

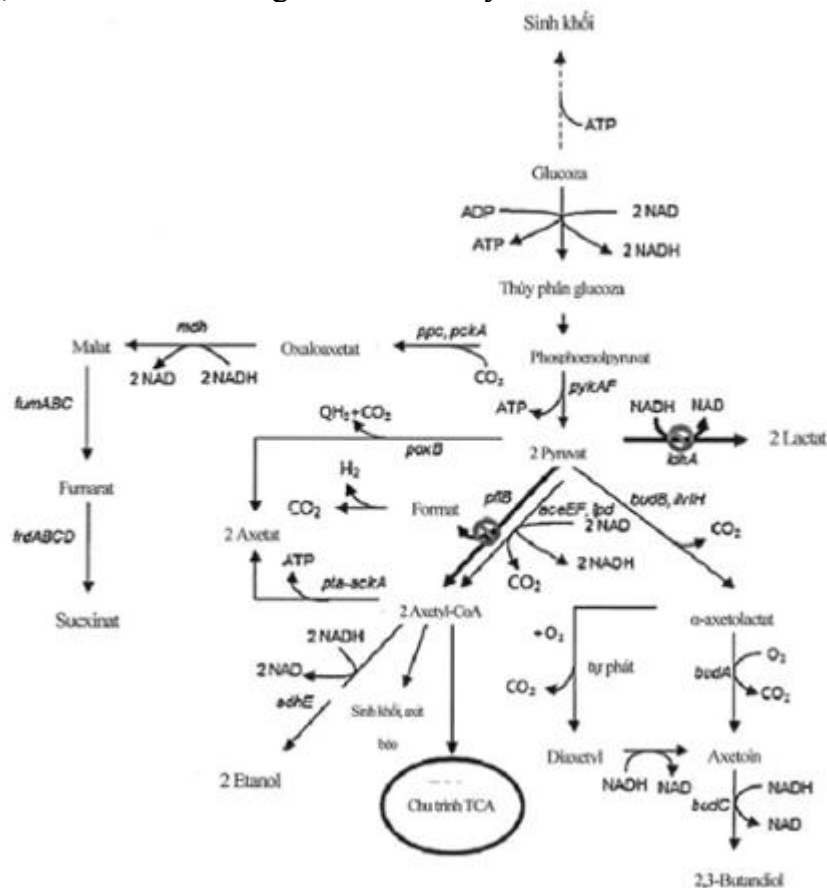


1-0025865

(21) 1-2015-03973 (22) 03/07/2014
 (86) PCT/KR2014/001920 03/07/2014 (87) WO 2014/148754 A1 25/09/2014
 (30) 10-2013-0028884 18/03/2013 KR; 10-2013-0114791 26/09/2013 KR
 (45) 26/10/2020 391 (43) 25/01/2016 334A
 (73) GS CALTEX CORPORATION (KR)
 508, Nonhyeon-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-985, Republic of Korea
 (72) PARK, Jong-Myoung (KR); SONG, Hyo-Hak (KR); YANG, Taek-Ho (KR).
 (74) Công ty cổ phần Sở hữu trí tuệ BROSS và Công sự (BROSS & PARTNERS., JSC)

(54) VI SINH VẬT TẠI TỔ HỢP CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT 2,3-BUTANDIOL GIA TĂNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT 2,3-BUTANDIOL SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic, hoặc con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat bị ức chế trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA và lactat. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất 2,3-butandiol sử dụng vi sinh vật này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng và phương pháp sản xuất 2,3-butandiol bằng cách sử dụng vi sinh vật này, trong đó vi sinh vật là *Klebsiella*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

2,3-butandiol ($\text{CH}_3\text{CHOHCHOHCH}_3$) là một trong số các rượu mà phân tử có bốn nguyên tử cacbon và hai nhóm hydroxyl ($-\text{OH}$) có thể được chuyển hóa bằng xúc tác hóa học thành 1,3-butadien mà là nguyên liệu thô được sử dụng cho quá trình sản xuất cao su tổng hợp và etyl methyl keton (methyl ethyl ketone - MEK) được dùng làm phụ gia cho nhiên liệu và dung môi (*Ji et al., Biotechnol. Adv., 29: 351, 2011*). Ngoài ra, 2,3-butandiol có thể dùng làm chất tăng chỉ số octan bằng cách trộn lẫn với gasolin (xăng), mà là hợp chất trung gian rất quan trọng trong các ngành công nghiệp nhiên liệu (*Celinska et al., Biotechnol. Adv., 27: 715, 2009*).

2,3-butandiol có thể được sản xuất bằng quá trình tổng hợp hóa học và quá trình lên men vi sinh vật. Tuy nhiên, do chi phí sản xuất 2,3-butandiol bằng các quá trình được mô tả trên đây là rất cao, nên không thể sản xuất 2,3-butandiol ở quy mô công nghiệp. Trong khi đó, với việc giá nguyên liệu thô hóa thạch đang tăng nhanh và việc đưa vào áp dụng quy định về ô nhiễm môi trường quốc tế, cùng với sự phát triển rất nhanh gần đây về công nghệ sản xuất 2,3-butandiol bằng quá trình lên men vi sinh vật, tầm quan trọng của quá trình sản xuất 2,3-butandiol trên cơ sở sinh học bằng quá trình lên men vi sinh vật và việc nghiên cứu và phát triển của chúng đang tăng nhanh.

Phương pháp sản xuất 2,3-butandiol trên cơ sở sinh học là chuyển hóa nguyên liệu sinh khối có thể tái sinh thành 2,3-butandiol bằng quá trình lên men vi sinh vật có khả năng sản xuất 2,3-butandiol. 2,3-butandiol được sản xuất bằng các loài vi sinh vật khác nhau như loài *Klebsiella*, loài *Enterobacter*, loài *Bacillus*, loài *Serratia*, và các loài vi sinh vật khác (*Maddox IS, Biotechnol., 6: 269, 1996*). Cụ thể, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), và *Paenibacillus polymyxa* sản xuất một lượng 2,3-

butandiol tương đối lớn. Cụ thể hơn, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) và *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) có ưu điểm ở chỗ quá trình nuôi cấy được thực hiện dễ dàng, tốc độ phát triển nhanh, và 2,3-butandiol có thể được sản xuất từ các nguồn nguyên liệu sinh khối khác nhau bao gồm pentoza có nguồn gốc từ lignoxenluloza (*Ji et al., Biotechnol. Adv., 29: 351, 2011; Chandel et al., Sustainable Biotechnol., 63, 2010; Jansen et al., Biotechnol. Bioeng., 26: 362, 1984; Jansen et al., Adv. Biochem. Eng., 27: 85, 1983*).

Việc nghiên cứu đối với quá trình sản xuất 2,3-butandiol trên cơ sở sinh học bằng quá trình lên men vi sinh vật đã được thực hiện chia thành hai lĩnh vực, lĩnh vực tối ưu hóa (bao gồm nhiệt độ, độ pH, lượng oxy hòa tan, và các yếu tố tương tự) quá trình lên men và lĩnh vực phát triển vi sinh vật (bao gồm phát hiện vi sinh vật, tìm hiểu đặc tính sinh lý, sự đột biến, kỹ thuật di truyền, và các yếu tố tương tự). Đối với lĩnh vực tối ưu hóa quá trình lên men, các điều kiện khác nhau như nhiệt độ, độ pH, hàm lượng oxy hòa tan, và các yếu tố khác để sản xuất một cách hiệu quả 2,3-butandiol được xác định (*Ji et al., Bioresour. Technol., 100: 3410, 2009; Nakashimada et al., J. Biosci. Bioeng., 90: 661, 2000; Nakashimada et al., Biotechnol. Lett., 20: 1133, 1998*). Tuy nhiên, quá trình sản xuất 2,3-butandiol bằng quá trình lên men vi sinh vật dưới các điều kiện được mô tả trên đây vẫn gặp khó khăn trong việc sử dụng một cách trực tiếp làm quá trình sản xuất thương mại do hiệu suất và sản lượng thấp. Ngoài ra, quá trình sản xuất này có nhược điểm ở chỗ các sản phẩm phụ như axit hữu cơ bao gồm axit lactic, rượu bao gồm etanol, và các sản phẩm tương tự, cũng được tạo ra, cùng với 2,3-butandiol trong quá trình lên men. Việc tạo thành các sản phẩm phụ làm giảm hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol đối với nguyên liệu sinh khối, và cần chi phí rất lớn để tách và làm sạch trong quá trình thu hồi 2,3-butandiol ra khỏi chất lỏng môi trường nuôi cấy.

Do đó, việc nghiên cứu đối với sự phát triển của vi sinh vật cho quá trình sản xuất 2,3-butandiol chủ yếu tập trung vào việc giảm lượng các sản phẩm phụ. Phương pháp tiêu biểu, của Ji và các cộng sự, đã thành công trong việc ngăn ngừa một phần sự tạo ra axit hữu cơ mà là các sản phẩm phụ, bằng cách cho chủng *Klebsiella oxytoca* thể tự nhiên tiếp xúc với tia tử ngoại (UV), làm một trong các phương pháp gây đột biến gen (*Ji et al., Biotechnol. Lett., 30: 731, 2008*). Ngoài ra, cũng có cố gắng khác để phát triển quá trình sản xuất 2,3-butandiol bằng cách sử dụng phương pháp phóng ion (chùm ion) đến chủng *Klebsiella*

pneumoniae để tăng tốc độ tiêu thụ nguyên liệu sinh khối (*Ma et al., Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82: 49, 2009). Tuy nhiên, các chủng được phát triển trên đây vẫn không đủ hiệu quả để sử dụng một cách trực tiếp trong quy trình sản xuất thương mại xét về năng suất, nồng độ cuối, và hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol.

Do đó, các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu vi sinh vật tái tổ hợp không chỉ có năng suất cao, nồng độ cao, và hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol cao, mà còn có độ chọn lọc cao đối với 2,3-butandiol, mà tạo ra ít sản phẩm phụ, và các tác giả sáng chế còn phát hiện ra rằng vi sinh vật tái tổ hợp mà từ đó các gen cụ thể được tách ra có thể tạo ra lượng nhỏ các sản phẩm phụ đồng thời có độ chọn lọc cao và năng suất tạo ra 2,3-butandiol cao, và do đó, các tác giả đã tạo ra sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Mục đích của sáng chế là tạo ra vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng, và phương pháp sản xuất 2,3-butandiol bằng cách sử dụng vi sinh vật này, trong đó vi sinh vật là *Klebsiella*.

Cách thức giải quyết vấn đề

Để đạt được mục đích trên đây, theo một phương án tiêu biểu, sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng,

trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic, hoặc con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat bị ức chế trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA và lactat, , trong đó vi sinh vật là *Klebsiella*.

Theo một phương án tiêu biểu khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất 2,3-butandiol, phương pháp này bao gồm các bước:

bước nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp như được mô tả trên đây;

và bước thu hồi 2,3-butandiol từ vi sinh vật tái tổ hợp được nuôi cấy.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể sản xuất 2,3-butandiol với độ chọn lọc và nồng độ cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là sơ đồ minh họa pathway trong đó 2,3-butandiol được tổng hợp trong chủng *Klebsiella*.

FIG. 2 là ảnh trên gel agarosa thu được bằng kỹ thuật khuếch đại PCR và điện di để xác định *ldhA* mà là gen của lactat dehydrogenaza liên quan đến sự tạo ra axit lactic được loại bỏ.

FIG. 3 là ảnh trên gel agarosa thu được bằng kỹ thuật khuếch đại PCR và điện di để xác định *pflB* mà là gen của pyruvat-format lyaza liên quan đến sự tạo ra format được loại bỏ.

FIG. 4 là sơ đồ minh họa kết quả của quá trình lên men chủng *Klebsiella oxytoca* của ví dụ so sánh 1.

FIG. 5 là sơ đồ minh họa kết quả của quá trình lên men chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của ví dụ so sánh 2.

FIG. 6 là sơ đồ minh họa kết quả của quá trình lên men chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của ví dụ 1.

FIG. 7 là sơ đồ đến 11 minh họa kết quả của quá trình lên men theo mẻ chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của ví dụ 1 phụ thuộc vào tốc độ khuấy trộn tại 150 vòng/phút (rpm) (FIG. 7), 250 vòng/phút (FIG. 8), 350 vòng/phút (FIG. 9), và 450 vòng/phút (FIG. 10) (FIG. 11: nồng độ 2,3-butandiol mỗi giờ phụ thuộc vào tốc độ khuấy trộn).

FIG. 12 là sơ đồ minh họa kết quả của quá trình lên men theo mẻ bổ sung cơ chất chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của ví dụ 1 được thực hiện bằng cách duy trì tốc độ khuấy trộn tại 450 vòng/phút dưới điều kiện ưa khí.

FIG. 13 là sơ đồ minh họa kết quả của quá trình lên men theo mẻ bổ sung cơ chất chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của ví dụ 1 được thực hiện bằng cách kiểm soát tốc độ khuấy trộn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến:

vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng,

trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic, hoặc con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat bị ức chế trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA và lactat, trong đó vi sinh vật là

Klebsiella.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến:

phương pháp sản xuất 2,3-butandiol, phương pháp này bao gồm: bước nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế; và

thu hồi 2,3-butandiol từ vi sinh vật tái tổ hợp được nuôi cấy này.

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

Vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic, hoặc con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat bị ức chế trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA và lactat, , trong đó vi sinh vật là *Klebsiella*.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp mà từ đó gen mã hóa enzym tách loại hydro (dehydro hóa) ra khỏi rượu (enzym dehydrogenaza aldehyt/rượu), cụ thể là, adhE, không được tách ra.

Tốt hơn nữa, như được minh họa trong FIG. 1, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic, hoặc con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat bị ức chế mặc dù có con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA và lactat.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có độ chọn lọc, hiệu suất, nồng độ, và năng suất tạo ra 2,3-butandiol cao. Cụ thể là, trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, độ chọn lọc đối với 2,3-butandiol là 70% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 80% hoặc lớn hơn, và hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol là 0,35 g/g hoặc lớn hơn đối với quá trình nuôi cấy theo mẻ hoặc quá trình nuôi cấy theo mẻ bổ sung cơ chất. Hơn nữa, do sự tái tổ hợp, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế ức chế tốt hơn khả năng sản xuất axit formic, axit axetic, hoặc etanol khi so với vi sinh vật thể tự nhiên.

Con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA

Con đường sinh tổng hợp theo axetyl-CoA của sáng chế được dùng để chỉ con đường trong đó axetyl-CoA được tổng hợp từ chất chuyển hóa cụ thể trong vi sinh vật. con đường sinh tổng hợp theo axetyl-CoA của sáng chế là con đường tổng hợp axetyl-CoA từ

pyruvat, và chất tương tự.

Con đường sinh tổng hợp lactat

Con đường sinh tổng hợp theo lactat của sáng chế được dùng để chỉ con đường trong đó lactat được tổng hợp từ chất chuyển hóa cụ thể trong vi sinh vật. con đường sinh tổng hợp theo lactat của sáng chế là con đường tổng hợp lactat từ pyruvat, và chất tương tự.

Vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA và lactat

Vi sinh vật theo sáng chế được bao gồm trong chi *Klebsiella*, tốt hơn là *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), và chủng tương tự, và tốt nhất là *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*).

Sự ức chế con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA

Enzym pyruvat-format lyaza kiểm soát sự chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA. Con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA có thể bị ức chế bằng cách ức chế pyruvat-format lyaza. Việc ức chế pyruvat-format lyaza có thể được thực hiện bằng cách ức chế sự biểu hiện của pyruvat-format lyaza, ức chế hoạt tính enzym của pyruvat-format lyaza, và các cách ức chế tương tự. Ví dụ, pyruvat-format lyaza có thể bị ức chế bằng cách chọn lựa phương pháp thích hợp bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, phương pháp thích hợp như loại bỏ *pflB* mà là gen mã hóa pyruvat-format lyaza, phát triển thể đột biến trong gen (thể đột biến ức chế sự biểu hiện của gen bình thường bằng cách gây đột biến, thể hoặc loại bỏ phần mẫu tự cơ bản ra khỏi gen, hoặc bằng cách bổ sung thêm phần mẫu tự cơ bản vào trong gen), điều hòa sự biểu hiện gen trong quá trình phiên mã hoặc quá trình dịch mã, và các phương pháp tương tự.

Sự ức chế con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic

Enzym pyruvat-format lyaza kiểm soát sự chuyển hóa pyruvat thành axit formic. Con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic có thể bị ức chế bằng cách ức chế pyruvat-format lyaza. sự ức chế pyruvat-format lyaza có thể được thực hiện bằng cách ức chế sự biểu hiện của pyruvat-format lyaza, ức chế hoạt tính enzym của pyruvat-format lyaza, và các cách ức chế tương tự. Ví dụ, pyruvat-format lyaza có thể bị ức chế bằng cách chọn lựa phương pháp thích hợp bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, phương pháp thích hợp như loại bỏ *pflB* mà là gen mã hóa pyruvat-format lyaza, phát triển thể đột biến trong gen (thể đột biến ức chế sự biểu hiện của gen bình thường bằng cách gây đột biến, thể hoặc loại

bỏ phần mẫu tự cơ bản ra khỏi gen, hoặc bằng cách bổ sung thêm phần mẫu tự cơ bản vào trong gen), điều hòa sự biểu hiện gen trong quá trình phiên mã hoặc quá trình dịch mã, và các phương pháp tương tự.

Sự ức chế con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat

Enzym lactat dehydrogenaza kiểm soát sự chuyển hóa pyruvat thành lactat. Con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat có thể bị ức chế bằng cách ức chế lactat dehydrogenaza. Sự ức chế lactat dehydrogenaza có thể được thực hiện bằng cách ức chế sự biểu hiện của lactat dehydrogenaza, ức chế hoạt tính enzym của lactat dehydrogenaza, và các cách ức chế tương tự. Ví dụ, lactat dehydrogenaza có thể bị ức chế bằng cách chọn lựa phương pháp thích hợp bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, phương pháp thích hợp như loại bỏ *ldha* mà là gen mã hóa lactat dehydrogenaza, phát triển thể đột biến trong gen (thể đột biến ức chế sự biểu hiện của gen bình thường bằng cách gây đột biến, thể hoặc loại bỏ phần mẫu tự cơ bản ra khỏi gen, hoặc bằng cách bổ sung thêm phần mẫu tự cơ bản vào trong gen), điều hòa sự biểu hiện gen trong quá trình phiên mã hoặc quá trình dịch mã, và các phương pháp tương tự.

Enzym dehydro hóa rượu

Enzym dehydro hóa rượu (enzym dehydrogenaza aldehyt/rượu) kiểm soát con đường chuyển hóa axetyl-CoA thành etanol. Do đó, có trường hợp trong đó việc tăng quá trình sản xuất 2,3-butandiol được đẩy mạnh bằng cách loại bỏ *adhE* mà là gen mã hóa enzym dehydro hóa rượu để ức chế sự tạo ra etanol (Ji et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 85: 1751, 2010). Tuy nhiên, trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, nếu *adhE* bị tách ra, thì lượng sản xuất, độ chọn lọc, và năng suất tạo ra 2,3-butandiol bị giảm một cách đáng kể. Do đó, *adhE* mà là gen mã hóa enzym dehydro hóa rượu không được tách ra theo sáng chế.

Phương pháp sản xuất 2,3-butandiol

Phương pháp sản xuất 2,3-butandiol theo sáng chế bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế; và bước thu hồi 2,3-butandiol từ vi sinh vật tái tổ hợp được nuôi cấy.

Bước nuôi cấy được thực hiện dưới điều kiện ưa khí, tốt hơn nếu, điều kiện ít ưa khí oxy. Ví dụ, bước nuôi cấy được thực hiện có kèm cấp oxy, cụ thể là, không khí trong bước nuôi cấy, và cụ thể hơn, việc cấp oxy có thể được thực hiện bằng cách khuấy. Tốt hơn nếu,

bước nuôi cấy được thực hiện có kèm khuấy tại tốc độ khuấy trộn 450 vòng/phút hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 50 đến 450 vòng/phút, và thậm chí tốt hơn nữa là 150 đến 450 vòng/phút.

Tốt hơn nữa, bước nuôi cấy có thể kiểm soát được năng suất tạo ra 2,3-butandiol bằng cách kiểm soát lượng oxy cấp vào. Đối với phương pháp kiểm soát lượng oxy cấp vào trong bước nuôi cấy, ví dụ, bước nuôi cấy theo sáng chế có thể được thực hiện có kèm khuấy, và bước nuôi cấy có thể kiểm soát được năng suất tạo ra 2,3-butandiol bằng cách kiểm soát tốc độ khuấy trộn trong môi trường nuôi cấy. Ví dụ, nếu nồng độ của axetoin được tăng lên đến 5 g/L hoặc lớn hơn, tốt hơn là 10 g/L hoặc lớn hơn, thì tốc độ khuấy trộn có thể được giảm, bằng cách này làm tăng nồng độ và năng suất tạo ra 2,3-butandiol và ức chế sự tạo ra sản phẩm phụ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các đặc điểm và ưu điểm của sáng chế và phương pháp thực hiện sáng chế sẽ trở nên rõ ràng nhờ phần mô tả các phương án với sự tham chiếu đến các hình vẽ kèm theo dưới đây. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở phương án tiêu biểu được mô tả ở đây, mà sáng chế còn có thể được thực hiện ở các dạng khác nhau. Các phương án tiêu biểu này được mô tả chỉ với mục đích minh họa để chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu rõ sáng chế và phạm vi của sáng chế. Do đó, sáng chế sẽ chỉ được xác định bằng phạm vi của yêu cầu bảo hộ đính kèm sau đây.

Nguyên liệu và phương pháp

- Nồng độ của 2,3-butandiol (g/L): Lượng 2,3-butandiol được sản xuất trên mỗi đơn vị thể tích;

- Hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol (g/g): $\text{Lượng sản xuất (g) 2,3-butandiol} / \text{nguồn cacbon (g)} \times 100$;

- Năng suất tạo ra 2,3-butandiol (g/L/h): $\text{Lượng 2,3-butandiol được sản xuất trên mỗi đơn vị thời gian và đơn vị thể tích}$.

Độ chọn lọc (%) 2,3-butandiol: $\text{Lượng sản xuất (g) 2,3-butandiol} / (\text{lượng sản xuất (g) 2,3-butandiol, etanol, axetoin, axit succinic, lactat format, và axit axetic}) \times 100$

Ví dụ thực nghiệm 1: Quá trình sản xuất vi sinh vật tái tổ hợp

Để bất hoạt gen đích của *Klebsiella oxytoca* được sản xuất bằng mảnh ADN bao gồm vùng tương đồng của gen đích, cơ chế tái tổ hợp của vi khuẩn được sử dụng, và vùng

tương đồng của gen được loại bỏ được khuếch đại bằng PCR. Sau đó, mảnh ADN tương ứng bao gồm vùng tương đồng được chuyển sang vi khuẩn, và sau đó, gen đích được loại bỏ bằng cơ chế tái tổ hợp bằng recombinaza (enzym tái tổ hợp gen) giữa vùng tương đồng của gen trong mảnh ADN và gen trong nhiễm sắc thể của *Klebsiella oxytoca*.

Đầu tiên, để thực hiện bước tạo dòng vô tính của lactat dehydrogenaza của *Klebsiella oxytoca*, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 2) của *ldhA* (SEQ ID NO: 1) mà là gen đích được khuếch đại bằng đoạn mồi có số xác định chuỗi (SEQ ID NO): 3 và 4 bằng PCR. Ngoài ra, vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 5) của nó được khuếch đại bằng đoạn mồi có SEQ ID NO: 6 và 7 bằng PCR. Sau đó, cả hai vùng tương đồng 1 và 2 được sử dụng một cách đồng thời làm mẫu và được khuếch đại bằng PCR, nhờ đó tạo ra mảnh ADN hoàn thành (SEQ ID NO: 8) bao gồm vùng tương đồng 1 và 2.

Trong khi đó, để thực hiện bước tạo dòng vô tính vùng tương đồng của pyruvat-format lyaza của *Klebsiella oxytoca*, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 10) của *pflB* (SEQ ID NO: 9) mà là gen đích được khuếch đại bằng đoạn mồi có SEQ ID NO: 11 và 12 bằng PCR. Ngoài ra, vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 13) của nó được khuếch đại bằng đoạn mồi có SEQ ID NO: 14 và 15 bằng PCR. Sau đó, cả hai vùng tương đồng 1 và 2 được sử dụng một cách đồng thời làm mẫu và được khuếch đại bằng PCR, nhờ đó tạo ra mảnh ADN hoàn chỉnh (SEQ ID NO: 16) bao gồm vùng tương đồng 1 và 2 (Bảng 1). Để tăng khả năng tái tổ hợp của gen đích, mảnh ADN hoàn chỉnh có thể bao gồm gen kháng thuốc kháng sinh, và các thành phần tương tự. Hơn nữa, mảnh ADN có thể bao gồm gen *sacB* mã hóa enzym levansucraza, để loại bỏ gen kháng thuốc kháng sinh tái tổ hợp trong nhiễm sắc thể.

Bảng 1

SEQ ID NO .	Trình tự
1	ATGAAAATCGCTGTGTATAGTACAAAACAGTACGACAAGAAGTATCTGCAGCATGTTAATGATG CATATGGCTTTGAACTGGAGTTTTTTGACTTCCTGCTAACCGAAAAAACCGCCAAAACCGCCA ACGGCTGTGAAGCGGTGTGTATCTTCGTAAACGATGACGGTAGCCGCCCGGTACTTGAAGAA CTGAAAGCCCACGGCGTGCAGTACATCGCGCTGCGCTGCGCGGGGTTCAACAACGTTGACC TCGATGCCGCCAAAGAGCTGGGCCTGCGGGTGGTGCGCTCCCGGCCTACTCGCCGGAAG CGGTCGCTGAGCAACGCGATCGGCATGATGATGTCGCTGAACCGCCGCATTACCGTGCCTA TCAGCGCACCCGCGACGCGAACTTCTCTCTGGAAGGGCTGACCGGTTTCACCATGCACGGT AAAACCGCCGGCGTTATTGGCACCGGTAAAATCGGCGTCGCCGCGCTGCGCATTCTTAAAG GCTTCGGTATGCGTCTGCTGGCGTTTGATCCCTACCCAAGCGCCGCCGCGCTGGATATGGG CGTGGAGTATGTCGATCTTGAAACCCTGTACCGGGAGTCCGATGTTATCTCACTGCACTGCC CACTGACCGATGAAAACCTACCATTTGCTGAACCATGCCGCGTTTCGATCGCATGAAAGACGGG GTGATGATCATCAACACCAGCCGCGGCGCGCTCATCGATTTCGAGGCAGCGATCGACGCCC TGAAGCATCAGAAAATTGGCGCGCTGGGGATGGACGTGTATGAGAACGAACGCGATCTGTTC TTTGAAGATAAGTCTAATGACGTGATTACAGGATGATGTGTTCCGCCGTCTCTCCGCTGCCAT AACGTCTGTTTACCGGTCACCAGGCGTTTCTGACCGCGGAAGCGTTGATCAGCATTTGCA AACCAACCTCGACAACCTGCGTCAAGTGGATGCAGGCGAAACCTGTCTAACGCACTGGTCT GA
2	ATGACGTTGCTAAATCCTGCGCCGTCATCTCGCTGCTGATCCCGGGCACCTCCGGGCTACT GCTGTTCCGGCACCTGGCATCGGCCAGCCCGGGACATTTCTGTTAATGTGGATGAGCGCC AGCCTCGGCGCTATCGGCGGATTCTGGCTCTCGTGGCTGACGGGCTACCGCTACCGGTACC ATCTGCATCGTATCCGCTGGCTTAATGCCGAACGCCTCGCTCGCGGCCAGTTGTTCTGCGC CGCCACGGCGCGTGGGCAGTCTTTTTAGCCGCTTCTCTCTCCGCTTCGCGCCACCGTGC CGCTGGTAACCGGCGCCAGCGGCACCTCTCTGCGCAGTTTCAGCTCGCCAACGTCAGCTC CGGGCTGCTCTGGCCGCTGATCCTGCTGGCGCCAGGCGCGTTAAGCCTCAGCTTTTGATGA

	AAGGTATTGTCTTTTAAAGAGATTTCTTAACACCGCGATATGCTCTAGAATTATTACTATAACCT GCTGATTAACTAGTTTTTAACATTTGTAAGATTATTTAATTATGCTACCGTGACGGTATTATCA CTGGAGAAAAGTCTTTTTTCCTTGCCCTTTTGTGC
3	Ko_IdhA_FP1 – CACGGATCCATGACGTTGCTAAATCCTGC
4	Ko_IdhA_RP1 – GCACAAAAGGGCAAGGAAAAAAGACTTTTCTCCAGTGATA
5	TATCACTGGAGAAAAGTCTTTTTTCCTTGCCCTTTGTGCTCCCCCTTCGCGGGGGGCACATT CAGATAATCCCCACAGAAATTGCCTGCGATAAAGTTACAATCCCTTCATTTATTAATACGATAA ATATTTATGGAGATTAAATGAACAAGTATGCTGCGCTGCTGGCGGTGGGAATGTTGCTATCGG GCTGCGTTTATAACAGCAAGGTGTCGACCAGAGCGGAACAGCTTCAGCACCACCGTTTTGTG CTGACCAGCGTTAACGGGCAGCCGCTGAATGCCGCGGATAAGCCGCAGGAGCTGAGCTTC GGCGAAAAGATGCCCATTACGGGCAAGATGTCTGTTTCAGGTAATATGTGCAACCGCTTCAG CGGCACGGGCAAAGTCTCTGACGGCGAGCTGAAGGTTGAAGAGCTGGCAATGACCCGCATG CTCTGCACGGACTCGCAGCTTAACGCCCTGGACGCCACGCTGAGCAAAATGCTGCGCGAAG GCGCGCAGGTGACCTGACGGAAACGCAGCTAACGCTGGCGACCGCCGACCAGACGCTGG TGTATAAGCTCGCCGACCTGATGAATTAATAATTA
6	Ko_IdhA_FP2 – TATCACTGGAGAAAAGTCTTTTTTCCTTGCCCTTTTGTGC
7	Ko_IdhA_RP2 – CCTGCGGCCGCTAATTATTAATTCATCAGGTC
8	ATGACGTTGCTAAATCCTGCGCGTCACTCGCTGCTGATCCCGGGCACCTCCGGGCTACT GCTGTTGCGCACCCCTGGCATCGGCCAGCCCGGGACATTTCTGTTAATGTGGATGAGCGCC AGCCTCGGCGCTATCGGCGGATTCTGGCTCTCGTGGCTGACGGGCTACCGCTACCGGTACC ATCTGCATCGTATCCGCTGGCTTAATGCCGAACGCCTCGCTCGCGGCCAGTTGTTCTGCGC CGCCACGGCGCGTGGGCAGTCTTTTTAGCCGCTTCTCTCTCCGCTTCGCGCCACCGTGC CGCTGGTAACCGGCGCCAGCGGCACCTCTCTCTGGCAGTTTCAGCTCGCCAACGTCAGCTC

	CGGGCTGCTCTGGCCGCTGATCCTGCTGGCGCCAGGCGCGTTAAGCCTCAGCTTTTGATGA AAGGTATTGTCTTTTAAAGAGATTTCTTAACACCGCGATATGCTCTAGAATTATTACTATAACCT GCTGATTAACTAGTTTTTAACATTTGTAAGATTATTTTAATTATGCTACCGTGACGGTATTATCA CTGGAGAAAAGTCTTTTTTCTTGCCCTTTTGTGCTCCCCCTTCGCGGGGGGACATTGAGAT AATCCCCACAGAAATTGCCTGCGATAAAGTTACAATCCCTTCATTTATTAATACGATAAATATTT ATGGAGATTAAATGAACAAGTATGCTGCGCTGCTGGCGGTGGGAATGTTGCTATCGGGCTGC GTTTATAACAGCAAGGTGTCGACCAGAGCGGAACAGCTTCAGCACCACCGTTTTGTGCTGAC CAGCGTTAACGGGCAGCCGCTGAATGCCGCGGATAAGCCGCAGGAGCTGAGCTTCGGCGA AAAGATGCCCATACGGGCAAGATGTCTGTTTCAGGTAATATGTGCAACCGCTTCAGCGGCA CGGGCAAAGTCTCTGACGGCGAGCTGAAGGTTGAAGAGCTGGCAATGACCCGCATGCTCTG CACGGA CTG CAGCTTAACGCCCTGGACGCCACGCTGAGCAAAATGCTGCGCGAAGGCGC GCAGGTGACCTGACGGAAACGCAGCTAACGCTGGCGACCGCCGACCAGACGCTGGTGTA TAAGCTCGCCGACCTGATGAATTAATAATTA
9	ATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTAGCCACAGCCTGGGAAGGTTTTGCGAAAGGTGACTGGCA GAACGAAGTCAACGTCCGCGACTTCATCCAGAAAACTATACCCCGTACGAAGGTGACGAGT CCTTCCTGGCTGGCGCAACTGACGCGACCAACCAAGCTGTGGGACACCGTAATGGAAGGCGT TAAACAGGAAAACCGCACTCACGCGCCTGTTGATTTTGATACTTCCCTTGCATCCACCATCAC TTCTCATGACGCTGGCTACATCGAGAAAGGTCTCGAGAAAAATCGTTGGTCTGCAGACTGAAG CTCCGCTGAAACGCGCGATTATCCCGTTGCGCGGCATCAAAATGGTGAAGGTTCCCTGCAAA GCGTACGATCGCGAGCTGGACCCGATGCTGAAGAAAAATCTTCACTGAATACCGTAAACTCA CAACCAGGGCGTGTTTGACGTTTACACCAAAGACATCCTGAACTGCCGTAAATCTGGTGTTCT GACCGGTCTGCCGGATGCCTATGGCCGTGGTCGTATCATCGGTGACTACCGTCGCGTTGCG CTGTACGGTATCGACTTCCTGATGAAAGACAAATACGCTCAGTTCGTTTCTCTGCAAGAGAAA CTGGAAAACGGCGAAGATCTGGAAGCAACCATCCGTCTGCGCGAAGAAATCTCTGAACAGCA

CCGCGCGCTGGGTCAGATCAAAGAAATGGCGGCTAAATATGGCTGCGATATCTCTGGTCCTG
CTACCACCGCTCAGGAAGCTATCCAGTGGACCTACTTCGGTTACCTGGCTGCCGTAAAATCT
CAGAACGGCGCGGCAATGTCCTTOGGTGTACCTCCAGCTTCTGGACATCTTCATCGAACG
TGACCTGAAAGCCGGTAAAATCACCGAGCAAGACGCACAGGAAATGATTGACCACCTGGTCA
TGAAACTGCGTATGGTTCGTTTCCTGCGTACCCCTGAATATGATGAACTGTTCTCTGGCGACC
CGATCTGGGCAACAGAATCTATCGGCGGTATGGGCGTTGACGGCCGTA CTCTGGTCACCAA
AAACAGCTTCCGTTTCCTGAACACCCTGTACACCATGGGGCCGTCTCCGGAGCCGAACATCA
CCATTCTGTGGTCTGAAAAACTGCCGCTGAGCTTCAAAAAATACGCCGCGAAAAGTGTCCATC
GATACCTCTTCTCTGCAGTACGAGAACGATGACCTGATGCGTCCTGACTTCAACAACGATGAC
TACGCTATCGCTTGCTGCGTAAGCCCGATGGTTGTTGGTAAGCAAATGCAGTTCTTCGGCGC
GCGTGCTAACCTGGCGAAAACCATGCTGTACGCAATCAACGGCGGCGTTGATGAAAACTGA
AAATGCAGGTTGGTCCTAAATCTGAACCGATCAAAGGCGACGTTCTGAACTTCGACGAAGTGA
TGGACCGCATGGATCACTTCATGGACTGGCTGGCTAAACAGTACGTCACTGCGCTGAACATC
ATCCACTACATGCACGACAAGTACAGCTACGAAGCTTCCCTGATGGCGCTGCACGACCGTGA
TGTTATCCGCACCATGGCATGTGGTATCGCAGGTCTTCCGTTGCGGCTGACTCCCTGTCTG
CAATCAAATATGCGAAAAGTTAAACCGATTCTGTACGAAAACGGTCTGGCTGTGCACTTCGAAA
TCGAAGGCGAATACCCGCAGTTTGGTAACAACGACTCTCGCGTCGATGATATGGCCGTTGAC
CTGGTTGAACGTTTCATGAAGAAAATTCAGAACTGCACACCTACCGCAACGCTATCCCGACT
CAGTCCGTTCTGACCATCACCTCTAACGTTGTGTATGGTAAGAAAACCGGCAACACCCCTGA
CGGTCGTCGCGCTGGCGCTCCGTTCCGACCAGGTGCTAACCOGATGCACGGCCGTGACCA
GAAAGGCGCTGTTGCCTCTCTGACCTCCGTTGCAAACTGCCGTTTGCTTACGCGAAAGATG
GTATTTCTTACACCTTCTCTATCGTGCCGAACGCGCTGGGTAAAGACGACGAAGTTCGTAAAA
CTAACCTCGCCGGCCTGATGGATGGTTACTTCCACCACGAAGCGTCCATCGAAGGCGGTCA
GCATCTGAACGTCAACGTTATGAACCGCGAAATGCTGCTCGACGCGATGGAAAACCCGGAAA

	AATATCCGCAGCTGACCATCCGCGTATCCGGCTACGCAGTACGTTTTAACTCCCTGACTAAAG AACAGCAGCAGGACGTTATTACTCGTACCTTCACTCAGACCATGTAA
10	GGGTCAACTGGCGAAAAAAGTGGCTCAACGTCTATGTTGGTAACCTGATTGGTTGCTTACTGTT TGTATTGCTGATGTGGCTTTCAGGCGAATATATGACTGCCAACGGTCAATGGGGACTTAACGT TCTGCAAACCGCCGACCACAAAATGCACCATACTTTTGTGAAGCCGTGTGCCTGGGTATCCT GGCAAACCTGATGGTCTGCCTTGCGGTATGGATGAGTTACTCCGGCCGTAGCCTGATGGATA AAGCCATGATTATGGTTTTACCGGTGGCAATGTTTGTGCGAGCGGGTTTGAGCACAGTATCG CGAACATGTTTATGATCCCGCTGGGTATCGTTATCCGCGACTTTGCAAGCCCGGAATTCTGGA CCGCAGTTGGTTCAACTCCGGAAAAGTTTCTCTCACCTGACCGTCATGAACTTCATCACTGATA ACCTGATTCCGGTAACTATCGGGAACATCATCGGCGGTGGTCTGCTGGTTGGGTTGACATAC TGGGTCAATTTACCTGCGTGGCGACGACCATCACTAAGGGTTGTTTCAGGCAGTAAATAAAAAA TCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTACAGCAGCAGGACGTT ATTACTC
11	Ko_pflB_FP1 – ATCGGATCCGGGTCAACTGGCGAAAAAAGTGGCTCAACGT
12	Ko_pflB_RP1 – GAGTAATAACGTCCTGCTGCTGTAACTTTCATTAAGCTCGGACAT
13	ATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTACAGCAGCAGGACGTTATTACTCGTACCTTCACTCAGACC ATGTAATGGTATTGACTGAAATCGTACAGTAAAAAGCGTACAATAAAGGCTCCACGCAAGTGG GGCCTTTTTAGCAATATCATCCTGCCCCAGTCTCTTTTGTCTGCTGTCTATACTTTATGGATAA CAGCCAAAACAGACTCGACATAGCCTTTGAGCTGTGCATCTACATAGGCCCCGGATGGGCCA AATTCGGAGATATCACCGCAATGTCAACAATTGGTCGCATTCACTCCTTTGAATCCTGTGGCA CCGTCGATGGCCCGGGGATTGCTTTATCACCTTCTTCCAGGGCTGCCTGATGCGCTGCCTC TATTGCCACAACCGCGATACCTGGGATACCCACGGCGGCAAAGAGATTACCGTTGAAGAGCT GATGAAAGAGGTGGTGACCTATCGCCACTTTATGAACGCTTCCGGCGGCGGCGTGACGGCA TCCGGCGGCGAGGCTATCCTGCAGGCCGAATTTGTTGCGGACTGGTTCCGCGCCTGTAAGA AAGAAGGTATTCATACCTGTCTCGATACCAACGGCTTTGTGCGCCGCTACGATCCGGTTATTG ATGAACTGCTGGAGGTCACCGACCTGGTGATGCTCGATCTCAAGC

14	Ko_pflB_FP2 – ATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTACAGCAGCAGGACGTTATTACTC
15	Ko_pflB_RP2 – ACTGCGGCCGCGCTTGAGATCGAGCATCACCAGGTCGGTGA
16	GGGTCAACTGGCGAAAACTGGCTCAACGTCTATGTTGGTAACCTGATTGGTTGCTTACTGTT TGTATTGCTGATGTGGCTTTCAGGCGAATATATGACTGCCAACGGTCAATGGGGACTTAACGT TCTGCAAACCGCCGACCACAAAATGCACCATACTTTTGTGGAAGCCGTGTGCCTGGGTATCCT GGCAAACCTGATGGTCTGCCTTGCGGTATGGATGAGTTACTCCGGCCGTAGCCTGATGGATA AAGCCATGATTATGGTTTTACCGGTGGCAATGTTTGTGCGAGCGGGTTTGAGCACAGTATCG CGAACATGTTTATGATCCCGCTGGGTATCGTTATCCGCGACTTTGCAAGCCCGGAATTCTGGA CCGCAGTTGGTTCAACTCCGGAAGTTTCTCTCACCTGACCGTCATGAACTTCATCACTGATA ACCTGATTCCGGTAACTATCGGGAACATCATCGGCGGTGGTCTGCTGGTTGGGTGACATAC TGGGTCATTTACCTGCGTGGCGACGACCATCACTAAGGGTTGTTTCAGGCAGTAAATAAAAAA TCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTACAGCAGCAGGACGTT ATTACTCGTACCTTCACTCAGACCATGTAATGGTATTGACTGAAATCGTACAGTAAAAAGCGTA CAATAAAGGCTCCACGCAAGTGGGGCCTTTTTAGCAATATCATCCTGCCCCAGTCTCTTTTGT CTGCTGTCTATACTTTATGGATAACAGCCAAAACAGACTCGACATAGCCTTTGAGCTGTGCAT CTACATAGGCCCCGGATGGGCCAAATTCGGAGATATCACCGCAATGTCAACAATTGGTCGCA TTCCTCCTTTGAATCCTGTGGCACCGTCGATGGCCCGGGGATTGCTTTATCACCTTCTTCC AGGGCTGCCTGATGCGCTGCCTCTATTGCCACAACCGCGATACCTGGGATACCCACGGCGG CAAAGAGATTACCGTTGAAGAGCTGATGAAAGAGGTGGTGACCTATCGCCACTTTATGAACG CTTCGGCGGCGGCGGTGACGGCATCCGGCGGCGAGGCTATCCTGCAGGCCGAATTTGTTG GCGACTGGTTCGCGCCTGTAAGAAAGAAGGTATTCATACCTGTCTCGATACCAACGGCTTT GTGCGCCGCTACGATCCGGTTATTGATGAACTGCTGGAGGTCACCGACCTGGTGATGCTCG ATCTCAAGC

Sự phát triển của vi sinh vật tái tổ hợp

Mảnh ADN được tạo ra được chuyển sang *Klebsiella oxytoca* bằng cách sử dụng kỹ thuật xung điện (25 uF, 200 Ω , 18 kV/cm), và gen đích có thể được loại bỏ bằng cách sử dụng cơ chế tái tổ hợp của vi sinh vật.

Mảnh ADN bao gồm vùng tương đồng của gen *ldhA* được chuyển sang *Klebsiella oxytoca* thể tự nhiên để sản xuất *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp mà từ đó gen *ldhA* được loại bỏ (Ví dụ so sánh 2). Trong khi đó, sau khi gen *ldhA* được loại bỏ ra khỏi *Klebsiella oxytoca* thể tự nhiên, mảnh ADN bao gồm vùng tương đồng của gen *pflB* được chuyển để sản xuất *Klebsiella oxytoca* mà từ đó gen *pflB* được tiếp tục loại bỏ cùng với việc loại bỏ gen *ldhA* (Ví dụ 1).

Kỹ thuật xung điện được thực hiện, và vi sinh vật tái tổ hợp được nuôi cấy ở 30°C trong 1 giờ và được làm ổn định. Sau đó, vi sinh vật tái tổ hợp được nuôi cấy bằng cách phân bố chúng trên môi trường hỗn hợp rắn LB chứa chất kháng sinh (như kanamycin, chloramphenicol, và chất tương tự) tương ứng ở 37°C.

Sau đó, kỹ thuật PCR trực tiếp từ khuẩn lạc được thực hiện đối với khuẩn lạc được phát triển trên môi trường rắn, và gen tương ứng được xác nhận là được loại bỏ ra khỏi khuẩn lạc (FIG. 2 lần lượt minh họa việc loại bỏ *ldhA* và FIG. 3 minh họa việc loại bỏ *pflB*). Trong trường hợp này, để xác định gen *ldhA* được loại bỏ, PCR được thực hiện bằng đoạn mồi có SEQ ID NO: 17 và 18, và để xác định gen *pflB* được loại bỏ, PCR được thực hiện bằng đoạn mồi có SEQ ID NO: 19 và 20 (Bảng 2).

Bảng 2

SEQ ID NO .	Trình tự
17	Ko_ldhA_Sc_FP – CCATCTGCATCGTATCCGCTGGCTTAAT
18	Ko_ldhA_Sc_RP – GCTGAAGCGGTTGCACATATTACCTG
18	Ko_pflB_Sc_FP – ACCATCACTAAGGGTTGTTTCAGGCAGTAA
20	Ko_pflB_Sc_RP – GCTAAAAAGGCCCACTTGCGTGGAGCCTT

Trong thử nghiệm tiếp theo, *Klebsiella oxytoca* thể tự nhiên được sử dụng như trong Ví dụ so sánh 1. Trong khi đó, *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp mà từ đó gen *ldhA* và *adhE*

được tách ra được sản xuất bằng cách tiếp tục loại bỏ gen adhE từ *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp mà từ đó ldhA được tách ra theo Ví dụ so sánh 2, gen adhE là gen mã hóa enzym dehydro hóa rượu (enzym dehydrogenaza aldehyt/rượu) trực tiếp tham gia trong việc tạo ra etanol. *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp được sản xuất mà từ đó gen ldhA và adhE được tách ra được thử nghiệm như trong Ví dụ so sánh 3. Gen adhE được loại bỏ theo phương pháp tương tự như phương pháp loại bỏ gen ldhA hoặc gen pflB. Mảnh ADN bao gồm vùng tương đồng của gen adhE được chuyển sang *Klebsiella oxytoca* mà từ đó ldhA được loại bỏ, nhờ đó tạo ra *Klebsiella oxytoca* mà từ đó gen adhE được tiếp tục loại bỏ cùng với việc loại bỏ gen ldhA.

Ví dụ thực nghiệm 2

Quá trình nuôi cấy theo mẻ được thực hiện bằng cách sử dụng vi sinh vật của Ví dụ 1, Ví dụ so sánh 1 và 2 được tạo ra trong Ví dụ thực nghiệm 1 trên đây. Đầu tiên, chủng *Klebsiella oxytoca* được cấy truyền trong 250 ml môi trường hỗn hợp bao gồm 9 g/L glucoza (50 mM) và được nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ, và sau đó chất lỏng môi trường nuôi cấy được cấy truyền trong 3L của môi trường hỗn hợp và được nuôi cấy. Trong trường hợp này, quá trình lên men được thực hiện dưới điều kiện ít ư khí (tốc độ cấp khí 1 vvm và tốc độ khuấy trộn 150 vòng/phút), ở nồng độ glucoza ban đầu 90 g/L, độ pH là 6,8, và nhiệt độ nuôi cấy 37°C. Dung dịch NH₄OH 5N được sử dụng để kiểm soát độ pH trong quá trình lên men. Các mẫu đối với chủng *Klebsiella oxytoca* được lấy ra trong quá trình lên men, và tốc độ phát triển thu được bằng cách xác định mật độ quang 600 (OD 600) của các mẫu được lấy ra. Sau đó, các mẫu được lấy ra được ly tâm ở tốc độ 13,000 vòng/phút trong 10 phút, và chất chuyển hóa của các chất trên bề mặt và nồng độ 2,3-butandiol của nó được phân tích bằng sắc ký lỏng (HPLC).

Kết quả là, trong chủng của Ví dụ so sánh 2, lượng sản xuất 2,3-butandiol là 29,91 g/L, và hiệu suất quá trình sản xuất 2,3-butandiol (gam của 2,3-butandiol/gam của glucoza) 0,32. Ngoài ra, trong chủng của Ví dụ so sánh 2, năng suất (g/L/h) của 2,3-butandiol là 1,07, và độ chọn lọc của nó 59%. Khi so với Ví dụ so sánh 1 mà là *Klebsiella oxytoca* thể tự nhiên, chủng tái tổ hợp của Ví dụ so sánh 2 được xác định là nâng cao tất cả các thông số về của nồng độ quá trình sản xuất, hiệu suất quá trình sản xuất, năng suất và độ chọn lọc đối với 2,3-butandiol đồng thời làm giảm sự tạo ra axit lactic và tăng khả năng sản xuất 2,3-

butandiol. Tuy nhiên, *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của Ví dụ so sánh 2 vẫn sản xuất lượng rất lớn của các sản phẩm phụ bao gồm axit formic và etanol, điều này được xem là nguyên nhân gây ra sự ức chế nồng độ quá trình sản xuất, hiệu suất quá trình sản xuất, độ chọn lọc, và các yếu tố tương tự, đối với 2,3-butandiol của Ví dụ so sánh 2 (FIG. 4 minh họa Ví dụ so sánh 1, và FIG. 5 minh họa Ví dụ so sánh 2).

Trong khi đó, khi so với Ví dụ so sánh 2 (*Klebsiella oxytoca* Δ ldhA, 2,3-BDO 29,91 g/L), trong chủng tái tổ hợp của Ví dụ 1, lượng sản xuất 2,3-butandiol được tăng lên đến $39,17 \pm 1,51$ g/L. Ngoài ra, trong chủng tái tổ hợp của Ví dụ 1 lượng axit formic tạo ra được xác định là giảm đến 90% hoặc lớn hơn, và lượng etanol tạo ra giảm đến 73% hoặc lớn hơn, và hiệu suất quá trình sản xuất 2,3-butandiol (gam của 2,3-butandiol/gam của glucoza) cũng tăng một cách đáng kể từ 0,32 đến 0,45. Do đó, hiệu suất trên lý thuyết tạo ra 2,3-butandiol (hiệu suất với giả thiết rằng tất cả lượng glucoza được cấp cho *Klebsiella oxytoca* được chuyển hóa thành thành 2,3-butandiol) là 0,5, hiệu suất của Ví dụ 1 (hiệu suất trên lý thuyết của nó là 90%) là rất cao.

Do đó, có thể xác định được rằng việc tạo ra các sản phẩm phụ được giảm một cách đáng kể, và 2,3-butandiol được sản xuất với độ tinh khiết cao bằng cách loại bỏ đồng thời các sản phẩm phụ như axit formic, etanol, và chất tương tự, thông qua việc loại bỏ ldhA và gen pflB. Do đó, có thể xác định được rằng việc loại bỏ gen (*ldhA*) mã hóa enzyme dehydro hóa axit lactic (lactat dehydrogenaza) của *Klebsiella oxytoca* và gen (*pflB*) mã hóa pyruvat-format lyaza có vai trò rất quan trọng đối với quá trình sản xuất 2,3-butandiol trong các giai đoạn khác nhau của các con đường tạo ra 2,3-butandiol (FIG. 6) (Bảng 3).

Bảng 3

Chủng	2,3-butandiol				Nồng độ (g/L) của các sản phẩm phụ				
	Nồng độ (g/L)	Hiệu suất tạo ra (g/g)	Năng suất (g/L/h)	Độ chọn lọc (%)	Lactat	Axit succinic	Etanol	Axit formic	Axit axetic
Ví dụ so sánh 1	17,31	0,18	0,58	27	32,20	1,92	1,61	3,88	1,27
Ví dụ so sánh 2	29,91	0,32	1,07	59	1,93	2,27	3,54	6,11	0,92
Ví dụ 1	$39,17 \pm 1,51$	0,45	$0,43 \pm 0,02$	$83,33 \pm 1,53$	3,24	1,77	0,53	0,97	0,15

Ví dụ thực nghiệm 3

Việc xác định liệu khả năng sản xuất 2,3-butandiol tăng hay giảm được thực hiện tại thời điểm loại bỏ gen tham gia vào việc tạo ra các sản phẩm phụ so với sự sinh tổng hợp 2,3-butandiol trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol. *AdhE* là gen mã hóa enzym dehydro hóa rượu (enzym dehydrogenaza aldehyt/rượu) trực tiếp tham gia trong việc tạo ra etanol mà là sản phẩm phụ trong quá trình sản xuất 2,3-butandiol. Do đó, *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của Ví dụ so sánh 3 mà từ đó *ldhA* và *adhE* được loại bỏ được nuôi cấy và so sánh với với vi sinh vật của Ví dụ 1. Trong trường hợp này, điều kiện nuôi cấy của vi sinh vật tái tổ hợp của Ví dụ so sánh 3 là giống với điều kiện nuôi cấy của Ví dụ thực nghiệm 2.

Kết quả là, trong Ví dụ so sánh 3 mà từ đó *ldhA* và *adhE* được loại bỏ một cách đồng thời ra khỏi *Klebsiella oxytoca*, lượng sản xuất 2,3-butandiol giảm xuống đến 25,96g/L khi so với Ví dụ so sánh 2 (*Klebsiella oxytoca* Δ *ldhA*, 2,3-BDO 29.91 g/L). Ngoài ra, trong Ví dụ so sánh 3, hiệu suất quá trình sản xuất 2,3-butandiol là 0,27, thấp hơn so với hiệu suất của Ví dụ so sánh 2 (0,32), và độ chọn lọc của nó là 55%, thấp hơn độ chọn lọc của Ví dụ so sánh 2 (59%), và năng suất (g/L/h) là 0,36, thấp hơn đáng kể so với năng suất của Ví dụ so sánh 2 (1.07). Hơn nữa, trong Ví dụ so sánh 3, lượng etanol tạo ra giảm khi so với Ví dụ so sánh 2; tuy nhiên, khả năng tạo ra 2,3-butandiol lại giảm.

Ngoài ra, mặc dù được so sánh với với Ví dụ 1, tuy nhiên cần phải hiểu rằng khả năng tạo ra 2,3-butandiol của Ví dụ so sánh 3 bị giảm một cách đáng kể (Bảng 4). Do đó, có thể xác định được rằng mặc dù gen tham gia vào việc tạo ra các sản phẩm phụ được loại bỏ, tuy nhiên nó không tạo thuận lợi cho quá trình sản xuất 2,3-butandiol.

Bảng 4

Chủng	2,3-butandiol				Nồng độ (g/L) của các sản phẩm phụ				
	Nồng độ (g/L)	Hiệu suất tạo ra (g/g)	Năng suất (g/L/h)	Độ chọn lọc (%)	Lactat	Axit succinic	Etanol	Axit formic	Axit axetic
Ví dụ so sánh 1	17,31	0,18	0,58	27	32,20	1,92	1,61	3,88	1,27
Ví dụ so sánh 2	29,91	0,32	1,07	59	1,93	2,27	3,54	6,11	0,92
Ví dụ so sánh 3	25,96	0,27	0,36	55	2,71	2,32	0,89	4,13	6,43
Ví dụ 1	39,17 ± 1,51	0,45	0,43 ± 0,02	83,33 ± 1,53	3,24	1,77	0,53	0,97	0,15

Ví dụ thực nghiệm 4: Sự thay đổi trong quá trình sản xuất 2,3-butandiol theo sự thay đổi về lượng oxy cấp vào

Tác động của sự thay đổi về lượng oxy hòa tan lượng trong môi trường phụ thuộc vào tốc độ khuấy trộn trong bước nuôi cấy, đối với hiệu suất quá trình sản xuất, năng suất, và độ chọn lọc đối với 2,3-butandiol được đánh giá bằng cách sử dụng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của Ví dụ 1.

Đầu tiên, vi sinh vật tái tổ hợp của Ví dụ 1 được cấy truyền trong 250 ml của môi trường hỗn hợp bao gồm 9 g/L glucoza (50 mM) và được nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ. Sau đó, chất lỏng môi trường nuôi cấy thu được được cấy truyền trong 3L của môi trường hỗn hợp, và quá trình lên men theo mẻ (gián đoạn) được thực hiện. Quá trình lên men này được thực hiện dưới điều kiện ít ư khí (tốc độ cấp khí 1 vvm), ở nồng độ glucoza ban đầu là 90 g/L, độ pH là 6,8, và nhiệt độ nuôi cấy 37°C, tại các tốc độ khuấy khác nhau, ví dụ, 150 vòng/phút, 250 vòng/phút, 350 vòng/phút, và 450 vòng/phút. Dung dịch NH₄OH 5N được sử dụng để kiểm soát độ pH trong quá trình lên men. Các mẫu đối với chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp được lấy ra trong quá trình lên men, và tốc độ phát triển thu được bằng cách xác định mật độ quang 600 (OD 600) của các mẫu được lấy ra. Sau đó, các mẫu được lấy ra được ly tâm ở tốc độ 13,000 vòng/phút trong 10 phút, và chất chuyển hóa của các chất trên bề mặt và nồng độ 2,3-butandiol (2,3-BDO) của nó được phân tích bằng sắc ký lỏng (HPLC).

Kết quả là, trong chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của Ví dụ 1, năng suất tạo ra 2,3-butandiol (g/L/h) thay đổi rất nhiều phụ thuộc vào sự thay đổi trong tốc độ khuấy trộn. Cụ thể là, có thể xác định được rằng tại thời điểm khuấy trộn ở tốc độ khuấy trộn là 450 vòng/phút, năng suất tạo ra 2,3-butandiol tăng 5 lần hoặc lớn hơn khi so với khuấy trộn ở tốc độ khuấy trộn là 150 vòng/phút (Bảng 5, FIG. 7 đến 11). Có thể xác định được rằng sự thay đổi về lượng oxy cấp vào phụ thuộc vào tốc độ khuấy trộn là could improve năng suất của Ví dụ 1.

Bảng 5

Tốc độ khuấy trộn (vòng/phút)	2,3-Butandiol			
	Nồng độ (g/L)	Hiệu suất tạo ra (g/g)	Năng suất (g/L/h)	Độ chọn lọc (%)
150	39,17 ± 1,51	0,45	0,43 ± 0,02	83,33 ± 1,53
250	33,51 ± 0,23	0,39 ± 0,01	0,77 ± 0,02	84
350	31,39 ± 1,68	0,37 ± 0,02	1,40 ± 0,12	80 ± 1,00
450	30,79 ± 1,46	0,35 ± 0,02	2,71 ± 0,21	84 ± 4,58

Ví dụ thực nghiệm 5 Quá trình sản xuất 2,3-butandiol bằng quá trình lên men theo mẻ bổ sung cơ chất dưới điều kiện ưa khí (khuấy trộn ở tốc độ khuấy trộn là 450 vòng/phút)

Quá trình lên men theo mẻ bổ sung cơ chất đối với quá trình sản xuất 2,3-butandiol được thực hiện bằng cách sử dụng chủng của Ví dụ 1 đồng thời duy trì tốc độ khuấy trộn là 450 vòng/phút mà nâng cao năng suất nhất dựa trên kết quả của Ví dụ thực nghiệm 4.

Đầu tiên, chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của Ví dụ 1 được cấy truyền trong 250 ml của môi trường hỗn hợp bao gồm 9 g/L glucoza (50 mM) và được nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ, và sau đó chất lỏng môi trường nuôi cấy thu được được cấy truyền trong 3L của môi trường hỗn hợp và quá trình nuôi cấy theo mẻ bổ sung cơ chất được thực hiện. Trong trường hợp này, quá trình lên men được thực hiện dưới điều kiện ít ưa khí (tốc độ cấp khí 1 vvm), ở nồng độ glucoza ban đầu 90 g/L, độ pH là 6,8, và nhiệt độ nuôi cấy 37°C. Tốc độ khuấy trộn tiếp tục được duy trì ở 450 vòng/phút. Dung dịch NH₄OH 5N được sử dụng để kiểm soát độ pH trong quá trình lên men. Nếu glucoza nồng độ giảm xuống đến 10 g/L hoặc thấp hơn trong quá trình lên men, dung dịch glucoza 700 g/L hoặc lớn hơn được bổ sung thêm. Mẫu đối với chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp được lấy ra trong quá trình lên men, và tốc

độ phát triển thu được bằng cách xác định mật độ quang 600 (OD 600) của mẫu được lấy ra. Sau đó, mẫu được lấy ra được ly tâm ở tốc độ 13,000 vòng/phút trong 10 phút, và chất chuyển hóa của chất nền bề mặt và nồng độ 2,3-butandiol của nó được phân tích bằng sắc ký lỏng (HPLC).

Kết quả là, có thể xác định được rằng nếu tốc độ khuấy trộn tiếp tục được duy trì ở 450 vòng/phút, khả năng tạo ra 2,3-butandiol không được duy trì một cách liên tục (Bảng 6). Cụ thể, có thể xác định được rằng nếu nồng độ của axetoin vượt quá 10 g/L, thì khả năng tạo ra 2,3-butandiol bị giảm một cách đáng kể (FIG. 12). Tuy nhiên cần phải hiểu rằng tốc độ khuấy trộn của quá trình nuôi cấy theo mẻ bổ sung cơ chất cần phải được kiểm soát dựa trên kết quả của quá trình nuôi cấy theo mẻ bổ sung cơ chất được thực hiện ở tốc độ khuấy trộn được duy trì ở 450 vòng/phút, và thời điểm để kiểm soát tốc độ khuấy trộn cần phải được xác định dựa trên nồng độ của axetoin được tích tụ.

Bảng 6

Chủng	2,3-Butandiol						
	Nồng độ (g/L)	Năng suất (g/L/h)	Hiệu suất tạo ra (g/g)	Độ chọn lọc (%)	Axetoin (g/L)	Axit succinic (g/L)	Axit axetic (g/L)
Ví dụ 1	57,7	1,65	29	63	13,44	12,38	5,32

Ví dụ thực nghiệm 6: Quá trình sản xuất 2,3-butandiol bằng quá trình lên men theo mẻ bổ sung cơ chất

Chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của Ví dụ 1 được cấy truyền trong 250 ml của môi trường hỗn hợp bao gồm 9 g/L glucoza (50 mM) và được nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ. Sau đó, chất lỏng môi trường nuôi cấy thu được được cấy truyền trong 3L của môi trường hỗn hợp, và quá trình nuôi cấy theo mẻ bổ sung cơ chất được thực hiện. Trong trường hợp này, quá trình lên men được thực hiện dưới điều kiện ít ư khí (tốc độ cấp khí 1 vvm), ở nồng độ glucoza ban đầu 90 g/L, độ pH là 6,8, nhiệt độ nuôi cấy 37°C, và tốc độ khuấy trộn là 450 vòng/phút. Dung dịch NH₄OH 5N được sử dụng để kiểm soát độ pH trong quá trình lên men. Nếu glucoza nồng độ giảm xuống đến 10 g/L hoặc thấp hơn trong quá trình lên men, dung dịch glucoza 700 g/L hoặc lớn hơn được bổ sung thêm. Ngoài ra, ở thời điểm mà là nồng độ của axetoin mà là một trong số các sản phẩm phụ, 7 g/L, quá trình lên men

được thực hiện bằng cách thay đổi tốc độ khuấy trộn từ 450 vòng/phút thành 350 vòng/phút. Mẫu đối với chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp được lấy ra trong quá trình lên men, và tốc độ phát triển thu được bằng cách xác định mật độ quang 600 (OD 600) của mẫu được lấy ra. Sau đó, mẫu được lấy ra được ly tâm ở tốc độ 13,000 vòng/phút trong 10 phút, và chất chuyển hóa của chất nổi bề mặt và nồng độ 2,3-butandiol của nó được phân tích bằng sắc ký lỏng (HPLC).

Kết quả là, khi so với quá trình nuôi cấy theo mẻ bổ sung cơ chất được thực hiện bằng cách duy trì tốc độ khuấy trộn ổn định tại 450 vòng/phút trong Ví dụ thực nghiệm 5, tất cả các thông số về nồng độ, năng suất, hiệu suất, và độ chọn lọc đối với 2,3-butandiol tăng ở mức độ rất lớn lần lượt là 74,5%, 29,7%, 55,2%, và 27,0%. Do đó, có thể xác định được rằng quá trình sản xuất 2,3-butandiol bằng cách sử dụng chủng tái tổ hợp của Ví dụ 1 bị ảnh hưởng rất nhiều bằng cách kiểm soát lượng oxy hòa tan lượng phụ thuộc vào tốc độ khuấy trộn. Do đó, năng suất tạo ra 2,3-butandiol được xác định là được nâng cao bằng cách kiểm soát tốc độ khuấy trộn để kiểm soát lượng oxy hòa tan lượng trong môi trường nuôi cấy (Bảng 7, FIG. 13).

Bảng 7

Chủng	2,3-Butandiol					
	Nồng độ (g/L)	Năng suất (g/L/h)	Độ chọn lọc (%)	Axetoin (g/L)	Axit succinic (g/L)	Axit axetic (g/L)
Ví dụ 1	100,66	2,14	80	5,19	14,76	2,73

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic, hoặc con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat bị ức chế trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA và lactat, , trong đó vi sinh vật là *Klebsiella*. Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể sản xuất 2,3-butandiol với nồng độ và độ chọn lọc cao.

<110> GS CALTEX CORPORATION

<120> VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT 2,3-BUTANDIOL
GIA TĂNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT 2,3-BUTANDIOL BẰNG CÁCH SỬ
DỤNG VI SINH VẬT NÀY

<130> DOP130178PCT

<150> 10-2013-0028884

<151> 2013-03-18

<150> 10-2013-0114791

<151> 2013-09-26

<160> 20

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 990

<212> ADN

<213> Klebsiella oxytoca

<400> 1

atgaaaatcg ctgtgtatag tacaaaacag tacgacaaga agtatctgca gcatgttaat	60
gatgcatatg gctttgaact ggagtttttt gacttcctgc taaccgaaaa aaccgccaaa	120
accgccaacg gctgtgaagc ggtgtgtatc ttcgtaaacy atgacggtag ccgcccggta	180
cttgaagaac tgaaagccca cggcgtgcag tacatcgcgc tgcgctgcgc ggggttcaac	240
aacgttgacc tcgatgccgc caaagagctg ggccctgcggg tgggtgcgcgt cccggcctac	300
tcgccggaag cggtcgctga gcacgcgacg ggcatgatga tgcgctgaa ccgccgcatt	360
caccgtgcct atcagcgcac ccgcgacgcg aacttctctc tggaagggct gaccggtttc	420
accatgcacg gtaaaaccgc cggcgttatt ggcaccggta aaatcggcgt cgccgcgctg	480
cgcattctta aaggcttcgg tatgctctg ctggcgtttg atccctaccc aagcgccgcc	540
gcgctggata tgggcgtgga gtatgtcgat cttgaaaccc tgtaccggga gtccgatgtt	600
atctcactgc actgccact gaccgatgaa aactaccatt tgctgaacca tgccgcgttc	660
gatcgcatga aagacggggt gatgatcatc aacaccagcc gcggcgcgct catcgattcg	720
caggcagcga tcgacgccct gaagcatcag aaaattggcg cgctggggat ggacgtgtat	780
gagaacgaac gcgatctgtt ctttgaagat aagtctaag acgtgattca ggatgatgtg	840
ttccgccgtc tctccgcctg ccataacgtc ctgtttaccg gtcaccaggc gtttctgacc	900
gcggaagcgt tgatcagcat ttcgcaaacc accctcgaca acctgcgtca agtggatgca	960
ggcgaaacct gtcctaacgc actggtctga	990

<210> 2

<211> 595

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tương đương của gen ldhA

<400> 2

atgacgttcg ctaaactctg cgccgtcatc tcgctgctga tcccgggcac ctccgggcta	60
ctgctgttcg gcaccctggc atcgccacgc ccgggacatt tcctgttaat gtggatgagc	120
gccagcctcg gcgctatcgg cggattctgg ctctcgtggc tgacgggcta ccgctaccgg	180
taccatctgc atcgatccg ctggcttaat gccgaacgcc tcgctcgcgg ccagttgttc	240
ctgcgccgcc acggcgctg ggcagtcttt tttagccgct ttctctctcc gcttcgcgcc	300
accgtgccgc tggtaacggc cgccagcggc acctctctct ggcagtttca gctcgccaac	360
gtcagctccg ggctgctctg gccgctgac ctgctggcgc caggcgctt aagcctcagc	420
ttttgatgaa aggtattgtc ttttaaagag atttcttaac accgcgatat gctctagaat	480
tattactata acctgctgat taaactagtt ttttaacattt gtaagattat ttttaattatg	540
ctaccgtgac ggtattatca ctggagaaaa gtcttttttc cttgcccttt tgtgc	595

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 3

cacggatcca tgacgttcgc taaatcctgc 30

<210> 4

<211> 40

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 4

gcacaaaagg gcaaggaaaa aagacttttc tccagtata 40

<210> 5

<211> 591

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tương đương của gen ldhA

<400> 5

tatcactgga gaaaagtctt ttttccttgc ccttttgtgc tcccccttcg cggggggcac	60
attcagataa tccccacaga aattgcctgc gataaagtta caatcccttc atttattaat	120
acgataaata tttatggaga tttaatgaac aagtatgctg cgctgctggc ggtgggaatg	180
ttgctatcgg gctgcgttta taacagcaag gtgtcgacca gagcggaaca gcttcagcac	240
caccgttttg tgctgaccag cgttaacggg cagccgctga atgccgcgga taagccgcag	300
gagctgagct tcggcgaaaa gatgccatt acgggcaaga tgtctgtttc aggtaatatg	360
tgcaaccgct tcagcggcac gggcaaagtc tctgacggcg agctgaaggt tgaagagctg	420
gcaatgaccc gcatgctctg cacggactcg cagcttaacg ccctggacgc cacgctgagc	480
aaaatgctgc gcgaaggcgc gcaggtcgac ctgacggaaa cgcagctaac gctggcgacc	540
gccgaccaga cgctggtgta taagctcgcc gacctgatga attaataatt a	591

<210> 6

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 6

tatcactgga gaaaagtctt ttttccttgc ccttttgtgc 40

<210> 7

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 7

cctgcggcgc ctaattatta attcatcagg tc 32

<210> 8

<211> 1146

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mãnh ADN

<400> 8

atgacgttcg ctaaatacctg cgcgcgtcatc tcgctgctga tcccggggcac ctccggggcta	60
ctgctgttcg gcaccctggc atcggccagc cggggacatt tcctgttaat gtggatgagc	120
gccagcctcg gcgctatcgg cggattctgg ctctcgtggc tgacggggcta ccgctaccgg	180
taccatctgc atcgtatccg ctggcttaat gccgaacgcc tcgctcgcgg ccagttgttc	240
ctgcgccgcc acggcgcgctg ggcagtcttt tttagccgct ttctctctcc gcttcgcgcc	300
accgtgccgc tggttaaccgg cgcagcggc acctctctct ggagtttca gctcgccaac	360
gtcagctccg ggctgctctg gccgctgac ctgctggcgc caggcgcggt aagcctcagc	420
ttttgatgaa aggtattgtc ttttaaagag atttcttaac accgcgatat gctctagaat	480
tattactata acctgctgat taaactagtt ttttaacattt gtaagattat ttttaattatg	540
ctaccgtgac ggtattatca ctggagaaaa gtcttttttc cttgcccttt tgtgctcccc	600
cttcgcgggg ggcacattca gataatcccc acagaaattg cctgcgataa agttacaatc	660
ccttcattta ttaatacgat aaatatattat ggagattaaa tgaacaagta tgctgcgctg	720
ctggcggtgg gaatgttgct atcgggctgc gtttataaca gcaagggtgc gaccagagcg	780
gaacagcttc agcaccaccg ttttgtgctg accagcgta acgggcagcc gctgaatgcc	840
gcggataagc cgcaggagct gagcttcggc gaaaagatgc ccattacggg caagatgtct	900
gtttcaggtg atatgtgcaa ccgcttcagc ggcacgggca aagtctctga cggcgagctg	960
aagggtgaag agctggcaat gacccgcatg ctctgcacgg actcgcagct taacgcctg	1020
gacgccacgc tgagcaaaat gctgcgcgaa ggcgcgcagg tcgacctgac ggaaacgcag	1080
ctaacgctgg cgaccgccga ccagacgctg gtgtataagc tcgccgacct gatgaattaa	1140
taatta	1146

<210> 9

<211> 2283

<212> ADN

<213> Klebsiella oxytoca

<400> 9

atgtccgagc ttaatgaaaa gttagccaca gcctgggaag gttttgcgaa aggtgactgg	60
cagaacgaag tcaacgtccg cgacttcac cagaaaaact ataccccgta cgaagggtgac	120
gagtccttcc tggctggcgc aactgacgcg accaccaagc tgtgggacac cgtaatggaa	180
ggcgtaaacc aggaaaaccg cactcacgcg cctgttgatt ttgatacttc ccttgcaccc	240
accatcactt ctcatgacgc tggctacac gagaaaggtc tcgagaaaat cgttggtctg	300
cagactgaag ctccgctgaa acgcgcgatt atcccgttcg gcggcatcaa aatggtcgaa	360
ggttcctgca aagcgtacga tcgcgagctg gacccgatgc tgaagaaaat cttcactgaa	420
taccgtaaaa ctcaaacca gggcgtgttt gacgtttaca ccaaagacat cctgaactgc	480
cgtaaactctg gtgttctgac cggctctgccg gatgcctatg gccgtggctcg tatcatcggc	540
gactaccgtc gcgttgcgct gtacggtatc gacttcctga tgaaagacaa atacgctcag	600
ttcgtttctc tgcaagagaa actggaaaac ggcgaagatc tggaagcaac catccgtctg	660
cgcgaagaaa tctctgaaca gcaccgcgcg ctgggtcaga tcaaagaaat ggcggctaaa	720

tatggctgcg atatctctgg tcctgctacc accgctcagg aagctatcca gtggacctac	780
ttcggttacc tggctgccgt aaaatctcag aacggcgccg caatgtcctt cggtcgtacc	840
tccagcttcc tggacatctt catcgaacgt gacctgaaag ccggtaaaat caccgagcaa	900
gacgcacagg aaatgattga ccacctggtc atgaaactgc gtatggttcg tttcctgctg	960
accctgaat atgatgaact gttctctggc gacctgatct gggcaacaga atctatcggc	1020
ggtatgggcg ttgacggccg tactctggtc accaaaaaca gcttccgttt cctgaacacc	1080
ctgtacacca tggggccgct tccggagccg aacatcacca ttctgtggtc tgaaaaactg	1140
ccgctgagct tcaaaaaata cgccgcgaaa gtgtccatcg atacctcttc tctgcagtac	1200
gagaacgatg acctgatgcg tcctgacttc aacaacgatg actacgctat cgcttgctgc	1260
gtaagcccga tggttgttgg taagcaaatg cagttcttcg gcgcgcgtgc taacctggcg	1320
aaaaccatgc tgtacgcaat caacggcggc gttgatgaaa aactgaaaat gcaggttggt	1380
cctaaatctg aaccgatcaa aggcgacgtt ctgaacttcg acgaagtgat ggaccgcatg	1440
gatcacttca tggactggct ggctaaacag tacgtcactg cgctgaacat catccactac	1500
atgcacgaca agtacagcta cgaagcttcc ctgatggcgc tgcacgaccg tgatgttacc	1560
cgcaccatgg catgtggtat cgcaggctct tccgttgccg ctgactccct gtctgcaatc	1620
aaatatgcga aagttaaacc gattcgtgac gaaaacggtc tggctgtcga cttcgaaatc	1680
gaaggcgaat acccgagtt tggttaacaac gactctcgcg tcgatgatat ggccgttgac	1740
ctggttgaac gtttcatgaa gaaaattcag aaactgcaca cctaccgcaa cgctatcccg	1800
actcagtccg ttctgaccat cacctctaac gttgtgtatg gtaagaaaac cggcaacacc	1860
cctgacggtc gtcgcgctgg cgctccgttc ggaccagggtg ctaaccgat gcacggccgt	1920
gaccagaaag gcgctgttgc ctctctgacc tccgttgcaa aactgccgtt tgcttacgcg	1980
aaagatggta tttcttacac cttctctatc gtgccgaacg cgctgggtaa agacgacgaa	2040
gttcgtaaaa ctaacctcgc cggcctgatg gatggttact tccaccacga agcgtccatc	2100
gaaggcggtc agcatctgaa cgtcaacgtt atgaaccgcg aaatgctgct cgacgcgatg	2160
gaaaaccggg aaaaatatcc gcagctgacc atccgcgtat ccggctacgc agtacgtttt	2220
aactccctga ctaaagaaca gcagcaggac gttattactc gtaccttcac tcagaccatg	2280
taa	2283

<210> 10

<211> 635

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tương đương của gen pflB

<400> 10

gggtcaactg gcgaaaaact ggctcaacgt ctatgttggt aacctgattg gttgcttact	60
gtttgtattg ctgatgtggc tttcaggcga atatatgact gccaacggtc aatggggact	120
taacgttctg caaacgcgcg accacaaaat gcaccatact tttgttgaag ccgtgtgcct	180
gggtatcctg gcaaacctga tgggtctgcct tgcggtatgg atgagttact ccggccgtag	240
cctgatggat aaagccatga ttatggtttt accggtggca atgtttgttg ccagcgggtt	300
tgagcacagt atcgcgaaaca tgtttatgat cccgctgggt atcgttatcc gcgactttgc	360
aagcccggaa ttctggaccg cagttgggtc aactccggaa agtttctctc acctgaccgt	420
catgaacttc atcactgata acctgattcc ggtaactatc gggaacatca tcggcggtgg	480
tctgctgggt gggttgacat actgggtcat ttacctgcgt ggcgacgacc atcactaagg	540
gttgtttcag gcagtaaata aaaaatccac ttaagaaggt aggtgttaca tgtccgagct	600
taatgaaaag ttacagcagc aggacgttat tactc	635

<210> 11

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 11

atcggatccg ggtcaactgg cgaaaaactg gctcaacgt 39

<210> 12

<211> 46

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 12

gagtaataac gtctgctgc tgtaactttt catlaagctc ggacat 46

<210> 13

<211> 669

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tương đương của gen pflB

<400> 13

atgtccgagc ttaatgaaaa gttacagcag caggacgtta ttactcgtac cttcactcag	60
accatgtaat ggtattgact gaaatcgtac agtaaaaagc gtacaataaa ggctccacgc	120
aagtggggcc ttttttagcaa tatcatcctg ccccagtctc ttttgtctgc tgtctatact	180
ttatggataa cagccaaaac agactcgaca tagcctttga gctgtgcatc tacataggcc	240
ccggatgggc caaatcggga gatatcaccg caatgtcaac aattggtcgc attcactcct	300
ttgaatcctg tggcaccgtc gatggcccgg ggattcgctt tatcaccttc ttccagggct	360
gcctgatgcg ctgcctctat tgccacaacc gcgatacctg ggataccac gccggcaaag	420
agattaccgt tgaagagctg atgaaagagg tggtagccta tcgccacttt atgaacgctt	480
ccggcggcgg cgtgacggca tccggcggcg aggctatcct gcaggccgaa tttgttcgcg	540
actgggtccg cgctgtaag aaagaaggta ttcatacctg tctcgatacc aacggctttg	600
tgcgccgcta cgatccggtt attgatgaac tgctggaggt caccgacctg gtgatgctcg	660
atctcaagc	669

<210> 14

<211> 46

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 14

atgtccgagc ttaatgaaaa gttacagcag caggacgtta ttactc 46

<210> 15

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 15

actgcggccg cgcttgagat cgagcatcac caggtcggtg a 41

<210> 16

<211> 1258

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mảnh ADN

<400> 16

gggtcaactg gcgaaaaact ggctcaacgt ctatgttggg aacctgattg gttgcttact	60
gtttgtattg ctgatgtggc tttcaggcga atatatgact gccaacgggc aatggggact	120
taacgttctg caaacccgccc accacaaaat gcaccatact tttgttgaag ccgtgtgcct	180
gggtatcctg gcaaacctga tggctctgcct tgcggtatgg atgagttact ccggccgtag	240
cctgatggat aaagccatga ttatggtttt accggtggca atgtttgttg ccagcgggtt	300
tgagcacagt atcgcaaca tgtttatgat cccgctgggt atcgttatcc gcgactttgc	360
aagcccggaa ttctggaccg cagttgggtc aactccggaa agtttctctc acctgaccgt	420
catgaacttc atcactgata acctgattcc ggtaactatc gggaacatca tcggcgggtg	480
tctgctggtt ggggtgacat actgggtcat ttacctgcgt ggcgacgacc atcactaagg	540
gttgtttcag gcagtaaata aaaaatccac ttaagaagg aggtgttaca tgtccgagct	600
taatgaaaag ttacagcagc aggacgttat tactcgtacc ttcactcaga ccatgtaatg	660
gtattgactg aaatcgtaca gtaaaaagcg tacaataaag gctccacgca agtggggcct	720
ttttagcaat atcatcctgc cccagtctct tttgtctgct gtctatactt tatggataac	780
agccaaaaca gactcgacat agcctttgag ctgtgcatct acataggccc cggatgggcc	840
aaattcggag atatcaccgc aatgtcaaca attggtcgca ttcactcctt tgaatcctgt	900
ggcaccgtcg atggcccggg gattcgcttt atcaccttct tccagggctg cctgatgcgc	960
tgctctatt gccacaaccg cgatacctgg gataccacg gcggcaaaga gattaccgtt	1020
gaagagctga tgaaagagg ggtgacctat cgccacttta tgaacgcttc cggcggcggc	1080
gtgacggcat ccggcggcga ggctatcctg caggccgaat ttgttcgca ctggttccgc	1140
gcctgtaaga aagaaggat tcatacctgt ctcgatacca acggctttgt gcgccgtac	1200
gatccggtta ttgatgaact gctggaggtc accgacctgg tgatgctcga tctcaagc	1258

<210> 17

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 17

ccatctgcat cgtatccgct ggcttaat 28

<210> 18

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 18

gctgaagcgg ttgcacatat tacctg 26

<210> 19

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 19

accatcacta aggggtgttt caggcagtaa 30

<210> 20

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn môi

<400> 20

gctaaaaagg cccacttgc gtggagcctt 30

Yêu cầu bảo hộ

1. Vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic, hoặc con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat bị ức chế trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA và lactat, và vi sinh vật này là *Klebsiella*.
2. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, và con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic bị ức chế bằng cách ức chế enzym pyruvat-format lyaza.
3. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat bị ức chế bằng cách ức chế enzym lactat dehydrogenaza.
4. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó cả hai *pflB* và *ldhA* bị xóa bỏ hoặc bị ức chế, *pflB* là gen mã hóa enzym pyruvat-format lyaza và *ldhA* là gen mã hóa enzym lactat dehydrogenaza.
5. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó gen mã hóa enzym chuyển hóa axetyl-CoA thành etanol không bị xóa bỏ tách ra.
6. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó độ chọn lọc đối với 2,3-butandiol là 70% hoặc lớn hơn trên cơ sở quá trình nuôi cấy theo mẻ.
7. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol là 0,35g/g hoặc lớn hơn trên cơ sở quá trình nuôi cấy theo mẻ.
8. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó độ chọn lọc đối với 2,3-butandiol là 70% hoặc lớn hơn trên cơ sở quá trình nuôi cấy theo mẻ bổ sung cơ chất.

9. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó độ chọn lọc đối với 2,3-butandiol là 80% hoặc lớn hơn trên cơ sở quá trình nuôi cấy theo mẻ bổ sung cơ chất.

10. Phương pháp sản xuất 2,3-butandiol, phương pháp này bao gồm các bước:
nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9; và
thu hồi 2,3-butandiol từ môi trường nuôi cấy.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó bước nuôi cấy được thực hiện dưới điều kiện ưa khí.

12. Phương pháp theo điểm 10, trong đó bước nuôi cấy kiểm soát năng suất tạo ra 2,3-butandiol bằng cách kiểm soát lượng oxy cấp vào.

Fig. 1

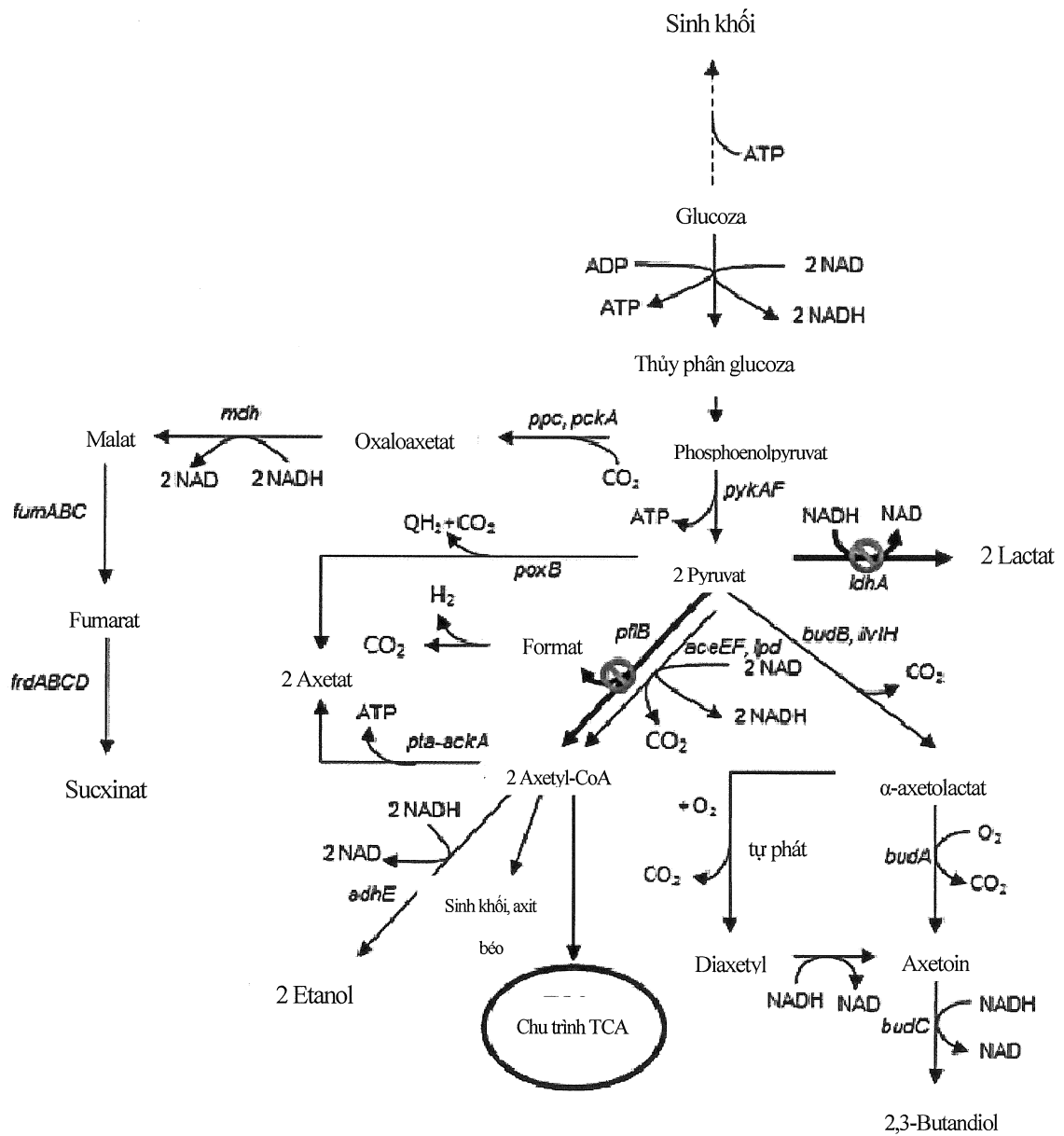


Fig. 2

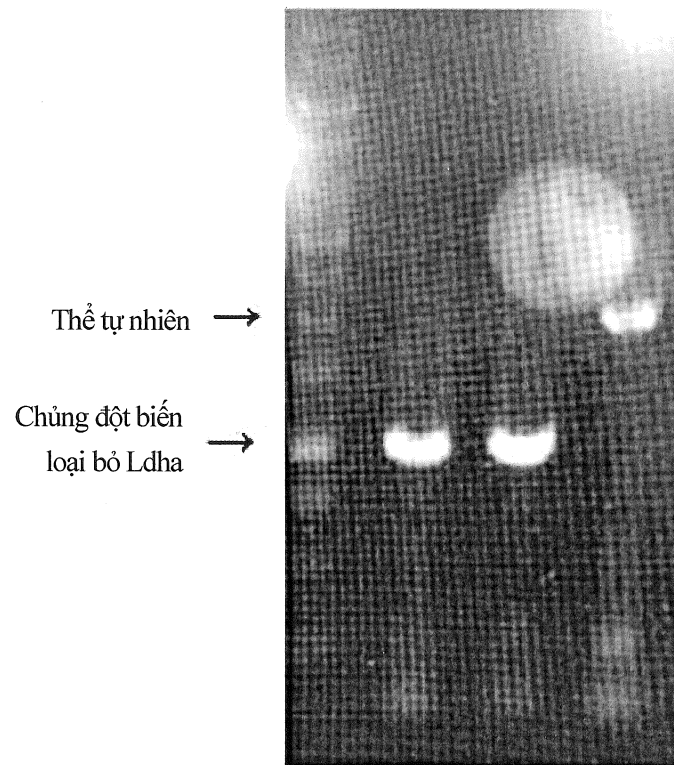


Fig. 3

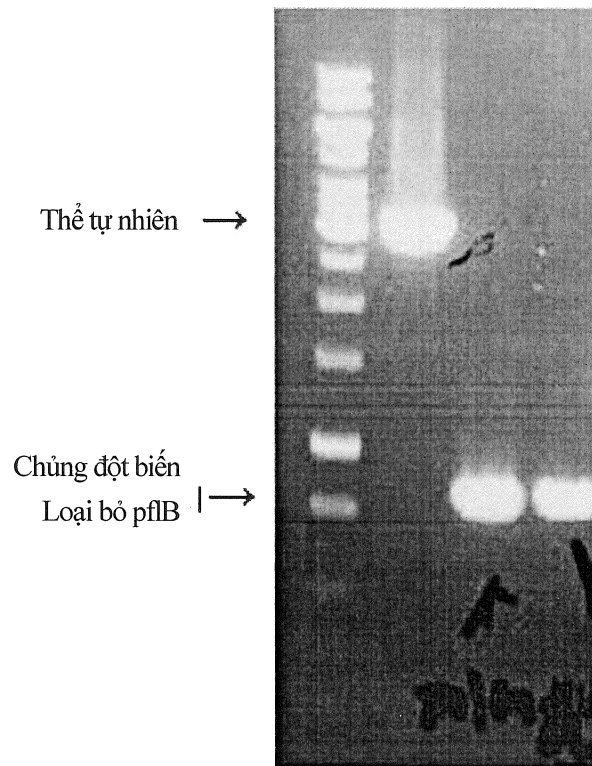


Fig. 4

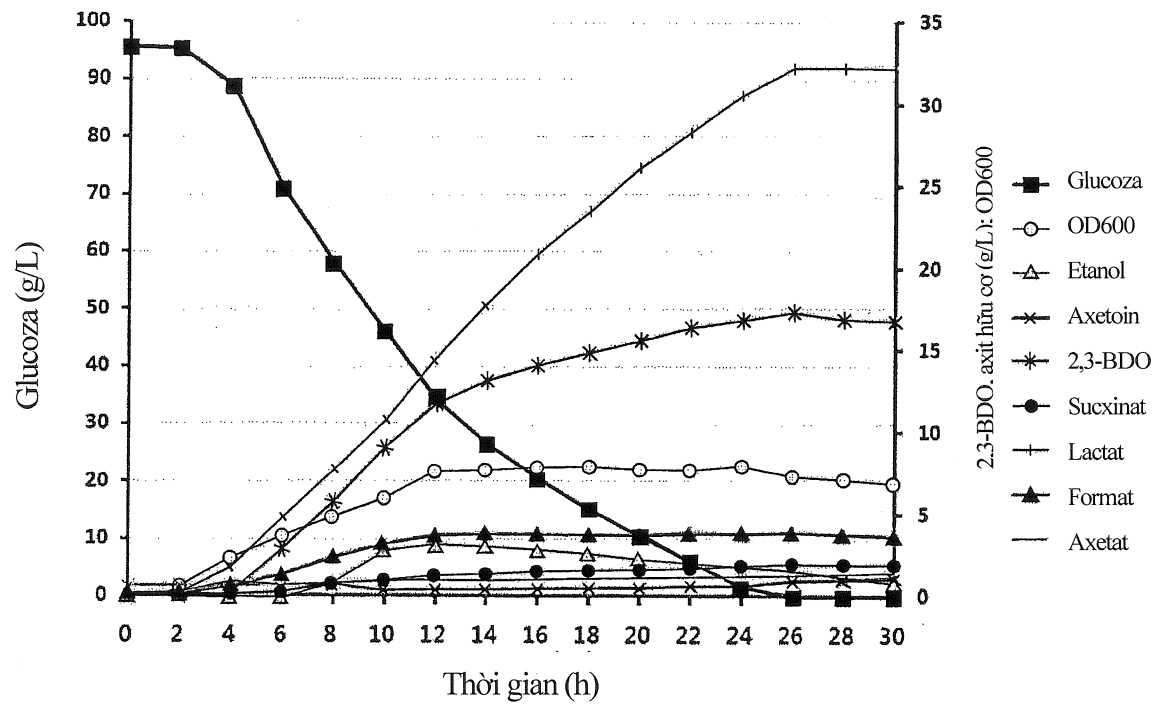


Fig. 5

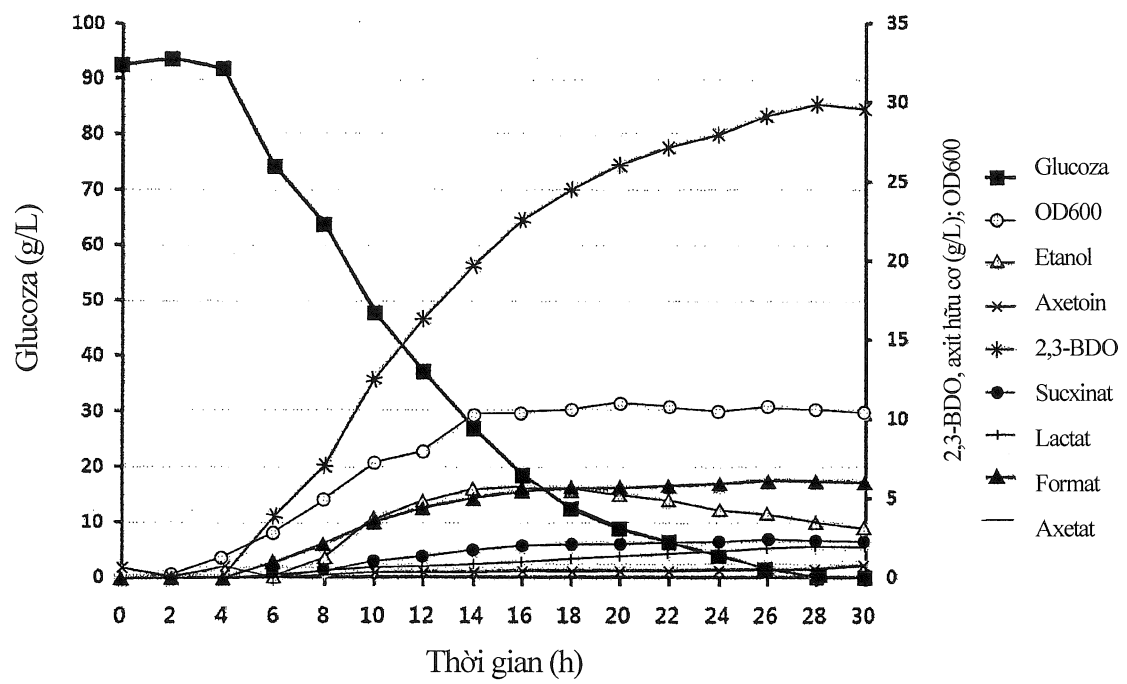


Fig. 6

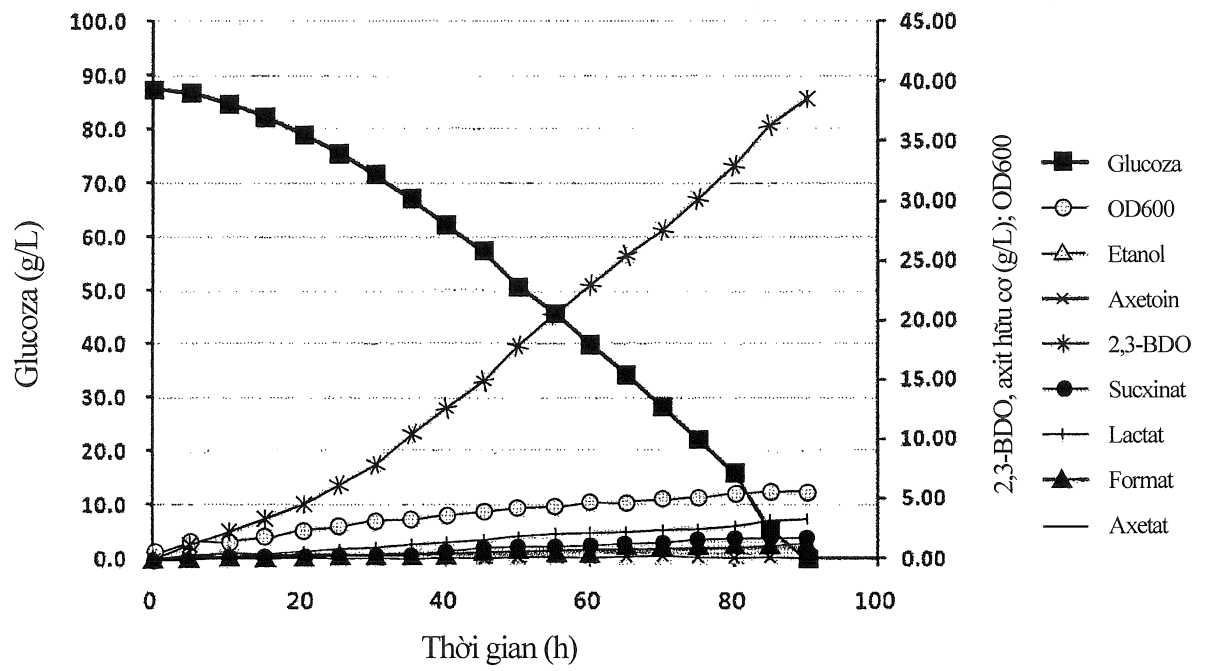


Fig. 7

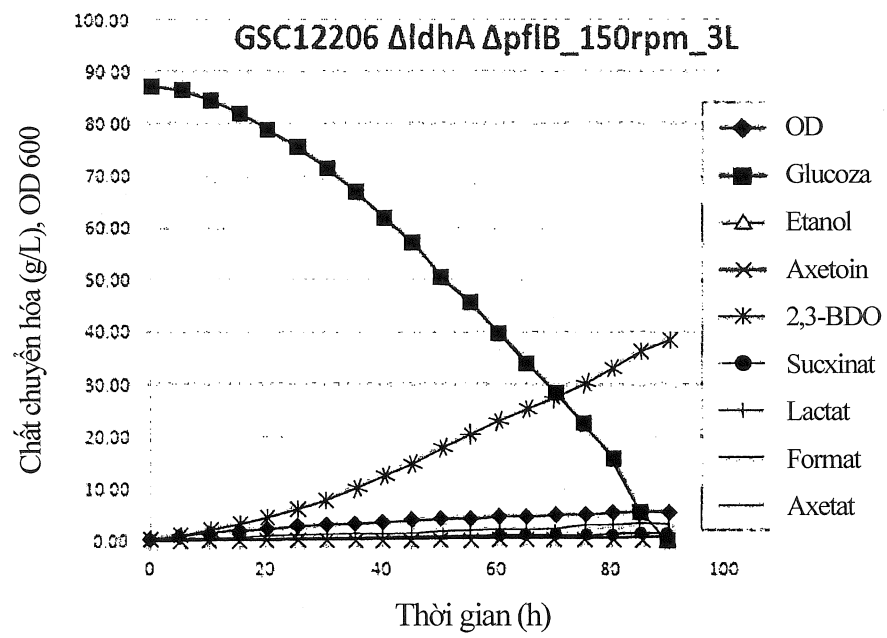


Fig. 8

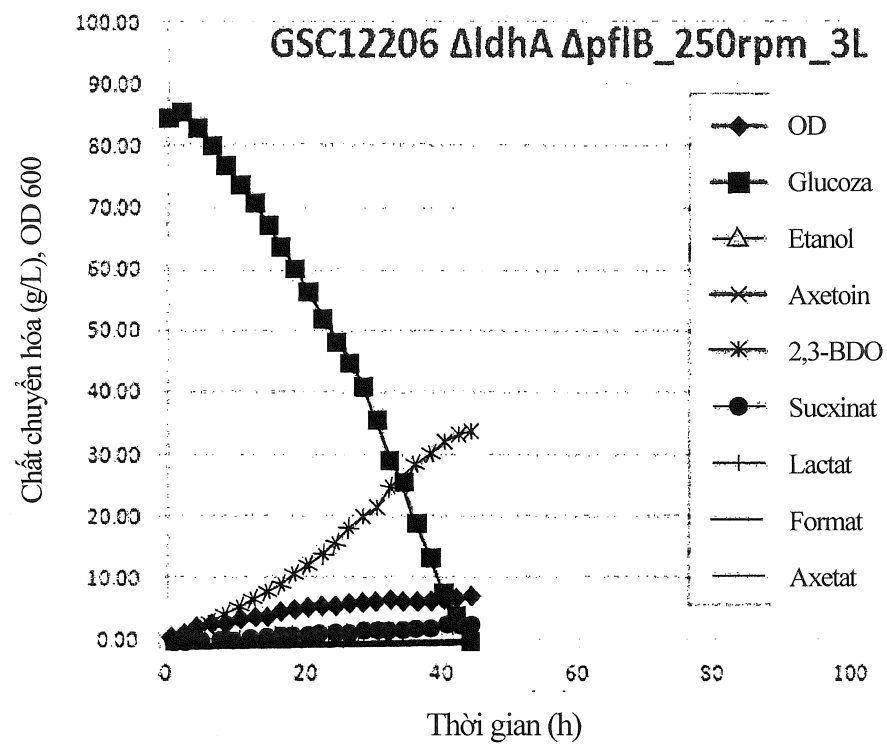


Fig. 9

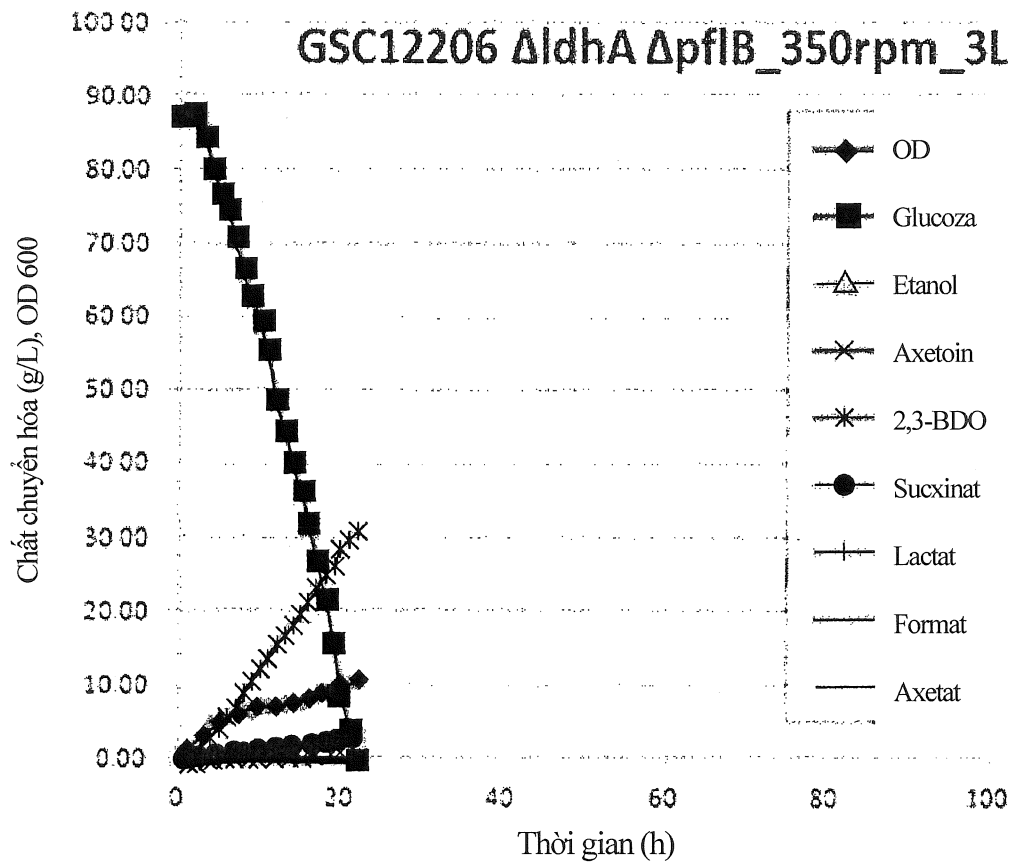


Fig. 10

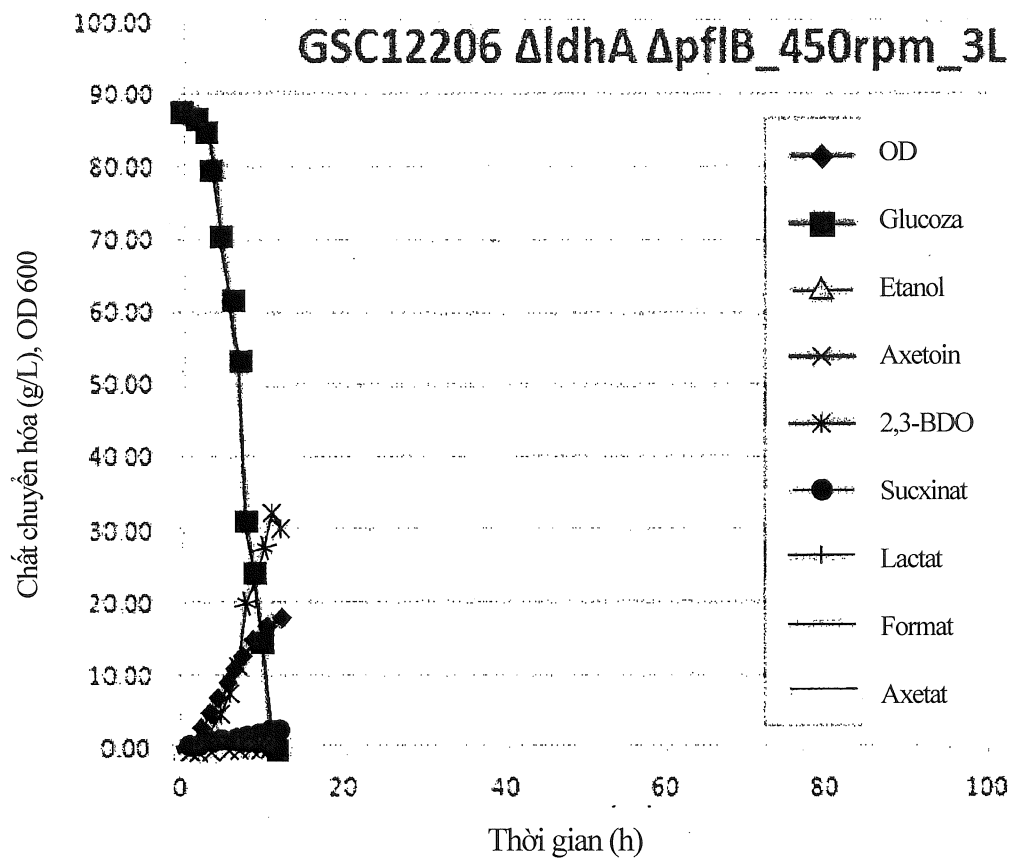


Fig. 11

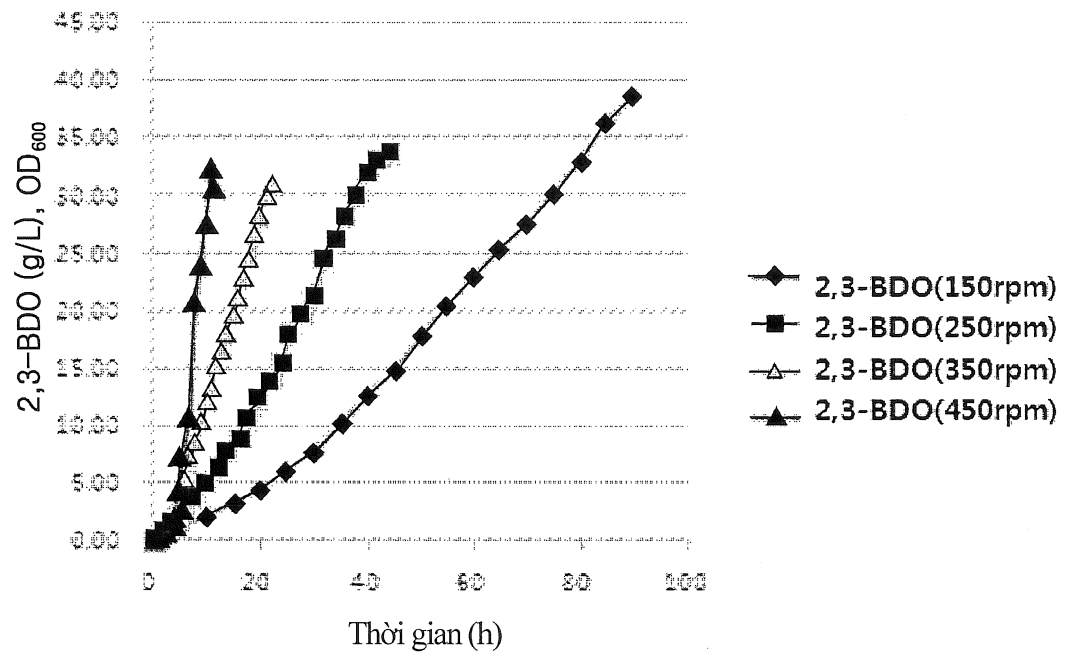


Fig. 12

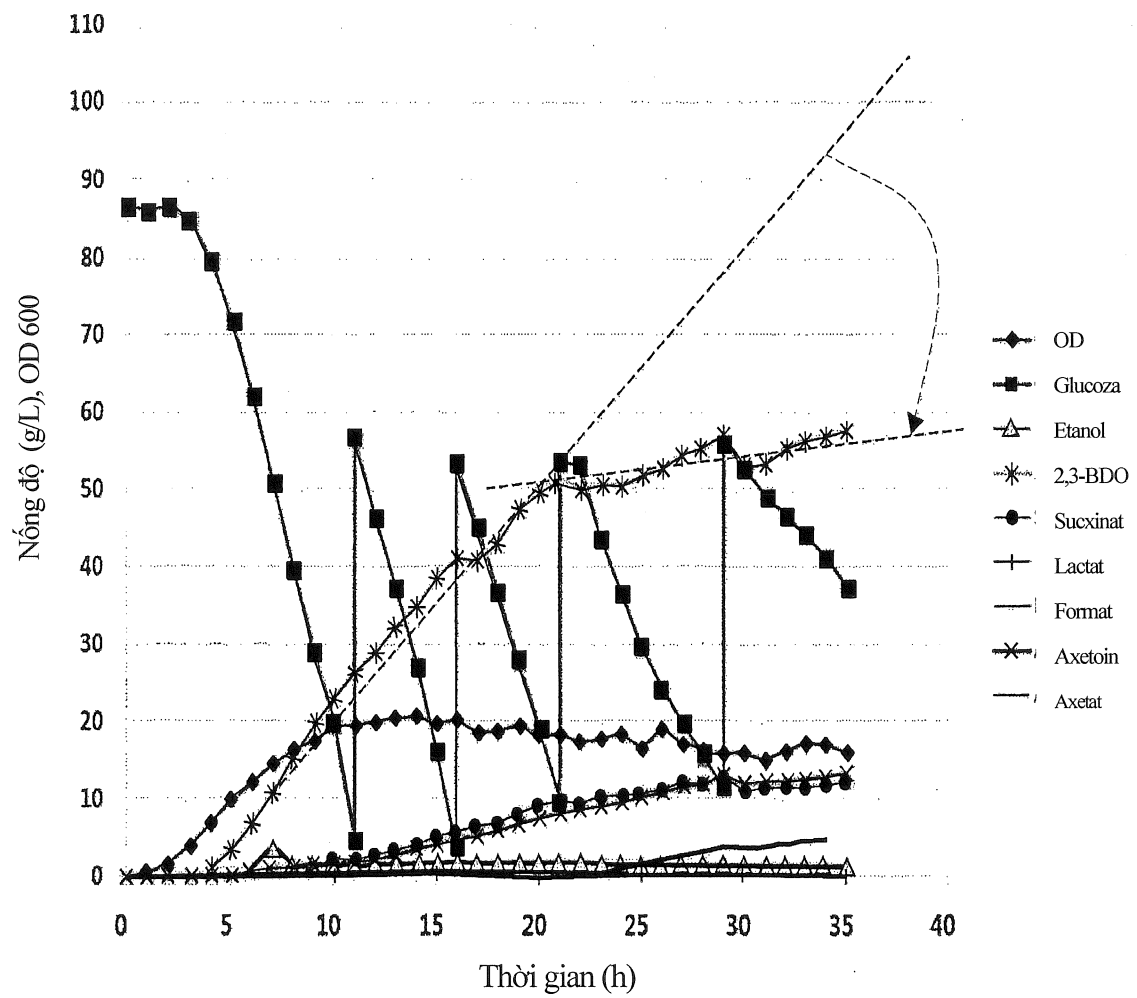


Fig. 13

