechuic pUXPEaLT_tphA2A3BA1_tpaK được tạo cấu trúc ở Ví dụ tham khảo 2 được đưa vào *Escherichia coli* dòng M7032 bằng phương pháp biến nạp để thu được *Escherichia coli* dòng M7032 tạo ra axit protocatechuic (pUXPEaLT_tphA2A3BA1_tpaK).

Sau đó, ở phương pháp tương tự như được mô tả ở Ví dụ 2, dịch nuôi cấy trước của vi khuẩn tạo ra axit protocatechuic được chuẩn bị và sau đó chỉ 2% dịch nuôi cấy này được cấy vào môi trường nuôi cấy chính để thực hiện việc nuôi cấy chính. Khi độ đục của tế bào vi khuẩn đạt khoảng 7 ở hệ số hấp thụ 600 nm, tác nhân gây cảm ứng axit m-toluic được bổ sung sao cho nồng độ cuối của nó bằng 1 mM để biểu hiện protein terephthalat 1,2-dioxygenaza, protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza, protein terephthalat dihydrodiol dehydrogenaza, và protein vận chuyển axit terephthalic. Nồng độ glucoza được đo theo thời gian. Khi nồng độ glucoza bằng 0, glucoza và dung dịch đã trộn chất nền được sử dụng.

Việc lấy mẫu được thực hiện 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy chính. Mỗi mẫu này được phân tích bằng máy phân tích khối phổ loại LC-TOF (Waters

Corporation, LCT Premier XE). Việc xác định axit terephthalic và axit protocatechuic được thực hiện với sự kết hợp thời gian lưu của phép sắc ký lỏng tính năng cao và giá trị khối lượng chính xác từ máy phân tích khối phổ, so với mẫu axit terephthalic tiêu chuẩn và axit protocatechuic.

Kết quả, nhận thấy rằng axit protocatechuic tăng khi axit terephthalic giảm. Bảng 5 cho thấy tỷ lệ với lượng axit protocatechuic được tạo ra từ từng terephthalat 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy là 100%. Từ các kết quả được thể hiện ở Bảng 5, rõ ràng rằng cả 3 loại kali terephthalat có khả năng trong việc tạo ra axit protocatechuic để tạo ra dinatri terephthalat cao hơn.

Bảng 5. Sự khác nhau về khả năng trong việc tạo ra axit protocatechuic giữa các terephthalat

Terephthalat được sử dụng làm nguyên liệu	Axit protocatechuic (g/L)	Tỷ lệ về khả năng trong việc tạo ra
Dinatri terephthalat	5.0	100%
Dikali terephthalat	8.3	166%
1-kali 4-natri terephthalat	7.7	154%
1-kali 4-amoni terephthalat	7.1	142%

Ví dụ 5. Sự khác nhau về khả năng trong việc tạo ra axit galic theo sự khác nhau giữa các muối của axit terephthalic

Plasmit tạo ra axit galic pUXPEaLT_HFM145_tphA2A3BA1_tpaK được tạo cấu trúc ở Ví dụ tham khảo 2 được đưa vào *Escherichia coli* dòng M7032 bằng phương pháp biến nạp để thu được *Escherichia coli* dòng M7032 tạo ra axit galic (pUXPEaLT_HFM145_tphA2A3BA1_tpaK). Sau đó, ở phương pháp tương tự như được mô tả ở Ví dụ 2, dịch nuôi cấy trước của vi khuẩn tạo ra axit galic này được chuẩn bị và sau đó chỉ 2% dịch nuôi cấy trước này được cấy vào môi trường nuôi cấy chính để thực hiện việc nuôi cấy chính dưới điều kiện nêu trên. Khi độ đục của tế bào vi khuẩn đạt khoảng 7 ở hệ số hấp thụ 600 nm, tác nhân gây cảm ứng axit m-toluic được bổ sung sao cho nồng độ cuối của nó bằng 1 mM để biểu hiện protein terephthalat

1,2-dioxygenaza, protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza, protein terephthalat dihydrodiol dehydrogenaza, protein vận chuyển axit terephthalic và para-hydroxybenzoat hydroxylaza đã cải tiến. Nồng độ glucoza được đo theo thời gian. Khi nồng độ glucoza bằng 0, glucoza và dung dịch đã trộn chất nền được sử dụng.

Việc lấy mẫu được thực hiện 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy chính. Mỗi mẫu này được phân tích bằng máy phân tích khối phổ loại LC-TOF (Waters Corporation, LCT Premier XE). Việc xác định axit terephthalic và axit galic được thực hiện với sự kết hợp thời gian lưu của phép sắc ký lỏng tính năng cao và giá trị khối lượng chính xác từ máy phân tích khối phổ, so với mẫu axit terephthalic tiêu chuẩn và axit galic.

Kết quả, nhận thấy rằng axit galic tăng khi axit terephthalic giảm. Bảng 6 cho thấy tỷ lệ với lượng axit galic được tạo ra từ từng muối của axit terephthalic 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy là 100%. Từ các kết quả được thể hiện ở Bảng 6, rõ ràng rằng cả 3 loại kali terephthalat có khả năng cao hơn trong việc sản xuất axit galic so với việc sản xuất sử dụng dinatri terephthalat.

Bảng 6. Sự khác nhau về khả năng trong việc tạo ra axit galic theo axit terephthalic

Terephthalat được sử dụng làm nguyên liệu	Axit galic (g/L)	Tỷ lệ về khả năng trong việc tạo ra
Dinatri terephthalat	7,6	100%
Dikali terephthalat	8,6	113%
1-kali 4-natri terephthalat	8,4	111%
1-kali 4-amoni terephthalat	8,5	112%

Ví dụ 6. Phản ứng khử trùng hợp PET thải trong dung môi etylen glycol

(1) Sự khác nhau về tốc độ khử trùng hợp và hiệu suất khử trùng hợp PET thải theo loại hydroxit của kim loại kiềm

Thu gom 22 kg chai PET thải. Sau khi loại bỏ nhãn và nắp của nó, chai được rửa và sấy khô. Chai PET thải đã rửa được nghiền thành viên có kích cỡ đủ để đi qua

sàng lỗ vuông 5 mm, hoạt động mà Nippon Coke & Engineering Co., Ltd. được yêu cầu để làm. Sản phẩm đã nghiền này được sử dụng ở các bước sau như sản phẩm nghiền từ chai PET thải.

Cho vào cốc mở bằng thép không gỉ dung tích 200 mL (được mua từ Sansyo Co., Ltd.) 12g sản phẩm nghiền từ chai PET thải và 60g etylen glycol. Sau đó, 0,13 mol kali hydroxit (dạng hạt), 0,13 mol natri hydroxit (dạng hạt), hoặc 0,066 mol kali hydroxit, và 0,066 mol natri hydroxit được cho vào đó và được, trong khi khuấy mạnh bằng cách sử dụng máy khuấy nóng, xử lý nhiệt ở nhiệt độ 160°C trong 120 phút.

Lúc này, thu khoảng 200 μ L dung dịch phản ứng ở thời gian 0 phút, 5 phút, 10 phút, 20 phút, 30 phút, 60 phút, hoặc 120 phút sau khi nhiệt độ bên trong dung dịch bằng 160°C; và đo nồng độ của terephtalat tại mỗi mốc thời gian. Fig.2 thể hiện nồng độ của terephtalat được tạo ra trong khoảng thời gian phản ứng.

Từ các kết quả trên Fig.2, nhận thấy rằng việc bổ sung kali hydroxit dẫn đến tốc độ tạo ra muối của axit terephtalic cao hơn từ sản phẩm nghiền từ chai PET thải và hơn thế nữa hiệu suất tạo ra cao hơn. Hơn nữa, giữa trường hợp chỉ bổ sung kali hydroxit và trường hợp bổ sung cả kali hydroxit và natri hydroxit với lượng mol bằng nhau, không có sự khác nhau về hiệu suất phản ứng.

(2) Phân tích phần chất rắn còn lại sau phản ứng khử trùng hợp PET thải

Trong cốc mở bằng thép không gỉ dung tích 500 mL (được mua từ Sansyo Co., Ltd.), cho vào 30g sản phẩm nghiền từ chai PET thải và 150g etylen glycol. Và sau đó, 0,33 mol kali hydroxit (dạng hạt), 0,33 mol natri hydroxit (dạng hạt), hoặc 0,17 mol kali hydroxit, và 0,17 mol natri hydroxit được cho vào đó và được, trong khi khuấy mạnh bằng cách sử dụng máy khuấy nóng, xử lý nhiệt ở nhiệt độ 160°C trong 60 phút. Sau đó, hỗn hợp thu được được làm lạnh một cách tự nhiên, và khi nhiệt độ bên trong của nó bằng 40°C hoặc thấp hơn, dung dịch này được lấy ra.

Hỗn hợp này được lọc bằng giấy lọc (Grade 540 được sản xuất bởi Whatman) để tách phần cặn ra khỏi dịch lọc và sau đó cân từng phần cặn này và đo tổng lượng axit terephtalic trong phần cặn. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 7.

Ngoài ra, độ tan của dikali terephtalat, dinatri terephtalat, và 1-kali 4-natri terephtalat trong etylen glycol được kiểm tra bằng phương pháp giống như được mô tả

ở Ví dụ 1 và có giá trị lần lượt bằng 231 mM, 109 mM, và 205 mM.

Nhận thấy rằng, vì độ tan của muối của axit terephthalic cao hơn trong etylen glycol, so với việc bổ sung natri hydroxit, việc bổ sung kali hydroxit dẫn đến hiệu suất tạo ra muối của axit terephthalic cao hơn, trong khi lượng axit terephthalic được thu gom là bằng nhau (tính theo mol) giữa trường hợp bổ sung kali hydroxit và trường hợp bổ sung natri hydroxit (xem Bảng 7).

Bảng 7. Sự khác nhau về lượng axit terephthalic được tạo ra giữa các hydroxit của kim loại kiềm trong phản ứng khử trùng hợp PET trong dung môi etylen glycol

Hydroxit của kim loại kiềm dùng trong phản ứng khử trùng hợp PET	Lượng cần thu được (g)	Tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn (mmol)
Kali hydroxit	43,0	142,0
Natri hydroxit	62,8	143,6
Kali hydroxit và natri hydroxit	45,4	120,6

(3) Phản ứng khử trùng hợp PET thải bằng cách sử dụng dung môi etylen glycol bão hoà muối của axit terephthalic

Ở bước khử trùng hợp PET thải, mong muốn tái sử dụng dung môi etylen glycol thu được bằng cách tách các phần cặn rắn bằng các muối của axit terephthalic làm thành phần chính sau phản ứng khử trùng hợp kết thúc. Việc cho rằng mỗi muối của axit terephthalic được hoà tan, ở trạng thái bão hoà, trong dung môi etylen glycol mà đã tham gia phản ứng khử trùng hợp PET thải, phản ứng khử trùng hợp PET thải bằng cách sử dụng dung môi etylen glycol bão hoà muối của axit terephthalic được thực hiện như sau:

Cho 4,15g axit terephthalic (0,025 mol) vào trong cốc mỏ bằng thuỷ tinh dung tích 200 mL và sau đó cho vào đó 0,050 mol kali hydroxit (dạng hạt), 0,050 mol natri hydroxit (dạng hạt), hoặc 0,025 mol kali hydroxit, và 0,025 mol natri hydroxit. Lọc etylen glycol để thu được thể tích khoảng 100 mL. Đậy hỗn hợp tạo thành bằng lá nhôm như chiếc nắp, gia nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 60 phút trong khi khuấy bằng

máy khuấy nóng, và cho làm nguội đến nhiệt độ 30°C hoặc thấp hơn. Các dung dịch này được lọc bằng giấy lọc (Grade 540 được sản xuất bởi Whatman) để thu được dung môi etylen glycol bão hoà terephthalat.

Nồng độ của mỗi terephthalat chứa trong dung môi này là 0,23 M trong dung dịch bão hoà dikali terephthalat, 0,11 M trong dung dịch bão hoà dinatri terephthalat, và 0,20 M trong dung dịch bão hoà 1-kali 4-natri terephthalat.

Cho vào cốc mở bằng thép không gỉ dung tích 200 mL (được mua từ Sansyo Co., Ltd.) 12g sản phẩm nghiền từ chai PET thải. Và sau đó dung môi etylen glycol bão hoà chứa 65g dikali terephthalat và 0,13 mol kali hydroxit, dung môi etylen glycol bão hoà chứa 65g dinatri terephthalat và 0,13 mol natri hydroxit, hoặc dung môi etylen glycol bão hoà chứa 65g 1-kali 4-natri terephthalat, và 0,066 mol kali hydroxit và 0,066 mol natri hydroxit được cho vào đó và được, trong khi khuấy mạnh bằng cách sử dụng máy khuấy nóng, xử lý nhiệt ở nhiệt độ 160°C trong 60 phút. Dung dịch thu được được cho làm lạnh; và khi nhiệt độ bên trong của nó bằng 40°C hoặc thấp hơn, dung dịch này được lấy ra.

Hỗn hợp này được lọc bằng giấy lọc để tách phần cặn ra khỏi dịch lọc và sau đó cân từng phần cặn này và đo tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn. Từ các kết quả được thể hiện ở Bảng 8, nhận thấy rằng tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn sau khi lọc theo thứ tự từ cao nhất đến thấp nhất là kali hydroxit, hỗn hợp gồm kali hydroxit và natri hydroxit, và natri hydroxit.

Bảng 8 Sự khác nhau về lượng axit terephthalic được tạo ra trong phản ứng khử trùng hợp PET trong dung môi etylen glycol bão hoà muối của axit terephthalic

Dung môi dùng trong phản ứng khử trùng hợp PET	Hydroxit của kim loại kiềm dùng trong phản ứng khử trùng hợp PET	Lượng cặn thu được (g)	Tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn (mmol)
Etylen glycol bão hoà dikali terephthalat	Kali hydroxit	21,8	63,9
Etylen glycol bão hoà dinatri terephthalat	Natri hydroxit	28,0	54,6
Etylen glycol bão hoà 1-kali 4-natri terephthalat	Kali hydroxit và natri hydroxit	24,1	59,9

(4) Phản ứng khử trùng hợp sản phẩm nghiền từ chai PET thải trong dung môi chứa nước

Trong cốc mở bằng thép không gỉ dung tích 200 mL, cho vào 10g sản phẩm nghiền từ chai PET thải và 50g etylen glycol. và sau đó, 0,083 mol, 0,090 mol, hoặc 0,11 mol kali hydroxit (dạng hạt), hoặc 0,083 mol, 0,090 mol, hoặc 0,11 mol dung dịch kali hydroxit 34% được bổ sung vào đó.

Sau đó, hỗn hợp tạo thành được, trong khi khuấy mạnh bằng cách sử dụng máy khuấy nóng, xử lý nhiệt ở nhiệt độ 160°C trong 60 phút. Kết quả là làm bay hơi gần như hoàn toàn hàm lượng nước trong dung dịch phản ứng trùng hợp được bổ sung dung dịch kali hydroxit 34%, thể tích lỏng của nó sẽ gần bằng với thể tích của dung dịch phản ứng khử trùng hợp được bổ sung kali hydroxit (dạng hạt). Dung dịch này được cho làm lạnh tự nhiên; và khi nhiệt độ bên trong của nó bằng 40°C hoặc thấp hơn, dung dịch này được lấy ra. Hỗn hợp này được lọc bằng giấy lọc để tách phần cặn ra khỏi dịch lọc. Hàm lượng terephtalat trong các phần cặn này được thể hiện trên Fig.3.

Từ các kết quả được thể hiện trên Fig.3, nhận thấy rằng, khi kali hydroxit được cho vào với lượng bằng 0,090 mol hoặc 0,11 mol, phản ứng khử trùng hợp trong dung môi chứa nước dẫn đến hiệu suất tạo ra các muối của axit terephtalic tuyệt vời.

Ví dụ 7. Phản ứng khử trùng hợp PTT trong dung môi etylen glycol

13g mền bông được làm bằng PTT (được sản xuất bởi Nishikawa Sangyo Co., Ltd., FINE SMOOTH SOLOTEX batting refill package RC7954); và 130g dung môi etylen glycol bão hoà dikali terephtalat, mà được điều chế ở Ví dụ 6(3) và 0,13 mol kali hydroxit; 130g dung dịch bão hoà dinatri terephtalat và 0,13 mol natri hydroxit; hoặc 130g dung dịch bão hoà 1-kali 4-natri terephtalat, 0,066 mol kali hydroxit và 0,066 mol natri hydroxit được cho vào cốc mở bằng thép không gỉ dung tích 200 mL và được, trong khi khuấy mạnh bằng cách sử dụng máy khuấy nóng, xử lý nhiệt ở nhiệt độ 160°C trong 60 phút để được thuỷ phân. Dung dịch thu được được cho làm lạnh; và khi nhiệt độ bên trong của nó bằng 40°C hoặc thấp hơn, dung dịch này được lấy ra. Hỗn hợp này được lọc bằng giấy lọc (Grade 540 được sản xuất bởi Whatman) để tách phần cặn ra khỏi dịch lọc và sau đó cân từng phần cặn này và đo tổng lượng axit terephtalic trong phần cặn. Từ các kết quả được thể hiện ở Bảng 9,

nhận thấy rằng tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn sau khi lọc theo thứ tự từ cao nhất đến thấp nhất là kali hydroxit, hỗn hợp gồm kali hydroxit và natri hydroxit, và natri hydroxit.

Bảng 9. Sự khác nhau về lượng axit terephthalic được tạo ra trong phản ứng khử trùng hợp PTT trong dung môi etylen glycol bão hoà muối của axit terephthalic

Dung môi dùng trong phản ứng khử trùng hợp PTT	Hydroxit của kim loại kiềm dùng trong phản ứng khử trùng hợp PTT	Lượng cặn thu được (g)	Tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn (mmol)
Etylen glycol bão hoà dikali terephthalat	Kali hydroxit	20,7	64,8
Etylen glycol bão hoà dinatri terephthalat	Natri hydroxit	21,6	59,4
Etylen glycol bão hoà 1-kali 4-natri terephthalat	Kali hydroxit và natri hydroxit	25,3	60,5

Ví dụ 8. Phản ứng khử trùng hợp PBT trong dung môi etylen glycol

Bổ sung 15g sản phẩm nghiền từ thìa theo phong cách Trung Quốc (PBT Chinese-style spoon 103TW white (RLVH00) được mua từ Amazon.com, Inc.) vào cốc mở bằng thép không gỉ dung tích 200 mL. Bổ sung tiếp 75g dung môi etylen glycol bão hoà dikali terephthalat, mà được điều chế ở Ví dụ 6(3), và 0,15 mol kali hydroxit, 75g dung môi etylen glycol bão hoà dinatri terephthalat và 0,15 mol natri hydroxit, hoặc 75g dung môi etylen glycol bão hoà 1-kali 2-natri terephthalat salt và 0,075 mol kali hydroxit; và 0,075 mol natri hydroxit.

Sau đó, dung dịch tạo thành được, trong khi khuấy mạnh bằng cách sử dụng máy khuấy nóng, xử lý nhiệt ở nhiệt độ 160°C trong 120 phút để được thủy phân. Dung dịch thu được được cho làm lạnh; và khi nhiệt độ bên trong của nó bằng 40°C hoặc thấp hơn, dung dịch này được lấy ra.

Hỗn hợp này được lọc bằng giấy lọc để tách phần cặn ra khỏi dịch lọc và sau đó cân từng phần cặn này và đo tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn. Từ các kết quả được thể hiện ở Bảng 10, nhận thấy rằng tổng lượng axit terephthalic trong phần

cặn sau khi lọc theo thứ tự từ cao nhất đến thấp nhất là kali hydroxit, hỗn hợp gồm kali hydroxit và natri hydroxit, và natri hydroxit.

Bảng 10, Sự khác nhau về lượng axit terephthalic được tạo ra ở phản ứng khử trùng hợp PBT trong dung môi etylen glycol bão hoà muối của axit terephthalic

Dung môi dùng trong phản ứng khử trùng hợp PBT	Hydroxit của kim loại kiềm dùng trong phản ứng khử trùng hợp PBT	Lượng cặn thu được (g)	Tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn (mmol)
Etylen glycol bão hoà dikali terephthalat	Kali hydroxit	25,8	53,0
Etylen glycol bão hoà dinatri terephthalat	Natri hydroxit	26,8	41,4
Etylen glycol bão hoà 1-kali 4-natri terephthalat	Kali hydroxit và natri hydroxit	26,6	49,7

Ví dụ 9. Sự khác nhau giữa kali hydroxit và natri hydroxit ở phản ứng khử trùng hợp PET thải trong 1-butanol

Độ tan của dikali terephthalat và dinatri terephthalat trong 1-butanol được kiểm tra theo cách giống như được mô tả ở Ví dụ 1 và có giá trị lần lượt là 0,2 mM và 1,9 mM. Như nêu trên, nhận thấy rằng, không giống như việc hoà tan trong etylen glycol, việc hoà tan trong 1-butanol là rất kém.

Do đó, có sự khác biệt lớn về hiệu suất thu gom muối của axit terephthalic được tạo ra ở phản ứng khử trùng hợp giữa dung môi cho phản ứng khử trùng hợp sử dụng 1-butanol tinh khiết và dung môi 1-butanol mà trước đây được dùng trong phản ứng khử trùng hợp PET thải. Do đó, chỉ có những ví dụ sử dụng 1-butanol tinh khiết sẽ được thể hiện ở các ví dụ sau mà sử dụng 1-butanol.

Cho vào cốc mở bằng thép không gỉ dung tích 200 mL 13g sản phẩm nghiền từ chai PET thải và 80g 1-butanol. Và sau đó, 0,14 mol kali hydroxit (dạng hạt) hoặc 0,14 mol natri hydroxit (dạng hạt) được cho vào đó và được, trong khi khuấy mạnh bằng cách sử dụng máy khuấy nóng, xử lý nhiệt ở nhiệt độ 100°C lần lượt trong 60 phút hoặc 90 phút. Các dung dịch này được cho làm lạnh tự nhiên; và, khi nhiệt độ bên

trong của nó bằng 40°C hoặc thấp hơn, được lọc bằng giấy lọc (Grade 540 được sản xuất bởi Whatman) để tách phần cặn ra khỏi dịch lọc. Phần cặn này được rửa bằng metanol 50 mL trên phễu và sau đó được sấy bằng cách sử dụng máy sấy chân không (được sản xuất bởi AS ONE Corporation) ở nhiệt độ 60°C cho đến khi trọng lượng giảm đến dưới 0,1 g/giờ. Trọng lượng của phần cặn này và hàm lượng axit terephthalic trong các phần cặn này được thể hiện ở Bảng 11. Như được thể hiện ở Bảng 11, nhận thấy rằng việc sử dụng kali hydroxit dẫn đến hiệu suất tạo ra muối của axit terephthalic cao hơn với việc sử dụng natri hydroxit.

Bảng 11. Sự khác nhau về lượng axit terephthalic được tạo ra giữa các hydroxit của kim loại kiềm ở phản ứng khử trùng hợp PET trong dung môi 1-butanol

Hydroxit của kim loại kiềm dùng trong phản ứng khử trùng hợp PET	Thời gian gia nhiệt (phút)	Lượng cặn thu được (g)	Tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn (mmol)
Kali hydroxit	60	17,1	67,5
Kali hydroxit	90	16,1	67,3
Natri hydroxit	60	14,5	59,2
Natri hydroxit	90	14,5	63,9

Ví dụ 10. Sự khác nhau giữa kali hydroxit và natri hydroxit ở phản ứng khử trùng hợp PTT trong 1-butanol

Cho vào cốc mở bằng thép không gỉ dung tích 200 mL 13g bông làm bằng PTT (được sản xuất bởi Nishikawa Sangyo Co., Ltd., FINE SMOOTH SOLOTEX cotton refill package RC7954) và 130g 1-butanol; và sau đó 0,13 mol kali hydroxit (dạng hạt) hoặc 0,13 mol natri hydroxit (dạng hạt) được cho vào đó. Dung dịch tạo thành được, trong khi khuấy mạnh bằng cách sử dụng máy khuấy nóng, xử lý nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 90 phút trong trường hợp kali hydroxit và nhiệt độ 100°C trong 120 phút trong trường hợp natri hydroxit.

Sau khi gia nhiệt, dung dịch này được cho làm lạnh tự nhiên; và khi nhiệt độ bên trong của nó bằng 40°C hoặc thấp hơn, dung dịch này được lấy ra. Hỗn hợp này được lọc bằng giấy lọc (Grade 540 được sản xuất bởi Whatman) để tách phần cặn

ra khỏi dịch lọc và sau đó cân từng phần cặn này và đo tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn.

Từ các kết quả được thể hiện ở Bảng 12, nhận thấy rằng, khi kali hydroxit được sử dụng, mặc dù khoảng thời gian gia nhiệt càng ngắn, tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn càng lớn, so với khi natri hydroxit được sử dụng.

Bảng 12. Sự khác nhau về lượng axit terephthalic được tạo ra giữa các hydroxit của kim loại kiềm ở phản ứng khử trùng hợp PTT trong dung môi 1-butanol

Hydroxit của kim loại kiềm dùng trong phản ứng khử trùng hợp PTT	Thời gian gia nhiệt (phút)	Lượng cặn thu được (g)	Tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn (mmol)
Kali hydroxit	60	26,1	60,2
Natri hydroxit	120	22,2	54,3

Ví dụ 11. Sự khác nhau giữa kali hydroxit và natri hydroxit ở phản ứng khử trùng hợp PBT trong 1-butanol

Cho vào cốc mỏ bằng thép không gỉ dung tích 200 mL 15g sản phẩm nghiền từ thìa theo phong cách Trung Quốc (Chinese-style spoon) làm bằng PBT thải, mà được điều chế ở Ví dụ 7, và 75g 1-butanol; và tiếp tục cho vào đó 0,15 mol kali hydroxit (dạng hạt) hoặc 0,15 mol natri hydroxit (dạng hạt). Dung dịch tạo thành được, trong khi khuấy mạnh bằng cách sử dụng máy khuấy nóng, xử lý nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 240 phút, sau đó được cho làm lạnh tự nhiên, và, khi nhiệt độ bên trong của nó bằng 40°C hoặc thấp hơn, dung dịch này được lấy ra.

Hỗn hợp này được lọc bằng giấy lọc để tách phần cặn ra khỏi dịch lọc và sau đó cân từng phần cặn này và đo tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn.

Như được thể hiện ở Bảng 13, nhận thấy rằng tổng lượng axit terephthalic trong phần cặn lớn hơn khi sử dụng kali hydroxit, so với khi sử dụng natri hydroxit.

Bảng 13. Sự khác nhau về lượng axit terephthalic được tạo ra giữa các hydroxit của kim loại kiềm ở phản ứng khử trùng hợp PBT trong dung môi 1-butanol

Hydroxit của kim loại kiềm dùng trong phản ứng khử trùng hợp PBT	Lượng cần thu được (g)	Tổng lượng axit terephthalic trong phần cần (mmol)
Kali hydroxit	26,0	44,5
Natri hydroxit	25,0	43,3

Ví dụ 12. Sự phân huỷ etylen glycol khi tạo ra TPA-DHD từ muối của axit terephthalic chứa etylen glycol

Đối với vi khuẩn tạo ra TPA-DHD có khả năng phân huỷ etylen glycol, pUXPEaLT_tpaA_tpaK_Pm_fucO_I7L_aldA được tạo cấu trúc ở Ví dụ tham khảo 3 được đưa vào *Escherichia coli* K-12 dòng M7032 bằng phương pháp biến nạp, nhờ đó tạo ra *Escherichia coli* dòng M7032 (pUXPEaLT_tpaA_tpaK_Pm_fucO_I7L_aldA).

Sau đó, ở phương pháp tương tự như được mô tả ở Ví dụ 1, *Escherichia coli* dòng M7032 (pUXPEaLT_tpaA_tpaK_Pm_fucO_I7L_aldA) và *Escherichia coli* K-12 dòng M7032 mà đóng vai trò làm đối chứng được nuôi cấy trong thiết bị lên men dạng vại nhỏ. 0,278 ml (nồng độ cuối 72 mM) etylen glycol được cho đồng thời với việc cho dikali terephthalat mà đóng vai trò làm nguyên liệu.

Việc lấy mẫu được thực hiện 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy chính. Mỗi mẫu này được phân tích dưới các điều kiện được thể hiện ở Bảng 1 bằng máy phân tích khối phổ loại LC-TOF (Waters Corporation, LCT Premier XE). Việc xác định axit terephthalic được thực hiện với sự kết hợp thời gian lưu của phép sắc ký lỏng tính năng cao và giá trị khối lượng chính xác từ máy phân tích khối phổ, so với mẫu axit terephthalic tiêu chuẩn. Trong số các chất xuất hiện khi axit terephthalic giảm, TPA-DHD được xác định tính theo giá trị khối lượng chính xác đã dự đoán của TPA-DHD. Hơn nữa, việc định lượng TPA-DHD được thực hiện tính theo đường chuẩn được tạo ra từ lượng axit terephthalic giảm và sự tăng diện tích đỉnh của TPA-DHD.

Kết quả, nhận thấy rằng TPA-DHD tăng khi axit terephthalic giảm. Đối với lượng TPA-DHD được tạo ra 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy, lượng TPA-DHD được tạo ra 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy *Escherichia coli* dòng M7032

(pUXPEaLT_tpaA_tpaK_Pm_fucO_I7L_aldA) và *Escherichia coli* K-12 dòng M7032 lần lượt là 10,5 g/L và 11,1 g/L.

Sau đó, lượng etylen glycol 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy trong dung dịch nuôi cấy được phân tích dưới các điều kiện được thể hiện ở Bảng 14 bằng cách sử dụng máy phân tích khối phổ loại sắc ký khí (GC) (GC: Agilent 7890A, mass spectrometer: Agilent 5975C). Etylen glycol được xác định bằng cách thực hiện kết hợp việc đo thời gian lưu của phép sắc ký khí và việc đo từ máy phân tích khối phổ có m/z62 làm ion mục tiêu, so với mẫu etylen glycol tiêu chuẩn. Kết quả, nồng độ của etylen glycol 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy *Escherichia coli* dòng M7032 (pUXPEaLT_tpaA_tpaK_Pm_fucO_I7L_aldA) và *Escherichia coli* dòng M7032 có giá trị lần lượt là 37,1 mM và 0,0 mM; và phát hiện ra rằng sự tăng cường lượng biểu hiện của lactaldehyt reductaza và lactaldehyt dehydrogenaza cho phép phân huỷ etylen glycol chứa trong terephtalat.

Bảng 14. Điều kiện phân tích bằng cách sử dụng máy phân tích khối phổ loại sắc ký khí

Cột	DB-WAX (đường kính trong: 0,25 mm, chiều dài: 30 m, độ dày màng: 0,25 µm, J&W Scientific)
Nhiệt độ phun	250°C
Nhiệt độ mặt phân cách	250°C
Chế độ phun	Không chia nhỏ
Thể tích phun	1 µl
Chương trình mở	1 ml/phút
Chế độ MS	40°C (5 phút), sau đó nâng nhiệt độ đến 230°C ở tốc độ 10°C/phút
Hạt phát hiện	EI (70 eV)
Chế độ đo	SIM

Ví dụ 13. Sản xuất axit protocatechuic từ muối của axit terephtalic thu được bằng phản ứng khử trùng hợp PET

Bằng cách sử dụng *Escherichia coli* dòng M7032 (pUXPEaLT_tphA2A3BA1_tpaK) tạo ra axit protocatechuic được tạo ra ở Ví dụ tham khảo 2, ở phương pháp tương tự như được mô tả ở Ví dụ 2, việc nuôi cấy trước vi khuẩn tạo ra axit protocatechuic này được chuẩn bị và sau đó chỉ 2% dịch nuôi cấy này được cấy vào môi trường nuôi cấy chính để thực hiện việc nuôi cấy chính. Khi độ đục của tế bào vi khuẩn đạt khoảng 7 ở hệ số hấp thụ 600 nm, tác nhân gây cảm ứng axit m-toluic được bổ sung sao cho nồng độ cuối của nó bằng 1 mM để biểu hiện protein terephthalat 1,2-dioxygenaza, protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza, protein terephthalat dihydrodiol dehydrogenaza, và protein vận chuyển axit terephthalic. Nồng độ glucoza được đo theo thời gian. Khi nồng độ glucoza bằng 0, muối của axit terephthalic thu được từ PET, mà được điều chế ở Ví dụ 6, được hoà tan sao cho nồng độ của nó bằng 0,6M, được trộn với glucoza, và được đưa vào thiết bị nuôi cấy.

Việc chuẩn bị mẫu được thực hiện 52 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy chính. Mỗi mẫu này được phân tích bằng máy phân tích khối phổ loại LC-TOF (Waters Corporation, LCT Premier XE). Việc xác định axit terephthalic và axit protocatechuic được thực hiện với sự kết hợp thời gian lưu của phép sắc ký lỏng tính năng cao và giá trị khối lượng chính xác từ máy phân tích khối phổ, so với mẫu axit terephthalic tiêu chuẩn và axit protocatechuic.

Kết quả, nhận thấy rằng axit protocatechuic tăng khi axit terephthalic giảm. Bảng 15 cho thấy tỷ lệ với lượng axit protocatechuic được tạo ra từ từng muối của axit terephthalic 52 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy là 100%. Từ các kết quả được thể hiện ở Bảng 15, rõ ràng rằng cả 2 loại kali terephthalat có khả năng cao hơn trong việc sản xuất axit protocatechuic so với việc sản xuất sử dụng dinatri terephthalat.

Bảng 15. Sản xuất axit protocatechuic từ muối của axit terephthalic thu được bằng phản ứng khử trùng hợp PET

Muối của axit terephthalic được sử dụng làm nguyên liệu	Axit protocatechuic (g/L)	Tỷ lệ về khả năng trong việc tạo ra
Dinatri terephthalat	10,2	100%
Dikali terephthalat	11,5	113%
1-kali 4-natri terephthalat	11,1	108%

Ví dụ 14. Sản xuất TPA-DHD từ muối của axit terephthalic thu được bằng phản ứng khử trùng hợp PTT

Bằng cách sử dụng tái tổ hợp *Escherichia coli* strain M7032 sản xuất TPA-DHD (pUXPEaLT_tphA2A3A1_tpaK) được tạo cấu trúc ở Ví dụ tham khảo 2, ở phương pháp tương tự như được mô tả ở Ví dụ 2, việc nuôi cấy trước vi khuẩn tạo ra TPA-DHD này được chuẩn bị và sau đó chỉ 2% dịch nuôi cấy này được cấy vào môi trường nuôi cấy chính để thực hiện việc nuôi cấy chính. Khi độ đục của tế bào vi khuẩn đạt khoảng 7 ở hệ số hấp thụ 600 nm, tác nhân gây cảm ứng axit m-toluic được bổ sung sao cho nồng độ cuối của nó bằng 1 mM để biểu hiện protein terephthalat 1,2-dioxygenaza, protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza, và protein vận chuyển axit terephthalic. Nồng độ glucoza được đo theo thời gian. Khi nồng độ glucoza bằng 0, muối của axit terephthalic thu được từ PTT, mà được điều chế ở Ví dụ 7, được hoà tan sao cho nồng độ của nó bằng 0,6M, được trộn với glucoza, và được đưa vào thiết bị nuôi cấy.

Việc lấy mẫu được thực hiện 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy chính. Mỗi mẫu này được phân tích dưới các điều kiện được thể hiện ở Bảng 1 bằng máy phân tích khối phổ loại LC-TOF (Waters Corporation, LCT Premier XE). Việc xác định axit terephthalic được thực hiện với sự kết hợp thời gian lưu của phép sắc ký lỏng tính năng cao và giá trị khối lượng chính xác từ máy phân tích khối phổ, so với mẫu axit terephthalic tiêu chuẩn. Trong số các chất xuất hiện khi axit terephthalic giảm, TPA-DHD được xác định tính theo giá trị khối lượng chính xác đã dự đoán của TPA-DHD. Hơn nữa, việc định lượng TPA-DHD được thực hiện tính theo đường chuẩn được tạo ra từ lượng axit terephthalic giảm và sự tăng diện tích đỉnh của TPA-DHD.

Kết quả, nhận thấy rằng TPA-DHD tăng khi axit terephthalic giảm. Bảng 16 cho thấy tỷ lệ với lượng TPA-DHD được tạo ra từ từng muối của axit terephthalic 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy là 100%. Từ các kết quả được thể hiện ở Bảng 16, rõ ràng rằng cả 2 loại kali các muối của axit terephthalic có khả năng cao hơn trong việc sản xuất TPA-DHD so với việc sản xuất sử dụng dinatri terephthalat.

Bảng 16. Sản xuất TPA-DHD từ muối của axit terephthalic thu được bằng phản ứng khử trùng hợp PTT

Terephthalat được sử dụng làm nguyên liệu	TPA-DHD (g/L)	Tỷ lệ về khả năng trong việc tạo ra
Dinatri terephthalat	12,8	100%
Dikali terephthalat	17,7	138%
1-kali 4-natri terephthalat	14,3	112%

Ví dụ 15. Sản xuất axit protocatechuic từ muối của axit terephthalic thu được bằng phản ứng khử trùng hợp PTT

Bằng cách sử dụng *Escherichia coli* dòng M7032 tạo ra axit protocatechuic (pUXPEaLT_tphA2A3BA1_tpaK) được tạo ra ở Ví dụ tham khảo 2, ở phương pháp tương tự như được mô tả ở Ví dụ 2, dịch nuôi cấy trước của vi khuẩn tạo ra axit protocatechuic được chuẩn bị và sau đó chỉ 2% dịch nuôi cấy này được cấy vào môi trường nuôi cấy chính để thực hiện việc nuôi cấy chính. Khi độ đục của tế bào vi khuẩn đạt khoảng 7 ở hệ số hấp thụ 600 nm, tác nhân gây cảm ứng axit m-toluic được bổ sung sao cho nồng độ cuối của nó bằng 1 mM để biểu hiện protein terephthalat 1,2-dioxygenaza, protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza, protein terephthalat dihydrodiol dehydrogenaza, và protein vận chuyển axit terephthalic. Nồng độ glucoza được đo theo thời gian. Khi nồng độ glucoza bằng 0, muối của axit terephthalic thu được từ PBT, mà được điều chế ở Ví dụ 8, được hoà tan sao cho nồng độ của nó bằng 0,6M, được trộn với glucoza, và được đưa vào thiết bị nuôi cấy.

Việc lấy mẫu được thực hiện 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy chính. Mỗi mẫu này được phân tích bằng máy phân tích khối phổ loại LC-TOF (Waters Corporation, LCT Premier XE). Việc xác định axit terephthalic và axit protocatechuic được thực hiện với sự kết hợp thời gian lưu của phép sắc ký lỏng tính năng cao và giá trị khối lượng chính xác từ máy phân tích khối phổ, so với mẫu axit terephthalic tiêu chuẩn và axit protocatechuic.

Kết quả, nhận thấy rằng axit protocatechuic tăng khi axit terephthalic giảm. Bảng 17 cho thấy tỷ lệ với lượng axit protocatechuic được tạo ra từ từng muối của axit terephthalic 48 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy là 100%. Từ các kết quả được thể hiện ở Bảng 17, rõ ràng rằng cả 2 loại kali terephthalat có khả năng cao hơn trong việc sản xuất axit protocatechuic so với việc sản xuất sử dụng dinatri terephthalat.

Bảng 17. Sản xuất axit protocatechuic từ muối của axit terephthalic thu được bằng phản ứng khử trùng hợp PBT

Muối của axit terephthalic được sử dụng làm nguyên liệu	Axit protocatechuic (g/L)	Tỷ lệ về khả năng trong việc tạo ra
Dinatri terephthalat	10,2	100%
Dikali terephthalat	11,6	114%
1-kali 4-natri terephthalat	11,0	108%

Ví dụ 16. Sản xuất TPA-DHD từ muối của axit terephthalic thu được bằng phản ứng khử trùng hợp PET trong dung môi 1-butanol

Bằng cách sử dụng tái tổ hợp *Escherichia coli* dòng M7032 tạo ra TPA-DHD (pUXPEaLT_tphA2A3A1_tpaK) được tạo ra ở Ví dụ tham khảo 2, ở phương pháp tương tự như được mô tả ở Ví dụ 2, việc nuôi cấy trước vi khuẩn tạo ra TPA-DHD này được chuẩn bị và sau đó chỉ 2% dịch nuôi cấy này được cấy vào môi trường nuôi cấy chính để thực hiện việc nuôi cấy chính. Khi độ đục của tế bào vi khuẩn đạt khoảng 7 ở hệ số hấp thụ 600 nm, tác nhân gây cảm ứng axit m-toluic được bổ sung sao cho nồng độ cuối của nó bằng 1 mM để biểu hiện protein terephthalat 1,2-dioxygenaza, protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza, và protein vận chuyển axit terephthalic. Nồng độ glucoza được đo theo thời gian. Khi nồng độ glucoza bằng 0, muối của axit terephthalic thu được từ PET mà thu được bằng phản ứng khử trùng hợp trong 1-butanol, trong đó muối của axit terephthalic được chuẩn bị ở Ví dụ 9, được hoà tan sao cho nồng độ của nó bằng 0,6M, được trộn với glucoza, và được đưa vào thiết bị nuôi cấy.

Việc chuẩn bị mẫu được thực hiện 35 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy chính. Mỗi mẫu này được phân tích dưới các điều kiện được thể hiện ở Bảng 1 bằng máy phân tích khối phổ loại LC-TOF (Waters Corporation, LCT Premier XE). Việc xác định axit terephthalic được thực hiện với sự kết hợp thời gian lưu của phép sắc ký lỏng tính năng cao và giá trị khối lượng chính xác từ máy phân tích khối phổ, so với mẫu axit terephthalic tiêu chuẩn. Trong số các chất xuất hiện khi axit terephthalic giảm, TPA-DHD được xác định tính theo giá trị khối lượng chính xác đã dự đoán của TPA-DHD. Hơn nữa, việc định lượng TPA-DHD được thực hiện tính theo đường chuẩn được tạo

ra từ lượng axit terephthalic giảm và sự tăng diện tích đỉnh của TPA-DHD.

Kết quả, nhận thấy rằng TPA-DHD tăng khi axit terephthalic giảm. Bảng 18 cho thấy tỷ lệ với lượng TPA-DHD được tạo ra từ từng muối của axit terephthalic 35 giờ sau khi bắt đầu việc nuôi cấy là 100%. Từ các kết quả được thể hiện ở Bảng 18, rõ ràng rằng cả 2 loại kali các muối của axit terephthalic có khả năng cao hơn trong việc sản xuất TPA-DHD so với việc sản xuất sử dụng dinatri terephthalat.

Bảng 18. Sản xuất TPA-DHD từ muối của axit terephthalic thu được bằng phản ứng khử trùng hợp PET trong 1-butanol

Muối của axit terephthalic được sử dụng làm nguyên liệu	TPA-DHD (g/L)	Tỷ lệ về khả năng trong việc tạo ra
Dinatri terephthalat	12,8	100%
Dikali terephthalat	17,4	136%
1-kali 4-natri terephthalat	14,8	116%

Ví dụ tham khảo 1. Tạo cấu trúc vectơ biểu hiện pUXPEaLT19

Để thực hiện việc biểu hiện có hiệu quả tính độc lập của tác dụng phiên mã và dịch mã gen sử dụng *Escherichia coli*, việc tạo cấu trúc hệ thống biểu hiện được thực hiện, trong đó việc phiên mã gen mong muốn phụ thuộc vào gen giả và gen mong muốn cũng được dịch mã ở trạng thái duy trì tác dụng dịch mã gen giả. Cụ thể, để xen trình tự kết thúc vào pUC19 (được sản xuất bởi Takara Bio Inc.), sáu ADN tổng hợp nêu trong các SEQ ID NO: 13 đến 18 được tổng hợp.

Các ADN tổng hợp này được xen giữa vị trí KpnI và vị trí EcoRI của pUC19 để tạo cấu trúc plasmit pUC1LT1. Vùng giữa vị trí PvuII và vị trí HindIII của pUC1LT1 sau đó được làm mất đoạn để tạo cấu trúc pULTDL1. Để xen trình tự gen khởi đầu T7 và vị trí PacI để liên kết gen giả với gen mong muốn vào pULTDL1, sáu ADN tổng hợp nêu trong Các SEQ ID NO: 19 đến 24 được tổng hợp. Các ADN tổng hợp này được xen giữa vị trí SphI site và vị trí SalI của pULTDL1 để tạo cấu trúc plasmit biểu hiện pUTPELT19. Và sau đó, bằng phương pháp PCR sử dụng PrimeSTAR ADN polymeraza (được sản xuất bởi Takara Bio Inc.; sau đây, trừ khi có quy định khác, enzym này được sử dụng làm enzym khuếch đại ADN dùng trong các phản ứng PCR),

vùng giữa vị trí BglII và vị trí PacI của pUTPELT19 được thể bằng trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25 để tạo cấu trúc plasmit biểu hiện pUTPEaLT19.

Hơn nữa, để tạo cấu trúc hệ thống biểu hiện cảm ứng bằng cách sử dụng gen khởi đầu XylS-Pm, ADN của vùng gen khởi đầu XylS-Pm thu được. Vùng gen khởi đầu XylS-Pm được khuếch đại bằng phản ứng PCR với plasmit pJB866 mà thu được từ National Institute of Genetics làm mẫu sử dụng 2 loại đoạn nối ADN (các SEQ ID NO: 26 và 27). Gốc A được thêm vào đầu 3' của mảnh ADN đã khuếch đại nhờ Taq ADN polymeraza và mảnh ADN đã khuếch đại này được tinh chế bằng phương pháp điện di trên gel và được kết hợp vào vector pT7Blue-T (được sản xuất bởi Novagen), nhờ đó tạo cấu trúc plasmit pT7-xylS_Pm mà giữ lại toàn bộ vùng gen khởi đầu XylS-Pm.

Vùng gen khởi đầu XylS-Pm được cắt ra khỏi plasmit pT7-xylS_Pm bằng enzym giới hạn SbfI và enzym giới hạn BamHI và được kết hợp giữa vị trí SbfI và vị trí BglII của pUTPEaLT19, nhờ đó tạo ra vector biểu hiện pUXPEaLT19.

Ví dụ tham khảo 2. Tạo cấu trúc plasmit tạo ra axit protocatechuic

(1) Tách *Comamonas testosteroni* dòng 72W2 từ tự nhiên

Comamonas testosteroni dòng 72W2 thu được dưới dạng dòng vi khuẩn sinh trưởng bằng axit terephthalic như nguồn cacbon duy nhất từ đất lấy từ Itabashi Ward, Tokyo.

Cụ thể, mẫu đất lấy được được thêm 5 ml môi trường lỏng W chứa axit terephthalic 10 mM được cho vào ống Falcon dung tích 15 mL và được nuôi cấy đồng thời lắc ở nhiệt độ 30°C. Lưu ý rằng thành phần của môi trường lỏng W là kali dihydro phosphat 0,85 g/L, dinatri hydrogen phosphat 4,9 g/L, amoni sulfat 0,5 g/L, magie sulfat heptahydrat 9,5 mg/L, sắt sulfat (II) heptahydrat 9,5 mg/L, magie oxit 10,75 mg/L, canxi cacbonat 2 mg/L, kẽm sulfat heptahydrat 4,5 mg/ml, mangan sulfat (II) tetrahydrat 1,12mg/L, đồng sulfat (II) pentahydrat 0,25 mg/L, coban sulfat (II) heptahydrat 0,28 g/L, và axit boric 0,06 mg/L.

Dung dịch nuôi cấy được rải trên tấm thạch chứa môi trường lỏng W chứa axit terephthalic 10 mM và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C để nhờ đó lựa chọn dòng vi khuẩn sinh trưởng bằng axit terephthalic như nguồn cacbon duy nhất. Các khuẩn lạc

trên tấm thạch được nuôi cấy trong 5mL môi trường lỏng W chứa axit terephthalic 10 mM trong 3 ngày. Bằng cách xác định trình tự 16S rDN của dòng vi khuẩn này, dòng vi khuẩn này được xác định là *Comamonas testosteroni* và được đặt tên dòng 72W2.

(2) Phân lập gen từ *Comamonas testosteroni* dòng 72W2

Comamonas testosteroni dòng 72W2 được nuôi cấy và các tế bào được thu lại. ADN hệ gen được chiết bằng cách sử dụng hệ gen vi khuẩn minh họa Prep Mini Spin Kit (được mua từ GE Healthcare Japan Corporation).

Tiếp theo, trình tự nucleotit của operon mã hoá cụm gen trao đổi chất axit terephthalic của *Comamonas testosteroni* dòng YZW-D thu được như mã lưu giữ GB là AY923836 từ cơ sở dữ liệu GB của the National Center for Biotechnology Information (dưới đây được viết tắt là NCBI). Hơn nữa, trình tự nucleotit của hai operon mã hoá cụm gen trao đổi chất axit terephthalic được sở hữu bởi *Comamonas* dòng E6 thu được từ cơ sở dữ liệu GB của NCBI. Cụ thể, đối với *Comamonas testosteroni* dòng YZW-D, trình tự của các nucleotit từ 8242 đến 11908 có mã lưu giữ GB là AY923836 được sử dụng làm trình tự nucleotit của operon của cụm gen trao đổi chất axit terephthalic. Vì vi khuẩn *Comamonas* dòng E6 có 2 operon của cụm gen trao đổi chất axit terephthalic, trình tự của các nucleotit từ 3260 đến 6926 có mã lưu giữ GB là AB238678.1 và trình tự của các nucleotit từ 4911 đến 8577 có mã lưu giữ GB là AB238679.1 đều được sử dụng làm trình tự nucleotit của operon của cụm gen trao đổi chất axit terephthalic.

Tính theo các trình tự này, các đoạn môi thoái hóa được tạo ra để tách dòng ADN mã hoá cụm gen trao đổi chất axit terephthalic của *Comamonas testosteroni* dòng 72W2. Trong số các đoạn môi thoái hóa này, vị trí nhận biết PacI được thêm vào đoạn môi 5' (SEQ ID NO: 28) và vị trí nhận biết SgfI và vị trí nhận biết NotI được thêm vào đoạn môi 3' (SEQ ID NO: 29).

Bằng cách sử dụng 2 loại đoạn môi thoái hóa này, với ADN hệ gen của *Comamonas testosteroni* dòng 72W2 làm mẫu, vùng operon của cụm gen trao đổi chất axit terephthalic (gen tphA2-gen tphA3-gen tphB-gen tphA1; dưới đây được viết tắt là gen tphA2A3BA1) được khuếch đại bằng phản ứng PCR. Mảnh ADN đã khuếch đại được thu hồi bằng cách sử dụng kit tinh chế QIAquick PCR (được sản xuất bởi QIAGEN; sau đây, trừ khi có quy định khác, kit này được sử dụng làm kit tinh chế cho phản ứng PCR). Sau khi trình tự nucleotit của mảnh ADN đã khuếch đại này được xác

định, đã khẳng định được rằng AND này đã mã hóa gen tphA2 mã hoá protein nhóm con lớn terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza (SEQ ID NO: 1), gen tphA3 mã hoá protein nhóm con nhỏ terephthalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza (SEQ ID NO: 3), gen tphB mã hoá protein dehydrogenaza TPA-DHD (SEQ ID NO: 9), và gen tphA1 mã hoá protein terephthalat 1,2-dioxygenaza reductaza (SEQ ID NO: 5).

Operon của gen tphA2A3BA1 (SEQ ID NO: 30) được cắt ra khỏi sản phẩm của phản ứng PCR bằng enzym giới hạn PacI và enzym giới hạn NotI và được kết hợp giữa vị trí PacI và vị trí NotI của vector biểu hiện pUXPEaLT19 được mô tả ở Ví dụ tham khảo 1, nhờ đó tạo ra plasmit pUXPEaLT_tphA2A3BA1 biểu hiện nhóm enzym liên quan đến việc chuyển hóa từ axit terephthalic thành axit protocatechuic.

(4) Tách dòng tác nhân vận chuyển axit terephthalic và tạo cấu trúc plasmit tạo ra axit protocatechuic

Vì khả năng của *Escherichia coli* Dòng K-12 để vận chuyển axit terephthalic yếu, nên cần tăng cường khả năng vận chuyển axit terephthalic của nó bằng cách biểu hiện tác nhân vận chuyển axit terephthalic mà đẩy mạnh việc vận chuyển axit terephthalic.

Cụ thể, đã thu được ADN mã hoá tác nhân vận chuyển axit terephthalic tpaK *Rhodococcus jostii* dòng RHA1 có tác dụng đẩy mạnh việc vận chuyển axit terephthalic với các tế bào vi khuẩn. Trình tự nucleotit của gen tpaK thu được từ cơ sở dữ liệu GB của NCBI làm trình tự của các nucleotit từ 175046 đến 176425 (SEQ ID NO: 7) có mã lưu giữ CP000432. Với ADN nhiễm sắc thể (100 ng) *Rhodococcus jostii* dòng RHA1 thu được từ Professor Masao Fukuda, Nagaoka University of Technology làm mẫu, sử dụng 2 loại đoạn mồi ADN (SEQ ID NO: 31 và SEQ ID NO: 32), toàn bộ vùng gen tpaK mã hoá protein vận chuyển axit terephthalic (SEQ ID NO: 8) được khuếch đại bằng phản ứng PCR.

Mảnh ADN đã khuếch đại được thu hồi bằng cách sử dụng kit tinh chế dùng cho phản ứng PCR. Gen tpaK được cắt ra khỏi sản phẩm của phản ứng PCR bằng enzym giới hạn PacI và enzym giới hạn NotI và được kết hợp giữa vị trí SgfI và vị trí NotI của plasmit pUXPEaLT_tphA2A3BA1 nêu trên, nhờ đó tạo ra plasmit tạo ra axit protocatechuic pUXPEaLT_tphA2A3BA1_tpaK.

Ví dụ tham khảo 3. Tạo cấu trúc plasmit tạo ra TPA-DHD

Với pUXPEaLT_tphA2A3BA1_tpaK (100 ng) được tạo cấu trúc ở Ví dụ tham khảo 2(4) làm mẫu, và sử dụng 2 loại đoạn môi ADN (SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 33), vùng gen tphA2-gen tphA3 được khuếch đại bằng phản ứng PCR. Hơn nữa, bằng cách sử dụng 2 loại đoạn môi ADN (SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 34), vùng gen tphA1 được khuếch đại bằng phản ứng PCR. Các mảnh ADN đã khuếch đại này được thu hồi bằng cách sử dụng kit tinh chế dùng cho phản ứng PCR. Sau đó, với mảnh đã khuếch đại của vùng gen tphA2-gen tphA3 và mảnh đã khuếch đại gen gen tphA1, mà đều được thu hồi, làm mẫu, và bằng cách sử dụng 2 loại đoạn môi ADN (SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29), vùng gen tphA2-tphA3-tphA1 được khuếch đại bằng phản ứng PCR. Mảnh ADN đã khuếch đại được thu hồi bằng cách sử dụng kit tinh chế dùng cho phản ứng PCR. Mảnh đã khuếch đại bị phân hủy bằng enzym giới hạn PacI và enzym giới hạn HindIII, và sau đó được kết hợp giữa vị trí PacI và vị trí HindIII của vector biểu hiện pUXPEaLT_tphA2A3BA1 được tạo ra ở Ví dụ tham khảo 2(3), nhờ đó tạo cấu trúc pUXPEaLT_tphA2A3A1_tpaK.

Ví dụ tham khảo 4. Tạo cấu trúc plasmit tạo ra axit galic

Với mục đích chuyển hóa một cách hiệu quả axit protocatechuic thành axit galic, plasmit biểu hiện gen para-hydroxybenzoat hydroxylaza cùng với cụm gen tạo ra axit protocatechuic được tạo cấu trúc như sau:

Cụ thể, với ADN (SEQ ID NO: 11) mã hoá para-hydroxybenzoat hydroxylaza (SEQ ID NO: 12) được bộc lộ trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm số 2009-213392 làm mẫu, và bằng cách sử dụng 2 loại đoạn môi ADN (SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36), ADN mã hoá protein para-hydroxy benzoat hydroxylaza được khuếch đại bằng phản ứng PCR. Mảnh ADN đã khuếch đại được thu hồi bằng cách sử dụng kit tinh chế dùng cho phản ứng PCR. AND này bị phân hủy bằng enzym giới hạn PacI và enzym giới hạn SgfI, và sau đó được kết hợp vào vị trí PacI của pUXPEaLT_tphA2A3BA1_tpaK tạo ra trên đây, nhờ đó tạo cấu trúc plasmit tạo ra axit galic pUXPEaLT_HFM145_tphA2A3BA1_tpaK.

Ví dụ tham khảo 5. Tạo vi khuẩn phân hủy etylen glycol

(1) Tách dòng gen fucO của *Escherichia coli* dòng K-12

Trình tự nucleotit của gen fucO mã hoá protein lactaldehyt reductaza thu được từ *Escherichia coli* dòng K-12 MG1655 thu được dưới dạng trình tự các vị trí từ 13420

đến 14571 của trình tự nucleotit (Mã lưu giữ GB là U29581) thu được từ NCBI thông qua Internet. Bằng cách sử dụng 2 loại đoạn mồi ADN (SEQ ID NO: 37 và SEQ ID NO: 38) được tổng hợp tính theo trình tự này, với ADN nhiễm sắc thể (100 ng) của *Escherichia coli* dòng K-12 MG1655 thu được từ NBRP làm mẫu, toàn bộ vùng gen fucO được khuếch đại bằng phản ứng PCR. Mẫu ADN đã khuếch đại này được cắt ra khỏi sản phẩm của phản ứng PCR bằng enzym giới hạn PacI và enzym giới hạn NotI và được kết hợp vào vectơ biểu hiện pUXPEaLT19 được tạo ra ở Ví dụ tham khảo 1, nhờ đó tạo ra plasmit pUXPEaLT_fucO_I7L.

(2) Tách dòng gen aldA của *Escherichia coli* dòng K-12

Trình tự nucleotit của gen aldA mã hoá protein lactaldehyt dehydrogenaza thu được từ *Escherichia coli* dòng K-12 MG1655 thu được dưới dạng trình tự các vị trí từ 1486256 đến 1487695 của trình tự nucleotit (mã lưu giữ GB là U00096.2) thu được từ NCBI thông qua Internet. Bằng cách sử dụng 2 loại đoạn mồi ADN (SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 40) được tổng hợp tính theo trình tự này, với ADN nhiễm sắc thể (100 ng) của *Escherichia coli* dòng K-12 MG1655 thu được từ NBRP làm mẫu, toàn bộ vùng gen aldA được khuếch đại bằng phản ứng PCR. Mẫu ADN đã khuếch đại này được cắt ra khỏi sản phẩm của phản ứng PCR bằng enzym giới hạn SmaI và enzym giới hạn NotI và được kết hợp vào plasmit pUXPEaLT_fucO_I7L, nhờ đó tạo ra plasmit pUXPEaLT_fucO_I7L_aldA.

Mẫu được cắt khỏi ADN tổng hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41 bằng enzym giới hạn NotI và enzym giới hạn AscII và được kết hợp giữa vị trí NotI và vị trí AscI của plasmit pUEPEaLT_fucO_I7L_aldA, nhờ đó tạo ra plasmit pUXPEaLTeK_fucO_I7L_aldA.

Sau đó, bằng cách sử dụng 2 loại đoạn mồi ADN (SEQ ID NO: 42 và SEQ ID NO: 43), đơn vị biểu hiện chứa gen fucO và gen aldA (dưới đây được viết tắt là đơn vị biểu hiện fucO-aldA) được khuếch đại từ plasmit pUXPEaLTeX_fucO_I7L_aldA bằng phản ứng PCR. Mẫu được cắt ra khỏi sản phẩm của phản ứng PCR bằng enzym giới hạn AscI và được kết hợp vào vectơ biểu hiện pUXPEaLT_tphA2A3A1_tpaK tạo ra trên đây (ví dụ tham khảo 3), nhờ đó tạo cấu trúc plasmit pUXPEaLT_tpaA_tpaK_PmfucO_I7L_aldA.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế đã đề xuất phương pháp điều chế terephtalat 1,2-cis-dihydrodiol sử dụng kali terephtalat làm nguyên liệu bằng cách sử dụng vi sinh vật biểu hiện terephtalat 1,2-dioxygenaza, phương pháp chuyển hoá TPA-DHD thành các axit phenol như axit protocatechuic hoặc axit galic, và phương pháp thu được kali terephtalat để làm nguyên liệu bằng cách khử trùng hợp các polyeste thải.

Mô tả danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1: ADN mã hoá protein nhóm con lớn terephtalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza

SEQ ID NO: 2: Protein nhóm con lớn terephtalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza

SEQ ID NO: 3: ADN mã hoá protein nhóm con nhỏ terephtalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza

SEQ ID NO: 4: Protein nhóm con nhỏ terephtalat 1,2-dioxygenaza oxygenaza

SEQ ID NO: 5: ADN mã hoá protein terephtalat 1,2-dioxygenaza reductaza

SEQ ID NO: 6: Protein terephtalat 1,2-dioxygenaza reductaza

SEQ ID NO: 7: ADN mã hoá protein vận chuyển axit terephtalic

SEQ ID NO: 8: Protein vận chuyển axit terephtalic

SEQ ID NO: 9: ADN mã hoá protein dehydrogenaza TPA-DHD

SEQ ID NO: 10: Protein dehydrogenaza TPA-DHD

SEQ ID NO: 11: ADN mã hoá protein para-hydroxybenzoat hydroxylaza

SEQ ID NO: 12: Protein para-hydroxybenzoat hydroxylaza

SEQ ID NO: 13: ADN tổng hợp dùng để tạo cấu trúc nhân tổ kết thúc

SEQ ID NO: 14: ADN tổng hợp dùng để tạo cấu trúc nhân tổ kết thúc

SEQ ID NO: 15: ADN tổng hợp dùng để tạo cấu trúc nhân tổ kết thúc

SEQ ID NO: 16: ADN tổng hợp dùng để tạo cấu trúc nhân tổ kết thúc

SEQ ID NO: 17: ADN tổng hợp dùng để tạo cấu trúc nhân tổ kết thúc

SEQ ID NO: 18: ADN tổng hợp dùng để tạo cấu trúc nhân tổ kết thúc

SEQ ID NO: 19: Tổng hợp để tạo cấu trúc gen khởi đầu ADN T7 và gen giả

SEQ ID NO: 20: Tổng hợp để tạo cấu trúc gen khởi đầu ADN T7 và gen giả

SEQ ID NO: 21: Tổng hợp để tạo cấu trúc gen khởi đầu ADN T7 và gen giả

SEQ ID NO: 22: Tổng hợp để tạo cấu trúc gen khởi đầu ADN T7 và gen giả

SEQ ID NO: 23: Tổng hợp để tạo cấu trúc gen khởi đầu ADN T7 và gen giả

SEQ ID NO: 24: Tổng hợp để tạo cấu trúc gen khởi đầu ADN T7 và gen giả

SEQ ID NO: 25: Trình tự giữa enzym giới hạn vị trí BglII và enzym giới hạn vị trí PacI của plasmit pUTPELT19

SEQ ID NO: 26: Đoạn môi phản ứng PCR để thu được ADN của gen khởi đầu vùng XylS-Pm

SEQ ID NO: 27: Đoạn môi phản ứng PCR để thu được ADN của gen khởi đầu vùng XylS-Pm

SEQ ID NO: 28: Đoạn môi phản ứng PCR thoái hóa để tách dòng cụm gen trao đổi chất axit terephthalic của *Comamonas testosteroni*

SEQ ID NO: 29: Đoạn môi phản ứng PCR thoái hóa để tách dòng cụm gen trao đổi chất axit terephthalic của *Comamonas testosteroni*

SEQ ID NO: 30: ADN mã hoá cụm gen trao đổi chất axit terephthalic của *Comamonas testosteroni* dòng 72W2

SEQ ID NO: 31: Đoạn môi phản ứng PCR để tách dòng tác nhân vận chuyển axit terephthalic

SEQ ID NO: 32: Đoạn môi phản ứng PCR để tách dòng tác nhân vận chuyển axit terephthalic

SEQ ID NO: 33: Đoạn mồi phản ứng PCR để tách dòng vùng gen tphA2-gen tphA3

SEQ ID NO: 34: Đoạn mồi phản ứng PCR để tách dòng vùng gen tphA1

SEQ ID NO: 35: Đoạn mồi phản ứng PCR để tách dòng para-hydroxybenzoat hydroxylaza đã cải tiến

SEQ ID NO: 36: Đoạn mồi phản ứng PCR để tách dòng para-hydroxybenzoat hydroxylaza đã cải tiến

SEQ ID NO: 37: Đoạn mồi phản ứng PCR để tách dòng *Escherichia coli* lactaldehyt reductaza

SEQ ID NO: 38: Đoạn mồi phản ứng PCR để tách dòng *Escherichia coli* lactaldehyt reductaza

SEQ ID NO: 39: Đoạn mồi phản ứng PCR để tách dòng *Escherichia coli* lactaldehyt dehydrogenaza

SEQ ID NO: 40: Đoạn mồi phản ứng PCR để tách dòng *Escherichia coli* lactaldehyt dehydrogenaza

SEQ ID NO: 41: Trình tự giữa vị trí NotI và vị trí AscI của plasmit pUXPEaLTEK_fucO_I7L_aldA

SEQ ID NO: 42: Đoạn mồi phản ứng PCR để tách dòng đơn vị biểu hiện chứa gen fucO và gen aldA

SEQ ID NO: 43: Đoạn mồi phản ứng PCR để tách dòng đơn vị biểu hiện chứa gen fucO và gen aldA

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol bao gồm bước cho vi sinh vật hoặc sản phẩm giống nuôi cấy đã được xử lý của nó phản ứng với axit terephthalic trong môi trường nước chứa muối của axit terephthalic để tạo ra terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol, trong đó muối của axit terephthalic chứa 0,5 lần đến 2 lần lượng mol kali tính theo tổng số mol của axit terephthalic chứa trong muối của axit terephthalic; và trong đó vi sinh vật có ADN được nêu ở các mục (a), (b), (c), hoặc (d) dưới đây; ADN được nêu ở các mục (e), (f), (g); hoặc (h) dưới đây, và ADN được nêu ở các mục (i), (j), (k), hoặc (l) dưới đây; và có thể tạo ra terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol từ axit terephthalic;

(a) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

(b) ADN chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol;

(c) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1;

(d) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol;

(e) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4;

(f) ADN chứa trình tự axit amin giống như nêu trong SEQ ID NO: 4 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol;

(g) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3;

(h) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic

thành terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol;

(i) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6;

(j) ADN chứa trình tự axit amin giống như nêu trong SEQ ID NO: 6 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol;

(k) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5;

(l) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có chức năng liên quan đến việc chuyển hoá từ axit terephthalic thành terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol.

2. Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo điểm 1, trong đó môi trường nước chứa muối của axit terephthalic là dung dịch nước chứa một hoặc nhiều kali terephthalat được chọn từ nhóm bao gồm dikali terephthalat, 1-kali 4-natri terephthalat, và 1-kali 4-amoni terephthalat.

3. Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo điểm 1 hoặc 2, trong đó muối của axit terephthalic được bổ sung dưới dạng dung dịch nước, dạng bột hoặc dạng hỗn dịch, vào vi sinh vật hoặc sản phẩm giống nuôi cấy đã được xử lý của nó để vi sinh vật hoặc sản phẩm đã được xử lý này phản ứng với axit terephthalic.

4. Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vi sinh vật nêu trong điểm 1 còn có khả năng vận chuyển nội bào axit terephthalic được tăng cường bằng cách đưa vào ADN được nêu ở các mục (m), (n), (o), hoặc (p) dưới đây:

(m) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8;

(j) ADN chứa trình tự axit amin giống như nêu trong SEQ ID NO: 8 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có hoạt tính vận chuyển axit terephthalic;

(o) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7;

(p) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có hoạt tính vận chuyển axit terephthalic.

5. Phương pháp điều chế axit protocatechuic bao gồm bước tạo ra terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol từ muối của axit terephthalic bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và sau đó chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit protocatechuic, trong đó vi sinh vật còn có ADN nêu ở mục (q), (r), (s), hoặc (t) dưới đây và có thể tạo ra axit protocatechuic từ axit terephthalic:

(q) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10;

(r) ADN chứa trình tự axit amin giống như nêu trong SEQ ID NO: 10 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có hoạt tính chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit protocatechuic;

(s) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9;

(t) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có hoạt tính chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit protocatechuic.

6. Phương pháp điều chế axit protocatechuic bao gồm bước tạo ra terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol từ muối của axit terephthalic bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, và sau đó chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit protocatechuic bằng cách sử dụng vi sinh vật thu được bằng cách đưa vào ADN được thể hiện ở các mục (q), (r), (s), hoặc (t) bằng cách biến nạp, hoặc sản phẩm giống nuôi cấy đã được xử lý của nó.

7. Phương pháp điều chế axit galic bao gồm bước tạo ra terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol từ muối của axit terephthalic bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và sau đó chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit galic, trong đó vi sinh vật còn có ADN nêu ở mục (q), (r), (s), hoặc (t) dưới đây, ADN nêu ở mục (u), (v), (w), hoặc (x) dưới đây và có thể tạo ra axit galic từ axit terephthalic:

(q) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10;

(r) ADN chứa trình tự axit amin giống như nêu trong SEQ ID NO: 10 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có hoạt tính chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit protocatechuic;

(s) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9;

(t) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 9 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có hoạt tính chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit protocatechuic;

(u) ADN mã hoá protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12;

(v) ADN chứa trình tự axit amin giống như nêu trong SEQ ID NO: 12 trừ một hoặc một vài axit amin được làm mất đoạn, thế đoạn, và/hoặc thêm đoạn; và mã hoá protein có hoạt tính chuyển hoá axit protocatechuic thành axit galic;

(w) ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 11;

(x) ADN mà có thể lai với ADN chứa trình tự bổ trợ với toàn bộ hoặc một phần trình tự của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 11 dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và mã hoá protein có hoạt tính chuyển hoá axit protocatechuic thành axit galic.

8. Phương pháp điều chế axit galic bao gồm bước tạo ra terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol từ muối của axit terephthalic bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, và sau đó chuyển hoá terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol thành axit galic bằng cách sử dụng vi sinh vật thu được bằng cách đưa vào ADN nêu ở mục (u), (v), (w), hoặc (x), ngoài ADN nêu ở mục (q), (r), (s), hoặc (t) bằng cách biến nạp, hoặc sản phẩm giống nuôi cấy đã được xử lý của nó.

9. Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu được muối của axit terephthalic theo các bước từ (A) đến (D) dưới đây:

(A) gia nhiệt vật liệu thải bằng polyeste chứa polyetylen terephthalat,

polytrimetylen terephtalat, hoặc polybutylen terephtalat như thành phần chính và chứa tạp chất trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa kali hydroxit hoặc trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa cả kali hydroxit và natri hydroxit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 196°C trong 10 phút hoặc lâu hơn để nhờ đó làm bay hơi nước trong dung dịch phản ứng và đồng thời khử trùng hợp polyetylen terephtalat, polytrimetylen terephtalat, hoặc polybutylen terephtalat chứa trong vật liệu thải;

(B) loại bỏ tạp chất rắn nổi ra khỏi dung dịch phản ứng khử trùng hợp vật liệu thải thu được ở bước (A) bằng phương pháp tuyển nổi các tạp chất rắn chứa trong dung dịch này;

(C) thu gom các chất rắn không phải tạp chất nổi từ dung dịch đã xử lý ở bước (B) bằng phương pháp tách rắn-lỏng;

(D) xử lý các chất rắn thu gom được ở bước (C) bằng cách sấy nhiệt, sấy dưới áp suất giảm, hoặc ly tâm để nhờ đó làm giảm hàm lượng glycol trong các chất rắn này và thu được chất rắn còn lại là muối của axit terephtalic.

10. Phương pháp điều chế terephtalat 1,2-cis-dihydrodiol theo điểm 9, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc thu gom dung môi phản ứng etylen glycol sau khi thu gom các chất rắn bằng phương pháp tách rắn-lỏng ở bước (C), và sử dụng dung môi này làm dung môi phản ứng etylen glycol ở bước (A).

11. Phương pháp điều chế axit protocatechuic theo điểm 5 hoặc 6, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu được muối của axit terephtalic theo các bước từ (A) đến (D) dưới đây:

(A) gia nhiệt vật liệu thải bằng polyeste chứa polyetylen terephtalat, polytrimetylen terephtalat, hoặc polybutylen terephtalat như thành phần chính và chứa tạp chất trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa kali hydroxit hoặc trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa cả kali hydroxit và natri hydroxit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 196°C trong 10 phút hoặc lâu hơn để nhờ đó làm bay hơi nước trong dung dịch phản ứng và đồng thời khử trùng hợp polyetylen terephtalat, polytrimetylen terephtalat, hoặc polybutylen terephtalat chứa trong vật liệu thải;

(B) loại bỏ tạp chất rắn nổi ra khỏi dung dịch phản ứng khử trùng hợp vật liệu thải thu được ở bước (A) bằng phương pháp tuyển nổi các tạp chất rắn chứa trong

dung dịch này;

(C) thu gom các chất rắn không phải tạp chất nổi từ dung dịch đã xử lý ở bước (B) bằng phương pháp tách rắn-lỏng;

(D) xử lý các chất rắn thu gom được ở bước (C) bằng cách sấy nhiệt, sấy dưới áp suất giảm, hoặc ly tâm để nhờ đó làm giảm hàm lượng glycol trong các chất rắn này và thu được chất rắn còn lại là muối của axit terephthalic.

12. Phương pháp điều chế axit protocatechuic theo điểm 11, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc thu gom dung môi phản ứng etylen glycol sau khi thu gom các chất rắn bằng phương pháp tách rắn-lỏng ở bước (C); sử dụng dung môi này làm dung môi phản ứng etylen glycol ở bước (A); và nhờ đó sử dụng muối của axit terephthalic thu được bằng cách sử dụng lại, mà không bỏ đi, dung môi phản ứng etylen glycol.

13. Phương pháp điều chế axit galic theo điểm 7 hoặc 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu được muối của axit terephthalic theo các bước từ (A) đến (D) dưới đây:

(A) gia nhiệt vật liệu thải bằng polyeste chứa polyetylen terephthalat, polytrimetylen terephthalat, hoặc polybutylen terephthalat như thành phần chính và chứa tạp chất trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa kali hydroxit hoặc trong dung môi phản ứng etylen glycol chứa cả kali hydroxit và natri hydroxit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C và 196°C trong 10 phút hoặc lâu hơn để nhờ đó làm bay hơi nước trong dung dịch phản ứng và đồng thời khử trùng hợp polyetylen terephthalat, polytrimetylen terephthalat, hoặc polybutylen terephthalat chứa trong vật liệu thải;

(B) loại bỏ tạp chất rắn nổi ra khỏi dung dịch phản ứng khử trùng hợp vật liệu thải thu được ở bước (A) bằng phương pháp tuyển nổi các tạp chất rắn chứa trong dung dịch;

(C) thu gom các chất rắn không phải tạp chất nổi từ dung dịch đã xử lý ở bước (B) bằng phương pháp tách rắn-lỏng;

(D) xử lý các chất rắn thu gom được ở bước (C) bằng cách sấy nhiệt, sấy dưới áp suất giảm, hoặc ly tâm để nhờ đó làm giảm hàm lượng glycol trong các chất rắn này và thu được chất rắn còn lại là muối của axit terephthalic.

14. Phương pháp điều chế axit galic theo điểm 13, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc thu gom dung môi phản ứng etylen glycol sau khi thu gom các chất rắn bằng phương pháp tách rắn-lỏng ở bước (C); sử dụng dung môi này làm dung môi phản ứng etylen glycol ở bước (A); và nhờ đó sử dụng muối của axit terephthalic thu được bằng cách sử dụng lại, mà không bỏ đi, dung môi phản ứng etylen glycol.

15. Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo điểm 9 hoặc 10, trong đó vi sinh vật theo điểm 1 hoặc 4 có thể phân huỷ etylen glycol chứa trong muối của axit terephthalic thu được từ các bước từ (A) đến (D) bằng cách tăng cường lượng biểu hiện của lactaldehyt reductaza và lactaldehyt dehydrogenaza.

16. Phương pháp điều chế axit protocatechuic theo điểm 11 hoặc 12, trong đó vi sinh vật theo điểm 5 có thể phân huỷ etylen glycol chứa trong muối của axit terephthalic thu được từ các bước từ (A) đến (D) bằng cách tăng cường lượng biểu hiện của lactaldehyt reductaza và lactaldehyt dehydrogenaza.

17. Phương pháp điều chế axit galic theo điểm 13 hoặc 14, trong đó vi sinh vật theo điểm 7 có thể phân huỷ etylen glycol chứa trong muối của axit terephthalic thu được từ các bước từ (A) đến (D) bằng cách tăng cường lượng biểu hiện của lactaldehyt reductaza và lactaldehyt dehydrogenaza.

18. Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu được muối của axit terephthalic theo các bước từ (E) đến (H) dưới đây:

(E) gia nhiệt vật liệu thải bằng polyeste chứa polyetylen terephthalat, polytrimetylen terephthalat, hoặc polybutylen terephthalat như thành phần chính và chứa tạp chất trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa kali hydroxit hoặc trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa cả kali hydroxit và natri hydroxit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 116°C trong 10 phút hoặc lâu hơn để nhờ đó làm bay hơi nước trong dung dịch phản ứng và đồng thời khử trùng hợp polytrimetylen terephthalat hoặc polybutylen terephthalat chứa trong vật liệu thải;

(F) loại bỏ tạp chất rắn nổi ra khỏi dung dịch phản ứng khử trùng hợp vật liệu thải thu được ở bước (E) bằng phương pháp tuyển nổi các tạp chất rắn chứa trong dung dịch;

(G) thu gom các chất rắn không phải tạp chất nổi từ dung dịch đã xử lý ở bước (F) bằng phương pháp tách rắn-lỏng;

(H) cho các chất rắn thu gom được ở bước (G) xử lý sấy nhiệt, xử lý sấy dưới áp suất giảm, hoặc xử lý ly tâm để nhờ đó làm giảm hàm lượng 1-butanol và các glycol trong các chất rắn và thu được chất rắn còn lại là muối của axit terephthalic.

19. Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol theo điểm 18, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc thu gom dung môi phản ứng 1-butanol sau khi thu gom các chất rắn bằng phương pháp tách rắn-lỏng ở bước (G); sử dụng dung môi này làm dung môi phản ứng 1-butanol ở bước (E); và nhờ đó sử dụng muối của axit terephthalic thu được bằng cách sử dụng lại, mà không bỏ đi, dung môi phản ứng etylen glycol.

20. Phương pháp điều chế axit protocatechuic theo điểm 5 hoặc 6, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu được muối của axit terephthalic theo các bước từ (E) đến (H) dưới đây:

(E) gia nhiệt vật liệu thải bằng polyeste chứa polyetylen terephthalat, polytrimetylen terephthalat, hoặc polybutylen terephthalat như thành phần chính và chứa tạp chất trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa kali hydroxit hoặc trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa cả kali hydroxit và natri hydroxit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 116°C trong 10 phút hoặc lâu hơn để nhờ đó làm bay hơi nước trong dung dịch phản ứng và đồng thời khử trùng hợp polytrimetylen terephthalat hoặc polybutylen terephthalat chứa trong vật liệu thải;

(F) loại bỏ tạp chất rắn nổi ra khỏi dung dịch phản ứng khử trùng hợp vật liệu thải thu được ở bước (E) bằng phương pháp tuyển nổi các tạp chất rắn chứa trong dung dịch;

(G) thu gom các chất rắn không phải tạp chất nổi từ dung dịch đã xử lý ở bước (F) bằng phương pháp tách rắn-lỏng;

(H) cho các chất rắn thu gom được ở bước (G) xử lý sấy nhiệt, xử lý sấy dưới áp suất giảm, hoặc xử lý ly tâm để nhờ đó làm giảm hàm lượng 1-butanol và các glycol trong các chất rắn và thu được chất rắn còn lại là muối của axit terephthalic.

21. Phương pháp điều chế axit protocatechuic theo điểm 20, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc thu gom dung môi phản ứng 1- butanol sau khi thu gom các chất rắn bằng phương pháp tách rắn-lỏng ở bước (G); sử dụng dung môi này làm dung môi phản ứng 1-butanol ở bước (E); và nhờ đó sử dụng muối của axit terephthalic thu được bằng cách sử dụng lại, mà không bỏ đi, dung môi phản ứng etylen glycol.

22. Phương pháp điều chế axit galic theo điểm 7 hoặc 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu được muối của axit terephthalic theo các bước từ (E) đến (H) dưới đây:

(E) gia nhiệt vật liệu thải bằng polyeste chứa polyetylen terephthalat, polytrimetylen terephthalat, hoặc polybutylen terephthalat như thành phần chính và chứa tạp chất trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa kali hydroxit hoặc trong dung môi phản ứng 1-butanol chứa cả kali hydroxit và natri hydroxit ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 116°C trong 10 phút hoặc lâu hơn để nhờ đó làm bay hơi nước trong dung dịch phản ứng và đồng thời khử trùng hợp polytrimetylen terephthalat hoặc polybutylen terephthalat chứa trong vật liệu thải;

(F) loại bỏ tạp chất rắn nổi ra khỏi dung dịch phản ứng khử trùng hợp vật liệu thải thu được ở bước (E) bằng phương pháp tuyển nổi các tạp chất rắn chứa trong dung dịch;

(G) thu gom các chất rắn không phải tạp chất nổi từ dung dịch đã xử lý ở bước (F) bằng phương pháp tách rắn-lỏng;

(H) cho các chất rắn thu gom được ở bước (G) xử lý sấy nhiệt, xử lý sấy dưới áp suất giảm, hoặc xử lý ly tâm để nhờ đó làm giảm hàm lượng 1-butanol và các glycol trong các chất rắn và thu được chất rắn còn lại là muối của axit terephthalic.

23. Phương pháp điều chế axit galic theo điểm 22, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc thu gom dung môi phản ứng 1- butanol sau khi thu gom các chất rắn bằng phương pháp tách rắn-lỏng ở bước (G); sử dụng dung môi này làm dung môi phản ứng 1-butanol ở bước (E); và nhờ đó sử dụng muối của axit terephthalic thu được bằng cách sử dụng lại, mà không bỏ đi, dung môi phản ứng etylen glycol.

24. Phương pháp điều chế theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23, trong đó vi sinh vật là *Escherichia coli*.

Fig.1

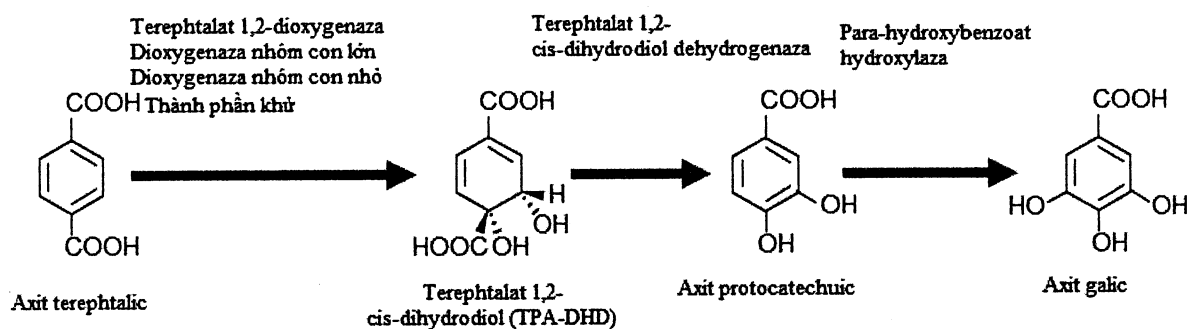


Fig.2

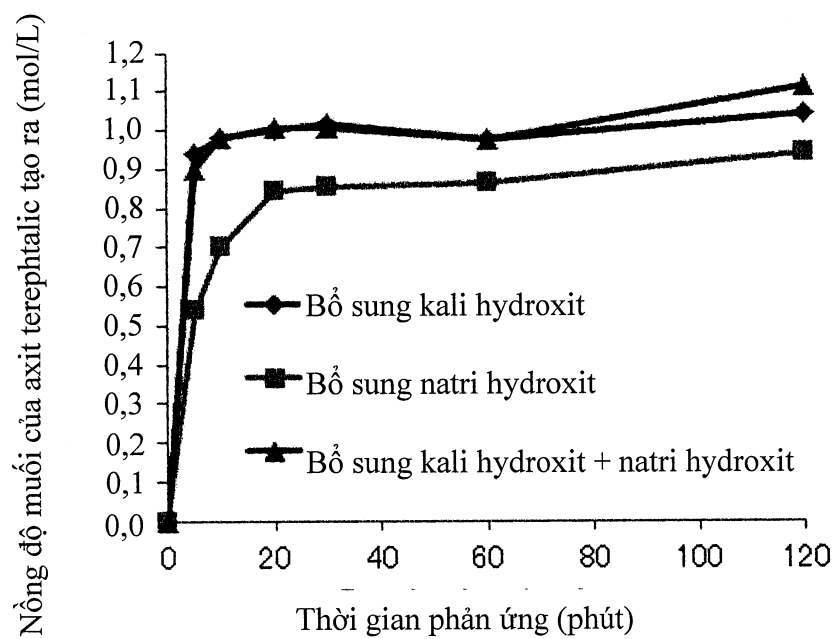
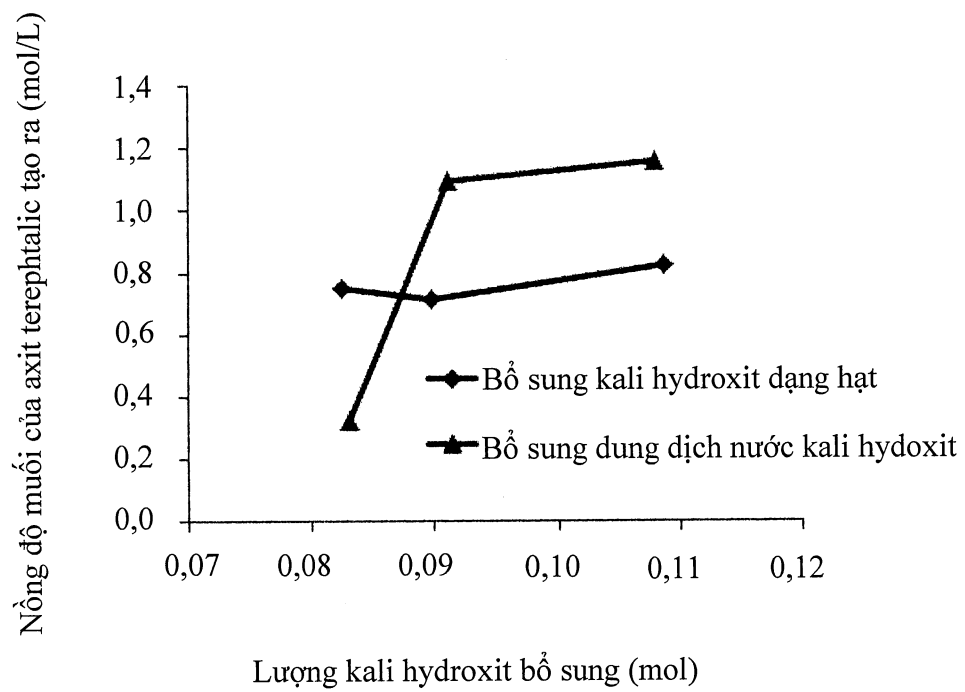


Fig.3



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> KAO CORPORATION

<120> Phương pháp điều chế terephthalat 1,2-cis-dihydrodiol, axit protocatechuic và axit galic từ muối kali của axit terephthalic

<130> GP1102-11321

<160> 43

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1242

<212> ADN

<213> Comamonas testosteroni

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1242)

<400> 1

atg caa gaa tcc att atc cag tgg cat ggg gcc act aat aca cgc gtg	48
Met Gln Glu Ser Ile Ile Gln Trp His Gly Ala Thr Asn Thr Arg Val	
1 5 10 15	
cct ttc ggt atc tac act gac aca gcc aat gct gat caa gaa cag cag	96
Pro Phe Gly Ile Tyr Thr Asp Thr Ala Asn Ala Asp Gln Glu Gln Gln	
20 25 30	
cgc atc tat cgc ggc gag gtc tgg aac tac ctg tgc ctg gaa tct gaa	144
Arg Ile Tyr Arg Gly Glu Val Trp Asn Tyr Leu Cys Leu Glu Ser Glu	
35 40 45	
atc ccc gag gct ggt gat ttc cgt act acc ttt gcc ggt gaa aca ccg	192
Ile Pro Glu Ala Gly Asp Phe Arg Thr Thr Phe Ala Gly Glu Thr Pro	
50 55 60	
ata gtt gtc gta cgg gat gcc gac cag gaa atc tac gcc ttc gag aac	240
Ile Val Val Val Arg Asp Ala Asp Gln Glu Ile Tyr Ala Phe Glu Asn	
65 70 75 80	
cgc tgc gcg cat cgc ggc gct ctc atc gct ctg gag aaa tcg gga cgt	288
Arg Cys Ala His Arg Gly Ala Leu Ile Ala Leu Glu Lys Ser Gly Arg	
85 90 95	
acg gat agt ttc cag tgc gtc tat cac gcc tgg agc tac aac cga cag	336
Thr Asp Ser Phe Gln Cys Val Tyr His Ala Trp Ser Tyr Asn Arg Gln	
100 105 110	
gga gat ctg acc ggc gtt gcc ttc gag aaa ggt gtc aag ggc cag ggt	384
Gly Asp Leu Thr Gly Val Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Gly Gln Gly	
115 120 125	
ggc atg ccg gcc tca ttc tgc aaa gaa gag cat ggc ccg cgc aag ctc	432
Gly Met Pro Ala Ser Phe Cys Lys Glu Glu His Gly Pro Arg Lys Leu	
130 135 140	
cgc gtg gct gtc ttt tgc ggt ttg gtc ttt ggc agt ttt tcc gag gac	480
Arg Val Ala Val Phe Cys Gly Leu Val Phe Gly Ser Phe Ser Glu Asp	
145 150 155 160	
gta ccc agc att gag gat tac ctt ggc cct gag att tgc gag cgc ata	528
Val Pro Ser Ile Glu Asp Tyr Leu Gly Pro Glu Ile Cys Glu Arg Ile	
165 170 175	
gag cgc gtg ctg cac aag ccc gta gaa gtc atc ggt cgc ttc acg caa	576
Glu Arg Val Leu His Lys Pro Val Glu Val Ile Gly Arg Phe Thr Gln	
180 185 190	
aag ctg cct aac aac tgg aag ctc tac ttc gag aac gtg aag gac agc	624
Lys Leu Pro Asn Asn Trp Lys Leu Tyr Phe Glu Asn Val Lys Asp Ser	
195 200 205	
tat cac gcc agc ctc ctg cat atg ttc ttc acc acc ttc gag ctg aat	672

```

Tyr His Ala Ser Leu Leu His Met Phe Phe Thr Thr Phe Glu Leu Asn
  210                215                220
cgc ctc tca caa aaa ggc gga gtc atc gtc gac gag tcg ggt ggc cac      720
Arg Leu Ser Gln Lys Gly Gly Val Ile Val Asp Glu Ser Gly Gly His
  225                230                235                240
cat gtg agc tat tcc atg att gat cgt agc gcc aaa gac gac tcg tac      768
His Val Ser Tyr Ser Met Ile Asp Arg Ser Ala Lys Asp Asp Ser Tyr
                245                250                255
aag gac cag gcc atc cgc tcc gac aac gag cgt tac cgg ctc aaa gat      816
Lys Asp Gln Ala Ile Arg Ser Asp Asn Glu Arg Tyr Arg Leu Lys Asp
                260                265                270
ccc agc ctt cta gag ggc ttc gag gag ttc gag gac ggc gtg acc ctg      864
Pro Ser Leu Leu Glu Gly Phe Glu Glu Phe Glu Asp Gly Val Thr Leu
                275                280                285
cag atc ctt tct gtg ttc cct ggc ttt gtg ctg cag cag att cag aac      912
Gln Ile Leu Ser Val Phe Pro Gly Phe Val Leu Gln Gln Ile Gln Asn
                290                295                300
agc atc gcc gtg cgt cag ttg ttg ccc aag agc atc tcc agc tcg gaa      960
Ser Ile Ala Val Arg Gln Leu Leu Pro Lys Ser Ile Ser Ser Ser Glu
                305                310                315                320
ctc aac tgg acc tat ctt ggc tat gca gat gac agt gca gag cag cgc      1008
Leu Asn Trp Thr Tyr Leu Gly Tyr Ala Asp Asp Ser Ala Glu Gln Arg
                325                330                335
aag gtc aga ctc aaa cag gcc aac ctc atc ggc cct gca gga ttt att      1056
Lys Val Arg Leu Lys Gln Ala Asn Leu Ile Gly Pro Ala Gly Phe Ile
                340                345                350
tcc atg gag gac gga gct gtc ggt gga ttc gtg cag cgt ggc atc gca      1104
Ser Met Glu Asp Gly Ala Val Gly Gly Phe Val Gln Arg Gly Ile Ala
                355                360                365
ggc gct gcc aac ctt gat gcg gtc atc gag atg ggc gga gac cac gaa      1152
Gly Ala Ala Asn Leu Asp Ala Val Ile Glu Met Gly Gly Asp His Glu
                370                375                380
ggc tct agc gag ggc cgc gcc aca gaa acc tcg gta cgc ggc ttt tgg      1200
Gly Ser Ser Glu Gly Arg Ala Thr Glu Thr Ser Val Arg Gly Phe Trp
                385                390                395                400
aag gcc tac cgc aag cat atg gga cag gag atg caa gca tga      1242
Lys Ala Tyr Arg Lys His Met Gly Gln Glu Met Gln Ala
                405                410

```

```

<210> 2
<211> 413
<212> PRT
<213> Comamonas testosteroni

```

```

<400> 2
Met Gln Glu Ser Ile Ile Gln Trp His Gly Ala Thr Asn Thr Arg Val
  1                5                10                15
Pro Phe Gly Ile Tyr Thr Asp Thr Ala Asn Ala Asp Gln Glu Gln Gln
                20                25                30
Arg Ile Tyr Arg Gly Glu Val Trp Asn Tyr Leu Cys Leu Glu Ser Glu
                35                40                45
Ile Pro Glu Ala Gly Asp Phe Arg Thr Thr Phe Ala Gly Glu Thr Pro
                50                55                60
Ile Val Val Val Arg Asp Ala Asp Gln Glu Ile Tyr Ala Phe Glu Asn
                65                70                75                80
Arg Cys Ala His Arg Gly Ala Leu Ile Ala Leu Glu Lys Ser Gly Arg
                85                90                95
Thr Asp Ser Phe Gln Cys Val Tyr His Ala Trp Ser Tyr Asn Arg Gln
                100                105                110
Gly Asp Leu Thr Gly Val Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Gly Gln Gly
                115                120                125
Gly Met Pro Ala Ser Phe Cys Lys Glu Glu His Gly Pro Arg Lys Leu
                130                135                140
Arg Val Ala Val Phe Cys Gly Leu Val Phe Gly Ser Phe Ser Glu Asp

```

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

<210> 3
 <211> 465
 <212> ADN
 <213> Comamonas testosteroni

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(465)

<400> 3
 atg atc cat gaa att caa atc gcg gcc ttc aat gcc gct tac gcg aag 48
 Met Ile His Glu Ile Gln Ile Ala Ala Phe Asn Ala Ala Tyr Ala Lys
 1 5 10 15
 acc ata gac agt gac gtt atg gag caa tgg cca acc ttc ttc acg aag 96
 Thr Ile Asp Ser Asp Val Met Glu Gln Trp Pro Thr Phe Phe Thr Lys
 20 25 30
 gat tgc cat tat cgc gtc acc aat gtc gac aac cat gct gaa gga ctt 144
 Asp Cys His Tyr Arg Val Thr Asn Val Asp Asn His Ala Glu Gly Leu
 35 40 45
 gct gct ggc att gtc tgg gca gat tcg cag gac atg ctc acc gac cga 192
 Ala Ala Gly Ile Val Trp Ala Asp Ser Gln Asp Met Leu Thr Asp Arg
 50 55 60
 att tct gcg ctg cgc gaa gcc aat atc tac gag cgc cac cgc tat cgc 240
 Ile Ser Ala Leu Arg Glu Ala Asn Ile Tyr Glu Arg His Arg Tyr Arg
 65 70 75 80
 cat atc ctg ggt ctg cct tcg atc cag tca gcc gat gca aca cag gcc 288
 His Ile Leu Gly Leu Pro Ser Ile Gln Ser Ala Asp Ala Thr Gln Ala
 85 90 95
 agt gct tcc acg cca ttc ctg gtg ctg cgc atc atg cat acc ggg gaa 336

```

Ser Ala Ser Thr Pro Phe Leu Val Leu Arg Ile Met His Thr Gly Glu
      100      105      110
aca gag gtc ttt gcc agc ggt gag tac cac gac aaa ttc acc acg atc      384
Thr Glu Val Phe Ala Ser Gly Glu Tyr His Asp Lys Phe Thr Thr Ile
      115      120      125
gat gga aag tta cgt ctg caa gag cgc gtc gcg gtt tgc gac agc acg      432
Asp Gly Lys Leu Arg Leu Gln Glu Arg Val Ala Val Cys Asp Ser Thr
      130      135      140
gtg acg gac acg ctg atg tca ttg ccg cta tga      465
Val Thr Asp Thr Leu Met Ser Leu Pro Leu
145      150

```

<210> 4
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Comamonas testosteroni

```

<400> 4
Met Ile His Glu Ile Gln Ile Ala Ala Phe Asn Ala Ala Tyr Ala Lys
1      5      10      15
Thr Ile Asp Ser Asp Val Met Glu Gln Trp Pro Thr Phe Phe Thr Lys
      20      25      30
Asp Cys His Tyr Arg Val Thr Asn Val Asp Asn His Ala Glu Gly Leu
      35      40      45
Ala Ala Gly Ile Val Trp Ala Asp Ser Gln Asp Met Leu Thr Asp Arg
      50      55      60
Ile Ser Ala Leu Arg Glu Ala Asn Ile Tyr Glu Arg His Arg Tyr Arg
65      70      75      80
His Ile Leu Gly Leu Pro Ser Ile Gln Ser Ala Asp Ala Thr Gln Ala
      85      90      95
Ser Ala Ser Thr Pro Phe Leu Val Leu Arg Ile Met His Thr Gly Glu
      100      105      110
Thr Glu Val Phe Ala Ser Gly Glu Tyr His Asp Lys Phe Thr Thr Ile
      115      120      125
Asp Gly Lys Leu Arg Leu Gln Glu Arg Val Ala Val Cys Asp Ser Thr
      130      135      140
Val Thr Asp Thr Leu Met Ser Leu Pro Leu
145      150

```

<210> 5
 <211> 1011
 <212> ADN
 <213> Comamonas testosteroni

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1011)

```

<400> 5
atg aac cac cag atc cat atc cac gac tct gat atc gcg ttc ccc tgc      48
Met Asn His Gln Ile His Ile His Asp Ser Asp Ile Ala Phe Pro Cys
1      5      10      15
gcg cct ggg caa tcc gta ctg gat gca gcc ctg cag gcc ggc atc gag      96
Ala Pro Gly Gln Ser Val Leu Asp Ala Ala Leu Gln Ala Gly Ile Glu
      20      25      30
ctg ccc tat tcc tgc cgc aaa ggt agc tgt ggc aac tgt gcg agt acg      144
Leu Pro Tyr Ser Cys Arg Lys Gly Ser Cys Gly Asn Cys Ala Ser Thr
      35      40      45
ctg ctc gac gga aat att act tcc ttc aat ggc atg gcc gtg cgc agc      192
Leu Leu Asp Gly Asn Ile Thr Ser Phe Asn Gly Met Ala Val Arg Ser
      50      55      60
gaa ctc tgc acc tcg gag cag gta ttg ctg tgc ggc tgc acc gcc gcc      240
Glu Leu Cys Thr Ser Glu Gln Val Leu Leu Cys Gly Cys Thr Ala Ala

```

65	70	75	80	
agc gat ata cgt atc cag ccg agc tcc ttt cgc cgt ctc gac ccg gaa				288
Ser Asp Ile Arg Ile Gln Pro Ser Ser Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu				
	85	90	95	
gcc cgc aaa cgt ttt acg gcc aag gtg tac agc aat aca ctg gcg gca				336
Ala Arg Lys Arg Phe Thr Ala Lys Val Tyr Ser Asn Thr Leu Ala Ala				
	100	105	110	
ccc gat gtc tcg cta ctg cgc ctg cgc ctg cct gtg ggc aag cgc gcc				384
Pro Asp Val Ser Leu Leu Arg Leu Arg Leu Pro Val Gly Lys Arg Ala				
	115	120	125	
aaa ttt gaa gcc ggc caa tac ctg ctg att cac ctc gac ggc ggg gaa				432
Lys Phe Glu Ala Gly Gln Tyr Leu Leu Ile His Leu Asp Gly Gly Glu				
	130	135	140	
agc cgc agc tac tct atg gcc aac cca ccc cat gag agc gat ggc atc				480
Ser Arg Ser Tyr Ser Met Ala Asn Pro Pro His Glu Ser Asp Gly Ile				
	145	150	155	160
aca ttg cat atc agg cat gta ccg ggt ggt cgc ttc agc act atc gtt				528
Thr Leu His Ile Arg His Val Pro Gly Gly Arg Phe Ser Thr Ile Val				
	165	170	175	
cag cag ttg aag tct ggt gac aca ttg gat atc gaa ctg cca ttc ggc				576
Gln Gln Leu Lys Ser Gly Asp Thr Leu Asp Ile Glu Leu Pro Phe Gly				
	180	185	190	
agc atc gcg ttg aag cct gac gac agc aga ccc cta gtt tgc gtt gca				624
Ser Ile Ala Leu Lys Pro Asp Asp Ser Arg Pro Leu Val Cys Val Ala				
	195	200	205	
gga ggc acc gga ttt gca ccc atc aag tcc gtt ctg gat gac ctg gcc				672
Gly Gly Thr Gly Phe Ala Pro Ile Lys Ser Val Leu Asp Asp Leu Ala				
	210	215	220	
aaa cgc aag gta cag cgc gac atc acg ctg att tgg ggt gct cgc aac				720
Lys Arg Lys Val Gln Arg Asp Ile Thr Leu Ile Trp Gly Ala Arg Asn				
	225	230	235	240
ccc tct ggc ctg tat ctt cct agc gcc atc gac aag tgg cgc aaa gct				768
Pro Ser Gly Leu Tyr Leu Pro Ser Ala Ile Asp Lys Trp Arg Lys Ala				
	245	250	255	
tgg ccg cag ttt cgc tac att gca gcc atc act gac cta agc aac gtg				816
Trp Pro Gln Phe Arg Tyr Ile Ala Ala Ile Thr Asp Leu Ser Asn Val				
	260	265	270	
cct gcg gat gct cac gcc ggt cgg gtg gat gac gcg cta cgc atg cac				864
Pro Ala Asp Ala His Ala Gly Arg Val Asp Asp Ala Leu Arg Met His				
	275	280	285	
ttt gac aac cta cac gat cat gtt gtc cac tgc tgt ggc tca cca gcc				912
Phe Asp Asn Leu His Asp His Val Val His Cys Cys Gly Ser Pro Ala				
	290	295	300	
ctc gtt caa tct gtg cgc aca gca gcc tcc aat atg ggc ctg cta gca				960
Leu Val Gln Ser Val Arg Thr Ala Ala Ser Asn Met Gly Leu Leu Ala				
	305	310	315	320
caa gac ttt cat gcg gat gtg ttc gct aca gac ccg act ggc cac cac				1008
Gln Asp Phe His Ala Asp Val Phe Ala Thr Asp Pro Thr Gly His His				
	325	330	335	
taa				1011

<210> 6
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> Comamonas testosteroni

<400> 6
 Met Asn His Gln Ile His Ile His Asp Ser Asp Ile Ala Phe Pro Cys
 1 5 10 15
 Ala Pro Gly Gln Ser Val Leu Asp Ala Ala Leu Gln Ala Gly Ile Glu
 20 25 30
 Leu Pro Tyr Ser Cys Arg Lys Gly Ser Cys Gly Asn Cys Ala Ser Thr
 35 40 45

Leu Leu Asp Gly Asn Ile Thr Ser Phe Asn Gly Met Ala Val Arg Ser
 50 55 60
 Glu Leu Cys Thr Ser Glu Gln Val Leu Leu Cys Gly Cys Thr Ala Ala
 65 70 75 80
 Ser Asp Ile Arg Ile Gln Pro Ser Ser Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu
 85 90 95
 Ala Arg Lys Arg Phe Thr Ala Lys Val Tyr Ser Asn Thr Leu Ala Ala
 100 105 110
 Pro Asp Val Ser Leu Leu Arg Leu Arg Leu Pro Val Gly Lys Arg Ala
 115 120 125
 Lys Phe Glu Ala Gly Gln Tyr Leu Leu Ile His Leu Asp Gly Gly Glu
 130 135 140
 Ser Arg Ser Tyr Ser Met Ala Asn Pro Pro His Glu Ser Asp Gly Ile
 145 150 155 160
 Thr Leu His Ile Arg His Val Pro Gly Gly Arg Phe Ser Thr Ile Val
 165 170 175
 Gln Gln Leu Lys Ser Gly Asp Thr Leu Asp Ile Glu Leu Pro Phe Gly
 180 185 190
 Ser Ile Ala Leu Lys Pro Asp Asp Ser Arg Pro Leu Val Cys Val Ala
 195 200 205
 Gly Gly Thr Gly Phe Ala Pro Ile Lys Ser Val Leu Asp Asp Leu Ala
 210 215 220
 Lys Arg Lys Val Gln Arg Asp Ile Thr Leu Ile Trp Gly Ala Arg Asn
 225 230 235 240
 Pro Ser Gly Leu Tyr Leu Pro Ser Ala Ile Asp Lys Trp Arg Lys Ala
 245 250 255
 Trp Pro Gln Phe Arg Tyr Ile Ala Ala Ile Thr Asp Leu Ser Asn Val
 260 265 270
 Pro Ala Asp Ala His Ala Gly Arg Val Asp Asp Ala Leu Arg Met His
 275 280 285
 Phe Asp Asn Leu His Asp His Val Val His Cys Cys Gly Ser Pro Ala
 290 295 300
 Leu Val Gln Ser Val Arg Thr Ala Ala Ser Asn Met Gly Leu Leu Ala
 305 310 315 320
 Gln Asp Phe His Ala Asp Val Phe Ala Thr Asp Pro Thr Gly His His
 325 330 335

<210> 7
 <211> 1380
 <212> ADN
 <213> Rhodococcus jostii

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1380)

<400> 7
 atg tcc tta gca cca tcg cgc gtg aca ctg ccg gat ttc atc gat tcg 48
 Met Ser Leu Ala Pro Ser Arg Val Thr Leu Pro Asp Phe Ile Asp Ser
 1 5 10 15
 cgg cca gtg agt cga tac cag tac atc gtg atc gcc ctg tgt ggg gtg 96
 Arg Pro Val Ser Arg Tyr Gln Tyr Ile Val Ile Ala Leu Cys Gly Val
 20 25 30
 gtc atg ttc atc gac ggc ttc gac acc cag agc atc agc tac atg gcg 144
 Val Met Phe Ile Asp Gly Phe Asp Thr Gln Ser Ile Ser Tyr Met Ala
 35 40 45
 ccc cac atc gcc gag gag tgg ggc ctg tcg aaa cag gtg ctc ggg ccc 192
 Pro His Ile Ala Glu Glu Trp Gly Leu Ser Lys Gln Val Leu Gly Pro
 50 55 60
 atc ttc tcc gcc gct ctc gcc ggt ctc atg gtc ggc tat ctg gcg ctc 240
 Ile Phe Ser Ala Ala Leu Ala Gly Leu Met Val Gly Tyr Leu Ala Leu
 65 70 75 80
 tcg ccg ctg tcc gag cgg ttc ggc cac cgc cgg atg atc ctc acg agc 288

Ser	Pro	Leu	Ser	Glu	Arg	Phe	Gly	His	Arg	Arg	Met	Ile	Leu	Thr	Ser		
				85					90					95			
acg	gtc	atc	ttc	gcg	ctc	ggc	acg	ttg	gcg	gcg	gcc	tgg	tca	cag	aac		336
Thr	Val	Ile	Phe	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Ala	Ala	Ala	Trp	Ser	Gln	Asn		
			100					105					110				
gtc	acc	gaa	ctg	atg	gcg	ttg	cgc	ttc	atc	acc	gga	atg	ggg	ctc	ggt		384
Val	Thr	Glu	Leu	Met	Ala	Leu	Arg	Phe	Ile	Thr	Gly	Met	Gly	Leu	Gly		
		115						120					125				
gcc	gcc	gcg	ccg	agt	gcc	atc	gca	ctg	acg	ggc	gaa	ttc	agc	ccc	aag		432
Ala	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Ile	Ala	Leu	Thr	Gly	Glu	Phe	Ser	Pro	Lys		
		130						135					140				
cgt	ctt	cga	gca	acc	ttc	gtc	ctg	gtg	atc	tat	tgc	ggc	ttc	tcc	ctc		480
Arg	Leu	Arg	Ala	Thr	Phe	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	Cys	Gly	Phe	Ser	Leu		
145					150					155					160		
gga	ttc	gtc	gcg	gca	ggg	ctg	gtc	tcc	ggt	tgg	ctg	atc	ccg	atc	ctc		528
Gly	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Leu	Ile	Pro	Ile	Leu		
			165						170						175		
ggc	tgg	cgg	tcg	gta	ctc	gtc	gtc	ggc	gca	gta	gca	ccg	ctg	ctc	ctg		576
Gly	Trp	Arg	Ser	Val	Leu	Val	Val	Gly	Ala	Val	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu		
			180						185						190		
ctc	ccg	gcg	ttg	ctg	cgc	tac	ctg	ccg	gac	tca	ctc	acc	tca	atg	atc		624
Leu	Pro	Ala	Leu	Leu	Arg	Tyr	Leu	Pro	Asp	Ser	Leu	Thr	Ser	Met	Ile		
		195						200					205				
aac	cga	ggc	gcg	gag	ccc	aac	aga	atc	cag	gcg	atc	ttc	cgc	aaa	atg		672
Asn	Arg	Gly	Ala	Glu	Pro	Asn	Arg	Ile	Gln	Ala	Ile	Phe	Arg	Lys	Met		
		210						215					220				
gat	ccc	gcc	ctc	gcc	gtc	ggc	ccc	gac	atc	acc	tac	gag	gcc	gag	aag		720
Asp	Pro	Ala	Leu	Ala	Val	Gly	Pro	Asp	Ile	Thr	Tyr	Glu	Ala	Glu	Lys		
					230					235					240		
cgg	acc	gac	gga	caa	cgc	act	gca	ctg	agg	agc	ctg	ttc	acc	cgt	gac		768
Arg	Thr	Asp	Gly	Gln	Arg	Thr	Ala	Leu	Arg	Ser	Leu	Phe	Thr	Arg	Asp		
				245					250						255		
cgg	gtc	ttg	gga	acc	ctg	ctg	ctg	tgg	ctg	gtc	ttc	gtc	atc	aac	ctc		816
Arg	Val	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Val	Phe	Val	Ile	Asn	Leu		
			260						265						270		
ggc	gag	ttt	tac	gcg	ctg	cag	agc	tgg	cta	ccg	tcg	atc	atg	acg	agc		864
Gly	Glu	Phe	Tyr	Ala	Leu	Gln	Ser	Trp	Leu	Pro	Ser	Ile	Met	Thr	Ser		
		275						280							285		
ctg	gac	tac	gac	atg	ggt	acg	gtg	gtc	acc	gcc	acc	acc	ctc	acg	act		912
Leu	Asp	Tyr	Asp	Met	Gly	Thr	Val	Val	Thr	Ala	Thr	Thr	Leu	Thr	Thr		
		290						295					300				
gtc	ggc	ggc	atc	gcc	gct	gca	ttt	gtc	acc	ggg	ccc	tgt	atg	gac	cga		960
Val	Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Ala	Phe	Val	Thr	Gly	Pro	Cys	Met	Asp	Arg		
					310					315					320		
ctc	ggc	gcg	tac	gtc	acc	ctc	gga	acc	gtt	tat	gtc	gtc	gga	ttc	gca		1008
Leu	Gly	Ala	Tyr	Val	Thr	Leu	Gly	Thr	Val	Tyr	Val	Val	Gly	Phe	Ala		
				325						330					335		
ttc	gtt	gcg	ctg	acc	ggt	gtc	gcc	ttt	acg	gcg	ccg	ttg	tgg	gtc	cta		1056
Phe	Val	Ala	Leu	Thr	Gly	Val	Ala	Phe	Thr	Ala	Pro	Leu	Trp	Val	Leu		
			340						345						350		
ttg	acg	gcc	aat	ttt	ttt	gcg	ggg	gtc	tgc	atc	agc	ggt	gga	cag	aag		1104
Leu	Thr	Ala	Asn	Phe	Phe	Ala	Gly	Val	Cys	Ile	Ser	Gly	Gly	Gln	Lys		
		355						360							365		
agc	ctc	atc	gcg	ctg	tcc	gcg	gtg	ttc	tat	ccg	aca	ccg	atg	cgg	tcc		1152
Ser	Leu	Ile	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Phe	Tyr	Pro	Thr	Pro	Met	Arg	Ser		
		370						375							380		
acc	ggg	gtt	gga	tgg	gcg	ttg	ggt	gtt	ggc	cgc	ctc	ggc	ggc	atc	gtc		1200
Thr	Gly	Val	Gly	Trp	Ala	Leu	Gly	Val	Gly	Arg	Leu	Gly	Gly	Ile	Val		
					390					395					400		
ggg	ccg	atc	gcg	gtc	gga	gcg	gca	ctc	ggc	atg	ggc	tgg	tcc	gcc	agt		1248
Gly	Pro	Ile	Ala	Val	Gly	Ala	Ala	Leu	Gly	Met	Gly	Trp	Ser	Ala	Ser		
				405						410					415		
gca	gtc	ttc	tac	gca	atg	tca	gtc	ccc	atg	ctc	gtc	gcc	gga	gct	gcg		1296
Ala	Val	Phe	Tyr	Ala	Met	Ser	Val	Pro	Met	Leu	Val	Ala	Gly	Ala	Ala		

```

          420          425          430
gtc ttc ctc ctc ggc cgc tgg gtc cga agc gac aat cac ccc gat cgc      1344
Val Phe Leu Leu Gly Arg Trp Val Arg Ser Asp Asn His Pro Asp Arg
          435          440          445
aag tcg gca gaa agt cat tcg ctc gcc cgc aag tag      1380
Lys Ser Ala Glu Ser His Ser Leu Ala Arg Lys
          450          455

```

```

<210> 8
<211> 459
<212> PRT
<213> Rhodococcus jostii

```

```

<400> 8
Met Ser Leu Ala Pro Ser Arg Val Thr Leu Pro Asp Phe Ile Asp Ser
1          5          10          15
Arg Pro Val Ser Arg Tyr Gln Tyr Ile Val Ile Ala Leu Cys Gly Val
          20          25          30
Val Met Phe Ile Asp Gly Phe Asp Thr Gln Ser Ile Ser Tyr Met Ala
          35          40          45
Pro His Ile Ala Glu Glu Trp Gly Leu Ser Lys Gln Val Leu Gly Pro
          50          55          60
Ile Phe Ser Ala Ala Leu Ala Gly Leu Met Val Gly Tyr Leu Ala Leu
65          70          75          80
Ser Pro Leu Ser Glu Arg Phe Gly His Arg Arg Met Ile Leu Thr Ser
          85          90          95
Thr Val Ile Phe Ala Leu Gly Thr Leu Ala Ala Ala Trp Ser Gln Asn
          100          105          110
Val Thr Glu Leu Met Ala Leu Arg Phe Ile Thr Gly Met Gly Leu Gly
          115          120          125
Ala Ala Ala Pro Ser Ala Ile Ala Leu Thr Gly Glu Phe Ser Pro Lys
          130          135          140
Arg Leu Arg Ala Thr Phe Val Leu Val Ile Tyr Cys Gly Phe Ser Leu
145          150          155          160
Gly Phe Val Ala Ala Gly Leu Val Ser Gly Trp Leu Ile Pro Ile Leu
          165          170          175
Gly Trp Arg Ser Val Leu Val Val Gly Ala Val Ala Pro Leu Leu Leu
          180          185          190
Leu Pro Ala Leu Leu Arg Tyr Leu Pro Asp Ser Leu Thr Ser Met Ile
          195          200          205
Asn Arg Gly Ala Glu Pro Asn Arg Ile Gln Ala Ile Phe Arg Lys Met
          210          215          220
Asp Pro Ala Leu Ala Val Gly Pro Asp Ile Thr Tyr Glu Ala Glu Lys
225          230          235          240
Arg Thr Asp Gly Gln Arg Thr Ala Leu Arg Ser Leu Phe Thr Arg Asp
          245          250          255
Arg Val Leu Gly Thr Leu Leu Leu Trp Leu Val Phe Val Ile Asn Leu
          260          265          270
Gly Glu Phe Tyr Ala Leu Gln Ser Trp Leu Pro Ser Ile Met Thr Ser
          275          280          285
Leu Asp Tyr Asp Met Gly Thr Val Val Thr Ala Thr Thr Leu Thr Thr
290          295          300
Val Gly Gly Ile Ala Ala Phe Val Thr Gly Pro Cys Met Asp Arg
305          310          315          320
Leu Gly Ala Tyr Val Thr Leu Gly Thr Val Tyr Val Val Gly Phe Ala
          325          330          335
Phe Val Ala Leu Thr Gly Val Ala Phe Thr Ala Pro Leu Trp Val Leu
          340          345          350
Leu Thr Ala Asn Phe Phe Ala Gly Val Cys Ile Ser Gly Gly Gln Lys
          355          360          365
Ser Leu Ile Ala Leu Ser Ala Val Phe Tyr Pro Thr Pro Met Arg Ser
370          375          380
Thr Gly Val Gly Trp Ala Leu Gly Val Gly Arg Leu Gly Gly Ile Val
385          390          395          400

```

Gly	Pro	Ile	Ala	Val	Gly	Ala	Ala	Leu	Gly	Met	Gly	Trp	Ser	Ala	Ser
				405					410					415	
Ala	Val	Phe	Tyr	Ala	Met	Ser	Val	Pro	Met	Leu	Val	Ala	Gly	Ala	Ala
			420					425					430		
Val	Phe	Leu	Leu	Gly	Arg	Trp	Val	Arg	Ser	Asp	Asn	His	Pro	Asp	Arg
		435					440					445			
Lys	Ser	Ala	Glu	Ser	His	Ser	Leu	Ala	Arg	Lys					
	450					455									

```
<210>      9
<211>     948
<212>      ADN
<213>      Comamonas testosteroni
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(948)
```

<400>																	9
atg	aca	ata	gtg	cac	cgt	aga	ttg	gct	ttg	gcc	atc	ggc	gat	ccc	cac	48	
Met	Thr	Ile	Val	His	Arg	Arg	Leu	Ala	Leu	Ala	Ile	Gly	Asp	Pro	His		
1				5				10				15					
ggc	att	ggc	cca	gaa	atc	gca	ctg	aaa	gct	ctt	cag	cag	ttg	tct	gcc	96	
Gly	Ile	Gly	Pro	Glu	Ile	Ala	Leu	Lys	Ala	Leu	Gln	Gln	Leu	Ser	Ala		
20				25				30									
acc	gaa	aga	tcc	ctg	atc	aag	gtc	tat	gga	ccg	tgg	agc	gct	ctt	gaa	144	
Thr	Glu	Arg	Ser	Leu	Ile	Lys	Val	Tyr	Gly	Pro	Trp	Ser	Ala	Leu	Glu		
35				40				45									
caa	gca	gcg	cag	atc	tgc	caa	atg	gag	tcc	ctt	ctt	caa	gac	ctc	att	192	
Gln	Ala	Ala	Gln	Ile	Cys	Gln	Met	Glu	Ser	Leu		Gln	Asp	Leu	Ile		
50				55				60									
cat	gag	gaa	gcc	ggc	tcg	ctt	gca	caa	cca	gtg	caa	tgc	gga	gag	atc	240	
His	Glu	Glu	Ala	Gly	Ser	Leu	Ala	Gln	Pro	Val	Gln	Cys	Gly	Glu	Ile		
65				70				75				80					
acc	ccg	cag	gca	ggc	cta	tcc	acg	gtg	caa	tcc	gca	aca	gca	gcc	atc	288	
Thr	Pro	Gln	Ala	Gly	Leu	Ser	Thr	Val	Gln	Ser	Ala	Thr	Ala	Ala	Ile		
85				90				95									
cgg	gcg	tgc	gaa	agc	ggc	gag	gtc	gat	gcc	gtc	att	gcc	tgc	ccc	cac	336	
Arg	Ala	Cys	Glu	Ser	Gly	Glu	Val	Asp	Ala	Val	Ile	Ala	Cys	Pro	His		
100				105				110									
cat	gag	acg	gcc	att	cac	cgt	gca	ggc	ata	gcg	ttc	agc	ggc	tac	cca	384	
His	Glu	Thr	Ala	Ile	His	Arg	Ala	Gly	Ile	Ala	Phe	Ser	Gly	Tyr	Pro		
115				120				125									
tct	ttg	ctc	gcc	aat	gtt	ctt	ggc	atg	aac	gaa	gac	gag	gta	ttc	ctg	432	
Ser	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Leu	Gly	Met	Asn	Glu	Asp	Glu	Val	Phe	Leu		
130				135				140									
atg	ctg	gta	ggg	gct	gga	ctg	cgc	atc	gtg	cat	gtc	acc	ttg	cat	gag	480	
Met	Leu	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	His	Val	Thr	Leu	His	Glu		
145				150				155				160					
agc	gtg	cgt	agc	gca	cta	gag	cgg	ctc	tca	cct	cag	ttg	gtt	atc	aac	528	
Ser	Val	Arg	Ser	Ala	Leu	Glu	Arg	Leu	Ser	Pro	Gln	Leu	Val	Ile	Asn		
165				170				175									
gcg	gtg	gat	gcc	gcc	gtg	cag	aca	tgc	acc	cta	ctc	ggg	gtg	cct	aaa	576	
Ala	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Gln	Thr	Cys	Thr	Leu	Leu	Gly	Val	Pro	Lys		
180				185				190									
ccg	caa	gtc	gct	gta	ttc	ggg	atc	aac	cct	cat	gca	tcc	gaa	gga	cag	624	
Pro	Gln	Val	Ala	Val	Phe	Gly	Ile	Asn	Pro	His	Ala	Ser	Glu	Gly	Gln		
195				200				205									
ttg	ttc	ggc	ctg	gag	gac	tcg	cag	atc	acc	gtt	cct	gcc	gtc	gag	aca	672	
Leu	Phe	Gly	Leu	Glu	Asp	Ser	Gln	Ile	Thr	Val	Pro	Ala	Val	Glu	Thr		
210				215				220									
ctg	cgc	aaq	cgc	ggc	ctg	acg	gta	gac	ggc	ccc	atg	gga	gca	gac	atg	720	

Leu	Arg	Lys	Arg	Gly	Leu	Thr	Val	Asp	Gly	Pro	Met	Gly	Ala	Asp	Met		
225					230					235					240		
gtt	ctg	gca	cag	cgc	aag	cac	gac	ttg	tat	gtg	gcc	atg	ctg	cat	gac		768
Val	Leu	Ala	Gln	Arg	Lys	His	Asp	Leu	Tyr	Val	Ala	Met	Leu	His	Asp		
				245					250					255			
caa	ggg	cac	att	ccc	atc	aag	ctg	ctg	gct	cct	aac	gga	gcc	agt	gcg		816
Gln	Gly	His	Ile	Pro	Ile	Lys	Leu	Leu	Ala	Pro	Asn	Gly	Ala	Ser	Ala		
			260						265				270				
ctc	tcc	atc	ggc	ggc	agg	gtg	gtg	ctt	tcc	agc	gtg	ggc	cat	ggc	agc		864
Leu	Ser	Ile	Gly	Gly	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Gly	His	Gly	Ser		
			275					280					285				
gcc	atg	gac	att	gcc	ggc	cgt	ggc	gtg	gct	gac	gcc	acg	gcc	ctc	cta		912
Ala	Met	Asp	Ile	Ala	Gly	Arg	Gly	Val	Ala	Asp	Ala	Thr	Ala	Leu	Leu		
	290					295				300							
cgc	aca	atc	gcc	cta	ctc	gga	gcc	caa	ccg	gtc	tga						948
Arg	Thr	Ile	Ala	Leu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Val							
305					310					315							

<210> 10
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Comamonas testosteroni

<400> 10

Met	Thr	Ile	Val	His	Arg	Arg	Leu	Ala	Leu	Ala	Ile	Gly	Asp	Pro	His		
1				5					10					15			
Gly	Ile	Gly	Pro	Glu	Ile	Ala	Leu	Lys	Ala	Leu	Gln	Gln	Leu	Ser	Ala		
			20					25					30				
Thr	Glu	Arg	Ser	Leu	Ile	Lys	Val	Tyr	Gly	Pro	Trp	Ser	Ala	Leu	Glu		
		35				40						45					
Gln	Ala	Ala	Gln	Ile	Cys	Gln	Met	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Asp	Leu	Ile		
	50					55					60						
His	Glu	Glu	Ala	Gly	Ser	Leu	Ala	Gln	Pro	Val	Gln	Cys	Gly	Glu	Ile		
65					70					75					80		
Thr	Pro	Gln	Ala	Gly	Leu	Ser	Thr	Val	Gln	Ser	Ala	Thr	Ala	Ala	Ile		
				85					90					95			
Arg	Ala	Cys	Glu	Ser	Gly	Glu	Val	Asp	Ala	Val	Ile	Ala	Cys	Pro	His		
			100					105					110				
His	Glu	Thr	Ala	Ile	His	Arg	Ala	Gly	Ile	Ala	Phe	Ser	Gly	Tyr	Pro		
		115					120					125					
Ser	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Leu	Gly	Met	Asn	Glu	Asp	Glu	Val	Phe	Leu		
	130					135					140						
Met	Leu	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	His	Val	Thr	Leu	His	Glu		
145					150					155					160		
Ser	Val	Arg	Ser	Ala	Leu	Glu	Arg	Leu	Ser	Pro	Gln	Leu	Val	Ile	Asn		
			165						170					175			
Ala	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Gln	Thr	Cys	Thr	Leu	Leu	Gly	Val	Pro	Lys		
			180					185					190				
Pro	Gln	Val	Ala	Val	Phe	Gly	Ile	Asn	Pro	His	Ala	Ser	Glu	Gly	Gln		
	195					200						205					
Leu	Phe	Gly	Leu	Glu	Asp	Ser	Gln	Ile	Thr	Val	Pro	Ala	Val	Glu	Thr		
	210					215					220						
Leu	Arg	Lys	Arg	Gly	Leu	Thr	Val	Asp	Gly	Pro	Met	Gly	Ala	Asp	Met		
225					230					235					240		
Val	Leu	Ala	Gln	Arg	Lys	His	Asp	Leu	Tyr	Val	Ala	Met	Leu	His	Asp		
			245						250					255			
Gln	Gly	His	Ile	Pro	Ile	Lys	Leu	Leu	Ala	Pro	Asn	Gly	Ala	Ser	Ala		
			260						265				270				
Leu	Ser	Ile	Gly	Gly	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Gly	His	Gly	Ser		
		275					280					285					
Ala	Met	Asp	Ile	Ala	Gly	Arg	Gly	Val	Ala	Asp	Ala	Thr	Ala	Leu	Leu		
	290					295				300							
Arg	Thr	Ile	Ala	Leu	Leu	Gly	Ala	Gln	Pro	Val							

305

310

315

<210> 11

<211> 1188

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1188)

<400> 11

atg aac cac gta cca gtg gca att att ggc gca gga cca gca gga cta	48
Met Asn His Val Pro Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Leu	
1 5 10 15	
acc ctc gcc cac ctc ctc cac ctt caa ggt gtg gaa tca atc gtc ttt	96
Thr Leu Ala His Leu Leu His Leu Gln Gly Val Glu Ser Ile Val Phe	
20 25 30	
gaa tcc cgc acc cgc aag gac gtc gaa gaa acc gtc cga gca ggc atc	144
Glu Ser Arg Thr Arg Lys Asp Val Glu Glu Thr Val Arg Ala Gly Ile	
35 40 45	
ctg gaa caa ggc acc ctg aat ctg atg cgc gaa acc gga gtc ggc gca	192
Leu Glu Gln Gly Thr Leu Asn Leu Met Arg Glu Thr Gly Val Gly Ala	
50 55 60	
cgc atg gaa gca gaa gcc gat cac gat gaa gca atc gac atc tcc atc	240
Arg Met Glu Ala Glu Ala Asp His Asp Glu Ala Ile Asp Ile Ser Ile	
65 70 75 80	
aac aat gag cgc acc cgc att ccg ctg acc gaa ctc acc ggc cac aag	288
Asn Asn Glu Arg Thr Arg Ile Pro Leu Thr Glu Leu Thr Gly His Lys	
85 90 95	
gtt gcg atc tac ccg cag cac gaa tac ctc aaa gat ttc att gcc aag	336
Val Ala Ile Tyr Pro Gln His Glu Tyr Leu Lys Asp Phe Ile Ala Lys	
100 105 110	
cgc atc gaa gat ggc ggc gaa ctc ctt ttc acc acc act gtt gat tcc	384
Arg Ile Glu Asp Gly Gly Glu Leu Leu Phe Thr Thr Thr Val Asp Ser	
115 120 125	
gta gaa aac tac gaa ggc gac ctc gcc aag gtg acc tac acc gaa gcc	432
Val Glu Asn Tyr Glu Gly Asp Leu Ala Lys Val Thr Tyr Thr Glu Ala	
130 135 140	
gat ggt tcc tcc acc acc atc acc gcc gac tac gtc atc gca gct gac	480
Asp Gly Ser Ser Thr Thr Ile Thr Ala Asp Tyr Val Ile Ala Ala Asp	
145 150 155 160	
ggc tcc aac tcc cct tac cgc aag ctg atc acc gaa gac ggt ggc gtg	528
Gly Ser Asn Ser Pro Tyr Arg Lys Leu Ile Thr Glu Asp Gly Gly Val	
165 170 175	
cgc gcc cgc cat gaa tac cct tac gca tgg ttc ggc att ttg gtg gaa	576
Arg Ala Arg His Glu Tyr Pro Tyr Ala Trp Phe Gly Ile Leu Val Glu	
180 185 190	
gca cca aaa acc caa aag gaa ctc atc tac gca acc cac cct gag ggc	624
Ala Pro Lys Thr Gln Lys Glu Leu Ile Tyr Ala Thr His Pro Glu Gly	
195 200 205	
ttt gcg ctg atc tcc acc cgt acc gat gaa atc cag cgc tac tac ctg	672
Phe Ala Leu Ile Ser Thr Arg Thr Asp Glu Ile Gln Arg Tyr Tyr Leu	
210 215 220	
cag tgc aac cct gac gac acc cca gac atg tgg ccc gat gac cgc att	720
Gln Cys Asn Pro Asp Asp Thr Pro Asp Met Trp Pro Asp Asp Arg Ile	
225 230 235 240	
tgg gaa cag ctg cac ctg cgt gcg gac tcc cct ggc atc acc gtg tct	768
Trp Glu Gln Leu His Leu Arg Ala Asp Ser Pro Gly Ile Thr Val Ser	
245 250 255	
gaa ggg cgc atc ttt gac aag gcc gtg ctg cgt ttc cgc tcc gcg gtc	816
Glu Gly Arg Ile Phe Asp Lys Ala Val Leu Arg Phe Arg Ser Ala Val	
260 265 270	

```

acc gaa cca atg caa aag gga cgc ctc ttc ctt gct ggc gat gct gca      864
Thr Glu Pro Met Gln Lys Gly Arg Leu Phe Leu Ala Gly Asp Ala Ala
      275      280      285

cac acc gtg ccg cca acc gga gct aag ggc ctc aac ttg gct gtt gcc      912
His Thr Val Pro Pro Thr Gly Ala Lys Gly Leu Asn Leu Ala Val Ala
      290      295      300

gat gtc tca gta ctc gcg cca gca ctg gtt cgt gcc ctg aag aag aag      960
Asp Val Ser Val Leu Ala Pro Ala Leu Val Arg Ala Leu Lys Lys Lys
      305      310      315      320

gac acc ggc ttg ctc gat agc tac acc tcc ctg gca gtc ccc cgc atc      1008
Asp Thr Gly Leu Leu Asp Ser Tyr Thr Ser Leu Ala Val Pro Arg Ile
      325      330      335

tgg aaa gca cag cac ttc tcc tac tgg atg agc tcc atg ctc cac gca      1056
Trp Lys Ala Gln His Phe Ser Tyr Trp Met Ser Ser Met Leu His Ala
      340      345      350

gta ccc ggc gaa gat cac ttt gcc acc cag cgc cga ttc gct gaa ttg      1104
Val Pro Gly Glu Asp His Phe Ala Thr Gln Arg Arg Phe Ala Glu Leu
      355      360      365

cgc tcc gtc cta gaa tcc caa tcc ggc caa cgc tac ctc gca gag cag      1152
Arg Ser Val Leu Glu Ser Gln Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Glu Gln
      370      375      380

ttc gtt ggg cgc gac cta cca cgc ttc gag gta taa      1188
Phe Val Gly Arg Asp Leu Pro Arg Phe Glu Val
      385      390      395

```

```

<210> 12
<211> 395
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

```

```

<400> 12
Met Asn His Val Pro Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Leu
1      5      10      15
Thr Leu Ala His Leu Leu His Leu Gln Gly Val Glu Ser Ile Val Phe
      20      25      30
Glu Ser Arg Thr Arg Lys Asp Val Glu Glu Thr Val Arg Ala Gly Ile
      35      40      45
Leu Glu Gln Gly Thr Leu Asn Leu Met Arg Glu Thr Gly Val Gly Ala
      50      55      60
Arg Met Glu Ala Glu Ala Asp His Asp Glu Ala Ile Asp Ile Ser Ile
      65      70      75      80
Asn Asn Glu Arg Thr Arg Ile Pro Leu Thr Glu Leu Thr Gly His Lys
      85      90      95
Val Ala Ile Tyr Pro Gln His Glu Tyr Leu Lys Asp Phe Ile Ala Lys
      100      105      110
Arg Ile Glu Asp Gly Gly Glu Leu Leu Phe Thr Thr Thr Val Asp Ser
      115      120      125
Val Glu Asn Tyr Glu Gly Asp Leu Ala Lys Val Thr Tyr Thr Glu Ala
      130      135      140
Asp Gly Ser Ser Thr Thr Ile Thr Ala Asp Tyr Val Ile Ala Ala Asp
      145      150      155      160
Gly Ser Asn Ser Pro Tyr Arg Lys Leu Ile Thr Glu Asp Gly Gly Val
      165      170      175
Arg Ala Arg His Glu Tyr Pro Tyr Ala Trp Phe Gly Ile Leu Val Glu
      180      185      190
Ala Pro Lys Thr Gln Lys Glu Leu Ile Tyr Ala Thr His Pro Glu Gly
      195      200      205
Phe Ala Leu Ile Ser Thr Arg Thr Asp Glu Ile Gln Arg Tyr Tyr Leu
      210      215      220
Gln Cys Asn Pro Asp Asp Thr Pro Asp Met Trp Pro Asp Asp Arg Ile
      225      230      235      240
Trp Glu Gln Leu His Leu Arg Ala Asp Ser Pro Gly Ile Thr Val Ser
      245      250      255

```

Glu Gly Arg Ile Phe Asp Lys Ala Val Leu Arg Phe Arg Ser Ala Val
 260 265 270
 Thr Glu Pro Met Gln Lys Gly Arg Leu Phe Leu Ala Gly Asp Ala Ala
 275 280 285
 His Thr Val Pro Pro Thr Gly Ala Lys Gly Leu Asn Leu Ala Val Ala
 290 295 300
 Asp Val Ser Val Leu Ala Pro Ala Leu Val Arg Ala Leu Lys Lys Lys
 305 310 315 320
 Asp Thr Gly Leu Leu Asp Ser Tyr Thr Ser Leu Ala Val Pro Arg Ile
 325 330 335
 Trp Lys Ala Gln His Phe Ser Tyr Trp Met Ser Ser Met Leu His Ala
 340 345 350
 Val Pro Gly Glu Asp His Phe Ala Thr Gln Arg Arg Phe Ala Glu Leu
 355 360 365
 Arg Ser Val Leu Glu Ser Gln Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Glu Gln
 370 375 380
 Phe Val Gly Arg Asp Leu Pro Arg Phe Glu Val
 385 390 395

<210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <213> ADN tổng hợp

<400> 13
 cgagctcgaa ttgcggccg ctaatagtac ctg

33

<210> 14
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sythetic DNA

<400> 14
 tgaagtga aa atggcgac attgtgcgac att

33

<210> 15
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <213> ADN tổng hợp

<400> 15
 ttttttgtct gccgtttacc ggcgcgcgc gatcgcc

37

<210> 16
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <213> ADN tổng hợp

<400> 16	
aattggcgat cgcggcgcgc cggtaaacgg cagacaa	37
<210> 17	
<211> 32	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 17	
aaaaaatgtc gcacaatgtg cgccattttt ca	32
<210> 18	
<211> 42	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 18	
cttcacaggt actattagcg gccgcgaatt cgagctcggg ac	42
<210> 19	
<211> 38	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 19	
tggccggcct gcaggtaata cgactcacta taggggtc	38
<210> 20	
<211> 41	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 20	
ctggcggttac ctaaggagat ctaaattatg actaatataa a	41
<210> 21	
<211> 39	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 21	
taaggaggtc cttaattaat aagcttgcat gcctgcagg	39

<210> 22
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 22
 tcgacctgca ggcattgcaag cttattaatt aaggacc 37

 <210> 23
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 23
 tccttattta tattagtcac aatttagatc tccttaggta ac 42

 <210> 24
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 24
 gccaggaacc ctatagtgag tcgtattacc tgcaggccgg ccacatg 47

 <210> 25
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 25
 agatctaaaa attatgaata atataaaagg aggaattaat taa 43

 <210> 26
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <213> ADN tổng hợp

 <400> 26
 ttggatcctc ctttattatt gtttctgttg c 31

 <210> 27
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 27	
ttcctgcagg ttaagccact tcctttttgc	30
<210> 28	
<211> 43	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 28	
ggatccgcga tcgctaaatg cargaatcya tyatycartg gca	43
<210> 29	
<211> 41	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 29	
tctagagcgg ccgctagcta cttctartgg ykrccagtcg g	41
<210> 30	
<211> 3667	
<212> ADN	
<213> Comamonas testosteroni	
<400> 30	
atgcaagaat ccattatcca gtggcatggg gccactaata cacgcgtgcc tttcgggtatc	60
tacactgaca cagccaatgc tgatcaagaa cagcagcgca tctatcgcgg cgaggtctgg	120
aactacctgt gcctggaatc tgaaatcccc gaggctgggtg atttccgtac tacctttgcc	180
ggtgaaacac cgatagttgt cgtacgggat gccgaccagg aaatctacgc cttcgagaac	240
cgctgcgcgc atcgcggcgc totcatcgct ctggagaaat cgggacgtac ggatagtttc	300
cagtgcgtct atcacgcctg gagctacaac cgacagggag atctgaccgg cgttgccttc	360
gagaaagggtg tcaagggcca ggggtggcatg ccggcctcat tctgcaaaga agagcatggc	420
ccgcgcaagc tccgcgtggc tgtcttttgc ggtttggtct ttggcagttt ttccgaggac	480
gtaccacaga ttgaggatta ccttggccct gagatttgcg agcgcataga gcgcgtgctg	540
cacaagcccg tagaagtcac cggtcgcttc acgcaaaagc tgcctaacaa ctggaagctc	600
tacttcgaga acgtgaagga cagctatcac gccagcctcc tgcataatgtt cttcaccacc	660
ttcgagctga atcgccctctc acaaaaaggc ggagtcacgc tgcacgagtc ggggtggccac	720
catgtgagct attccatgat tgatcgtagc gccaaagacg actcgtacaa ggaccaggcc	780
atccgctccg acaacgagcg ttaccggctc aaagatccca gccttctaga gggcttcgag	840
gagttcgagg acggcgtgac cctgcagatc ctttctgtgt tccctggctt tgtgctgcag	900
cagattcaga acagcatcgc cgtgcgtcag ttgttgccca agagcatctc cagctcggaa	960
ctcaactgga cctatcttgg ctatgcagat gacagtgcag agcagcgcaa ggtcagactc	1020
aaacaggcca acctcatcgg ccctgcagga tttatttcca tggaggacgg agctgtcggt	1080
ggattcgtgc agcgtggcat cgcaggcgct gccaaccttg atgcggtcac cgagatgggc	1140
ggagaccacg aaggctctag cgagggccgc gccacagaaa cctcggtagc cggcttttgg	1200
aaggcctacc gcaagcatat gggacaggag atgcaagcat gatccatgaa attcaaactc	1260
cggccttcaa tgccgcttac gcgaagacca tagacagtga cgttatggag caatggccaa	1320
ccttcttcac gaaggattgc cattatcgcg tcaccaatgt cgacaacat gctgaaggac	1380
ttgctgctgg cattgtctgg gcagattcgc aggacatgct caccgaccga atttctgcgc	1440
tgcgcgaagc caatatctac gagcgccacc gctatcgcca tatcctgggt ctgccttcga	1500
tccagtcagc cgatgcaaca caggccagtg cttccacgcc attcctggtg ctgcgcacatca	1560

tgcataccgg	ggaaacagag	gtctttgcc	gcggtgagta	ccacgacaaa	ttcaccacga	1620
tcgatggaaa	gttacgtctg	caagagcgcg	tcgcggtttg	cgacagcacg	gtgacggaca	1680
cgctgatgtc	attgcogcta	tgacaatagt	gcaccgtaga	ttggctttgg	ccatcggcga	1740
tccccacggc	attggcccag	aaatcgcaact	gaaagctctt	cagcagttgt	ctgccaccga	1800
aagatccctg	atcaaggtct	atggaccgtg	gagcgctctt	gaacaagcag	cgcagatctg	1860
ccaaatggag	tcccttcttc	aagacctcat	tcatgaggaa	gccggctcgc	ttgcacaacc	1920
agtgcattgc	ggagagatca	ccccgcaggc	aggcctatcc	acggtgcaat	ccgcaacagc	1980
agccatccgg	gcgtgcgaaa	gcggcgagggt	cgatgcgcgtc	attgcctgcc	cccaccatga	2040
gacggccatt	caccgtgcag	gcatagcgtt	cagcggtctac	ccatctttgc	tcgccaatgt	2100
tcttggcatg	aacgaagacg	aggtattcct	gatgctggta	ggggctggac	tgcgcatcgt	2160
gcatgtcacc	ttgcatgaga	gcgtgcgtag	cgactagag	cggtctcac	ctcagttggt	2220
tatcaacgcg	gtggatgccg	ccgtgcagac	atgcacccta	ctcggggtgc	ctaaaccgca	2280
agtcgctgta	ttcgggatca	accctcatgc	atccgaagga	cagttgttcg	gcctggagga	2340
ctcgcagatc	accgttccctg	ccgtcgagac	actgcgcaag	cgcgccctga	cggtagacgg	2400
ccccatggga	gcagacatgg	ttctggcaca	gcgcaagcac	gacttgtatg	tggccatgct	2460
gcatgaccga	gggcacattc	ccatcaagct	gctggctcct	aacggagcca	gtgcgctctc	2520
catcggcggc	aggggtggtg	ttccagcgt	gggcatggc	agcgccatgg	acattgcccg	2580
ccgtggcggtg	gctgacgcca	cgccctcct	acgcacaatc	gccctactcg	gagcccaacc	2640
ggctctgagga	ctctctatga	accaccagat	ccatatccac	gactctgata	tcgcttccc	2700
ctgcgcgcct	gggcaatccg	tactggatgc	agccctgcag	gccggcatcg	agctgccta	2760
ttcctgcgcg	aaaggtagct	gtggcaactg	tgcgagtacg	ctgctcgacg	gaaatattac	2820
ttccttcaat	ggcatggccg	tgcgcagcga	actctgcacc	tcggagcagg	tattgctgtg	2880
cggctgcacc	gccgccagcg	atatacgtat	ccagccgagc	tcctttcgcc	gtctcgaccc	2940
ggaagcccg	aaacgtttta	cggccaaggt	gtacagcaat	acactggcgg	cacccgatgt	3000
ctcgtacttg	cgctgcgcgc	tgctgtggg	caagcgcgcc	aaatttgaag	ccggccaata	3060
cctgctgatt	cacctcgacg	gcggggaaaag	ccgcagctac	tctatggcca	acccaccca	3120
tgagagcgat	ggcatcacat	tgcatatcag	gcatgtaccg	ggtggtcgct	tcagcactat	3180
cgttcagcag	ttgaagtctg	gtgacacatt	ggatatcgaa	ctgccattcg	gcagcatcgc	3240
gttgaagcct	gacgacagca	gacccctagt	ttgcgttgca	ggaggcaccg	gatttgcacc	3300
catcaagtcc	gttctggatg	acctggccaa	acgcaaggta	cagcgcgaca	tcacgctgat	3360
ttggggtgct	cgcaaccctt	ctggcctgta	tcttcctagc	gccatcgaca	agtggcgcaa	3420
agcttgcccg	cagtttctgct	acattgcagc	catcactgac	ctaagcaacg	tgccctgcgga	3480
tgctcacgcc	ggtcgggtgg	atgacgcgct	acgcatgcac	tttgacaacc	tacacgatca	3540
tgttgctccac	tgctgtggct	caccagccct	cgttcaatct	gtgcgcacag	cagcctccaa	3600
tatgggcctg	ctagcacaaag	actttcatgc	ggatgtgttc	gctacagacc	cgactggcca	3660
ccactaa						3667

<210> 31
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <213> ADN tổng hợp

<400> 31
 aatttaatta aggaggatta ataaatgtcc ttagcaccat cgcgcgtg 48

<210> 32
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <213> ADN tổng hợp

<400> 32
 aagcgccgc gatcgatttc atttacttgc gggcgagcga atgactttc 49

<210> 33
 <211> 37
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <213> ADN tổng hợp
 <400> 33
 ggtgggttcac agcggcaatg acatcagcgt gtccgtc 37
 <210> 34
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <213> ADN tổng hợp
 <400> 34
 cattgccgct atgaaccacc agatccatat ccacgac 37
 <210> 35
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <213> ADN tổng hợp
 <400> 35
 aattttaatta aggaggataa ataaatgaac cacgtaccag tggc 44
 <210> 36
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <213> ADN tổng hợp
 <400> 36
 aagcgggccgc gatcgcatc atttatacct cgaagcgtgg taggtcg 47
 <210> 37
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <213> ADN tổng hợp
 <400> 37
 aattaattaa atgatggcta acagaatgct tttaaacgaa acggcatgg 49
 <210> 38
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <213> ADN tổng hợp

<400> 38	
tgcgggcgct tgtttaaacc tccttatattt accaggcggt atggtaaagc	50
<210> 39	
<211> 35	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 39	
tgatttaaatt ttatgagtggt acccggtcaa catcc	35
<210> 40	
<211> 50	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 40	
tgcgggcgct tgtttaaacc tccttatattt aagactgtaa ataaaccacc	50
<210> 41	
<211> 66	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 41	
gcgggcgcgga tatcggttgta aaaaaccccg ctccggcggg gttttttgta tctggccagg	60
cgcgcc	66
<210> 42	
<211> 28	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 42	
aaggcgcgcc gtgtccggtt tgataggg	28
<210> 43	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<213> ADN tổng hợp	
<400> 43	
tgtaaaacga cggccagt	18