



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0032373

(51)⁸ C12N 15/77; C12P 13/10; C12P 13/00 (13) B

(21) 1-2018-00227

(22) 19/07/2016

(86) PCT/KR2016/007841 19/07/2016

(87) WO 2017/014532 26/01/2017

(30) 10-2015-0102624 20/07/2015 KR

(45) 25/06/2022 411

(43) 25/05/2018 362A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

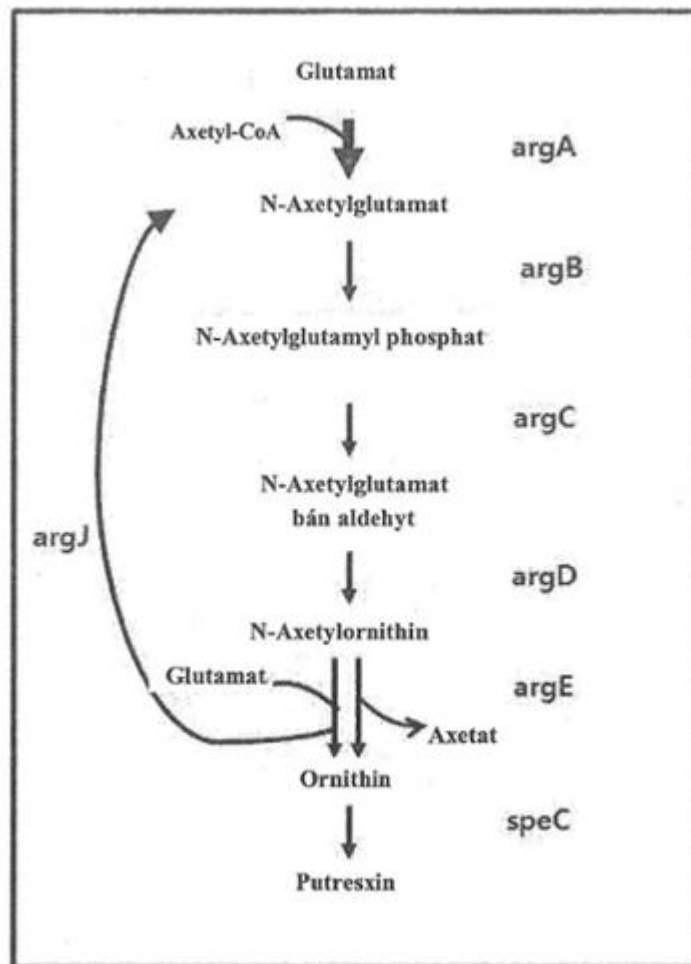
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) PARK, Su Jin (KR); YANG, Young Lyeol (KR); UM, Hye Won (KR); LI, Hong Xian (KR); LEE, Kyoung Min (KR); LEE, Baek Seok (KR); LEE, Hyo Hyung (KR); JUNG, Hee Kyoung (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) VI SINH VẬT CẢI BIẾN THUỘC GIỐNG CORYNEBACTERIUM SẢN XUẤT PUTRESCIN HOẶC ORNITHIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PUTRESCIN HOẶC ORNITHIN BẰNG CÁCH SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến sản xuất putrescin hoặc ornithin, phương pháp sản xuất putrescin hoặc ornithin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp sản xuất putrescin hoặc ornithin, và phương pháp sản xuất putrescin hoặc ornithin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các amin có nguồn gốc sinh vật (Biogenic amine - BA) là các hợp chất nitơ mà được tạo ra chủ yếu bởi quá trình tách nhóm carboxyl của axit amin hoặc amin hóa và chuyển hóa amin của aldehyt và keton. Các amin có nguồn gốc sinh vật này có phân tử lượng thấp và được tổng hợp trong các quá trình trao đổi chất ở vi sinh vật, thực vật, và động vật, nhờ đó được gọi là các yếu tố cấu thành và thường được tìm thấy trong các tế bào của chúng.

Trong số đó, putrescin được tìm thấy trong vi khuẩn gram âm hoặc nấm và có mặt với nồng độ cao ở các loài khác nhau, và do đó putrescin được cho là có vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa của vi sinh vật. Nói chung, putrescin là nguyên liệu thô quan trọng để tổng hợp polyamin nylon-4,6 và được tạo ra chủ yếu bằng cách tổng hợp hóa học. Quy trình tổng hợp hóa học là quy trình 3 bước bao gồm phản ứng oxy hóa nhờ xúc tác, phản ứng sử dụng hợp chất xyanua, và phản ứng hydro hóa sử dụng hydro áp suất cao. Do đó, có nhu cầu phát triển phương pháp thân thiện hơn với môi trường và có hiệu quả năng lượng hơn bằng cách sử dụng sinh khối.

Trong bối cảnh này, các phương pháp khác nhau để sản xuất putrescin ở nồng độ cao bằng cách biến đổi *E. coli* và vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* đã được bộc lộ (Công bố đơn quốc tế số WO 06/005603; Công bố đơn quốc tế số WO 09/125924; Qian ZD *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 104 (4): 651 - 662, 2009; Schneider *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88 (4): 859 - 868, 2010; Schneider *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95: 169 - 178, 2012).

Mặt khác, ornithin là nguyên liệu được tìm thấy rộng rãi trong thực vật, động vật, và vi sinh vật, và được dùng làm tiền chất để sinh tổng hợp arginin, prolin, và

polyamin. Ngoài ra, ornithin còn đóng vai trò quan trọng trong con đường tạo ra ure từ axit amin hoặc amoniac và quyết định chu trình ornithin trong quá trình chuyển hóa *in-vivo* của sinh vật bậc cao. Ornithin là chất có hiệu quả trong quá trình tạo cơ và khử chất béo trong cơ thể, và do đó nó được dùng làm chất bổ sung dinh dưỡng và cũng được dùng làm dược phẩm để làm thuyên giảm bệnh xơ gan và rối loạn chức năng gan. Các phương pháp sản xuất ornithin bao gồm phương pháp sử dụng casein sữa làm enzym tiêu hóa và phương pháp sử dụng *E. coli* hoặc vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* (Patent Hàn Quốc số 10-1372635; T. Gotoh *et al.*, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 33: 773 - 777, 2010).

E. coli và vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* đều qua các con đường sinh tổng hợp tương tự nhau để tạo ra putrescin hoặc ornithin, nhưng chúng có sự khác biệt như sau. Trước tiên, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* qua “con đường vòng”, trong đó axit glutamic được chuyển hóa thành axit N-axetyl-L-glutamic và N-axetyl-L-ornithin được chuyển hóa thành L-ornithin bởi argJ (ornithin axetyltransferaza hai chức /N-axetylglutamat syntaza, EC 2.3.1.35). Trái lại, *E. coli* liên quan tới quá trình sinh tổng hợp putrescin hoặc ornithin bằng “con đường thẳng”, trong đó argA (N-axetylglutamat syntaza, EC 2.3.1.1) và argE (Axetylornithin deaxetylaza, EC 3.5.1.16) thay thế vai trò của argJ trong vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*.

Trong vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, đã biết rằng nhóm axetyl tái tuần hoàn giữa ornithin và axit glutamic trong ArgJ. Tuy nhiên, trong *E. coli*, ArgA gắn nhóm axetyl của axetyl-CoA vào glutamat để tạo ra N-axetyl-glutamat, và ArgE N-axetyl-ornithin sẽ phân hủy N-axetyl-ornithin để tạo ra ornithin và axetat (Schneider *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 17 - 30., 2011).

Cụ thể, operon pta-ackA (pta, phosphotransaxetylaza; ackA, axetat kinaza) và axetyl-coenzym A synthetaza (acs) được gọi là các gen dùng để tổng hợp axetyl-CoA bằng cách sử dụng axetat.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã có nhiều nỗ lực để cải thiện khả năng sản xuất ornithin

và putrescin của vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, và do đó các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc đưa *argA* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* vào vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có thể cải thiện được khả năng sản xuất ornithin và putrescin.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp sản xuất putrescin hoặc ornithin với hiệu suất cao.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất putrescin hoặc ornithin bằng cách sử dụng vi sinh vật nêu trên.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Đã khẳng định được rằng vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin theo sáng chế có thể cải thiện được lượng putrescin hoặc ornithin được tạo ra khi đưa vào vi sinh vật này *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*, và ngoài ra, khi tăng cường con đường sử dụng axetat. Do đó, vi sinh vật theo sáng chế có thể được sử dụng một cách rộng rãi để sản xuất putrescin hoặc ornithin, và ngoài ra, có thể được sử dụng một cách rộng rãi làm phương tiện hữu hiệu và theo cách mong muốn để cung cấp các nguyên liệu thô nhằm tạo ra các sản phẩm polyme khác nhau, trong đó putrescin hoặc ornithin được dùng làm nguyên liệu thô, xuất phát từ khía cạnh kinh tế và môi trường.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ minh họa con đường sinh tổng hợp (con đường vòng) để sản xuất putrescin và ornithin ở vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* (A) và con đường sinh tổng hợp (con đường thẳng) để sản xuất putrescin và ornithin ở *E. coli* (B).

Fig.2 là sơ đồ minh họa con đường sinh tổng hợp cải thiện được khả năng sản xuất putrescin và ornithin bằng cách đưa *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* vào vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, ở tình trạng biểu hiện *argJ*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của N-axetylglutamat syntaza thu được từ *E. coli* và axetylornithin deaxetylaza thu được từ *E. coli* được đưa vào.

Theo một phương án làm ví dụ, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó N-axetylglutamat syntaza có nguồn gốc từ *E. coli* bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó axetylornithin deaxetylaza có nguồn gốc từ *E. coli* bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3.

Vẫn theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* được chọn từ nhóm bao gồm *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Brevibacterium flavum*, và *Brevibacterium lactofermentum*.

Vẫn theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của operon phosphotransaxetylaza và axetat kinaza (operon *pta-ackA*) được tăng cường hơn nữa so với hoạt tính nội sinh của nó.

Vẫn theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó operon phosphotransaxetylaza và axetat kinaza bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc 7.

Vẫn theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của axetyl-CoA synthetaza có nguồn gốc từ *E. coli* (*acs*) được đưa vào tiếp nữa.

Vẫn theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó axetyl-CoA synthetaza có nguồn gốc từ *E. coli* (*acs*) bao gồm trình tự axit amin nêu

trong SEQ ID NO: 9.

Vẫn theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của ornithin decarboxylaza (ODC) được đưa vào tiếp nữa.

Vẫn theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của i) ornithin carbamoyltransferaza (ArgF), ii) chất vận chuyển tiết glutamat, hoặc iii) ornithin carbamoyltransferaza và chất vận chuyển tiết glutamat còn được làm suy yếu hơn nữa so với hoạt tính nội sinh của nó.

Vẫn theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm axetyl gama glutamyl phosphat reductaza (ArgC), axetylglutamat syntaza hoặc ornithin axetyltransferaza (ArgJ), axetylglutamat kinaza (ArgB), và axetyl ornithin aminotransferaza (ArgD), được tăng cường hơn nữa so với hoạt tính nội sinh của nó.

Vẫn theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của axetyltransferaza còn được làm suy yếu hơn nữa so với hoạt tính nội sinh của nó.

Vẫn theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó axetyltransferaza bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30 hoặc 31.

Vẫn theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của chất vận chuyển tiết putrescin được tăng cường hơn nữa so với hoạt tính nội sinh của nó.

Vẫn theo một phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó chất vận chuyển tiết putrescin bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 hoặc 28.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất putrescin hoặc ornithin, bao gồm các bước:

(i) nuôi cấy vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất

putrescin hoặc ornithin trong môi trường; và

(ii) thu hồi putrescin hoặc ornithin từ vi sinh vật đã được nuôi cấy hoặc môi trường này.

Theo một phương án làm ví dụ của sáng chế, vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.

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

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của N-axetylglutamat syntaza có nguồn gốc từ *E. coli* và axetylornithin deaxetylaza có nguồn gốc từ *E. coli* được đưa vào.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “N-axetylglutamat syntaza” được dùng để chỉ enzym mà làm trung gian cho phản ứng sản xuất N-axetylglutamat từ glutamat và axetyl-CoA, và N-axetylglutamat đã được tạo ra từ đó có thể được sử dụng làm tiền chất của ornithin và arginin.

Theo sáng chế, N-axetylglutamat syntaza có thể bao gồm, ví dụ, protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, và protein bất kỳ, mà có mức độ tương đồng là 70% hoặc cao hơn, cụ thể là 80% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, còn cụ thể hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và cụ thể nhất là 99% hoặc cao hơn, so với trình tự axit amin nêu trên, với điều kiện protein này có hoạt tính chủ yếu của N-axetylglutamat syntaza, mà không chỉ giới hạn ở đó.

Ngoài ra, các protein có hoạt tính nêu trên có thể có sự khác nhau về trình tự axit amin, theo loài và chủng vi sinh vật. Do đó, N-axetylglutamat syntaza theo sáng chế có thể, ví dụ, có nguồn gốc từ *E. coli*, dù nó không chỉ giới hạn ở đó.

Đối với trình tự có mức độ tương đồng so với trình tự nêu trên, nếu trình tự axit amin là trình tự về cơ bản là tương tự hoặc tương ứng với hoạt tính sinh học của protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, nhận thấy rằng trình tự axit amin chứa đoạn khuyết, cải biến, thế, hoặc bổ sung một phần trình tự là cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Polynucleotit mã hóa N-axetylglutamat syntaza theo sáng chế có thể bao gồm, mà không chỉ giới hạn ở, polynucleotit mã hóa protein có trình tự axit amin nêu trong

SEQ ID NO: 1, và protein bất kỳ, mà có mức độ tương đồng là 70% hoặc cao hơn, cụ thể là 80% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, còn cụ thể hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và cụ thể nhất là 99% hoặc cao hơn, so với trình tự axit amin nêu trên, với điều kiện polynucleotit này có hoạt tính tương tự so với hoạt tính của N-axetylglutamat syntaza, và ví dụ, trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể được bao gồm.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “axetylornithin deaxetylaza” được dùng để chỉ enzym mà làm trung gian cho phản ứng liên quan tới sự tạo ra axit axetic và ornithin bằng cách làm trung gian cho quá trình thủy phân axetylornithin.

Theo sáng chế, axetylornithin deaxetylaza có thể bao gồm, mà không chỉ giới hạn ở, protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, và protein bất kỳ, mà có mức độ tương đồng là 70% hoặc cao hơn, cụ thể là 80% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, còn cụ thể hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và cụ thể nhất là 99% hoặc cao hơn, so với trình tự axit amin nêu trên, với điều kiện protein này có hoạt tính chủ yếu của nhóm axetyl tách ra và ornithin từ axetylornithin.

Ngoài ra, các protein có hoạt tính nêu trên có thể có sự khác nhau về trình tự axit amin, theo loài và chủng vi sinh vật. Do đó, axetylornithin deaxetylaza theo sáng chế có thể là chất có nguồn gốc từ *E. coli*, cho dù nó không chỉ giới hạn ở đó. Đối với trình tự có mức độ tương đồng, nếu trình tự axit amin là trình tự về cơ bản là tương tự hoặc tương ứng với hoạt tính sinh học của protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, nhận thấy rằng trình tự axit amin có đoạn khuyết, cải biến, thế, hoặc bổ sung một phần trình tự là cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Polynucleotit mã hóa axetylornithin deaxetylaza theo sáng chế có thể bao gồm, với điều kiện polynucleotit này có hoạt tính tương tự so với hoạt tính của protein axetylornithin deaxetylaza, protein này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, hoặc polynucleotit mã hóa protein, mà có mức độ tương đồng là 70% hoặc cao hơn, cụ thể là 80% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, còn cụ thể hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và cụ thể nhất là 99% hoặc cao hơn, so với trình tự axit amin nêu trên, ví dụ, trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 4.

Ngoài ra, polynucleotit mã hóa N-axetylglutamat syntaza hoặc axetylornithin deaxetylaza theo sáng chế có thể được lai hóa với trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4 hoặc đoạn mã có nguồn gốc từ trình tự polynucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt, và nó có thể là loại cải biến của N-axetylglutamat syntaza hoặc axetylornithin deaxetylaza có chức năng thông thường. Trong trường hợp nêu trên, thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt” được dùng để chỉ điều kiện có thể xảy ra quá trình lai hóa đặc hiệu giữa các polynucleotit. Ví dụ, điều kiện nghiêm ngặt là điều cụ thể được mô tả trong các tài liệu viện dẫn (ví dụ, J. Sambrook et al., *supra*).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “mức độ tương đồng” được dùng để chỉ mức độ đồng nhất với trình tự axit amin nhất định hoặc trình tự polynucleotit, và có thể được biểu hiện bằng tỷ lệ phần trăm. Như được sử dụng trong bản mô tả này, trình tự tương đồng có hoạt tính giống hoặc tương tự với trình tự polypeptit hoặc trình tự polynucleotit nhất định có thể được biểu thị bằng “% mức độ tương đồng”. Ví dụ, % mức độ tương đồng có thể được xác nhận bằng cách sử dụng phần mềm tiêu chuẩn, nghĩa là, BLAST 2.0, để tính toán các thông số như điểm số, mức độ đồng nhất, và mức độ tương tự, hoặc bằng cách so sánh các trình tự thông qua thử nghiệm lai hóa phương Nam, và điều kiện lai hóa thích hợp cần xác định có thể được xác định bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current trình tự in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Mặt khác, vi sinh vật theo sáng chế có thể bao gồm cả loại tự nhiên và loại cải biến, ví dụ, vi sinh vật thuộc giống *Escherichia*, giống *Shigella*, giống *Citrobacter*, giống *Salmonella*, giống *Enterobacter*, giống *Yersinia*, giống *Klebsiella*, giống *Erwinia*, giống *Corynebacterium*, giống *Brevibacterium*, giống *Lactobacillus*, giống *Selenomanas*, giống *Vibrio*, giống *Pseudomonas*, giống *Streptomyces*, giống *Arcanobacterium*, giống *Alcaligenes*, v.v.. Cụ thể, vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, cụ thể hơn, vi sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Brevibacterium flavum*, và *Brevibacterium*

lactofermentum, và cụ thể hơn, *Corynebacterium glutamicum*, nhưng không chỉ giới hạn ở các giống này.

Cụ thể, trong bản mô tả này, thuật ngữ “vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin” được dùng để chỉ vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin ở trạng thái tự nhiên; hoặc vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin đã được tạo ra bằng cách đưa khả năng sản xuất putrescin hoặc ornithin vào giống bố mẹ của nó, mà không thể sản xuất putrescin hoặc ornithin.

Vi sinh vật, có khả năng sản xuất putrescin hoặc ornithin hoặc có thể sản sinh putrescin hoặc ornithin, có thể khả năng sản xuất ornithin cải thiện, mà được dùng làm nguyên liệu thô để sinh tổng hợp putrescin, bằng cách cải biến hoạt tính của axetylglutamat syntaza (chuyển hóa glutamat thành N-axetylglutamat), ornithin axetyltransferaza (ArgJ, chuyển hóa axetylornithin thành ornithin), axetylglutamat kinaza (ArgB, chuyển hóa axetylglutamat thành N-axetylglutamyl phosphat), gama glutamyl phosphat reductaza (ArgC, chuyển hóa N-axetylglutamyl phosphat thành N-axetylglutamat semialdehyt), và axetyl ornithin aminotransferaza (ArgD, chuyển hóa axetylglutamat semialdehyt thành N-axetylornithin) để tăng cường hơn nữa so với hoạt tính nội sinh của chúng, để tăng cường con đường sinh tổng hợp từ glutamat thành ornithin, mặc dù không bị giới hạn cụ thể ở đó.

Ngoài ra, vi sinh vật có thể được cải biến để hoạt tính suy yếu của ornithin carbamoyltransferaza (ArgF, có liên quan tới sự tổng hợp arginin từ ornithin), protein có liên quan tới sự xuất glutamat, và/hoặc protein axetyl hóa putrescin, hơn so với hoạt tính nội sinh của chúng; và/hoặc để đưa hoạt tính của ornithin decarboxylaza (ODC) vào.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “đưa hoạt tính” có thể được dùng để chỉ hoạt tính của protein, mà không có mặt hoặc suy yếu ở vi sinh vật, mới được đưa hoặc gia tăng ở vi sinh vật tương ứng. Cụ thể, nó có thể bao gồm việc chèn hoặc phân phối gen mã hóa protein, mà không có mặt ở vi sinh vật, vào vi sinh vật cần biểu hiện ở đó, hoặc cải biến protein để gia tăng sự biểu hiện protein, mà không được biểu hiện hoặc hầu như không được biểu hiện ở vi sinh vật, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Mặt khác, theo sáng chế, việc cải biến như việc đưa hoạt tính, gia tăng hoạt tính, hoạt tính suy yếu, v.v., có thể xảy ra thông qua quy trình biến nạp. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến nạp” được dùng để chỉ quy trình đưa vector, bao gồm polynucleotit mã hóa protein cụ thể hoặc trình tự khởi đầu có hoạt tính mạnh hoặc yếu, v.v., vào tế bào chủ, do đó dẫn tới sự biểu hiện protein được mã hóa bởi polynucleotit hoặc cải biến nhiễm sắc thể ở tế bào chủ. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được chèn vào ở dạng bất kỳ cho tới khi nó có thể được đưa vào tế bào chủ và được biểu hiện hoặc cải biến ở đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ ở dạng cắt-xét biểu hiện, là cấu trúc gen bao gồm tất cả các nguyên tố thiết yếu cần cho sự tự biểu hiện. Cắt-xét biểu hiện có thể thường bao gồm gen khởi đầu liên kết linh hoạt với polynucleotit, tín hiệu kết thúc sự phiên mã, miền gắn kết với ribosom, và tín hiệu kết thúc sự dịch mã, và có thể là ở dạng vector biểu hiện có khả năng tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ ở dạng vốn có, và liên kết linh hoạt với trình tự thiết yếu để biểu hiện nó trong tế bào chủ, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Ngoài ra, trong bản mô tả này, thuật ngữ “liên kết điều khiển” được dùng để chỉ sự liên kết chức năng giữa trình tự khởi đầu, bắt đầu và làm trung gian đối với sự phiên mã polynucleotit mã hóa protein cụ thể theo sáng chế, và trình tự gen.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vector” được dùng để chỉ cấu trúc ADN bao gồm trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa protein quan tâm, trong đó protein quan tâm này được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa thích hợp sao cho protein quan tâm này có thể được biểu hiện trong vật chủ thích hợp. Trình tự điều hòa bao gồm gen khởi đầu có khả năng bắt đầu sự phiên mã, trình tự điều khiển bất kỳ để điều hòa quá trình phiên mã, trình tự mã hóa miền gắn kết với mARN ribosom thích hợp, và trình tự điều hòa sự phiên mã và dịch mã. Vector, sau khi biến nạp thành tế bào chủ thích hợp, có thể được sao chép hoặc có chức năng không liên quan tới bộ gen của vật chủ, hoặc có thể được hợp nhất thành bộ gen của chính vật chủ.

Vector được sử dụng trong sáng chế có thể không bị giới hạn cụ thể với điều kiện vector này có khả năng sao chép trong tế bào chủ, và vector bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ về vector có thể bao gồm các plasmit tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmit, virus, và thể thực khuẩn. Ví dụ, đối với vector hoặc cosmit

vector của thể thực khuẩn, *pWE15*, *M13*, *MBL3*, *MBL4*, *IXII*, *ASHII*, *APII*, *t10*, *t11*, *Charon4A*, *Charon21A*, v.v., có thể được sử dụng; và đối với vector của plasmid, chúng dựa trên *pBR*, *pUC*, *pBluescriptII*, *pGEM*, *pTZ*, *pCL*, *pET*, v.v., có thể được sử dụng. Vector cần dùng trong sáng chế có thể không chỉ giới hạn cụ thể ở các vector này và vector bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Cụ thể, *pDZTn*, *pACYC177*, *pACYC184*, *pCL*, *pECCG117*, *pUC19*, *pBR322*, *pMW118*, *pCC1BAC* vectors, v.v., có thể được sử dụng.

Do đó, polynucleotit mã hóa protein đích có thể được thể bằng polynucleotit cải biến bằng cách sử dụng vector để chèn nhiễm sắc thể trong vi khuẩn. Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách tái tổ hợp đồng nhất, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Do vector theo sáng chế có thể được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp đồng nhất, nên chất đánh dấu chọn lọc để xác nhận việc chèn vào nhiễm sắc thể có thể còn được bao gồm nữa. Chất đánh dấu chọn lọc được dùng để chọn lọc tế bào biến nạp, nghĩa là để xác nhận xem liệu polynucleotit đích được chèn vào hay không, và chất đánh dấu tạo ra các phenotyp có khả năng chọn lọc như tính kháng thuốc, yêu cầu về chất dinh dưỡng, tính kháng với các tác nhân gây độc tế bào, và sự biểu hiện protein bề mặt có thể được sử dụng. Trong các trường hợp trong đó các tác nhân chọn lọc được xử lý, thì chỉ có các tế bào biểu hiện chất đánh dấu chọn lọc có thể sống sót hoặc biểu hiện các tính trạng về kiểu hình khác, và do đó các tế bào biến nạp có thể được chọn một cách dễ dàng.

Vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* theo sáng chế có thể là vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của operon phosphotransaxetylaza và axetat kinaza (operon *pta-ackA*) được tăng cường hơn nữa so với enzym nội sinh của nó.

Theo sáng chế, operon phosphotransaxetylaza và axetat kinaza (operon *pta-ackA*) là các operon bao gồm các gen làm trung gian thuận nghịch đối với con đường trao đổi chất, trong đó axetyl-CoA đã được tạo ra từ glucoza hoặc pyruvat được chuyển hóa thành axit axetic thông qua axetyl phosphat, và con đường trao đổi chất theo hướng ngược lại.

Theo sáng chế, operon phosphotransaxetylaza và axetat kinaza có thể bao gồm,

mà không chỉ giới hạn ở đó, các protein bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 7, hoặc protein bất kỳ, mà có mức độ tương đồng 70% hoặc cao hơn, cụ thể là 80% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 90% hoặc cao hơn, cụ thể, cụ thể hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, còn cụ thể hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, hoặc cụ thể nhất là 99% hoặc cao hơn, so với trình tự axit amin nêu trên, với điều kiện protein về cơ bản là làm trung gian cho phản ứng tạo ra axetyl-CoA từ axit axetic.

Ngoài ra, do trình tự axit amin của các protein có hoạt tính có thể thay đổi theo loài hoặc giống của vi sinh vật nhất định, nên operon phosphotransaxetylaza và axetat kinaza theo sáng chế có thể không chỉ giới hạn ở các operon có nguồn gốc từ đó. Nhận thấy rằng trình tự axit amin bất kỳ, mà có mức độ tương đồng so với trình tự nêu trên và có hoạt tính sinh học về cơ bản là tương tự hoặc tương ứng với protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 7, có thể cũng thuộc phạm vi của sáng chế, mặc dù trình tự axit amin có thể bị khuyết, cải biến, thế, hoặc bổ sung một phần trình tự.

Polynucleotit mã hóa operon phosphotransaxetylaza và axetat kinaza theo sáng chế có thể bao gồm polynucleotit mã hóa axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 7, hoặc polynucleotit mã hóa protein có mức độ tương đồng 70% hoặc cao hơn, cụ thể là 80% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, còn cụ thể hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và cụ thể nhất là 99% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin nêu trên, và cụ thể nhất là có thể bao gồm trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 8.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “sự gia tăng hoạt tính” không những bao gồm việc minh họa hiệu quả hữu hiệu hơn so với chức năng ban đầu do việc đưa mới hoạt tính hoặc tăng cường hoạt tính của chính protein, mà còn bao gồm việc tăng cường hoạt tính của nó bằng cách tăng cường hoạt tính của gen nội sinh, khuếch đại gen nội sinh từ yếu tố nội sinh hoặc yếu tố ngoại sinh, làm khuyết yếu tố điều hòa để ức chế sự biểu hiện gen, tăng cường số lượng bản sao gen, đưa gen từ bên ngoài vào, cải biến trình tự điều hòa sự biểu hiện, và cụ thể, tăng cường hoạt tính enzym do thay thế hoặc cải biến gen khởi đầu và đột biến trong gen, v.v..

Đặc biệt, theo sáng chế, việc tăng cường hoạt tính có thể được thực hiện bằng cách:

- 1) tăng cường số lượng bản sao polynucleotit mã hóa enzym,
 - 2) cải biến trình tự điều hòa sự biểu hiện để tăng cường sự biểu hiện polynucleotit,
 - 3) cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để gia tăng hoạt tính của enzym, hoặc
 - 4) cải biến bằng cách kết hợp các cách nêu trên,
- nhưng phương pháp này không chỉ giới hạn ở đó.

Việc tăng cường số lượng bản sao polynucleotit (phương pháp 1) có thể được thực hiện ở dạng trong đó polynucleotit này được liên kết điều khiển với vector, hoặc bằng cách chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ, mặc dù phương pháp này không bị giới hạn cụ thể ở đó. Cụ thể, số lượng bản sao của polynucleotit trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ có thể được tăng lên bằng cách đưa vector mà có thể thay thế và không kể chức năng của tế bào chủ và vào polynucleotit mã hóa protein theo sáng chế được liên kết điều khiển; hoặc có thể được tăng lên bằng cách đưa vector, mà có thể chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và vào polynucleotit được liên kết điều khiển, vào tế bào chủ.

Sau đó, việc cải biến trình tự điều hòa sự biểu hiện để tăng cường sự biểu hiện của polynucleotit (phương pháp 2) có thể được thực hiện bằng cách cải biến trên trình tự bằng cách làm khuyết, chèn, thế không bảo toàn hoặc bảo toàn trình tự polynucleotit, hoặc kết hợp các cách này để tăng cường hơn nữa hoạt tính của trình tự điều hòa sự biểu hiện, hoặc bằng cách thế trình tự polynucleotit bằng trình tự polynucleotit có hoạt tính mạnh hơn, mặc dù phương pháp này không bị giới hạn cụ thể ở đó. Trình tự điều hòa sự biểu hiện bao gồm gen khởi đầu, trình tự khởi đầu, trình tự mã hoá vị trí gắn kết với ribosom, và trình tự điều hòa kết thúc sự phiên mã và dịch mã, mặc dù không bị giới hạn cụ thể ở đó.

Gen ngoại sinh khởi đầu có hoạt tính mạnh, thay vì gen khởi đầu ban đầu, có thể được liên kết với vùng nằm ngược chiều của đơn vị biểu hiện polynucleotit. Ví dụ về gen khởi đầu có hoạt tính mạnh có thể là gen khởi đầu *CJ7*, gen khởi đầu *lysCP1*, gen khởi đầu *EF-Tu*, gen khởi đầu *groEL*, gen khởi đầu *aceA* hoặc *aceB*, v.v., và cụ thể hơn, mức độ biểu hiện có thể được cải thiện bằng cách liên kết linh hoạt với gen khởi đầu *lysCP1* có nguồn gốc từ *Corynebacterium* (WO 2009/096689) hoặc gen khởi

đầu *CJ7* (Patent Hàn Quốc số 10-0620092 và WO 2006/065095), nhưng gen khởi đầu có hoạt tính mạnh không chỉ bị giới hạn ở đó.

Hơn thế nữa, việc cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể (phương pháp 3) có thể được thực hiện bằng cách cải biến trình tự điều hòa sự biểu hiện bằng cách làm khuyết, chèn, thế không bảo toàn hoặc bảo toàn trình tự polynucleotit, hoặc kết hợp các cách này để tăng cường hơn nữa hoạt tính của trình tự polynucleotit, hoặc bằng cách thế trình tự polynucleotit bằng trình tự polynucleotit cải thiện có hoạt tính mạnh hơn, mặc dù phương pháp không bị giới hạn cụ thể ở đó.

Cụ thể, theo sáng chế, hoạt tính của operon phosphotransaxetylaza và axetat kinaza (operon *pta-ackA*) có thể là gia tăng so với hoạt tính nội sinh của nó bằng phương pháp bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm phương pháp tăng cường số lượng bản sao của operon trong tế bào, phương pháp đưa đoạn cải biến trên trình tự điều hòa sự biểu hiện operon, phương pháp thế trình tự điều hòa sự biểu hiện của gen trên operon bằng trình tự có hoạt tính mạnh hơn, phương pháp thay thế các gen mã hóa enzyme bằng các gen đã tạo đột biến trên nhiễm sắc thể để tăng cường hoạt tính của enzym cấu thành nên operon này, và phương pháp đưa đoạn cải biến trên gen trên nhiễm sắc thể để tăng cường hoạt tính của enzyme cấu thành nên operon. Cụ thể, phương pháp thay thế trình tự điều hòa sự biểu hiện gen trên operon có trình tự có hoạt tính mạnh hơn có thể thu được bằng cách thế gen nội sinh khởi đầu của operon axetylaza và axetat kinaza bằng gen khởi đầu *CJ7*, gen khởi đầu *lysCPI*, gen khởi đầu *EF-Tu*, gen khởi đầu *groEL*, gen khởi đầu *aceA* hoặc *aceB*, v.v., nhưng việc thay thế không chỉ bị giới hạn ở đó.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “hoạt tính nội sinh” được dùng để chỉ tình trạng hoạt hóa của enzym ở trạng thái không được cải biến được tạo ra ban đầu bởi vi sinh vật, và thuật ngữ “tăng cường hơn nữa so với hoạt tính nội sinh của nó” được dùng để chỉ tình trạng gia tăng của hoạt tính của enzym tạo ra bởi vi sinh vật sau khi khuếch đại, như đưa gen có hoạt tính hoặc tăng cường số lượng bản sao của gen tương ứng, làm khuyết yếu tố điều hòa sự ức chế quá trình biểu hiện của gen này, hoặc cải biến trình tự điều hòa sự biểu hiện, ví dụ, sử dụng gen khởi đầu cải thiện, so với hoạt tính tạo ra bởi vi sinh vật trước khi khuếch đại.

Theo sáng chế, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của axetyl-CoA synthetaza có nguồn gốc từ *E. coli* (acs) có thể được đưa thêm nữa vào đó.

Theo sáng chế, axetyl-CoA synthetaza (acs) là enzym mà làm trung gian cho phản ứng để tạo ra axetyl-CoA từ ATP, axit axetic, và CoA.

Theo sáng chế, axetyl-CoA synthetaza có thể bao gồm, mà không chỉ giới hạn ở đó, các protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, hoặc protein bất kỳ có mức độ tương đồng là 70% hoặc cao hơn, cụ thể là 80% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, còn cụ thể hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và cụ thể nhất là 99% hoặc cao hơn, so với trình tự axit amin nêu trên, với điều kiện protein này có hoạt tính làm trung gian chủ yếu của việc tổng hợp axetyl-CoA.

Ngoài ra, do trình tự axit amin của các protein có hoạt tính có thể thay đổi theo loài hoặc các giống của vi sinh vật nhất định, axetyl-CoA synthetaza (acs) theo sáng chế có thể không chỉ giới hạn ở nguồn gốc mà nó tạo ra từ đó, và ví dụ, nó có thể có nguồn gốc từ *E. coli*. Nhận thấy rằng trình tự axit amin bất kỳ, mà có mức độ tương đồng với trình tự nêu trên và có hoạt tính sinh học về cơ bản là tương tự như hoặc tương ứng với protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9, cũng có thể thuộc của sáng chế, mặc dù trình tự axit amin có thể có đoạn khuyết, cải biến, thay thế, hoặc bổ sung một phần trình tự.

Polynucleotit mã hóa axetyl-CoA synthetaza (acs) theo sáng chế có thể bao gồm polynucleotit mã hóa protein bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, hoặc protein bất kỳ có mức độ tương đồng là 70% hoặc cao hơn, cụ thể là 80% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, còn cụ thể hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và cụ thể nhất là 99% hoặc cao hơn, so với trình tự axit amin nêu trên, và cụ thể nhất là, nó có thể bao gồm trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 10.

Vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* theo sáng chế có thể là vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của ornithin decarboxylaza (ODC) được đưa thêm nữa vào đó.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “ornithin decarboxylaza” được dùng để chỉ

enzym tạo ra putrescin bằng cách làm trung gian cho quá trình tách nhóm carboxyl của ornithin. Mặc dù vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* không có enzym sinh tổng hợp putrescin, nhưng khi ornithin decarboxylaza (ODC) được đưa vào từ bên ngoài, thì putrescin được xuất ra ngoài tế bào do putrescin đang được tổng hợp. Ornithin decarboxylaza có thể được đưa vào từ bên ngoài có thể được sử dụng theo sáng chế với điều kiện nó có hoạt tính nêu trên, không kể vi sinh vật có nguồn gốc từ đâu, và cụ thể, vi sinh vật có nguồn gốc từ *E. coli* có thể được đưa vào.

Vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* theo sáng chế có thể là vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó, hoạt tính của i) ornithin carbamoyltransferaza (ArgF), ii) chất vận chuyển tiết glutamat, hoặc iii) ornithin carbamoyltransferaza và chất vận chuyển tiết glutamat được làm suy yếu tiếp, so với hoạt tính nội sinh của nó. Chất vận chuyển tiết glutamat thuộc giống *Corynebacterium* có thể là NCgl1221.

Vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* theo sáng chế có thể là vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó, hoạt tính của ít nhất một được chọn từ nhóm bao gồm axetyl gama glutamyl phosphat reductaza (ArgC), axetylglutamat syntaza hoặc ornithin axetyltransferaza (ArgJ), axetylglutamat kinaza (ArgB), và axetyl ornithin aminotransferaza (ArgD) được tăng cường hơn nữa so với hoạt tính nội sinh của nó.

Ngoài ra, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có thể là vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó, hoạt tính của axetyltransferaza, cụ thể hoạt tính của NCgl1469, được làm suy yếu tiếp so với hoạt tính nội sinh của nó.

Cuối cùng, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có thể là vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của chất vận chuyển tiết putrescin, cụ thể hoạt tính của NCgl2522, được tăng cường hơn nữa so với hoạt tính nội sinh của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “hoạt tính suy yếu” không những bao gồm việc đưa ra hiệu quả kém hơn so với chức năng ban đầu do sự giảm sút hoặc bất hoạt hoạt tính của chính protein, mà còn bao gồm sự giảm về hoạt tính của nó bằng cách giảm hoạt tính của gen nội sinh, hoạt hóa yếu tố điều hòa để ức chế sự biểu hiện

gen, giảm số lượng bản sao gen, cải biến trình tự điều hòa sự biểu hiện, và cụ thể, bất hoạt hoặc giảm sút hoạt tính enzym do thay thế hoặc cải biến gen khởi đầu và đột biến trong gen, v.v..

Cụ thể, theo sáng chế, hoạt tính suy yếu có thể được thực hiện bằng cách:

- 1) làm khuyết một phần hoặc toàn bộ polynucleotit mã hóa protein,
- 2) cải biến trình tự điều hòa sự biểu hiện để làm giảm sự biểu hiện polynucleotit,
- 3) cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để làm suy yếu hoạt tính của protein này, và
- 4) phương pháp đã được chọn từ các cách kết hợp nêu trên, nhưng phương pháp này không chỉ bị giới hạn ở đó.

Cụ thể, phương pháp làm khuyết một phần hoặc toàn bộ polynucleotit mã hóa protein có thể được thực hiện bằng cách thế polynucleotit mã hóa protein nội sinh đích trên nhiễm sắc thể bằng polynucleotit có đoạn khuyết một phần trình tự polynucleotit hoặc gen đánh dấu sử dụng vector để chèn nhiễm sắc thể trong vi khuẩn. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “một phần” có thể biến đổi tùy thuộc vào loại polynucleotit, nhưng nó có thể được dùng để chỉ cụ thể từ 1 đến 300, cụ thể hơn là từ 1 đến 100, và cụ thể hơn nữa là từ 1 đến 50.

Ngoài ra, phương pháp cải biến trình tự điều hòa sự biểu hiện có thể được thực hiện bằng cách cải biến trình tự điều hòa sự biểu hiện bằng cách làm khuyết, chèn, thế không bảo toàn hoặc bảo toàn trình tự polynucleotit, hoặc kết hợp các cách này để làm suy yếu tiếp hoạt tính của trình tự điều hòa sự biểu hiện, hoặc bằng cách thế trình tự polynucleotit bằng trình tự polynucleotit có hoạt tính yếu hơn. Trình tự điều hòa sự biểu hiện bao gồm gen khởi đầu, trình tự khởi đầu, trình tự mã hóa vị trí gắn kết với ribosom, và trình tự điều hòa kết thúc sự phiên mã và dịch mã.

Ngoài ra, phương pháp cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách cải biến trình tự bằng cách làm khuyết, chèn, thế không bảo toàn hoặc bảo toàn trình tự polynucleotit, hoặc kết hợp các cách này để làm suy yếu tiếp hoạt tính của enzym, hoặc bằng cách thế trình tự polynucleotit bằng trình tự polynucleotit cải thiện có hoạt tính mạnh hơn.

Ngoài ra, phương pháp làm khuyết yếu tố điều hòa mà ức chế sự biểu hiện của

polynucleotit của enzym có thể được thực hiện bằng cách thể polynucleotit để biểu hiện yếu tố ức chế bằng polynucleotit có đoạn khuyết một phần trình tự polynucleotit hoặc gen đánh dấu. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “một phần” có thể biến đổi tùy thuộc vào loại polynucleotit, nhưng nó có thể được dùng để chỉ cụ thể từ 1 đến 300, cụ thể hơn là 1 đến 100, và cụ thể hơn nữa là từ 1 đến 50.

Cụ thể, axetyl gama glutamyl phosphat reductaza (ArgC), axetylglutamat syntaza hoặc ornithin axetyltransferaza (ArgJ), axetylglutamat kinaza (ArgB), axetylornithin aminotransferaza (ArgD), ornithin carbamoyltransferaza (ArgF), các protein có liên quan tới sự xuất glutamat và ornithin decarboxylaza (ODC) có thể lần lượt bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37, hoặc 38, hoặc trình tự axit amin bất kỳ, cụ thể là có mức độ tương đồng là 70% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 80% hoặc cao hơn, và cụ thể hơn nữa là 90% hoặc cao hơn, so với trình tự axit amin nêu trên, mặc dù không bị giới hạn cụ thể ở đó. Ngoài ra, protein axetyl hóa putrescin có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30 hoặc 31, hoặc trình tự axit amin bất kỳ, cụ thể có mức độ tương đồng là 70% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 80% hoặc cao hơn, và cụ thể hơn nữa là 90% hoặc cao hơn, so với trình tự axit amin nêu trên, mặc dù trình tự axit amin này không bị giới hạn cụ thể ở đó.

Ngoài ra, theo sáng chế, chất vận chuyển tiết putrescin có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 hoặc 28, hoặc trình tự axit amin bất kỳ, cụ thể có mức độ tương đồng là 70% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 80% hoặc cao hơn, và cụ thể hơn nữa là 90% hoặc cao hơn, to trình tự axit amin nêu trên.

Trong số các protein nêu trên, sự gia tăng hoạt tính của axetyl gama glutamyl phosphat reductaza (ArgC), axetylglutamat syntaza hoặc ornithinaxetyltransferaza (ArgJ), axetylglutamat kinaza (ArgB), axetylornithin aminotransferaza (ArgD), ornithin decarboxylaza (ODC) và chất vận chuyển tiết putrescin có thể thu được, ví dụ, bằng phương pháp được chọn từ sự tăng cường số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa các protein, cải biến trình tự điều hòa sự biểu hiện để tăng cường sự biểu hiện của polynucleotit, cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để gia tăng hoạt tính của các enzym nêu trên, làm khuyết yếu tố điều hòa để ức chế sự biểu hiện của polynucleotit của các enzym nêu trên, hoặc kết hợp các cách nêu trên.

Ngoài ra, việc làm suy yếu ornithin carbamoyltransferaza (ArgF), các protein có liên quan tới sự xuất glutamat, và các protein axetyl hóa putrescin có thể thu được bằng phương pháp được chọn từ việc làm khuyết một phần hoặc toàn bộ polynucleotit mã hóa protein, cải biến trình tự điều hòa sự biểu hiện để làm suy giảm sự biểu hiện của polynucleotit, cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để làm suy yếu hoạt tính của các protein, và kết hợp các cách nêu trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất putrescin hoặc ornithin, bao gồm:

(i) nuôi cấy vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin trong môi trường; và

(ii) thu hồi putrescin hoặc ornithin từ vi sinh vật đã được nuôi cấy hoặc môi trường.

Trong phương pháp nêu trên, vi sinh vật có thể được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy theo mẻ, môi trường nuôi cấy liên tục, môi trường nuôi cấy cấp theo mẻ, v.v., đã biết trong lĩnh vực này, mặc dù không bị giới hạn cụ thể ở đó. Cụ thể, liên quan tới điều kiện nuôi cấy, độ pH thích hợp (tức là, độ pH tối ưu nằm trong khoảng từ 5 đến 9, cụ thể là độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8, và cụ thể nhất là độ pH bằng 6,8) có thể được duy trì bằng cách sử dụng hợp chất bazơ (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sulfuric), mặc dù không bị giới hạn cụ thể ở đó. Ngoài ra, điều kiện hiếu khí có thể được duy trì bằng cách bổ sung oxy hoặc hỗn hợp khí chứa oxy vào môi trường nuôi cấy tế bào. Nhiệt độ nuôi cấy có thể được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, và cụ thể ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C, và vi sinh vật có thể được nuôi cấy trong khoảng từ 10 giờ đến 160 giờ. Putrescin hoặc ornithin được tạo ra bằng cách nuôi cấy nêu trên có thể được tiết vào môi trường nuôi cấy hoặc duy trì trong các tế bào.

Ngoài ra, trong môi trường nuôi cấy, nguồn cacbon, như đường và hydrat cacbon (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, molasza, tinh bột, và xenluloza), các dầu và chất béo (ví dụ, dầu đỗ tương, dầu hạt hoa hướng dương, đậu phộng, và dầu dừa), axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic), các rượu (ví dụ, glyxerol và etanol), và axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic), có thể được sử dụng

riêng biệt hoặc ở dạng kết hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở đó; nguồn nitơ, như hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, dịch chiết nấm men, nước luộc thịt, dịch chiết mạch nha, nước ngâm ngũ cốc, bột mì từ đậu tương, và ure), hoặc hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat), có thể được sử dụng riêng biệt hoặc ở dạng kết hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở đó; và nguồn kali, như kali dihydro phosphat, dikali hydro phosphat, hoặc muối chứa natri tương ứng, có thể được sử dụng riêng biệt hoặc ở dạng kết hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Ngoài ra, các chất kích thích sự phát triển thiết yếu khác bao gồm các muối kim loại (ví dụ, magie sulfat hoặc sắt sulfat), axit amin, và vitamin có thể còn chứa trong môi trường, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Phương pháp thu hồi putrescin hoặc ornithin tạo ra trong quá trình nuôi cấy theo sáng chế có thể được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy thích hợp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, như nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, hoặc nuôi cấy cấp theo mẻ, và nhờ đó axit amin đích có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế được mô tả một cách chi tiết hơn trong các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, chứ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Đưa *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* vào chủng sản xuất putrescin và xác nhận khả năng sản xuất putrescin của chủng này

1-1. Tạo ra chủng đã được đưa đồng thời với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* thành gen nhảy của chủng trên cơ sở ATCC13032 sản xuất putrescin

Để xác nhận xem liệu việc đưa gen *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và gen *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* vào chủng trên cơ sở ATCC13032 sản xuất putrescin có thể cải thiện khả năng sản xuất putrescin hay không, các gen *argA* và *argE* được đưa vào gen nhảy của chủng này.

Vì vector để biến nạp có khả năng đưa vùng gen nhảy của vi sinh vật thuộc chủng *Corynebacterium* trong nhiễm sắc thể, nên *pDZTn* (WO 2009/125992) được sử dụng, và *lysCPI* gen khởi đầu (Công bố đơn quốc tế số WO 2009/096689, SEQ ID

NO: 39) được sử dụng làm gen khởi đầu.

Đặc biệt, cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 11 và 12 để thu được các mảnh tái tổ hợp đồng nhất ở vùng *argA* ORF được tạo ra trên cơ sở trình tự polynucleotit (SEQ ID NO: 2) của gen *argA* có nguồn gốc từ *E. coli*, mã hóa N-acetylglutamat syntaza. Ngoài ra, cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 15 và 16 để thu được các mảnh tái tổ hợp đồng nhất trong vùng *argE* ORF được điều chế tạo ra trên cơ sở trình tự polynucleotit (SEQ ID NO: 4) của gen *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*, mã hóa axetylornithin deaxetylaza, và cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NOS: 13 và 14 để thu được các mảnh tái tổ hợp đồng nhất trong vùng *lysCPI* được tạo ra trên cơ sở trình tự polynucleotit (SEQ ID NO: 39) của *lysCPI* (Bảng 1).

Bảng 1

Đoạn mồi	Trình tự (5' → 3')
PlysC-argA-F (SEQ ID NO:11)	GAAAGGTGCACAAAGATGGTAAAGGAACGTAAAAC CG
Tn-argA-RXh (SEQ ID NO:12)	GCCCCACTAGTCTCGAGCATGCGGCGTTGATTTTG
Tn-PlysC-FXh (SEQ ID NO:13)	GAATGAGTTCCTCGAGCCGATGCTAGGGCGAAAA
PlysC-R (SEQ ID NO:14)	CTTTGTGCACCTTTCGATCTACGTGCTGACAGTTAC
PlysC-argE-F (SEQ ID NO:15)	GAAAGGTGCACAAAGATGAAAAACAAATTACCGCC
Tn-argE-RXh (SEQ ID NO:16)	GCCCCACTAGTCTCGAGGTTTGAGTCACTGTCGGTTCG

Trước tiên, đoạn gen có kích thước khoảng 1,6 kb được khuếch đại bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của chủng *W3110* của *E. coli* làm khuôn mẫu cùng với cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11 và 12, để thu được gen *argA*. Cụ thể, PCR được thực hiện bằng cách lặp lại 30 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ ở 55°C

trong 30 giây, và giãn nở ở 72°C trong 1 phút và 30 giây. Các mảnh thu được từ đó được điện di trên 0,8% gel agarose, và các dải có kích thước mong muốn được rửa giải và được tinh chế.

Ngoài ra, vùng gen khởi đầu *lysCPI* được thực hiện PCR bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của chủng *KCCM10919P* (Công bố đơn quốc tế số WO 2009/096689) làm khuôn mẫu cùng với cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 13 và 14, được thực hiện bằng cách lặp lại 30 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây, và giãn nở ở 72°C trong 30 giây.

Vectơ *pDZTn* được xử lý bằng *XhoI* và sau đó mỗi sản phẩm trong số các sản phẩm PCR thu được từ đó được dùng để tách dòng dung hợp. Việc tách dòng dung hợp được thực hiện bằng cách sử dụng kit tách dòng In-Fusion® HD (Clontech) và plasmit thu được từ đó được gọi là *pDZTn-lysCPI-argA*.

Sau đó, để thu được gen *argE*, các sản phẩm PCR thu được bằng cách khuếch đại đoạn gen có kích thước khoảng 1,4 kb theo cùng cách như được mô tả trên đây, sử dụng nhiễm sắc thể của chủng *W3110* của *E. coli* làm khuôn mẫu cùng với cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 15 và 16, và được dùng để tách dòng dung hợp với vùng gen khởi đầu *lysCPI*. Plasmit thu được từ đó được gọi là *pDZTn-lysCPI-argE*.

Sau đó, plasmit *pDZTn-lysCPI-argA* được đưa vào chủng *KCCM11240P* (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2013-0082478) bằng cách điện di để thu được các thể biến nạp, và các thể biến nạp được phết lên môi trường phiên kính BHIS (Dịch truyền tim não (37 g/L), sorbitol (91 g/L), và aga (2%)) chứa kanamycin (25 µg/mL) và X-gal (5-bromo-4-clo-3-indolin-*D*-galactosit) và được nuôi cấy để tạo ra các khuẩn lạc. Trong số các khuẩn lạc này, các khuẩn lạc màu xanh da trời được chọn và do đó các chủng biến nạp đã được đưa vào với plasmit *pDZTn-lysCPI-argA* được chọn.

Các chủng đã chọn được nuôi cấy, lắc đồng thời (30°C, 8 giờ) trong môi trường CM (glucoza (10 g/L), polypepton (10 g/L), dịch chiết nấm men (5 g/L), dịch chiết thịt bò (5 g/L), NaCl (2,5 g/L), ure (2 g/L), độ pH = 6,8) và tiếp đó được pha loãng ở nồng độ từ 10⁻⁴ đến 10⁻¹⁰, được phết lên môi trường rắn chứa X-gal, và được nuôi cấy để tạo ra các khuẩn lạc. Trong số các khuẩn lạc đã tạo ra này, các khuẩn lạc

màu trắng xuất hiện với tốc độ tương đối chậm được chọn và chủng này đã được đưa vào với gen mã hóa *argA* bằng cách xuyên chéo thứ cấp được chọn cuối cùng. Chủng cuối cùng được chọn được thực hiện PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 12 và 13 và đã xác nhận rằng gen mã hóa *argA* được đưa vào, và chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được gọi là *KCCM11240P Tn:lysCPI-argA*.

Để đưa chủng này đã được đưa vào cùng với *argA* đã được tạo ra nêu trên, *pDZTn-lysCPI-argE* được tạo ra nêu trên được biến nạp thành he *KCCM11240P Tn:lysCPI-argA* theo cùng cách như được mô tả trên đây, và việc đưa *argE* thành vào gen nhảy được xác nhận trong chủng cuối cùng được chọn bằng cách tiến hành PCR có sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 13 và 16. Chủng cải biến thu được từ đó của *Corynebacterium glutamicum* được gọi là *KCCM11240P Tn:lysCPI-argA Tn:lysCPI-argE*.

1-2. Tạo ra chủng đã đưa đồng thời vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* thành gen nhảy của chủng trên cơ sở *ATCC13869* sản xuất putrescin

DAB12-a ΔNCgl1469 (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2013-0082478), là chủng trên cơ sở *ATCC13869* của *Corynebacterium glutamicum* sản xuất putrescin, được gọi là *DAB12-b*, và *argA* và *argE* được đưa vào gen nhảy để xác nhận xem liệu việc đưa các gen *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* có thể được có sự cải thiện về khả năng sản xuất putrescin của chủng thu được.

Trước tiên, *pDZTn-lysCPI-argA*, được tạo ra trước tiên, được biến nạp thành *DAB12-b* của *Corynebacterium glutamicum* theo cùng cách như trong Ví dụ 1-1, và việc đưa *argA* vào gen nhảy được xác nhận. Chủng cải biến thu được từ đó của *Corynebacterium glutamicum* được gọi là *DAB12-b Tn:lysCPI-argA*.

Sau đó, để đưa *argE* vào chủng này, mà đã được vào cùng với *argA*, the *pDZTn-lysCPI-argE*, được tạo ra trước tiên, được biến nạp thành *DAB12-b Tn:lysCPI-argA* theo cùng cách như trong Ví dụ 1-1, và việc đưa *argE* vào gen nhảy được xác nhận. Chủng cải biến thu được từ đó của *Corynebacterium glutamicum* được

gọi là *DAB12-b Tn:lysCP1-argE*.

1-3. Đánh giá khả năng sản xuất putrescin của chủng *Corynebacterium* sản xuất putrescin đã được đưa vào cùng với gen *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và gen *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*

Khả năng sản xuất putrescin được so sánh trong số các chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được tạo ra trong Ví dụ 1-1 và 1-2, để xác nhận ảnh hưởng của việc đưa *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* vào chủng sản xuất putrescin trong quá trình sản xuất putrescin.

Đặc biệt, hai loại chủng cải biến khác nhau của *Corynebacterium glutamicum*, nghĩa là, (*KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*; *DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*) được tạo ra trong Ví dụ 1-1 và 1-2, và hai loại chủng bố mẹ khác nhau (*tức là*, *KCCM11240P* và *DAB12-b*) lần lượt được phết lên môi trường phiên kính CM chứa 1mM arginin (1% glucoza, 1% polypepton, 0,5% dịch chiết nấm men, 0,5% dịch chiết thịt bò, 0,25% NaCl, 0,2% ure, 100 μ L NaOH 50%, 2% aga, độ pH = 6,8, đối với 1L), và được nuôi cấy ở 30°C trong 24 giờ.

Mỗi chủng trong số các chủng được nuôi cấy từ đó với lượng khoảng một vòng platin được chủng ngừa thành 25mL môi trường chuẩn độ (8% glucoza, 0,25% protein đậu tương, 0,50% chất rắn ngâm ngũ cốc, 4% (NH₄)₂SO₄, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,15% ure, biotin (100 μ g), thiamin HCl (3 mg), axit canxi-pantothenic (3 mg), nicotinamit (3 mg), 5% CaCO₃, đối với 1 L), và được nuôi cấy, lắc đồng thời ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 98 giờ. Trong tất cả môi trường nuôi cấy chủng, 1 mM arginin được bổ sung vào môi trường này. Khi nuôi cấy xong, nồng độ của putrescin tạo ra trong mỗi canh nuôi cấy được đo và kết quả được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Các chủng	Putrescin (g/L)
<i>KCCM 11240P</i>	12,2
<i>KCCM11240P Tn:lysCPI-argA Tn:lysCPI-argE</i>	13,4
<i>DAB12-b</i>	13,3
<i>DAB12-b Tn:lysCPI-argA Tn:lysCPI-argE</i>	14,6

Như được thể hiện trong Bảng 2 nêu trên, cả hai chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* đã đưa đồng thời vào với các *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* có khả năng sản xuất putrescin tăng 9,8% hoặc cao hơn.

Ví dụ 2: Tăng cường *pta-ackA* trong chủng sản xuất putrescin đã được đưa vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* và xác nhận khả năng sản xuất putrescin của chủng này

2-1. Tạo ra chủng có đoạn thể gen khởi đầu *pta-ackA* từ chủng *Corynebacterium* trên cơ sở ATCC13032 sản xuất putrescin

Chủng sản xuất putrescin đã được đưa vào với các gen *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*, được tạo ra trong Ví dụ 1, được gia tăng tiếp về hoạt tính phosphotransaxetylaza và axetat kinaza (*pta-ackA*) của nó và tác dụng tăng cường khả năng sản xuất putrescin của chủng được thử nghiệm.

Nhằm mục đích này, gen khởi đầu của operon *pta-ackA* trong nhiễm sắc thể được thể bằng gen khởi đầu có hoạt tính mạnh hơn so với gen nội sinh khởi đầu của nó, cụ thể, gen khởi đầu *lysCPI* (Công bố đơn quốc tế số WO 2009/096689) được đưa vào codon khởi đầu nằm sau của operon *pta-ackA*.

Trước tiên, mảnh tái tổ hợp đồng nhất, bao gồm gen khởi đầu *lysCPI* và cả hai đầu của gen khởi đầu này có trình tự *pta-ackA* ban đầu trên nhiễm sắc thể, thu được. Cụ thể, vùng có đầu 5' của gen khởi đầu *lysCPI* thu được bằng cách tiến hành PCR có sử dụng ADN của bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 cùng với cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 17 và 18. Cụ thể, phản ứng PCR được

thực hiện bằng cách lặp lại 30 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây, và giãn nở ở 72°C trong 30 giây.

Ngoài ra, vùng gen khởi đầu *lysCP1* thu được bằng cách tiến hành PCR trong điều kiện tương tự có sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 14 và 19, và vùng có đầu 3' của gen khởi đầu *lysCP1* thu được bằng cách tiến hành PCR có sử dụng ADN của bộ gen của *ATCC13032* của *Corynebacterium glutamicum* làm khuôn mẫu cùng với cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 20 và 21. Các đoạn mồi này đã được sử dụng để thu được gen khởi đầu *lysCP1* được thể hiện trong Bảng 1 nêu trên và Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Đoạn mồi	trình tự (5' -> 3')
Pro-pta-FX (SEQ ID NO: 17)	CCGGGGATCCTCTAGAGGGGTCTAAAAAATGTGGAG T
pta-PlysC-R (SEQ ID NO: 18)	GCCGTGCTTTTCGCCCTAGCATCGGACATCGCCTTTCT AATTT
PlysC-F (SEQ ID NO: 19)	CCGATGCTAGGGCGAAAAGCACGGC
PlysC-pta-ackA-F (SEQ ID NO: 20)	GAAAGGTGCACAAAGATGTCTGACACACCGACCTCAG CTC
Pro-pta-RX (SEQ ID NO: 21)	GCAGGTCGACTCTAGATTATCCGGCATTGGCTCT

Mỗi sản phẩm trong số các sản phẩm PCR thu được nêu trên được dùng để tách dòng dung hợp bằng cách sử dụng vector *pDZ* đã được xử lý bằng *XbaI*. Việc tách dòng dung hợp được thực hiện bằng cách sử dụng kit tách dòng In-Fusion® HD (Clontech) và plasmid thu được từ đó được gọi là *pDZ-lysCP1-1'pta-ackA*.

Plasmid *pDZ-lysCP1-1'pta-ackA* được tạo ra nêu trên lần lượt được đưa vào các chủng *KCCM11240P* và *KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*, là chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được tạo ra trong Ví dụ 1-1, bằng

cách điện di để thu được các thể biến nạp, và các thể biến nạp này được phết lên môi trường phiên kính BHIS (Dịch truyền tim não (37 g/L), sorbitol (91 g/L), và aga (2%)) chứa kanamycin (25 µg/mL) và X-gal (5-bromo-4-clo-3-indolin-*D*-galactosit) và được nuôi cấy để tạo ra các khuẩn lạc. Trong số các khuẩn lạc này, các khuẩn lạc màu xanh da trời được chọn và nhờ đó các chủng biến nạp đã được đưa vào với plasmit *pDZ-lysCP1-1'pta-ackA* được chọn.

Các chủng đã chọn được nuôi cấy, lắc đồng thời (30°C, 8 giờ) trong môi trường CM (glucoza (10 g/L), polypepton (10 g/L), dịch chiết nấm men (5 g/L), dịch chiết thịt bò (5 g/L), NaCl (2,5 g/L), ure (2 g/L), độ pH = 6,8) và tiếp đó được pha loãng từ 10^{-4} đến 10^{-10} , được phết lên môi trường rắn chứa X-gal, và được nuôi cấy để tạo ra các khuẩn lạc. Trong số các khuẩn lạc đã tạo ra này, các khuẩn lạc màu trắng xuất hiện với tốc độ tương đối chậm được chọn và chủng này, trong đó gen khởi đầu *pta-ackA* được thế bằng gen khởi đầu *lysCP1* bằng cách xuyên chéo thứ cấp, được chọn cuối cùng.

Chủng cuối cùng được chọn được tiến hành PCR có sử dụng cặp đoạn môi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 19 và 21 và được xác nhận rằng gen khởi đầu *lysCP1* được đưa vào codon khởi đầu nằm sau của *pta-ackA* trong nhiễm sắc thể. Cụ thể, phản ứng PCR được thực hiện bằng cách lặp lại 30 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây, và giãn nở ở 72°C trong 1 phút.

Chủng cải biến thu được từ đó của *Corynebacterium glutamicum* lần lượt được gọi là *KCCM11240P lysCP1-1'pta-ackA* và *KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE lysCP1-1'pta-ackA*.

2-2. Tạo ra chủng có đoạn thể chứa gen khởi đầu *pta-ackA* từ chủng *Corynebacterium* trên cơ sở *ATCC13869* sản xuất putrescin

Để xác nhận xem trình tự của gen mã hóa *pta-ackA* có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum ATCC13869* và protein được biểu hiện từ đó bằng phương pháp được bộc lộ trong Ví dụ 2-1 hay không, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN của bộ gen của *Corynebacterium glutamicum ATCC13869* làm khuôn mẫu cùng với cặp đoạn môi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 17 và 22 (Bảng 3 và 4). Cụ thể, phản ứng PCR được thực hiện bằng cách lặp lại 30 chu kỳ biến tính ở 95°C

trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây, và giãn nở ở 72°C trong 3 phút.

Các sản phẩm PCR thu được từ đó được tách bằng cách điện di và các trình tự này được phân tích. Do đó, đã xác nhận rằng gen mã hóa pta-ackA có nguồn gốc từ ATCC13869 của *Corynebacterium glutamicum* bao gồm trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 8 và protein được mã hóa bởi gen bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7.

Mặt khác, do việc so sánh giữa trình tự axit amin của pta-ackA có nguồn gốc từ ATCC13032 của *Corynebacterium glutamicum* (SEQ ID NO: 5) và trình tự axit amin của pta-ackA có nguồn gốc từ ATCC13869 của *Corynebacterium glutamicum*, đã xác nhận rằng chúng có mức độ tương đồng trình tự là 99,4%.

Bảng 4

Đoạn mồi	trình tự (5' → 3')
Pta-ackA-R (SEQ ID NO: 22)	TGCAGTTTCACCCCTTAA
13869_pta-PlysC-R (SEQ ID NO: 23)	GCCGTGCTTTTCGCCCTAGCATCGGACATCGCC TTTCTAGTTT

Trước tiên, mảnh tái tổ hợp đồng nhất, bao gồm gen khởi đầu *lysCP1* và cả hai đầu của gen khởi đầu có trình tự *pta-ackA* ban đầu trên nhiễm sắc thể, thu được. Cụ thể, vùng có đầu 5' của gen khởi đầu *lysCP1* thu được bằng cách tiến hành PCR có sử dụng ADN của bộ gen của ATCC13869 của *Corynebacterium glutamicum* cùng với cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 17 và 23. Cụ thể, phản ứng PCR được thực hiện bằng cách lặp lại 30 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây, và giãn nở ở 72°C trong 30 giây. Ngoài ra, vùng gen khởi đầu *lysCP1* thu được bằng cách tiến hành PCR trong điều kiện tương tự có sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 14 và 19, và vùng có đầu 3' của gen khởi đầu *lysCP1* thu được bằng cách tiến hành PCR có sử dụng ADN của bộ gen của ATCC13869 của *Corynebacterium glutamicum* làm khuôn mẫu cùng với cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NOS: 20 và 21. Các đoạn mồi được sử dụng trong quá trình thể gen khởi đầu được thể hiện trong các Bảng 1, 3 và 4.

Mỗi sản phẩm trong số các sản phẩm PCR thu được từ đó được dùng để tách dòng dung hợp sử dụng vector *pDZTn* đã được xử lý bằng *XhoI*. Việc tách dòng dung hợp được thực hiện bằng cách sử dụng kit tách dòng In-Fusion® HD (Clontech) và plasmit thu được từ đó được gọi là *pDZ-lysCP1-2'pta-ackA*.

Plasmit *pDZ-lysCP1-2'pta-ackA* được tạo ra ở trên lần lượt được biến nạp thành *DAB12-b* và *DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*, là chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được tạo ra trong Ví dụ 1-2, theo cùng cách như trong Ví dụ 2-1. Do đó, đã xác nhận rằng gen khởi đầu *lysCP1* được đưa vào codon khởi đầu nằm sau của *pta-ackA* trong nhiễm sắc thể. Các chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* lần lượt được gọi là *DAB12-b lysCP1-2'pta-ackA* và *DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE lysCP1-2'pta-ackA*.

2-3. Đánh giá khả năng sản xuất putrescin của chủng có *pta-ackA* tăng cường

Để xác nhận ảnh hưởng của *pta-ackA* tăng cường trong chủng sản xuất putrescin đã được đưa vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*, khả năng sản xuất putrescin được so sánh trong số các chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được tạo ra trong Ví dụ 2-1 và 2-2.

Đặc biệt, bốn loại chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* (*KCCM11240P lysCP1-1'pta-ackA*; *KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE lysCP1-1'pta-ackA*; *DAB12-b lysCP1-2'pta-ackA*; và *DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE lysCP1-2'pta-ackA*) và bốn loại chủng bố mẹ (*KCCM11240P*; *KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*; *DAB12-b*; và *DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*) lần lượt được phết lên môi trường phiên kính CM chứa 1mM arginin (1% glucoza, 1% polypepton, 0,5% dịch chiết nấm men, 0,5% dịch chiết thịt bò, 0,25% NaCl, 0,2% ure, 100 µL NaOH 50%, 2% aga, độ pH = 6,8, đối với 1L), và được nuôi cấy ở 30°C trong 24 giờ. Mỗi chủng trong số các chủng được nuôi cấy từ đó với lượng khoảng một vòng platin được chủng ngừa thành 25mL môi trường chuẩn độ (8% glucoza, 0,25% protein đậu tương, 0,50% chất rắn ngâm ngũ cốc, 4% (NH₄)₂SO₄, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,15% ure, biotin (100 µg), thiamin HCl (3 mg), axit canxi-pantothenic (3 mg), nicotinamit (3 mg), 5% CaCO₃, đối với 1L), và được nuôi cấy, lắc đồng thời ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 98 giờ.

Trong tất cả môi trường nuôi cấy chủng, 1 mM arginin được bổ sung vào môi trường này. Khi nuôi cấy xong, nồng độ của putrescin tạo ra trong mỗi canh nuôi cấy được đo và kết quả được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Các chủng	Putrescin (g/L)
<i>KCCM 11240P</i>	12,2
<i>KCCM 11240P lysCP1-1'pta-ackA</i>	12,3
<i>KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE</i>	13,4
<i>KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE lysCP1-1'pta-ackA</i>	14,1
<i>DAB12-b</i>	13,3
<i>DAB12-b lysCP1-2'pta-ackA</i>	13,4
<i>DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE</i>	14,6
<i>DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE lysCP1-2'pta-ackA</i>	15,2

Như được thể hiện trong Bảng 5, khi *pta-ackA* lần lượt được gia tăng trong *KCCM 11240P* và *DAB12-b*, thì lượng sản xuất putrescin thu được ở mức độ tương đương. Tuy nhiên, khi *pta-ackA* được gia tăng ở hai loại chủng cải biến khác nhau của *Corynebacterium glutamicum* đã đưa đồng thời lần lượt vào với các gen *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* (*KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*; *DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*), lượng sản xuất putrescin được tăng lên 14,3% hoặc cao hơn so với chủng bố mẹ. Ngoài ra, lượng putrescin tạo ra được tăng lên 4% hoặc cao hơn, trên cơ sở chủng cải biến.

Như vậy, các tác giả sáng chế đã gọi tên vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* (*Corynebacterium glutamicum KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE :lysCP1-1'pta-ackA*), có khả năng sản xuất putrescin cải thiện, được tạo ra từ chủng *KCCM 11240P* của *Corynebacterium glutamicum* sản xuất putrescin bằng cách đưa hoạt tính của *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* và hoạt tính gia tăng của *pta-ackA* đối với chủng *KCCM 11240P* của

Corynebacterium glutamicum, như CC01-1145, và được lưu giữ ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 21 tháng 11 năm 2014, với số lưu giữ KCCM11606P theo Hiệp định Budapest.

Ví dụ 3: Đưa *acs* có nguồn gốc từ *E. coli* vào chủng sản xuất putrescin đã được đưa vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* và xác nhận khả năng sản xuất putrescin của chủng thu được

3-1. Tạo ra chủng đã được đưa vào với *acs* có nguồn gốc từ *E. coli* vào gen nhảy của chủng trên cơ sở ATCC13032 sản xuất putrescin

acs được đưa vào gen nhảy bằng cách sử dụng gen khởi đầu *lysCPI* để xác nhận xem liệu việc đưa gen acetyl-CoA synthetaza có nguồn gốc từ *E. coli* (*acs*) vào chủng trên cơ sở ATCC13032 sản xuất putrescin, đã được đưa vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*, có thể cải thiện khả năng sản xuất putrescin.

Đặc biệt, cặp đoạn môi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 24 và 25 để thu được mảnh tái tổ hợp đồng nhất bao quanh vùng *acs* ORF và cặp đoạn môi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 13 và 14 để thu được mảnh tái tổ hợp đồng nhất bao quanh vùng gen khởi đầu *lysCPI* được điều chế như được thể hiện trong Bảng 1 nêu trên và Bảng 6 dưới đây, trên cơ sở trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 10 của gen mã hóa *acs*.

Bảng 6

Đoạn môi	trình tự (5' → 3')
PlysC-acs-F (SEQ ID NO: 24)	GAAAGGTGCACAAAGATGAGCCAAATTCACAA A
Tn-acs-RXh (SEQ ID NO: 25)	GCCCCACTAGTCTCGAGAAGGCGTTTACGCCGCA TCC

Đặc biệt, để thu được gen *acs*, đoạn gen có kích thước khoảng 2 kb được khuếch đại bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của chủng W3110 của *E. coli* làm khuôn mẫu cùng với cặp đoạn môi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 24 và 25. Cụ thể,

phản ứng PCR được thực hiện bằng cách lặp lại 30 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây, và giãn nở ở 72°C trong 1 phút và 30 giây. Sau đó, các sản phẩm PCR thu được từ đó được điện di trên 0,8% gel agarose và các dải có kích thước mong muốn được rửa giải và được tinh chế.

Ngoài ra, vùng gen khởi đầu *lysCPI* thu được bằng cách tiến hành PCR có sử dụng nhiễm sắc thể của chủng *KCCM10919P* (Công bố đơn quốc tế số WO 2009/096689) làm khuôn mẫu cùng với cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 13 và 14, được thực hiện bằng cách lặp lại 30 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây, và giãn nở ở 72°C trong 30 giây.

Vector *pDZ* được xử lý bằng *XhoI* và mỗi sản phẩm trong số các sản phẩm PCR thu được từ đó được dùng để tách dòng dung hợp. Việc tách dòng dung hợp được thực hiện bằng cách sử dụng kit tách dòng In-Fusion® HD (Clontech). Plasmid thu được từ đó được gọi là *pDZTn-lysCPI-acs*.

Sau đó, plasmid *pDZTn-lysCPI-acs* lần lượt được đưa vào *KCCM11240P* và *KCCM11240P Tn:lysCPI-argA Tn:lysCPI-argE*, là chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được tạo ra trong Ví dụ 1-1, bằng cách điện di để thu được các thể biến nạp, và các thể biến nạp này được phết lên môi trường phiên kính BHIS (Dịch truyền tim não (37 g/L), sorbitol (91 g/L), và aga (2%)) chứa kanamycin (25 µg/mL) và X-gal (5-bromo-4-clo-3-indolin-*D*-galactosit) và được nuôi cấy để tạo ra các khuẩn lạc. Trong số các khuẩn lạc này, các khuẩn lạc màu xanh da trời được chọn và nhờ đó các chủng biến nạp đã được đưa vào với plasmid *pDZTn-lysCPI-acs* được chọn.

Các chủng đã chọn được nuôi cấy, lắc đồng thời (30°C, 8 giờ) trong môi trường CM (glucoza (10 g/L), polypepton (10 g/L), dịch chiết nấm men (5 g/L), dịch chiết thịt bò (5 g/L), NaCl (2,5 g/L), ure (2 g/L), độ pH = 6,8) và tiếp đó được pha loãng từ 10^{-4} đến 10^{-10} , được phết lên môi trường rắn chứa X-gal, và được nuôi cấy để tạo ra các khuẩn lạc. Trong số các khuẩn lạc đã tạo ra này, các khuẩn lạc màu trắng xuất hiện với tốc độ tương đối chậm được chọn và các chủng này đã được đưa vào với gen mã hóa *acs* bằng cách xuyên chéo thứ cấp được chọn cuối cùng. Các chủng được chọn cuối cùng được tiến hành PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 13 và 25 và đã xác nhận rằng gen mã hóa *acs* được đưa vào, và

các chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* lần lượt được gọi là *KCCM11240P Tn:lysCP1-acs* và *KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE Tn:lysCP1-acs*.

3-2. Tạo ra chủng đã được đưa vào với *acs* có nguồn gốc từ *E. coli* vào gen nhảy của chủng trên cơ sở *ATCC13869* sản xuất putrescin

Như trong Ví dụ 3-1, *pDZTn-lysCP1-acs* được tạo ra ở trên được biến nạp thành *DAB12-b* và hệ *DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*, lần lượt là chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được tạo ra trong Ví dụ 1-2, theo cùng cách như trong Ví dụ 3-1, và đã xác nhận rằng *acs* được đưa vào gen nhảy này.

Chủng cải biến thu được từ đó của *Corynebacterium glutamicum* lần lượt được gọi là *DAB12-b Tn:lysCP1-acs* và *DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE Tn:lysCP1-acs*.

3-3. Đánh giá khả năng sản xuất putrescin của chủng đã được đưa vào với *acs* có nguồn gốc từ *E. coli*

Để xác nhận mức độ ảnh hưởng của việc đưa *acs* trong chủng sản xuất putrescin, mà đã được đưa vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*, khả năng sản xuất putrescin được so sánh trong số các chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được tạo ra trong Ví dụ 3-1 và 3-2.

Đặc biệt, bốn loại chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* (*KCCM11240P Tn:lysCP1-acs*; *KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE Tn:lysCP1-acs*; *DAB12-b Tn:lysCP1-acs*; và *DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE Tn:lysCP1-acs*) và bốn loại chủng bố mẹ (*KCCM11240P*; *KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*; *DAB12-b*; và *DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*) lần lượt được phết lên môi trường phiên kính CM chứa 1mM arginin (1% glucoza, 1% polypepton, 0,5% dịch chiết nấm men, 0,5% dịch chiết thịt bò, 0,25% NaCl, 0,2% ure, 100 μ L NaOH 50%, 2% aga, độ pH = 6,8, đối với 1L), và được nuôi cấy ở 30°C trong 24 giờ. Mỗi chủng trong số các chủng này được nuôi cấy từ đó với lượng khoảng một vòng platin được chủng ngừa thành 25mL môi trường chuẩn độ (8% glucoza, 0,25% protein đậu tương, 0,50% chất rắn ngâm ngũ cốc,

4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15% ure, biotin (100 μg), thiamin HCl (3 mg), axit canxi-pantothenic (3 mg), nicotinamit (3 mg), 5% CaCO_3 , đối với 1L), và được nuôi cấy, lắc đồng thời ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 98 giờ. Trong tất cả môi trường nuôi cấy chủng, 1 mM arginin được bổ sung vào môi trường này. Khi nuôi cấy xong, nồng độ của putrescin tạo ra trong mỗi canh nuôi cấy được đo và kết quả được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

Các chủng	Putrescin (g/L)
<i>KCCM 11240P</i>	12,2
<i>KCCM 11240P Tn:lysCP1-acS</i>	12,2
<i>KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE</i>	13,4
<i>KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE Tn:lysCP1-acS</i>	13,9
<i>DAB12-b</i>	13,3
<i>DAB12-b Tn:lysCP1-acS</i>	13,2
<i>DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE</i>	14,6
<i>DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE Tn:lysCP1-acS</i>	15,1

Như được thể hiện trong Bảng 7, khi *acs* lần lượt được đưa vào *KCCM 11240P* và *DAB12-b*, thì lượng sản xuất putrescin ở mức độ tương đương. Tuy nhiên, khi *acs* lần lượt được đưa vào ở hai loại chủng cải biến khác nhau của *Corynebacterium glutamicum* đã đưa đồng thời vào với các gen *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* (*KCCM11240P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*; *DAB12-b Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*), thì lượng sản xuất putrescin được tăng lên 13,5% hoặc cao hơn so với chủng bố mẹ. Ngoài ra, lượng sản xuất putrescin được tăng lên 3,4% hoặc cao hơn so với chủng cải biến nêu trên.

Ví dụ 4: Chủng có đoạn đưa *argA* có nguồn gốc từ *E. coli*, *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*, và đoạn thể của gen khởi đầu *pta-ackA* từ chủng sản xuất putrescin có khả năng xuất putrescin cải thiện, và khả năng sản xuất putrescin của chủng này

4-1. Tạo ra chủng có đoạn đưa *argA*, *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* và đoạn thể của gen khởi đầu *pta-ackA* từ chủng có khả năng xuất putrescin cải thiện

Chúng được tạo ra để thử nghiệm xem liệu việc đưa *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* và sự gia tăng hoạt tính của *pta-ackA* của *Corynebacterium* có thể cải thiện khả năng sản xuất putrescin hay không, trên cơ sở chủng KCCM11401P (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2014-0115244) có khả năng xuất putrescin cải thiện.

Đặc biệt, *pDZTn-lysCP1-argA* được tạo ra trong Ví dụ 1-1 được biến nạp thành KCCM11401P theo cùng cách như trong Ví dụ 1-1, và do đó, đã xác nhận rằng *argA* được đưa vào gen nhảy. Chúng cải biến thu được từ đó của *Corynebacterium glutamicum* được gọi là KCCM11401P *Tn:lysCP1-argA*.

Ngoài ra, để đưa *argE* vào chủng này, mà đã được đưa vào với *argA* như được tạo ra trong Ví dụ 1-1, *pDZTn-lysCP1-argE* được tạo ra trong Ví dụ 1-1 được biến nạp thành KCCM11401P *Tn:lysCP1-argA* theo cùng cách như trong Ví dụ 1-1 và đã xác nhận rằng *argE* được đưa vào gen nhảy này. Chúng cải biến đã chọn từ đó được gọi là KCCM11401P *Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*.

Sau đó, *pDZ-lysCP1-1'pta-ackA* được tạo ra trong Ví dụ 2-1 được biến nạp thành KCCM11401P *Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE* theo cùng cách như trong Ví dụ 2-1, và đã xác nhận rằng gen khởi đầu *lysCP1* được đưa vào codon khởi đầu nằm sau của *pta-ackA* trong nhiễm sắc thể. Chúng cải biến nêu trên của *Corynebacterium glutamicum* được gọi là KCCM11401P *Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE lysCP1-1'pta-ackA*.

4-2. Đánh giá chủng có đoạn đưa *argA* có nguồn gốc từ *E. coli*, *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* và đoạn thể của gen khởi đầu *pta-ackA* từ chủng có khả năng xuất putrescin cải thiện

Để xác nhận ảnh hưởng của việc đưa *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* và hoạt tính *pta-ackA* tăng cường trên chủng của *Corynebacterium glutamicum* sản xuất putrescin có khả năng xuất putrescin cải thiện, khả năng sản xuất putrescin được so sánh trong số các chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được tạo ra trong Ví dụ 4-1.

Đặc biệt, các chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* (KCCM11401P *Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*, KCCM11401P *Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*

lysCP1-1'pta-ackA) và chủng bố mẹ (*KCCM11401P*) lần lượt được phết lên môi trường phiên kính CM chứa 1mM arginin (1% glucoza, 1% polypepton, 0,5% dịch chiết nấm men, 0,5% dịch chiết thịt bò, 0,25% NaCl, 0,2% ure, 100 μ L NaOH 50%, 2% aga, độ pH = 6,8, đối với 1L), và được nuôi cấy ở 30°C trong 24 giờ. Mỗi chủng trong số các chủng được nuôi cấy từ đó với lượng khoảng một vòng platin được chủng ngừa thành 25mL môi trường chuẩn độ (8% glucoza, 0,25% protein đậu tương, 0,50% chất rắn ngâm ngũ cốc, 4% (NH₄)₂SO₄, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,15% ure, biotin (100 μ g), thiamin HCl (3 mg), axit canxi-pantothenic (3 mg), nicotinamit (3 mg), 5% CaCO₃, đối với 1L), và được nuôi cấy, lắc đồng thời ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 98 giờ. Trong tất cả môi trường nuôi cấy chủng, 1 mM arginin được bổ sung vào môi trường này. Khi nuôi cấy xong, nồng độ của putrescin tạo ra trong mỗi canh nuôi cấy được đo và kết quả được thể hiện trong Bảng 8 dưới đây.

Bảng 8

Các chủng	Putrescin (g/L)
<i>KCCM11401P</i>	11,8
<i>KCCM11401P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE</i>	13,2
<i>KCCM11401P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE lysCP1-1'pta-ackA</i>	13,7

Như được thể hiện trong Bảng 8, đã xác nhận rằng khi *KCCM11401P* có khả năng xuất putrescin gia tăng được đưa vào với gen *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và gen *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*, lượng putrescin tạo ra được tăng lên 11,9% so với lượng của chủng bố mẹ, và khi chủng này được gia tăng tiếp với *pta-ackA*, thì lượng putrescin tạo ra được tăng lên 16,1% so với lượng của chủng bố mẹ.

Ví dụ 5: Đưa *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* trong chủng sản xuất ornithin vào và xác nhận khả năng sản xuất ornithin của chủng này

5-1. Tạo ra chủng đã đưa đồng thời vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* vào gen nhảy của chủng trên cơ sở KCCM11137P sản xuất ornithin

Để xác nhận xem liệu việc đưa gen *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và gen *argE*

có nguồn gốc từ *E. coli* vào chủng *KCCM11137P* (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-1372635), là chủng trên cơ sở *ATCC13032* của *Corynebacterium glutamicum* sản xuất ornithin, có thể cải thiện khả năng sản xuất ornithin, gen *argA* và gen *argE* được đưa vào gen nhảy của chủng bằng cách sử dụng vector được tạo ra trong Ví dụ 1-1.

Trước tiên, plasmit *pDZTn-lysCP1-argA* được đưa vào t chủng *KCCM11137P* bằng cách điện di để thu được các thể biến nạp, và các thể biến nạp này được phết lên môi trường phiên kính BHIS (Dịch truyền tim não (37 g/L), sorbitol (91 g/L), và aga (2%)) chứa kanamycin (25 µg/mL) và X-gal (5-bromo-4-clo-3-indolin-*D*-galactosit) và được nuôi cấy để tạo ra các khuẩn lạc. Trong số các khuẩn lạc này, các khuẩn lạc màu xanh da trời được chọn và nhờ đó các chủng đã được đưa vào với plasmit *pDZTn-lysCP1-argA* được chọn.

Các chủng đã chọn được nuôi cấy, lắc đồng thời (30°C, 8 giờ) trong môi trường CM (glucoza (10 g/L), polypepton (10 g/L), dịch chiết nấm men (5 g/L), dịch chiết thịt bò (5 g/L), NaCl (2,5 g/L), ure (2 g/L), độ pH = 6,8) và tiếp đó được pha loãng từ 10^{-4} đến 10^{-10} , được phết lên môi trường rắn chứa X-gal, và được nuôi cấy để tạo ra các khuẩn lạc. Trong số các khuẩn lạc đã tạo ra này, các khuẩn lạc màu trắng xuất hiện với tốc độ tương đối chậm được chọn và chủng đã được đưa vào với gen mã hóa *argA* bằng cách xuyên chéo thứ cấp được chọn cuối cùng. Chủng cuối cùng được chọn được tiến hành PCR có sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 12 và 13 và đã xác nhận rằng gen mã hóa *argA* được đưa vào, và chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được gọi là *KCCM11137P Tn:lysCP1-argA*.

Để đưa *argE* vào chủng này, mà đã được đưa vào với *argA* như được tạo ra nêu trên, *pDZTn-lysCP1-argE* được tạo ra trong Ví dụ 1-1 được biến nạp thành *KCCM11137P Tn:lysCP1-argA* theo cùng cách như trong Ví dụ 1-1, và nhờ đó đã xác nhận rằng he *argE* được đưa vào trong gen nhảy.

Chủng cải biến thu được từ đó của *Corynebacterium glutamicum* được gọi là *KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*.

5-2. Đánh giá khả năng sản xuất ornithin của chủng *Corynebacterium* sản xuất ornithin đã được đưa vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*

Để xác nhận ảnh hưởng của việc đưa *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* trong quá trình sản xuất ornithin ở chủng sản xuất ornithin, khả năng sản xuất ornithin được so sánh trong số các chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được tạo ra trong Ví dụ 5-1.

Đặc biệt, một loại chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* (*KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*) và một loại chủng bố mẹ (*KCCM11137P*) lần lượt được phết lên môi trường phiên kính CM chứa 1mM arginin (1% glucoza, 1% polypepton, 0,5% dịch chiết nấm men, 0,5% dịch chiết thịt bò, 0,25% NaCl, 0,2% ure, 100 μ L NaOH 50%, 2% aga, độ pH = 6,8, đối với 1L), và được nuôi cấy ở 30°C trong 24 giờ. Mỗi chủng trong số các chủng được nuôi cấy từ đó với lượng khoảng một vòng platin được chủng ngừa thành 25mL môi trường chuẩn độ (8% glucoza, 0,25% protein đậu tương, 0,50% chất rắn ngâm ngũ cốc, 4% (NH₄)₂SO₄, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,15% ure, biotin (100 μ g), thiamin HCl (3 mg), axit canxi-pantothenic (3 mg), nicotinamit (3 mg), 5% CaCO₃, đối với 1L), và được nuôi cấy, lắc đồng thời ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 98 giờ. Trong tất cả môi trường nuôi cấy chủng, 1 mM arginin được bổ sung vào môi trường này. Khi nuôi cấy xong, nồng độ của putrescin tạo ra trong mỗi canh nuôi cấy được đo và kết quả được thể hiện trong Bảng 9 dưới đây.

Bảng 9

Các chủng	Ornithin (g/L)
<i>KCCM11137P</i>	7,8
<i>KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE</i>	8,9

Như được thể hiện trong Bảng 9, đã xác nhận rằng khi chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* đã được đưa vào với gen *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* gen có lượng sản xuất ornithin gia tăng 14,1% so với chủng bố mẹ.

Ví dụ 6: Tăng cường *pta-ackA* trong chủng đã được đưa vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* và xác nhận khả năng sản xuất ornithin của chủng

6-1. Tạo ra chủng có đoạn thể chứa gen khởi đầu *pta-ackA* từ chủng trên cơ sở ATCC13032 sản xuất ornithin

Để xác nhận xem liệu hoạt tính *pta-ackA* tăng cường trong chủng trên cơ sở ATCC13032 sản xuất ornithin đã được đưa vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* có thể cải thiện khả năng sản xuất ornithin, gen khởi đầu *lysCP1* (WO 2009/096689) được đưa vào codon khởi đầu nằm sau của operon *pta-ackA* trong nhiễm sắc thể.

Trước tiên, plasmid *pDZ-lysCP1-1'pta-ackA* được tạo ra trong Ví dụ 2-1 lần lượt được đưa vào các chủng *Tn:lysCP1-argA* *Tn:lysCP1-argE* của *KCCM11137P* và *KCCM11137P*, bằng cách điện di để thu được các thể biến nạp và các thể biến nạp này được phết lên môi trường phiên kính BHIS (Dịch truyền tim não (37 g/L), sorbitol (91 g/L), và aga (2%)) chứa kanamycin (25 µg/mL) và X-gal (5-bromo-4-clo-3-indolin-D-galactosit) và được nuôi cấy để tạo ra các khuẩn lạc. Trong số các khuẩn lạc này, các khuẩn lạc màu xanh da trời được chọn và nhờ đó các chủng biến nạp đã được đưa vào với plasmid *pDZ-lysCP1-1'pta-ackA* được chọn.

Các chủng đã chọn được nuôi cấy, lắc đồng thời (30°C, 8 giờ) trong môi trường CM (glucoza (10 g/L), polypepton (10 g/L), dịch chiết nấm men (5 g/L), dịch chiết thịt bò (5 g/L), NaCl (2,5 g/L), ure (2 g/L), độ pH = 6,8) và tiếp đó được pha loãng từ 10^{-4} đến 10^{-10} , được phết lên môi trường rắn chứa X-gal, và được nuôi cấy để tạo ra các khuẩn lạc. Trong số các khuẩn lạc đã tạo ra này, các khuẩn lạc màu trắng xuất hiện với tốc độ tương đối chậm được chọn và chủng, trong đó gen khởi đầu *pta-ackA* được thế bằng gen khởi đầu *lysCP1* bằng cách xuyên chéo thứ cấp, được chọn cuối cùng. Chủng cuối cùng được chọn được tiến hành PCR có sử dụng cặp đoạn môi có trình tự nêu trong SEQ ID NOS: 19 và 21 và đã xác nhận rằng gen khởi đầu *lysCP1* được đưa vào codon khởi đầu nằm sau của operon *pta-ackA* trong nhiễm sắc thể. Cụ thể, phản ứng PCR được thực hiện bằng cách lặp lại 30 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây, và giãn nở ở 72°C trong 1 phút.

Chủng cải biến thu được từ đó của *Corynebacterium glutamicum* lần lượt được gọi là *KCCM11137P lysCP1-1'pta-ackA* và *KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE lysCP1-1'pta-ackA*.

6-2. Đánh giá khả năng sản xuất ornithin của chủng có hoạt tính pta-ackA gia tăng

Để xác nhận ảnh hưởng của hoạt tính pta-ackA tăng cường trên chủng sản xuất ornithin đã được đưa vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*, khả năng sản xuất ornithin được so sánh trong số các chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được tạo ra trong Ví dụ 6-1.

Đặc biệt, hai loại chủng cải biến khác nhau của *Corynebacterium glutamicum*, (*KCCM11137P lysCP1-1'pta-ackA*; *KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE lysCP1-1'pta-ackA*) và hai loại chủng bố mẹ khác nhau (*KCCM11137P*; *KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*) lần lượt được phết lên môi trường phiên kính CM chứa 1mM arginin (1% glucoza, 1% polypepton, 0,5% dịch chiết nấm men, 0,5% dịch chiết thịt bò, 0,25% NaCl, 0,2% ure, 100 μ L NaOH 50%, 2% aga, độ pH = 6,8, đối với 1L), và được nuôi cấy ở 30°C trong 24 giờ. Mỗi chủng trong số các chủng được nuôi cấy từ đó với lượng khoảng một vòng platin được chủng ngừa thành 25mL môi trường chuẩn độ (8% glucoza, 0,25% protein đậu tương, 0,50% chất rắn ngâm ngũ cốc, 4% (NH₄)₂SO₄, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,15% ure, biotin (100 μ g), thiamin HCl (3 mg), axit canxi-pantothenic (3 mg), nicotinamit (3 mg), 5% CaCO₃, đối với 1L), và được nuôi cấy, lắc đồng thời ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 98 giờ. Trong tất cả môi trường nuôi cấy chủng, 1 mM arginin được bổ sung vào môi trường này. Khi nuôi cấy xong, nồng độ của ornithin tạo ra trong mỗi canh nuôi cấy được đo và kết quả được thể hiện trong Bảng 10 dưới đây.

Bảng 10

Các chủng	Ornithin (g/L)
<i>KCCM11137P</i>	7,8
<i>KCCM11137P lysCP1-1'pta-ackA</i>	7,7
<i>KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE</i>	8,9
<i>KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE lysCP1-1'pta-ackA</i>	9,4

Như được thể hiện trong Bảng 10, đã xác nhận rằng khi chủng *KCCM11137P* được gia tăng có hoạt tính pta-ackA, thì lượng sản xuất ornithin không được tăng lên, trong khi đó khi chủng *KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*, là chủng cải

biến của *Corynebacterium glutamicum* đã đưa đồng thời vào với gen *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và gen *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*, thì lượng sản xuất ornithin được tăng lên 20,5% so với lượng của chủng *KCCM11137P*, và cũng được tăng lên 5,6% so với chủng *KCCM11137P Tn:lysCPI-argA Tn:lysCPI-argE* chủng.

Ví dụ 7: Đưa *acs* có nguồn gốc từ *E. coli* trong chủng đã được đưa vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* vào và xác nhận khả năng sản xuất ornithin của chủng

7-1. Tạo ra chủng đã được đưa vào với *acs* có nguồn gốc từ *E. coli* thành gen nhảy từ chủng trên cơ sở *KCCM11137* chủng sản xuất ornithin

acs được đưa vào gen nhảy bằng cách sử dụng gen khởi đầu *lysCPI* để xác nhận xem liệu việc đưa *acs* có nguồn gốc từ *E. coli* vào chủng *KCCM11137P* (Patent Hàn Quốc số 10-1372635) là chủng trên cơ sở ATCC13032 của *Corynebacterium glutamicum* sản xuất ornithin, có thể cải thiện khả năng sản xuất ornithin hay không.

Trước tiên, plasmit *pDZTn-lysCPI-acS* được tạo ra trong Ví dụ 3-1 lần lượt được đưa vào các chủng *KCCM11137P* và *KCCM11137P Tn:lysCPI-argA Tn:lysCPI-argE*, bằng cách điện di để thu được các thể biến nạp, và các thể biến nạp này được phết lên môi trường phiên kính BHIS (Dịch truyền tim não (37 g/L), sorbitol (91 g/L), và aga (2%)) chứa kanamycin (25 µg/mL) và X-gal (5-bromo-4-clo-3-indolin-D-galactosit) và được nuôi cấy để tạo ra các khuẩn lạc. Trong số các khuẩn lạc này, các khuẩn lạc màu xanh da trời được chọn và nhờ đó các chủng biến nạp đã được đưa vào với plasmit *pDZTn-lysCPI-acS* được chọn.

Các chủng đã chọn được nuôi cấy, lắc đồng thời (30°C, 8 giờ) trong môi trường CM (glucoza (10 g/L), polypepton (10 g/L), dịch chiết nấm men (5 g/L), dịch chiết thịt bò (5 g/L), NaCl (2,5 g/L), ure (2 g/L), độ pH = 6,8) và tiếp đó được pha loãng từ 10^{-4} đến 10^{-10} , được phết lên môi trường rắn chứa X-gal, và được nuôi cấy để tạo ra các khuẩn lạc. Trong số các khuẩn lạc đã tạo ra này, các khuẩn lạc màu trắng xuất hiện với tốc độ tương đối chậm được chọn và chủng đã được đưa vào với gen mã hóa *acs* bằng cách xuyên chéo thứ cấp được chọn cuối cùng.

Các chủng được chọn cuối cùng được tiến hành PCR bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 13 và 25 và đã xác nhận rằng gen mã

hóa *acs* được đưa vào. Chủng cải biến thu được từ đó của *Corynebacterium glutamicum* lần lượt được gọi là *KCCM11137P Tn:lysCPI-ac*s và *KCCM11137P Tn:lysCPI-argA Tn:lysCPI-argE Tn:lysCPI-ac*s.

7-2. Đánh giá khả năng sản xuất ornithin của chủng đã được đưa vào với *acs* có nguồn gốc từ *E. coli*

Để xác nhận ảnh hưởng của việc đưa *acs* trên chủng sản xuất ornithin đã được đưa vào với *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*, khả năng sản xuất ornithin được so sánh trong số các chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* được tạo ra trong Ví dụ 7-1.

Đặc biệt, hai loại chủng cải biến khác nhau của *Corynebacterium glutamicum*, (*KCCM11137P Tn:lysCPI-ac*s; *KCCM11137P Tn:lysCPI-argA Tn:lysCPI-argE Tn:lysCPI-ac*s) và hai loại chủng bố mẹ khác nhau (*KCCM11137P*; *KCCM11137P Tn:lysCPI-argA Tn:lysCPI-argE*) lần lượt được phết lên môi trường phiên kính CM chứa 1mM arginin (1% glucoza, 1% polypepton, 0,5% dịch chiết nấm men, 0,5% dịch chiết thịt bò, 0,25% NaCl, 0,2% ure, 100 μ L NaOH 50%, 2% aga, độ pH = 6,8, đối với 1L), và được nuôi cấy ở 30°C trong 24 giờ. Mỗi chủng trong số các chủng được nuôi cấy từ đó với lượng khoảng một vòng platin được chủng ngừa thành 25mL môi trường chuẩn độ (8% glucoza, 0,25% protein đậu tương, 0,50% chất rắn ngâm ngũ cốc, 4% (NH₄)₂SO₄, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,15% ure, biotin (100 μ g), thiamin HCl (3 mg), axit canxi-pantothenic (3 mg), nicotinamit (3 mg), 5% CaCO₃, đối với 1L), và được nuôi cấy, lắc đồng thời ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 98 giờ. Trong tất cả môi trường nuôi cấy chủng, 1 mM arginin được bổ sung vào môi trường này. Khi nuôi cấy xong, nồng độ của ornithin tạo ra trong mỗi canh nuôi cấy được đo và kết quả được thể hiện trong Bảng 11 dưới đây.

Bảng 11

Các chủng	Ornithin (g/L)
<i>KCCM11137P</i>	7,8
<i>KCCM11137P Tn:lysCP1-acs</i>	7,8
<i>KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE</i>	8,9
<i>KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE</i> <i>Tn:lysCP1-acs</i>	9,2

Như được thể hiện trong Bảng 11, đã xác nhận rằng khi chủng *KCCM11137P* được đưa vào với *acs*, thì lượng sản xuất ornithin không được tăng lên, trong khi đó khi chủng *KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*, là chủng cải biến của *Corynebacterium glutamicum* đã đưa đồng thời vào với gen *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và gen *argE* có nguồn gốc từ *E. coli*, lượng sản xuất ornithin được tăng lên 17,9% so với lượng của chủng *KCCM11137P*, và cũng được tăng lên 3,4% so sánh với chủng *KCCM11137P Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE*.

Do đó, đã xác nhận rằng việc đưa *argA* có nguồn gốc từ *E. coli* và *argE* có nguồn gốc từ *E. coli* vào chủng của *Corynebacterium* có thể tăng cường lượng sản xuất putrescin và ornithin, và ngoài ra, đã xác nhận rằng sự gia tăng hoạt tính của gen *pta-ackA* trong chủng của *Corynebacterium* hoặc việc đưa *acs* có nguồn gốc từ *E. coli* có thể tăng cường tiếp lượng sản xuất putrescin và ornithin.

Từ đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu được rằng sáng chế có thể được minh họa ở các dạng cụ thể khác mà không làm cải biến khái niệm kỹ thuật hoặc đặc tính thiết yếu theo sáng chế. Về mặt này, các phương án làm ví dụ nêu trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Trái lại, sáng chế được dự định không những bao hàm các phương án làm ví dụ mà còn bao hàm các biến đổi, cải biến, dạng tương đương khác và các phương án khác mà có thể nằm trong phạm vi của sáng chế như được xác định bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo.



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To. CJ CheilJedang Corporation
CJ CHEILJEDANG CENTER,
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, SEOUL 100-400,
REPUBLIC OF KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Corynebacterium glutamicum</i> CC01-1145	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM11606P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on November. 21. 2014. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjena-e-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 120-861 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s) : Date: November. 21. 2014.

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

Form BP/4

Sole page

한국미생물보존센터

120-091 서울시 서대문구 홍제1동 361-221 유림빌딩 Tel: 02-391-0950, 396-0950 Fax: 02-392-2859 E-mail: kccmkcc@kccm.or.kr

KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

KOREAN FEDERATION OF CULTURE COLLECTIONS

Yoolim Bldg., 361-221 Hongje-1dong, Seodaemun-gu, Seoul, 120-0191, Korea Tel: 82-2-391-0950, 396-0950 Fax: 82-2-392-2859 E-mail: kccmkcc@kccm.or.kr

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin, trong đó hoạt tính của N-axetylglutamat syntaza từ *E. coli* và axetylornithin deaxetylaza từ *E. coli* được đưa vào vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hoạt tính ornithin axetyltransferaza (ArgJ).
2. Vi sinh vật cải biến theo điểm 1, trong đó N-axetylglutamat syntaza từ *E. coli* bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.
3. Vi sinh vật cải biến theo điểm 1, trong đó axetylornithin deaxetylaza từ *E. coli* bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3.
4. Vi sinh vật cải biến theo điểm 1, trong đó vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.
5. Vi sinh vật cải biến theo điểm 1, trong đó hoạt tính của operon phosphotransaxetylaza và axetat kinaza (*pta-ackA* operon) được tăng cường thêm nữa so với hoạt tính nội sinh của nó.
6. Vi sinh vật cải biến theo điểm 5, trong đó operon phosphotransaxetylaza và axetat kinaza bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 7.
7. Vi sinh vật cải biến theo điểm 1, trong đó hoạt tính của axetyl-CoA synthetaza (acs) từ *E. coli* được đưa thêm nữa vào.
8. Vi sinh vật cải biến theo điểm 7, trong đó axetyl-CoA synthetaza bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.
9. Vi sinh vật cải biến theo điểm 1, trong đó hoạt tính của ornithin decarboxylaza (ODC) được đưa thêm nữa vào.
10. Vi sinh vật cải biến theo điểm 1, trong đó hoạt tính của i) ornithin carbamoyltransferaza (ArgF), ii) chất vận chuyển tiết glutamat, hoặc iii) chất vận chuyển tiết ornithin carbamoyltransferaza và glutamat được làm suy yếu thêm nữa so

với hoạt tính nội sinh của nó.

11. Vi sinh vật cải biến theo điểm 1, trong đó hoạt tính của ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm axetyl gama glutamyl phosphat reductaza (ArgC), axetylglutamat syntaza hoặc ornithin axetyltransferaza (ArgJ), axetylglutamat kinaza (ArgB), và axetyl ornithin aminotransferaza (ArgD) được tăng cường thêm nữa so với hoạt tính nội sinh của nó.

12. Vi sinh vật cải biến theo điểm 1, trong đó hoạt tính của axetyltransferaza được làm suy yếu thêm nữa so với hoạt tính nội sinh của nó.

13. Vi sinh vật cải biến theo điểm 12, trong đó axetyltransferaza bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30 hoặc SEQ ID NO: 31.

14. Vi sinh vật cải biến theo điểm 1, trong đó hoạt tính của chất vận chuyển tiết putrescin được tăng cường thêm nữa so với hoạt tính nội sinh của nó.

15. Vi sinh vật cải biến theo điểm 14, trong đó chất vận chuyển tiết putrescin bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 hoặc SEQ ID NO: 28.

16. Phương pháp sản xuất putrescin hoặc ornithin bao gồm các bước:

(i) nuôi cấy vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15 trong môi trường; và

(ii) thu hồi putrescin hoặc ornithin từ vi sinh vật đã nuôi cấy hoặc môi trường.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.

Fig.1

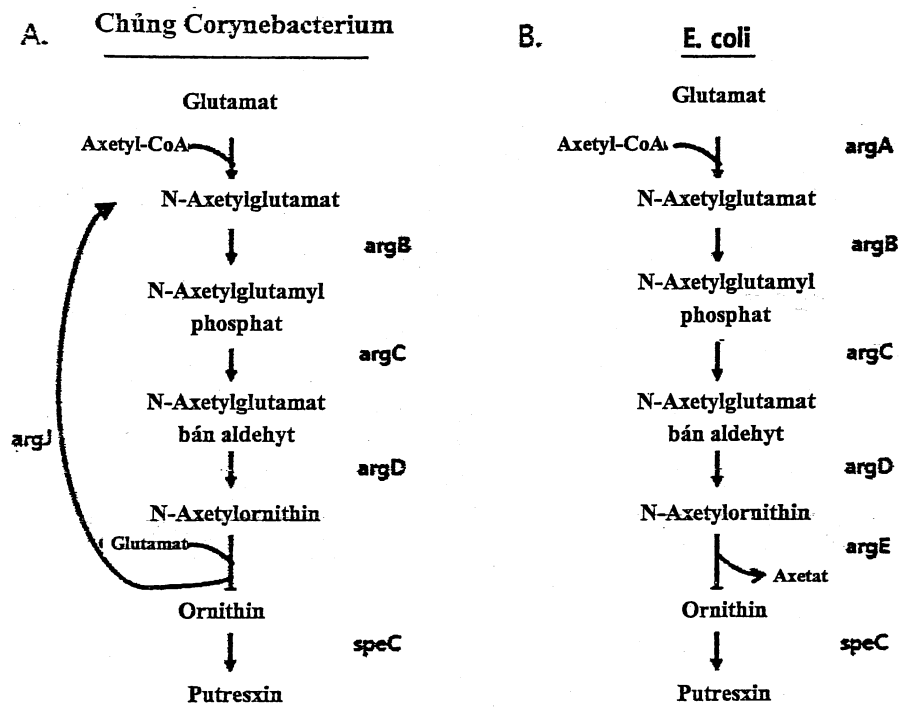
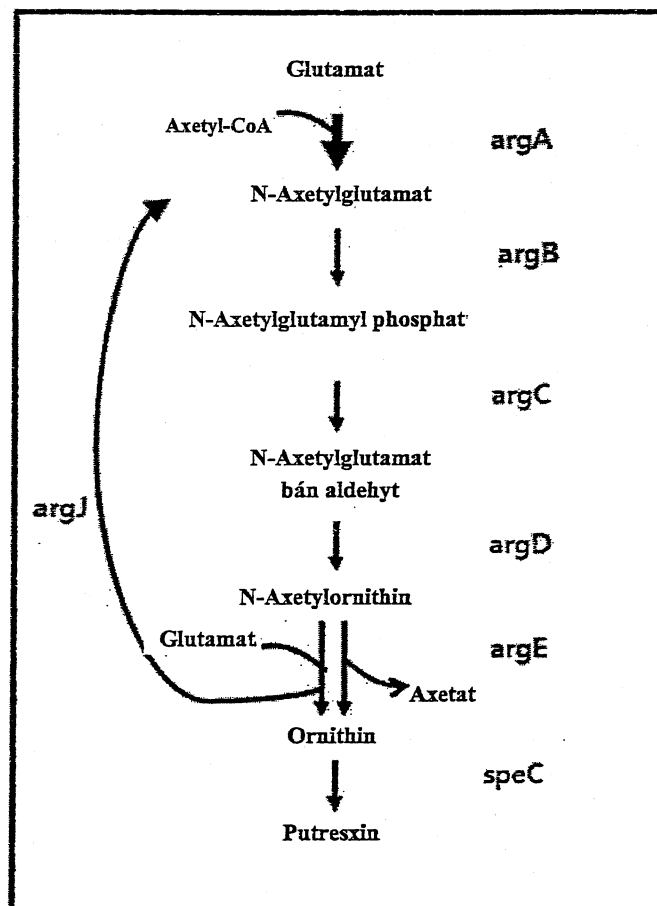


Fig.2



Danh mục trình tự

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

<120> Vi sinh vật cải biến thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất putrescin hoặc ornithin và phương pháp sản xuất putrescin hoặc ornithin bằng cách sử dụng vi sinh vật này

<130> KMC/80640EP1

<150> KR10-2015-0102624

<151> 2015-07-20

<160> 39

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 443

<212> PRT

<213> N-acetylglutamat syntaza của E.coli

<400> 1

Val Val Lys Glu Arg Lys Thr Glu Leu Val Glu Gly Phe Arg His Ser
1 5 10 15

Val Pro Tyr Ile Asn Thr His Arg Gly Lys Thr Phe Val Ile Met Leu
20 25 30

Gly Gly Glu Ala Ile Glu His Glu Asn Phe Ser Ser Ile Val Asn Asp
35 40 45

Ile Gly Leu Leu His Ser Leu Gly Ile Arg Leu Val Val Val Tyr Gly
50 55 60

Ala Arg Pro Gln Ile Asp Ala Asn Leu Ala Ala His His His Glu Pro
65 70 75 80

Leu Tyr His Lys Asn Ile Arg Val Thr Asp Ala Lys Thr Leu Glu Leu
85 90 95

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

Ser Met Ser Leu Asn Asn Thr Pro Leu Gln Gly Ala His Ile Asn Val
115 120 125

Val Ser Gly Asn Phe Ile Ile Ala Gln Pro Leu Gly Val Asp Asp Gly
130 135 140

Val Asp Tyr Cys His Ser Gly Arg Ile Arg Arg Ile Asp Glu Asp Ala

145		150		155		160
Ile His Arg Gln Leu Asp Ser Gly Ala Ile Val Leu Met Gly Pro Val						
	165		170		175	
Ala Val Ser Val Thr Gly Glu Ser Phe Asn Leu Thr Ser Glu Glu Ile						
	180		185		190	
Ala Thr Gln Leu Ala Ile Lys Leu Lys Ala Glu Lys Met Ile Gly Phe						
	195		200		205	
Cys Ser Ser Gln Gly Val Thr Asn Asp Asp Gly Asp Ile Val Ser Glu						
	210		215		220	
Leu Phe Pro Asn Glu Ala Gln Ala Arg Val Glu Ala Gln Glu Glu Lys						
	225		230		235	240
Gly Asp Tyr Asn Ser Gly Thr Val Arg Phe Leu Arg Gly Ala Val Lys						
	245		250		255	
Ala Cys Arg Ser Gly Val Arg Arg Cys His Leu Ile Ser Tyr Gln Glu						
	260		265		270	
Asp Gly Ala Leu Leu Gln Glu Leu Phe Ser Arg Asp Gly Ile Gly Thr						
	275		280		285	
Gln Ile Val Met Glu Ser Ala Glu Gln Ile Arg Arg Ala Thr Ile Asn						
	290		295		300	
Asp Ile Gly Gly Ile Leu Glu Leu Ile Arg Pro Leu Glu Gln Gln Gly						
	305		310		315	320
Ile Leu Val Arg Arg Ser Arg Glu Gln Leu Glu Met Glu Ile Asp Lys						
	325		330		335	
Phe Thr Ile Ile Gln Arg Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Ala Leu						
	340		345		350	
Tyr Pro Phe Pro Glu Glu Lys Ile Gly Glu Met Ala Cys Val Ala Val						
	355		360		365	
His Pro Asp Tyr Arg Ser Ser Ser Arg Gly Glu Val Leu Leu Glu Arg						
	370		375		380	
Ile Ala Ala Gln Ala Lys Gln Ser Gly Leu Ser Lys Leu Phe Val Leu						
	385		390		395	400
Thr Thr Arg Ser Ile His Trp Phe Gln Glu Arg Gly Phe Thr Pro Val						
	405		410		415	
Asp Ile Asp Leu Leu Pro Glu Ser Lys Lys Gln Leu Tyr Asn Tyr Gln						

	420	425	430	
Arg Lys Ser Lys Val Leu Met Ala Asp Leu Gly				
	435	440		
<210>	2			
<211>	1332			
<212>	ADN			
<213>	E.coli N-acetylglutamat syntaza			
<400>	2			
gtggtaaagg aacgtaaaac cgagttggtc gagggattcc gccattcggg tccctatata				60
aatacccacc ggggaaaaac gtttgtcatc atgctcggcg gtgaagccat tgagcatgag				120
aatttctcca gtatcgttaa tgatatcggg ttgttgaca gcctcggcat ccgtctggtg				180
gtggtctatg gcgcacgtcc gcagatcgac gcaaactctg ctgcgcatca ccacgaaccg				240
ctgtatcaca agaataatcg tgtgaccgac gccaaaacac tggaactggt gaagcaggct				300
gcgggaacat tgcaactgga tattactgct cgctctcga tgagtctcaa taacacgccg				360
ctgcaggcg cgcatatcaa cgtcgtcagt ggcaatttta ttattgccca gccgctgggc				420
gtcgtatgacg gcgtggatta ctgcatagc gggcgtatcc ggcggttgga tgaagacgcg				480
atccatcgtc aactggacag cggtgcaata gtgctaattg ggccggtcgc tgtttcagtc				540
actggcgaga gctttaacct gacctcgga gagattgcca ctcaactggc catcaaactg				600
aaagctgaaa agatgattgg tttttgctct tcccaggcg tcactaatga cgacggtgat				660
attgtctccg aacttttccc taacgaagcg caagcgcggg tagaagccca ggaagagaaa				720
ggcgattaca actccggtac ggtgcgcttt ttgcgtggcg cagtgaaagc ctgccgcagc				780
ggcgtgcgtc gctgtcattt aatcagttat caggaagatg gcgcgctggt gcaagagttg				840
ttctcacgcg acggtatcgg tacgcagatt gtgatggaaa gcgccgagca gattcgtcgc				900
gcaacaatca acgatattgg cgtattctg gagttgattc gccactgga gcagcaaggt				960
attctggtac gccgttctcg cgagcagctg gagatggaaa tcgacaaatt caccattatt				1020
cagcgcgata acacgactat tgctgcgcc gcgctctatc cgttcccga agagaagatt				1080
ggggaaatgg cctgtgtggc agttcacccg gattaccgca gtatcatcaag gggtaagtt				1140
ctgctggaac gcattgccgc tcaggcgaag cagagcggct taagcaaatt gtttgtctg				1200

accacgcgca gtattcactg gttccaggaa cgtggattta cccagtgga tattgattta 1260
 ctgcccgaga gcaaaaagca gttgtacaac taccagcgta aatccaaagt gttgatggcg 1320
 gatttagggt aa 1332

<210> 3
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> Acetylornithin deacetylaza của E.coli

<400> 3
 Met Asp Lys Leu Leu Glu Arg Phe Leu Asn Tyr Val Ser Leu Asp Thr
 1 5 10 15
 Gln Ser Lys Ala Gly Val Arg Gln Val Pro Ser Thr Glu Gly Gln Trp
 20 25 30
 Lys Leu Leu His Leu Leu Lys Glu Gln Leu Glu Glu Met Gly Leu Ile
 35 40 45
 Asn Val Thr Leu Ser Glu Lys Gly Thr Leu Met Ala Thr Leu Pro Ala
 50 55 60
 Asn Val Pro Gly Asp Ile Pro Ala Ile Gly Phe Ile Ser His Val Asp
 65 70 75 80
 Thr Ser Pro Asp Cys Ser Gly Lys Asn Val Asn Pro Gln Ile Val Glu
 85 90 95
 Asn Tyr Arg Gly Gly Asp Ile Ala Leu Gly Ile Gly Asp Glu Val Leu
 100 105 110
 Ser Pro Val Met Phe Pro Val Leu His Gln Leu Leu Gly Gln Thr Leu
 115 120 125
 Ile Thr Thr Asp Gly Lys Thr Leu Leu Gly Ala Asp Asp Lys Ala Gly
 130 135 140
 Ile Ala Glu Ile Met Thr Ala Leu Ala Val Leu Gln Gln Lys Lys Ile
 145 150 155 160
 Pro His Gly Asp Ile Arg Val Ala Phe Thr Pro Asp Glu Glu Val Gly
 165 170 175
 Lys Gly Ala Lys His Phe Asp Val Asp Ala Phe Asp Ala Arg Trp Ala
 180 185 190
 Tyr Thr Val Asp Gly Gly Gly Val Gly Glu Leu Glu Phe Glu Asn Phe

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

<210> 4
 <211> 1227
 <212> ADN
 <213> Acetylornithin deacetylaza của E.coli

<400> 4
 atggataaac tactttgagcg atttttgaac tacgtgtctc tggataccca atcaaaagca 60
 ggggtgagac aggttcccag cacggaaggc caatggaagt tattgcatct gctgaaagag 120

cagctcgaag agatggggct tatcaatgtg accttaagtg agaagggcac ttgatggcg 180
 acgttaccgg ctaacgtccc tggcgatata ccggcgattg gctttatttc tcatgtggat 240
 acctcaccgg attgcagcgg caaaaatgtg aatccgcaaa ttgttgaaaa ctatcgcggt 300
 ggcgatattg cgctgggiat cggcgatgaa gttttatcac cggttatgtt cccggtgctg 360
 catcagctac tgggtcagac gctgattacc accgatggta aaaccttggt aggtgccgat 420
 gacaaagcag gtattgcaga aatcatgacc gcgctggcgg tattgcaaca gaaaaaatt 480
 ccgcatggtg atattcgctg cgcctttacc ccggatgaag aagtgggcaa aggggcgaaa 540
 cattttgatg ttgacgcctt cgatgccgcg tgggcttaca ctgttgatgg tgggtggcgta 600
 ggccaactgg agtttgaaaa cttaacgcc gcgtcggta atatcaaaat tgcggtaac 660
 aatgttcata cgggcacggc gaaaggagt atggtaaagt cgctgtcgct ggccggcacgt 720
 attcatgcgg aagttccggc ggaatgaaag ccggaaatga cagaaggcta tgaaggtttc 780
 tatcatctgg cgagcatgaa aggcaccgtt gaacggggcg atatgcacta catcatccgt 840
 gatttcgacc gtaaacagtt tgaagcgct aaacgtaaaa tgatggagat cgccaaaaa 900
 gtgggcaaag ggttacatcc tgattgctac attgaactgg tgattgaaga cagttactac 960
 aatatgcgcg agaaagtggg tgagcatccg catattctcg atatcgccca gcaggcgatg 1020
 cgcgattgcg atattgaacc ggaactgaaa ccgatccgcg gtgttaccga cggcgcgag 1080
 ttgtcgttta tgggattacc gtcccgaac ctgttcactg gcggttaca ctatcatggt 1140
 aagcatgagt ttgtgactct ggaaggatg gaaaaagcgg tgcaggatgat cgtccgtatt 1200
 gccgagttaa cggcgcaacg gaagtaa 1227

<210> 5
 <211> 859
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 pta-ackA

<400> 5
 Met Ser Asp Thr Pro Thr Ser Ala Leu Ile Thr Thr Val Asn Arg Ser
 1 5 10 15
 Phe Asp Gly Phe Asp Leu Glu Glu Val Ala Ala Asp Leu Gly Val Arg
 20 25 30

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

Asn Pro Asn Pro Thr Ala Glu Gln Leu Gly Glu Ile Ala Val Val Ser
 305 310 315 320
 Ala Lys Thr Ala Ala Gln Phe Gly Ile Asp Pro Arg Val Ala Ile Leu
 325 330 335
 Ser Tyr Ser Thr Gly Asn Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val Asp Arg Ala
 340 345 350
 Ile Asp Ala Leu Ala Glu Ala Arg Arg Leu Asn Pro Glu Leu Cys Val
 355 360 365
 Asp Gly Pro Leu Gln Phe Asp Ala Ala Val Asp Pro Gly Val Ala Arg
 370 375 380
 Lys Lys Met Pro Asp Ser Asp Val Ala Gly Gln Ala Asn Val Phe Ile
 385 390 395 400
 Phe Pro Asp Leu Glu Ala Gly Asn Ile Gly Tyr Lys Thr Ala Gln Arg
 405 410 415
 Thr Gly His Ala Leu Ala Val Gly Pro Ile Leu Gln Gly Leu Asn Lys
 420 425 430
 Pro Val Asn Asp Leu Ser Arg Gly Ala Thr Val Pro Asp Ile Val Asn
 435 440 445
 Thr Val Ala Ile Thr Ala Ile Gln Ala Gly Gly Arg Ser Met Ala
 450 455 460
 Leu Ala Leu Val Leu Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ile Lys Phe Gln Leu
 465 470 475 480
 Val Asn Pro Glu Asn Ser Ala Ile Asp Glu Pro Tyr Val Ser Gly Leu
 485 490 495
 Val Glu Gln Ile Gly Glu Pro Asn Gly Arg Ile Val Leu Lys Ile Glu
 500 505 510
 Gly Glu Lys Tyr Thr Leu Glu Thr Pro Ile Ala Asp His Ser Glu Gly
 515 520 525
 Leu Asn Leu Ala Phe Asp Leu Met Asp Gln His Asn Cys Gly Pro Ser
 530 535 540
 Gln Leu Glu Ile Thr Ala Val Gly His Arg Val Val His Gly Gly Ile
 545 550 555 560
 Leu Phe Ser Ala Pro Glu Leu Ile Thr Asp Glu Ile Val Glu Met Ile
 565 570 575

Arg Asp Leu Ile Pro Leu Ala Pro Leu His Asn Pro Ala Asn Val Asp
 580 585 590
 Gly Ile Asp Val Ala Arg Lys Ile Leu Pro Asp Val Pro His Val Ala
 595 600 605
 Val Phe Asp Thr Gly Phe Phe His Ser Leu Pro Pro Ala Ala Ala Leu
 610 615 620
 Tyr Ala Ile Asn Lys Asp Val Ala Ala Glu His Gly Ile Arg Arg Tyr
 625 630 635 640
 Gly Phe His Gly Thr Ser His Glu Phe Val Ser Lys Arg Val Val Glu
 645 650 655
 Ile Leu Glu Lys Pro Thr Glu Asp Ile Asn Thr Ile Thr Phe His Leu
 660 665 670
 Gly Asn Gly Ala Ser Met Ala Ala Val Gln Gly Gly Arg Ala Val Asp
 675 680 685
 Thr Ser Met Gly Met Thr Pro Leu Ala Gly Leu Val Met Gly Thr Arg
 690 695 700
 Ser Gly Asp Ile Asp Pro Gly Ile Val Phe His Leu Ser Arg Thr Ala
 705 710 715 720
 Gly Met Ser Ile Asp Glu Ile Asp Asn Leu Leu Asn Lys Lys Ser Gly
 725 730 735
 Val Lys Gly Leu Ser Gly Val Asn Asp Phe Arg Glu Leu Arg Glu Met
 740 745 750
 Ile Asp Asn Asn Asp Gln Asp Ala Trp Ser Ala Tyr Asn Ile Tyr Ile
 755 760 765
 His Gln Leu Arg Arg Tyr Leu Gly Ser Tyr Met Val Ala Leu Gly Arg
 770 775 780
 Val Asp Thr Ile Val Phe Thr Ala Gly Val Gly Glu Asn Ala Gln Phe
 785 790 795 800
 Val Arg Glu Asp Ala Leu Ala Gly Leu Glu Met Tyr Gly Ile Glu Ile
 805 810 815
 Asp Pro Glu Arg Asn Ala Leu Pro Asn Asp Gly Pro Arg Leu Ile Ser
 820 825 830
 Thr Asp Ala Ser Lys Val Lys Val Phe Val Ile Pro Thr Asn Glu Glu
 835 840 845

Leu Ala Ile Ala Arg Tyr Ala Val Lys Phe Ala
 850 855

<210> 6
 <211> 2579
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 pta-ackA

<400> 6
 atgtctgaca caccgacctc agctctgac accacgggtca accgcagctt cgatggattc 60
 gatttggaag aagtagcagc agaccttgga gtccggctca cctacctgcc cgacgaagaa 120
 ctagaagtat ccaaagttct cgcgggcgac ctccctcgctg agggggccagc tctcatcatc 180
 ggtgtaggaa acacgttttt cgacgcccag gtccggctg ccctcgggct cccagtgtca 240
 ctgctggtag acaagcaagg caagcacgtt gctcttgctc gcacctcaggt aaacaatgcc 300
 ggccgagttg ttgcagcagc atttaccgct gaacaagagc caatgccgga taagctgcgc 360
 aaggctgtgc gcaaccacag caacctcgaa ccagtcatga gcgccgaact ctttgaaaac 420
 tggctgtctca agcgcgcacg cgcagagcac tcccacattg tgctgccaga aggtgacgac 480
 gaccgcatct tgatggctgc ccaccagctg cttgatcaag acatctgtga catcacgac 540
 ctgggcgatc cagtaaagat caaggagcgc gctaccgaac ttggcctgca ccttaacact 600
 gcataacctg tcaatccgct gacagatcct cgcctggagg aattcgccga acaattcgcg 660
 gagctgcgca agtcaagag cgctactatc gatgaagccc gcgaaatcat gaaggatatt 720
 tctacttctg gcaccatgat ggtccacaac ggcgacgccg acggaatggt atccggtgca 780
 gcaaacacca ccgcacacac cattaagcca agcttcaga tcatcaaaac tgttccagaa 840
 gcatccgtcg tttcttccat cttcctcatg gtgctgcgcg ggcgactgtg ggcattcggc 900
 gactgtgtctg ttaaccggaa cccaactgct gaacagcttg gtgaaatcgc cgttgtgtca 960
 gcaaaaactg cagcacaatt tggcattgat cctcgcgtag ccatcttgct ctactccact 1020
 ggcaactccg gcggaggctc agatgtggat cgcgccatcg acgctcttgc agaagcacgc 1080
 cgacttaacc cagaactatg cgtcgatgga ccacttcagt tcgacgccgc cgtcgacctg 1140
 ggtgtggcgc gcaagaagat gccagactct gacgtcgctg gccaggcaaa tgtgtttatc 1200

ttccctgacc tggagccgg aaacatcggc tacaaaactg cacaacgcac cggtcacgcc 1260
 ctggcagttg gtccgattct gcagggccta aacaaccag tcaacgacct ttcccgtggc 1320
 gcaacagtcc ctgacatcgt caacacagta gccatcacag caattcaggc aggaggacgc 1380
 agctaattggc attggcactt gttttgaact ccggttcac ttccatcaaa ttccagctgg 1440
 tcaaccccgaa aaactctgcc atcgacgagc catatgtttc tggctttgtg gagcagattg 1500
 gtgagccaaa cggccgcac gtactcaaaa tagagggtga aaaatatacc ctagagacac 1560
 ccatcgaga tactccgaa ggcctaaacc tggcgttcga tctcatggac cagcacaact 1620
 gtggtccttc ccaactggaa atcaccgcag ttggacaccg cgtggtccac ggcggaatct 1680
 tgttctccgc accggaactt atcactgatg aaatcggtga aatgatccgc gatctcattc 1740
 cactcgacc actgcacaac cctgcaaacg ttgacggcat tgaattgct cgaataattc 1800
 tcccgatgt cccacacgta gctgtctttg acaccggttt ctccactca ctccaccag 1860
 cagctgcgt gtatgccatc aacaaggatg tcgcagctga acacggaatc aggcgctatg 1920
 gtttcacgg cacctcccat gaatttgtgt ccaagcgcgt ggtggaaatt ctggaaaagc 1980
 ccaccgaaga catcaacacc atcaccttc acctgggcaa cggcgcatcc atggctgctg 2040
 ttcaaggtag cgtgcggtgataacttcca tgggtatgac acctctcgcg ggccttgta 2100
 tgggtaccg aagcggtagc attgatccag gtatcgtctt ccaccttcc cgcaccgctg 2160
 gcatgagcat cgtgagatc gataatctgc tgaacaaaaa gtcgggtgta aaggacttt 2220
 ccggtgttaa tgatttccgt gaactgcggg aaatgatcga caacaatgat caagatgcct 2280
 ggtccgcta caacatttac atacaccaac tccgcgcta cctcggttcc tacatggtgg 2340
 cactgggacg ggtagacacc atcgtgttca ccgccggtgt cgtgaaaat gccagtttg 2400
 tccgtgagga tgccittgca ggtttgaaa tgtacggaat tgagatcat ccagagcgtg 2460
 acgcattgcc aaacgatggt cctcgattga ttccaccga tgcctccaag gtgaagggt 2520
 ttgtatttcc aactaatgaa gagttagcta tcgctaggta cgcggtgaag ttcgcttag 2579

<210> 7

<211> 859

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 pta-ackA

<400> 7
 Met Ser Asp Thr Pro Thr Ser Ala Leu Ile Thr Thr Val Asn Arg Ser
 1 5 10 15
 Phe Asp Gly Phe Asp Leu Glu Glu Val Ala Ala Asp Leu Gly Val Arg
 20 25 30
 Leu Thr Asp Leu Pro Asp Glu Glu Leu Glu Val Ser Lys Val Leu Ala
 35 40 45
 Ala Asp Leu Leu Ala Glu Gly Pro Ala Leu Ile Ile Gly Val Gly Asn
 50 55 60
 Thr Phe Phe Asp Ala Gln Val Ala Ala Ala Leu Gly Val Pro Val Leu
 65 70 75 80
 Leu Leu Val Asp Lys Gln Gly Lys His Val Ala Leu Ala Arg Thr Gln
 85 90 95
 Val Asn Asn Ala Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Phe Thr Ala Glu Gln
 100 105 110
 Glu Pro Met Pro Asp Lys Leu Arg Lys Ala Val Arg Asn His Ser Asn
 115 120 125
 Leu Glu Pro Val Met Ser Ala Glu Leu Phe Glu Asn Trp Leu Leu Lys
 130 135 140
 Arg Ala Arg Ala Glu His Ser His Ile Val Leu Pro Glu Gly Asp Asp
 145 150 155 160
 Asp Arg Ile Leu Met Ala Ala His Gln Leu Leu Asp Gln Asp Ile Cys
 165 170 175
 Asp Ile Thr Ile Leu Gly Asp Pro Val Gln Ile Lys Glu Arg Ala Thr
 180 185 190
 Glu Leu Gly Leu His Leu Asn Thr Ala Tyr Leu Val Asn Pro Leu Thr
 195 200 205
 Asp Pro Arg Leu Glu Glu Phe Ala Glu Gln Phe Ala Glu Leu Arg Lys
 210 215 220
 Ser Lys Ser Val Thr Ile Asp Glu Ala Arg Glu Ile Met Lys Asp Ile
 225 230 235 240
 Cys Tyr Phe Gly Thr Met Met Val His Asn Gly Asp Ala Asp Gly Met
 245 250 255
 Val Ser Gly Ala Ala Asn Thr Thr Ala His Thr Ile Lys Pro Ser Phe

260	265	270
Gln Ile Ile Lys Thr Val Pro Glu Ala Ser Val Val Ser Ser Ile Phe		
275	280	285
Leu Met Val Leu Arg Gly Arg Leu Trp Ala Phe Gly Asp Cys Ala Val		
290	295	300
Asn Pro Asn Pro Thr Ala Glu Gln Leu Gly Glu Ile Ala Val Val Ser		
305	310	315
Ala Lys Thr Ala Ala Gln Phe Gly Ile Asp Pro Arg Val Ala Ile Leu		
325	330	335
Ser Tyr Ser Thr Gly Asn Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val Asp Arg Ala		
340	345	350
Ile Asp Ala Leu Ala Glu Ala Arg Arg Leu Asn Pro Glu Leu Cys Val		
355	360	365
Asp Gly Pro Leu Gln Phe Asp Ala Ala Val Asp Pro Gly Val Ala Arg		
370	375	380
Lys Lys Met Pro Asp Ser Asp Val Ala Gly Gln Ala Asn Val Phe Ile		
385	390	395
Phe Pro Asp Leu Glu Ala Gly Asn Ile Gly Tyr Lys Thr Ala Gln Arg		
405	410	415
Thr Gly His Ala Leu Ala Val Gly Pro Ile Leu Gln Gly Leu Asn Lys		
420	425	430
Pro Val Asn Asp Leu Ser Arg Gly Ala Thr Val Pro Asp Ile Val Asn		
435	440	445
Thr Val Ala Ile Thr Ala Ile Gln Ala Gly Gly Arg Ser *** Met Ala		
450	455	460
Leu Ala Leu Val Leu Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ile Lys Phe Gln Leu		
465	470	475
Val Asn Pro Glu Asn Ser Ala Ile Asp Glu Pro Tyr Val Ser Gly Leu		
485	490	495
Val Glu Gln Ile Gly Glu Pro Asn Gly Arg Ile Val Leu Lys Val Glu		
500	505	510
Gly Glu Lys Tyr Thr Leu Glu Thr Pro Ile Ala Asp His Ser Glu Gly		
515	520	525
Leu Asn Leu Ala Phe Asp Leu Met Asp Gln His Asn Cys Gly Pro Ser		

530 535 540
 Gln Leu Glu Ile Thr Ala Val Gly His Arg Val Val His Gly Gly Ile
 545 550 555 560
 Leu Phe Ser Ala Pro Glu Leu Ile Thr Asp Glu Ile Val Glu Met Ile
 565 570 575
 Arg Asp Leu Ile Pro Leu Ala Pro Leu His Asn Pro Ala Asn Val Asp
 580 585 590
 Gly Ile Asp Val Ala Arg Lys Ile Leu Pro Asp Val Pro His Val Ala
 595 600 605
 Val Phe Asp Thr Gly Phe Phe His Ser Leu Pro Pro Ala Ala Ala Leu
 610 615 620
 Tyr Ala Ile Asn Lys Asp Val Ala Ala Glu His Gly Ile Arg Arg Tyr
 625 630 635 640
 Gly Phe His Gly Thr Ser His Glu Phe Val Ser Lys Arg Val Val Glu
 645 650 655
 Ile Leu Glu Lys Pro Thr Glu Asp Ile Asn Thr Ile Thr Phe His Leu
 660 665 670
 Gly Asn Gly Ala Ser Met Ala Ala Val Gln Gly Gly Arg Ala Val Asp
 675 680 685
 Thr Ser Met Gly Met Thr Pro Leu Ala Gly Leu Val Met Gly Thr Arg
 690 695 700
 Ser Gly Asp Ile Asp Pro Gly Val Val Phe His Leu Ser Arg Thr Ala
 705 710 715 720
 Gly Met Ser Ile Asp Glu Ile Asp Asn Leu Leu Asn Lys Lys Ser Gly
 725 730 735
 Val Lys Gly Leu Ser Gly Val Asn Asp Phe Arg Glu Leu Arg Glu Met
 740 745 750
 Ile Asp Asn Asn Asp Gln Asp Ala Trp Ser Ala Tyr Asn Ile Tyr Ile
 755 760 765
 His Gln Leu Arg Arg Tyr Leu Gly Ser Tyr Met Val Ala Leu Gly Arg
 770 775 780
 Val Asp Thr Ile Val Phe Thr Ala Gly Val Gly Glu Asn Ala Gln Phe
 785 790 795 800
 Val Arg Glu Asp Ala Leu Ala Gly Leu Glu Met Tyr Gly Ile Glu Ile

805	810	815
Asp Pro Glu Arg Asn Ala Leu Pro Asn Asp Gly Pro Arg Leu Ile Ser		
820	825	830
Thr Asp Ala Ser Lys Val Lys Val Phe Val Ile Pro Thr Asn Glu Glu		
835	840	845
Leu Ala Ile Ala Arg Tyr Ala Val Lys Phe Ala		
850	855	

<210> 8
 <211> 2580
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC 13869 pta-ackA

<400> 8

atgtctgaca caccgacctc agctctgatac accacggta accgcagctt cgtatggattc	60
gatttggaa aagtagcagc agaccttga gttcggctca cgcacctgcc cgacgaagaa	120
ctagaagtat ccaaagttct cgcggcggac ctctcgtctg aggggccagc tctcatcatc	180
ggtgtaggaa acacgttttt cgacgcccag gtcgcccgtg cctcggcgt cccagtgtca	240
ctgctggtag acaagcaagg caagcacgtt gctcttgctc gcacctcaggt aaacaatgcc	300
ggcgcagttg ttgcagcagc atttaccgct gaacaagagc caatgccgga taagctgcgc	360
aaggctgtgc gcaaccacag caacctcgaa ccagtcata ggcgcgaact ctttgaaaac	420
tggtgtctca agcgcgcacg cgcagagcac tcccacattg tgctgccaga aggtgacgac	480
gaccgcattt tgatggctgc ccaccagctg cttgatcaag acatctgtga catcacgata	540
ctgggcgata cagtacagat caaggagcgc gctaccgaac ttggcctgca ccttaacact	600
gcatacctgg tcaatccgct gacagatcct cgcctggagg aattcgccga acaattcgcg	660
gagctgcgca agtcaaagag cgtcactatc gatgaagccc gcgaaatcat gaaggatatt	720
tgctacttcg gcacatgat ggtccacaac ggcgacgccg acggaatggt atccggtgca	780
gaaacacca ccgcacacac cattaagcca agcttcaga tcatcaaac tgttcagaa	840
gcatccgtcg ttctttccat ctctctcatg gtgctgcgcg ggcgactgtg ggcattcggc	900
gactgtgtcg ttaaccgaa cccaactgct gaacagcttg gtgaaatcgc cgttgtgtca	960
gcaaaaactg cagcacaatt tggcattgat cctcgcgtag ccatcttgct ctactccact	1020

ggcaactccg gcgaggctc agatgtggat cgcgccatcg acgctcttgc agaagcacgc	1080
cgactcaacc cagaactatg cgtcgatgga ccacttcagt tcgacgccgc cgtcgaccgc	1140
ggtgtggcgc gcaagaagat gccagactct gacgtcgctg gccaggcaaa tgtgtttatc	1200
ttccctgacc tggaagccgc aaacatcggc tacaaaactg cacaacgcac cggtcacgcc	1260
ctggcagttg gtccgattct gcagggcctg aacaaaccag tcaacgacct ttcccgtagc	1320
gcaacagtcc ctgacatcgt caacacagta gccatcaccg caattcaggc aggaggacgc	1380
agctaattgg cattggcact tgttttgaac tccggttcat cttccatcaa attccagctg	1440
gtcaaccccg aaaactctgc catcgacgag ccatatgttt ctggtcttgt ggagcagatt	1500
ggtgagccaa acggccgcgt cgtactcaaa gtagaggggtg aaaaatacac cctagagaca	1560
cccatcgcag atcactccga aggcctaaac ctggcggttcg atctcatgga ccagcacaac	1620
tgtggtcctt cccaactgga aatcacgcga gttggacacc gcgtggtcca cgttggatc	1680
ttgttctctg cgccggaact catcactgat gaaatcggtg aaatgatccg cgatctcatt	1740
ccactcgcac cactgcacaa ccctgcaaac gttgacggca ttgatgttgc tcgaaaaatt	1800
ctccccgatg tcccacagct agctgtcttt gacaccggtt tcttccactc acttccacca	1860
gcagctgcac tgtatgcat caacaaggat gtcgcagctg aacacggaat caggcgctat	1920
ggtttccacg gtacctccca cgaatttgtg tccaagcgcg tggtagaaat tttgaaaag	1980
cccaccgaag acatcaacac catcaccttc cacctgggca acggcgcatc catggctgct	2040
gttcaaggcg gccgtgcggt agatacttcc atgggtatga cacctctcgc gggacttgtc	2100
atgggtaccc gaagcgggtg cattgatcca ggtgtcgttt tccatctctc acgcaccgct	2160
ggcatgagca tcgatgagat cgataatctg ctgaacaaaa agtcgggtgt aaagggactt	2220
tccggagtca atgatttccg tgaactgcgg gaaatgatcg acaacaatga tcaagatgcc	2280
tggtagcgtg acaacattta catacaccia ctccgccgct acctcggttc ctacatggtg	2340
gcactgggac gggtagacac catcgtgttc accgccggtg ttggtgaaaa tggccagttt	2400
gtccgtgagg atgccttggc aggtttggaa atgtacggca tcgaaatcga tccggagcgc	2460
aacgcactgc caaacgatgg tcctagattg atttccaccg atgcctccaa ggtgaagggtg	2520

tttgttattc caactaatga agagttggct atcgctaggt acgcggtgaa gttcgcttag 2579

<210> 9
 <211> 652
 <212> PRT
 <213> E.coli acetyl-CoA synthetaza

<400> 9
 Met Ser Gln Ile His Lys His Thr Ile Pro Ala Asn Ile Ala Asp Arg
 1 5 10 15
 Cys Leu Ile Asn Pro Gln Gln Tyr Glu Ala Met Tyr Gln Gln Ser Ile
 20 25 30
 Asn Val Pro Asp Thr Phe Trp Gly Glu Gln Gly Lys Ile Leu Asp Trp
 35 40 45
 Ile Lys Pro Tyr Gln Lys Val Lys Asn Thr Ser Phe Ala Pro Gly Asn
 50 55 60
 Val Ser Ile Lys Trp Tyr Glu Asp Gly Thr Leu Asn Leu Ala Ala Asn
 65 70 75 80
 Cys Leu Asp Arg His Leu Gln Glu Asn Gly Asp Arg Thr Ala Ile Ile
 85 90 95
 Trp Glu Gly Asp Asp Ala Ser Gln Ser Lys His Ile Ser Tyr Lys Glu
 100 105 110
 Leu His Arg Asp Val Cys Arg Phe Ala Asn Thr Leu Leu Glu Leu Gly
 115 120 125
 Ile Lys Lys Gly Asp Val Val Ala Ile Tyr Met Pro Met Val Pro Glu
 130 135 140
 Ala Ala Val Ala Met Leu Ala Cys Ala Arg Ile Gly Ala Val His Ser
 145 150 155 160
 Val Ile Phe Gly Gly Phe Ser Pro Glu Ala Val Ala Gly Arg Ile Ile
 165 170 175
 Asp Ser Asn Ser Arg Leu Val Ile Thr Ser Asp Glu Gly Val Arg Ala
 180 185 190
 Gly Arg Ser Ile Pro Leu Lys Lys Asn Val Asp Asp Ala Leu Lys Asn
 195 200 205
 Pro Asn Val Thr Ser Val Glu His Val Val Val Leu Lys Arg Thr Gly

210	215	220
Gly Lys Ile Asp Trp Gln Glu Gly Arg Asp Leu Trp Trp His Asp Leu		
225	230	235 240
Val Glu Gln Ala Ser Asp Gln His Gln Ala Glu Glu Met Asn Ala Glu		
	245	250 255
Asp Pro Leu Phe Ile Leu Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Gly Lys Pro Lys		
	260	265 270
Gly Val Leu His Thr Thr Gly Gly Tyr Leu Val Tyr Ala Ala Leu Thr		
	275	280 285
Phe Lys Tyr Val Phe Asp Tyr His Pro Gly Asp Ile Tyr Trp Cys Thr		
	290	295 300
Ala Asp Val Gly Trp Val Thr Gly His Ser Tyr Leu Leu Tyr Gly Pro		
	305	310 315 320
Leu Ala Cys Gly Ala Thr Thr Leu Met Phe Glu Gly Val Pro Asn Trp		
	325	330 335
Pro Thr Pro Ala Arg Met Ala Gln Val Val Asp Lys His Gln Val Asn		
	340	345 350
Ile Leu Tyr Thr Ala Pro Thr Ala Ile Arg Ala Leu Met Ala Glu Gly		
	355	360 365
Asp Lys Ala Ile Glu Gly Thr Asp Arg Ser Ser Leu Arg Ile Leu Gly		
	370	375 380
Ser Val Gly Glu Pro Ile Asn Pro Glu Ala Trp Glu Trp Tyr Trp Lys		
	385	390 395 400
Lys Ile Gly Asn Glu Lys Cys Pro Val Val Asp Thr Trp Trp Gln Thr		
	405	410 415
Glu Thr Gly Gly Phe Met Ile Thr Pro Leu Pro Gly Ala Thr Glu Leu		
	420	425 430
Lys Ala Gly Ser Ala Thr Arg Pro Phe Phe Gly Val Gln Pro Ala Leu		
	435	440 445
Val Asp Asn Glu Gly Asn Pro Leu Glu Gly Ala Thr Glu Gly Ser Leu		
	450	455 460
Val Ile Thr Asp Ser Trp Pro Gly Gln Ala Arg Thr Leu Phe Gly Asp		
	465	470 475 480
His Glu Arg Phe Glu Gln Thr Tyr Phe Ser Thr Phe Lys Asn Met Tyr		

485 490 495
 Phe Ser Gly Asp Gly Ala Arg Arg Asp Glu Asp Gly Tyr Tyr Trp Ile
 500 505 510
 Thr Gly Arg Val Asp Asp Val Leu Asn Val Ser Gly His Arg Leu Gly
 515 520 525
 Thr Ala Glu Ile Glu Ser Ala Leu Val Ala His Pro Lys Ile Ala Glu
 530 535 540
 Ala Ala Val Val Gly Ile Pro His Asn Ile Lys Gly Gln Ala Ile Tyr
 545 550 555 560
 Ala Tyr Val Thr Leu Asn His Gly Glu Glu Pro Ser Pro Glu Leu Tyr
 565 570 575
 Ala Glu Val Arg Asn Trp Val Arg Lys Glu Ile Gly Pro Leu Ala Thr
 580 585 590
 Pro Asp Val Leu His Trp Thr Asp Ser Leu Pro Lys Thr Arg Ser Gly
 595 600 605
 Lys Ile Met Arg Arg Ile Leu Arg Lys Ile Ala Ala Gly Asp Thr Ser
 610 615 620
 Asn Leu Gly Asp Thr Ser Thr Leu Ala Asp Pro Gly Val Val Glu Lys
 625 630 635 640
 Leu Leu Glu Glu Lys Gln Ala Ile Ala Met Pro Ser
 645 650

<210> 10
 <211> 1959
 <212> ADN
 <213> E.coli axetyl-CoA synthetaza

<400> 10
 atgagccaaa ttcacaaaca caccattcct gccaacatcg cagaccgttg cctgataaac 60
 cctcagcagt acgaggcgat gtatcaacaa tctattaacg tacctgatac cttctggggc 120
 gaacagggaa aaattcttga ctggatcaaa ccttaccaga aggtgaaaaa cacctccttt 180
 gcccccggtatgtgtccat taaatggtac gaggacggca cgctgaatct ggcggcaaac 240
 tgcccttgacc gccatctgca agaaaacggc gatcgtaccg ccatcatctg ggaaggcgac 300
 gacgccagcc agagcaaaca tatcagctat aaagagctgc accgcgacgt ctgccgcttc 360

gccaataccc tgctcgagct gggcattaaa aaaggtgatg tgggtggcgat ttatatgccg	420
atggtgccgg aagccgcggt tgcgatgctg gcctgcgccc gcattggcgc ggtgcattcg	480
gtgattttcg gcggtttctc gccggaagcc gttgccgggc gcattattga ttccaactca	540
cgactggatga tcacttccga cgaaggtgtg cgtgccgggc gcagtattcc gctgaagaaa	600
aacgttgatg acgcgctgaa aaacccgaac gtcaccagcg tagagcatgt ggtggtactg	660
aagcgtactg gcgggaaaaa tgactggcag gaagggcgcg acctgtggtg gcacgacctg	720
gttgagcaag cgagcgatca gcaccaggcg gaagagatga acgccgaaga tccgctgttt	780
attctctaca cctccggttc taccgtaag ccaaaagggt tgctgcatac taccggcgggt	840
tatctggtgt acgcggcgct gacctttaaa tatgtctttg attatcatcc gggtgataac	900
tactggtgca ccgccgatgt gggctgggtg accggacaca gtacttgct gtacggcccg	960
ctggcctgcg gtgcgaccac gctgatgttt gaaggcgtag ccaactggcc gacgcctgcc	1020
cgtatggcgc aggtggtgga caagcatcag gtcaatatc tctataccgc acccacggcg	1080
atccgcgcgc tgatggcgga aggcgataaa gcgatcgaag gcaccgaccg ttctgcgctg	1140
cgcatctctg gttccgtggg cgagccaatt aacccggaag cgtgggagtg gtactggaaa	1200
aaaatcgga acgagaaatg tccggtggtc gatacctggt ggcagaccga aaccggcgggt	1260
ttcatgatca ccccgctgcc tggcgctacc gagctgaaag ccggttcggc aacacgtccg	1320
ttcttcggcg tgcaaccggc gctggtcgat aacgaaggta acccgctgga gggggccacc	1380
gaaggtagcc tggtaatcac cgactcctgg ccgggtcagg cgcgtacgct gtttggcgat	1440
cacgaacgtt ttgaacagac ctacttctcc accttcaaaa atatgtattt cagcggcgac	1500
ggcgcgctc gcgatgaaga tggctattac tggataaccg ggcgtgtgga cgacgtgctg	1560
aacgtctccg gtcaccgtct ggggacggca gagattgagt cggcgctggt ggcgcatccg	1620
aagattgccg aagccgccgt agtaggtatt ccgcacaata ttaaaggta ggcgatctac	1680
gcctacgtca cgcttaatca cggggaggaa ccgtcaccag aactgtacgc agaagtcgc	1740
aactgggtgc gtaaagagat tggcccgtg gcgacgccag acgtgctgca ctggaccgac	1800
tccctgccta aaaccgctc cggcaaaatt atgcgccgta ttctgcgcaa aattgcggcg	1860
ggcgatacca gcaacctggg cgatacctcg acgcttgccg atcctggcgt agtcgagaag	1920

ctgcttgaag agaagcaggc tatcgcgatg ccatcgtaa

1959

<210> 11
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PlysC-argA-F

<400> 11
 gaaaggtgca caaagatggg aaaggaacgt aaaaccg

37

<210> 12
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tn-argA-RXh

<400> 12
 gcccactagt ctcgagcatg cggcgttgat ttg

34

<210> 13
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tn-PlysC-FXh

<400> 13
 gaatgagttc ctcgagccga tgctagggcg aaaa

34

<210> 14
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PlysC-R

<400> 14
ctttgtgcac ctttcgatct acgtgctgac agttac 36

<210> 15
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PlysC-argE-F

<400> 15
gaaagggtgca caaagatgaa aaacaaatta ccgcc 35

<210> 16
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tn-argE-RXh

<400> 16
gccactagt ctcgaggttt gattcactgt cggtcg 36

<210> 17
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Pro-pta-FX

<400> 17
ccgggggatcc tctagagggg ttctaaaaaa tgtggagt 38

<210> 18
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> pta-PlysC-R

<400> 18
gccgtgcttt tcgccctagc atcggacatc gcctttctaa ttt 43

<210> 19
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PlysC-F

<400> 19
ccgatgctag ggcgaaaagc acggc 25

<210> 20
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PlysC-pta-ackA-F

<400> 20
gaaaggtgca caaagatgtc tgacacaccg acctcagctc 40

<210> 21
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Pro-pta-RX

<400> 21
gcaggtcgac tctagattat ccggcattgg ctct 34

<210> 22
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Pta-ackA-R

<400> 22

tcgagtttca ccccttaa

18

<210> 23

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 13869_pta-PlysC-R

<400> 23

gccgtgcttt tcgccctagc atcggacatc gcctttctag ttt

43

<210> 24

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PlysC-acs-F

<400> 24

gaaaggtgca caaagatgag ccaaattcac aaa

33

<210> 25

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tn-acs-RXh

<400> 25

gccactagt ctcgagaagg cgtttacgcc gcatcc

36

<210> 26

<211> 494

<212> PRT

<213> chất vận chuyển tiết putrescin của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

<400> 26

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

Trp Ala Phe Leu Ala Val Ile Ser Gly Gly Leu Phe Leu Ile Gly Val
 20 25 30

Asp Asn Ser Ile Leu Tyr Thr Ala Leu Pro Leu Leu Arg Glu Gln Leu
 35 40 45

Ala Ala Thr Glu Thr Gln Ala Leu Trp Ile Ile Asn Ala Tyr Pro Leu
 50 55 60

Leu Met Ala Gly Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Leu Gly Asp Lys Ile
 65 70 75 80

Gly His Arg Arg Met Phe Leu Met Gly Leu Ser Ile Phe Gly Ile Ala
 85 90 95

Ser Leu Gly Ala Ala Phe Ala Pro Thr Ala Trp Ala Leu Val Ala Ala
 100 105 110

Arg Ala Phe Leu Gly Ile Gly Ala Ala Thr Met Met Pro Ala Thr Leu
 115 120 125

Ala Leu Ile Arg Ile Thr Phe Glu Asp Glu Arg Glu Arg Asn Thr Ala
 130 135 140

Ile Gly Ile Trp Gly Ser Val Ala Ile Leu Gly Ala Ala Ala Gly Pro
 145 150 155 160

Ile Ile Gly Gly Ala Leu Leu Glu Phe Phe Trp Trp Gly Ser Val Phe
 165 170 175

Leu Ile Asn Val Pro Val Ala Val Ile Ala Leu Ile Ala Thr Leu Phe
 180 185 190

Val Ala Pro Ala Asn Ile Ala Asn Pro Ser Lys His Trp Asp Phe Leu
 195 200 205

Ser Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Leu Ala Gly Leu Ile Ile Thr Ile
 210 215 220

Lys Glu Ser Val Asn Thr Ala Arg His Met Pro Leu Leu Leu Gly Ala
 225 230 235 240

Val Ile Met Leu Ile Ile Gly Ala Val Leu Phe Ser Ser Arg Gln Lys
 245 250 255

Lys Ile Glu Glu Pro Leu Leu Asp Leu Ser Leu Phe Arg Asn Arg Leu
 260 265 270

Phe Leu Gly Gly Val Val Ala Ala Gly Met Ala Met Phe Thr Val Ser
275 280 285

Gly Leu Glu Met Thr Thr Ser Gln Arg Phe Gln Leu Ser Val Gly Phe
290 295 300

Thr Pro Leu Glu Ala Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Ala Leu Gly Ser
305 310 315 320

Phe Pro Met Ser Ile Ile Gly Gly Ala Asn Leu His Arg Trp Gly Phe
325 330 335

Lys Pro Leu Ile Ser Gly Gly Phe Ala Ala Thr Ala Val Gly Ile Ala
340 345 350

Leu Cys Ile Trp Gly Ala Thr His Thr Asp Gly Leu Pro Phe Phe Ile
355 360 365

Ala Gly Leu Phe Phe Met Gly Ala Gly Ala Gly Ser Val Met Ser Val
370 375 380

Ser Ser Thr Ala Ile Ile Gly Ser Ala Pro Val Arg Lys Ala Gly Met
385 390 395 400

Ala Ser Ser Ile Glu Glu Val Ser Tyr Glu Phe Gly Thr Leu Leu Ser
405 410 415

Val Ala Ile Leu Gly Ser Leu Phe Pro Phe Phe Tyr Ser Leu His Ala
420 425 430

Pro Ala Glu Val Ala Asp Asn Phe Ser Ala Gly Val His His Ala Ile
435 440 445

Asp Gly Asp Ala Ala Arg Ala Ser Leu Asp Thr Ala Tyr Ile Asn Val
450 455 460

Leu Ile Ile Ala Leu Val Cys Ala Val Ala Ala Ala Leu Ile Ser Ser
465 470 475 480

Tyr Leu Phe Arg Gly Asn Pro Lys Gly Ala Asn Asn Ala His
485 490

<210> 27

<211> 1485

<212> ADN

<213> chất vận chuyển ti ể tputrescin của Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

<400> 27

atgacttcag aaaccttaca ggcgcaagcg cctacgaaaa cccaacgttg ggctttcctc

60

gccgttatca gcggtggctt ctttctgac ggtgtagaca actcgattct ctacaccgca 120
 ctccctctgc tgcgtgaaca gctcgcagcc accgaaaccc aagcgttgtg gatcatcaac 180
 gcatacccc tgcctcatggc gggccttctt ttgggtaccg gcactttggg tgacaaaatc 240
 ggccaccgcc ggatgttcct catgggcttg agcattttcg gaatcgcttc acttgggtgct 300
 gcgtttgctc caactgcgtg ggctcttggt gctcgcagag ctttccttgg catcggtgcg 360
 gcaacgatga tgcctgcaac cttggctctg atccgcatta cgtttgagga tgagcgtgag 420
 cgcaacactg caattgggat ttggggttcc gtggcaattc ttggcgctgc ggcaggcccc 480
 atcattgggtg gtgcgctggt ggaattcttc tgggtggggt cggttttcct cattaacgtt 540
 ccggtggctg ttatcgctt gatcgctacg cttttgtgg cgccggccaa tatcgcaat 600
 ccgtctaagc attgggattt cttgtcgtcg ttctatgcgc tgcacact tgcgtgggtg 660
 atcatcacga tcaaggaatc tgtgaatact gcacgccata tgcctcttct tttgggtgca 720
 gtcacatgt tgatcattgg tgcggtgttg tttagcagtc gtcagaagaa gatcgaggag 780
 ccacttctag atctgtcgtt gttccgtaat cgccttttct taggcggtgt ggttgcctgc 840
 ggcatggcga tgtttactgt gtccggtttg gaaatgacta cctcgcagcg tttccagtgt 900
 tctgtgggtt tcaactccact tgaggctggt ttgctcatga tcccagctgc attgggtagc 960
 ttcccgaagt ctattatcgg tgggtcaaac ctgcatcgtt ggggcttcaa accgctgac 1020
 agtgggtggt ttgctgccac tgcggttggc atgcacctgt gtatttggg cgcgactcat 1080
 actgatgggt tgcggtttt catcggggt ctattcttca tgggcgagg tgctggttcg 1140
 gtaatgtctg tgtcttcac tgcgattatc ggttccgcgc cgttgcgtaa ggctggcatg 1200
 gcgtcgtcga tcgaagaggt ctcttatgag ttccgcacgc tgttgtctgt cgcgattttg 1260
 ggtagcttgt tccattctt ctactcgtg catgccccgg cagaggttgc ggataacttc 1320
 tcggcgggtg ttaccacgc gattgatggc gatcgggcgc gtgcatcttt ggacaccgca 1380
 tacattaacg tgttgatcat tgcctagta tgcgcagtag cggctgctct gatcagcagt 1440
 taccttttcc gcggaaatcc gaaggagcc aataatgcgc actag 1485

<211> 494
 <212> PRT
 <213> chất vận chuyển ti ết putrescin của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869

<400> 28

Met Ile Ser Glu Thr Leu Gln Ala Gln Ala Pro Thr Lys Thr Gln Arg
 1 5 10 15

Trp Ala Phe Leu Ala Val Ile Ser Gly Gly Leu Phe Leu Ile Gly Val
 20 25 30

Asp Asn Ser Ile Leu Tyr Thr Ala Leu Pro Leu Leu Arg Glu Gln Leu
 35 40 45

Ala Ala Thr Glu Thr Gln Ala Leu Trp Ile Ile Asn Ala Tyr Pro Leu
 50 55 60

Leu Met Ala Gly Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Leu Gly Asp Lys Ile
 65 70 75 80

Gly His Arg Arg Met Phe Leu Met Gly Leu Ser Ile Phe Gly Ile Ala
 85 90 95

Ser Leu Gly Ala Ala Phe Ala Pro Thr Ala Trp Ala Leu Val Ala Ala
 100 105 110

Arg Ala Phe Leu Gly Ile Gly Ala Ala Thr Met Met Pro Ala Thr Leu
 115 120 125

Ala Leu Ile Arg Ile Thr Phe Glu Asp Glu Arg Glu Arg Asn Thr Ala
 130 135 140

Ile Gly Ile Trp Gly Ser Val Ala Ile Leu Gly Ala Ala Ala Gly Pro
 145 150 155 160

Ile Ile Gly Gly Ala Leu Leu Glu Phe Phe Trp Trp Gly Ser Val Phe
 165 170 175

Leu Ile Asn Val Pro Val Ala Val Ile Ala Leu Ile Ala Thr Leu Phe
 180 185 190

Val Ala Pro Ala Asn Ile Ala Asn Pro Ser Lys His Trp Asp Phe Leu
 195 200 205

Ser Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Leu Ala Gly Leu Ile Val Thr Ile
 210 215 220

Lys Glu Ser Val Asn Thr Ala Arg His Leu Pro Leu Leu Val Gly Ala
 225 230 235 240

Ile Ile Leu Leu Ile Ile Gly Ala Val Leu Phe Ser Ser Arg Gln Lys

				245						250					255			
Lys	Ile	Glu	Glu	Pro	Leu	Leu	Asp	Leu	Ser	Leu	Phe	Arg	Asn	Arg	Leu			
			260					265					270					
Phe	Leu	Gly	Gly	Val	Val	Ala	Ala	Gly	Met	Ala	Met	Phe	Thr	Val	Ser			
		275					280					285						
Gly	Leu	Glu	Met	Thr	Thr	Ser	Gln	Arg	Phe	Gln	Leu	Ser	Val	Gly	Phe			
		290					295				300							
Thr	Pro	Leu	Glu	Ala	Gly	Leu	Leu	Met	Ile	Pro	Ala	Ala	Leu	Gly	Ser			
305					310					315					320			
Phe	Pro	Met	Ser	Ile	Ile	Gly	Gly	Ala	Asn	Leu	His	Arg	Trp	Gly	Phe			
				325					330					335				
Lys	Pro	Leu	Ile	Ser	Gly	Gly	Phe	Leu	Ala	Thr	Ala	Val	Gly	Ile	Ala			
			340					345					350					
Leu	Cys	Ile	Trp	Gly	Ala	Thr	His	Thr	Asp	Gly	Leu	Pro	Phe	Phe	Ile			
		355					360					365						
Ala	Gly	Leu	Phe	Phe	Met	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	Val	Met	Ser	Val			
		370				375					380							
Ser	Ser	Thr	Ala	Ile	Ile	Gly	Ser	Ala	Pro	Val	Arg	Lys	Ala	Gly	Met			
385					390					395					400			
Ala	Ser	Ser	Ile	Glu	Glu	Val	Ser	Tyr	Glu	Phe	Gly	Thr	Leu	Leu	Ser			
			405						410						415			
Val	Ala	Ile	Leu	Gly	Ser	Leu	Phe	Pro	Phe	Phe	Tyr	Ser	Leu	His	Ala			
			420					425					430					
Pro	Ala	Glu	Val	Ala	Asp	Asn	Phe	Ser	Ala	Gly	Val	His	His	Ala	Ile			
		435					440					445						
Tyr	Gly	Asp	Ala	Ala	Arg	Ala	Ser	Leu	Asp	Thr	Ala	Tyr	Ile	Asn	Val			
		450				455					460							
Leu	Ile	Ile	Ala	Leu	Val	Cys	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Leu	Ile	Ser	Ser			
465					470				475						480			
Tyr	Leu	Phe	Arg	Gly	Asn	Pro	Lys	Gly	Ala	Asn	Asn	Ala	His					
				485					490									

$\langle 210 \rangle$	29
$\langle 211 \rangle$	1485
$\langle 212 \rangle$	ADN

<213> chất vận chuyển ti ết putrescin của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869

<400> 29

atgatttcag aaactttgca ggcgcaagcg cctacgaaaa cccaacgttg ggctttcctc	60
gctgttatca gcggtggtct ctttctgac ggtgtagaca actcaatcct ctacaccgca	120
ctccccctgc tgcgtgaaca actcgcagcc actgaaaccc aagcgttgtg gatcatcaac	180
gcataatccc tgctcatggc gggctttctt ttgggtaccg gcactttggg tgacaaaatc	240
ggccaccgcc ggatgttcct catgggcttg agcattttcg gaatcgcttc acttggcgct	300
gcgtttgctc caactgcgtg ggcctttgtt gctgcgagag ctttccttgg catcggtgcg	360
gcgacgatga tgcccgaac ctgggctctg atccgcatta cgtttgaaga tgaacgcgaa	420
cggaaacaccg cgattggcat ttggggttct gtggcaattc ttggcgcggc ggcaggtccg	480
atcattgggtg gtgcgctgtt ggaattcttc tgggtgggtt cggttttcct cattaacgtt	540
ccggtggctg ttatcgctt gatcgctacg ctttttggg cgccggccaa tatcggaat	600
ccgtccaagc actgggattt ctatctctcg ttctatgcat tgcttaccct tgcaggtttg	660
attgtcacca tcaaagaatc ggtaaact gcacgtcatc tgccactgct ttaggtgcc	720
atcatcttgc ttatcattgg tgcggtgttg ttagcagtc gtcagaagaa gatcgaggag	780
ccacttctag atctgtcgtt gttccgtaat cgccttttct taggcggtgt ggttgctgcg	840
ggcatggcga tgtttactgt gtccggtttg gaaatgacta cctcgcagcg ttccagttg	900
tctgtgggtt tcaactccact tgaggctggt ttgctcatga tccagctgc attgggtagc	960
ttcccgatgt ctattatcgg tggtgcaaac ttgcatcgtt ggggcttcaa accgctgac	1020
agtgggtggt tccttgccac ggcagtcggc atcgccctgt gtatttggg cgcgactcat	1080
actgatggtt tgccgttttt catcgcggtt ctgttcttca tggcgcggg tgctggttcg	1140
gtaatgtctg tgtcttccac tgcgattatc ggttccgcgc cgggtcgtaa ggctggcatg	1200
gcgtcgtcga tcgaagaggt ctcttatgag ttccggcacgc tgttgtctgt cgcgattttg	1260
ggtagcttgt tccattctt ctactcgtg catgccccgg cagaggttgc ggataacttc	1320
tccgcggttg ttaccacgc gatattatggc gatcgcggc gtgcatcttt ggacaccgca	1380
tacattaacg tgttgatcat tgccctagta tgcgcagtag cggctgctct gatcagcagt	1440

taccttttcc gcggaaatcc gaaggagacc aataatgcgc actag

1485

<210> 30
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> axetyltransferaza của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

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

<210> 31
 <211> 203

<212> PRT

<213> axetyltransferaza cù Corynebacterium glutamicum ATCC 13869

<400> 31

Met Ser Pro Thr Val Leu Pro Ala Thr Gln Ala Asp Phe Pro Lys Ile
 1 5 10 15

Val Asp Val Leu Val Glu Ala Phe Ala Asn Asp Pro Ala Phe Leu Arg
 20 25 30

Trp Ile Pro Gln Pro Asp Pro Gly Ser Ala Lys Leu Arg Ala Leu Phe
 35 40 45

Glu Leu Gln Ile Glu Lys Gln Tyr Ala Val Ala Gly Asn Ile Asp Val
 50 55 60

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

Pro Asp Gly Asn His Ser Ala Lys Asp Gln Ala Ala Ile Leu Pro Arg
 85 90 95

Leu Val Ser Ile Phe Gly Ile Lys Ala Ala Gln Val Ala Trp Thr Asp
 100 105 110

Leu Ser Ser Ala Arg Phe His Pro Lys Phe Pro His Trp Tyr Leu Tyr
 115 120 125

Thr Val Ala Thr Ser Ser Ser Ala Arg Gly Thr Gly Val Gly Ser Ala
 130 135 140

Leu Leu Asn His Gly Ile Ala Arg Ala Gly Asp Glu Ala Ile Tyr Leu
 145 150 155 160

Glu Ala Thr Ser Thr Arg Ala Ala Gln Leu Tyr Asn Arg Leu Gly Phe
 165 170 175

Val Pro Leu Gly Tyr Ile Pro Ser Asp Asp Asp Gly Thr Pro Glu Leu
 180 185 190

Ala Met Trp Lys Pro Pro Ala Met Pro Thr Val
 195 200

<210> 32

<211> 357

<212> PRT

<213> Axetyl gama glutamyl phosphat reductaza (ArgC)

<400> 32

Met Ile Met His Asn Val Tyr Gly Val Thr Met Thr Ile Lys Val Ala

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

275 280 285
 Glu Gly Ala Gln Pro Gln Thr Gln Ala Val Leu Gly Ser Asn Met Cys
 290 295 300
 His Val Gln Val Glu Ile Asp Glu Glu Ala Gly Lys Val Leu Val Thr
 305 310 315 320
 Ser Ala Ile Asp Asn Leu Thr Lys Gly Thr Ala Gly Ala Ala Val Gln
 325 330 335
 Cys Met Asn Leu Ser Val Gly Phe Asp Glu Ala Ala Gly Leu Pro Gln
 340 345 350
 Val Gly Val Ala Pro
 355

<210> 33
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> Axetyl glutamat syntaza hoặc Ornithin axetyl transferaza (ArgJ)

<400> 33
 Met Ala Glu Lys Gly Ile Thr Ala Pro Lys Gly Phe Val Ala Ser Ala
 1 5 10 15
 Thr Thr Ala Gly Ile Lys Ala Ser Gly Asn Pro Asp Met Ala Leu Val
 20 25 30
 Val Asn Gln Gly Pro Glu Phe Ser Ala Ala Ala Val Phe Thr Arg Asn
 35 40 45
 Arg Val Phe Ala Ala Pro Val Lys Val Ser Arg Glu Asn Val Ala Asp
 50 55 60
 Gly Gln Ile Arg Ala Val Leu Tyr Asn Ala Gly Asn Ala Asn Ala Cys
 65 70 75 80
 Asn Gly Leu Gln Gly Glu Lys Asp Ala Arg Glu Ser Val Ser His Leu
 85 90 95
 Ala Gln Asn Leu Gly Leu Glu Asp Ser Asp Ile Gly Val Cys Ser Thr
 100 105 110
 Gly Leu Ile Gly Glu Leu Leu Pro Met Asp Lys Leu Asn Ala Gly Ile
 115 120 125
 Asp Gln Leu Thr Ala Glu Gly Ala Leu Gly Asp Asn Gly Ala Ala Ala
 130 135 140

Ala Lys Ala Ile Met Thr Thr Asp Thr Val Asp Lys Glu Thr Val Val
 145 150 155 160

Phe Ala Asp Gly Trp Thr Val Gly Gly Met Gly Lys Gly Val Gly Met
 165 170 175

Met Ala Pro Ser Leu Ala Thr Met Leu Val Cys Leu Thr Thr Asp Ala
 180 185 190

Ser Val Thr Gln Glu Met Ala Gln Ile Ala Leu Ala Asn Ala Thr Ala
 195 200 205

Val Thr Phe Asp Thr Leu Asp Ile Asp Gly Ser Thr Ser Thr Asn Asp
 210 215 220

Thr Val Phe Leu Leu Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Thr Pro Thr Gln
 225 230 235 240

Asp Glu Leu Asn Asp Ala Val Tyr Ala Ala Cys Ser Asp Ile Ala Ala
 245 250 255

Lys Leu Gln Ala Asp Ala Glu Gly Val Thr Lys Arg Val Ala Val Thr
 260 265 270

Val Val Gly Thr Thr Asn Asn Glu Gln Ala Ile Asn Ala Ala Arg Thr
 275 280 285

Val Ala Arg Asp Asn Leu Phe Lys Cys Ala Met Phe Gly Ser Asp Pro
 290 295 300

Asn Trp Gly Arg Val Leu Ala Ala Val Gly Met Ala Asp Ala Asp Met
 305 310 315 320

Glu Pro Glu Lys Ile Ser Val Phe Phe Asn Gly Gln Ala Val Cys Leu
 325 330 335

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

Asp Ile Asp Val Arg Ile Asp Leu Gly Thr Ser Gly Glu Gly Gln Ala
 355 360 365

Thr Val Arg Thr Thr Asp Leu Ser Phe Ser Tyr Val Glu Ile Asn Ser
 370 375 380

Ala Tyr Ser Ser
 385

<210> 34
 <211> 317

<212> PRT

<213> Acetyl glutamat kinaza (ArgB)

<400> 34

Met Asn Asp Leu Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Val Arg Ala Asn Val
 1 5 10 15

Leu Ala Glu Ala Leu Pro Trp Leu Gln His Phe Arg Asp Lys Ile Val
 20 25 30

Val Val Lys Tyr Gly Gly Asn Ala Met Val Asp Asp Asp Leu Lys Ala
 35 40 45

Ala Phe Ala Ala Asp Met Val Phe Leu Arg Thr Val Gly Ala Lys Pro
 50 55 60

Val Val Val His Gly Gly Gly Pro Gln Ile Ser Glu Met Leu Asn Arg
 65 70 75 80

Val Gly Leu Gln Gly Glu Phe Lys Gly Gly Phe Arg Val Thr Thr Pro
 85 90 95

Glu Val Met Asp Ile Val Arg Met Val Leu Phe Gly Gln Val Gly Arg
 100 105 110

Asp Leu Val Gly Leu Ile Asn Ser His Gly Pro Tyr Ala Val Gly Thr
 115 120 125

Ser Gly Glu Asp Ala Gly Leu Phe Thr Ala Gln Lys Arg Met Val Asn
 130 135 140

Ile Asp Gly Val Pro Thr Asp Ile Gly Leu Val Gly Asp Ile Ile Asn
 145 150 155 160

Val Asp Ala Ser Ser Leu Met Asp Ile Ile Glu Ala Gly Arg Ile Pro
 165 170 175

Val Val Ser Thr Ile Ala Pro Gly Glu Asp Gly Gln Ile Tyr Asn Ile
 180 185 190

Asn Ala Asp Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ala Ala Ala Ile Gly Ala Glu
 195 200 205

Arg Leu Leu Val Leu Thr Asn Val Glu Gly Leu Tyr Thr Asp Trp Pro
 210 215 220

Asp Lys Ser Ser Leu Val Ser Lys Ile Lys Ala Thr Glu Leu Glu Ala
 225 230 235 240

Ile Leu Pro Gly Leu Asp Ser Gly Met Ile Pro Lys Met Glu Ser Cys
 245 250 255

Leu Asn Ala Val Arg Gly Gly Val Ser Ala Ala His Val Ile Asp Gly
260 265 270

Arg Ile Ala His Ser Val Leu Leu Glu Leu Leu Thr Met Gly Gly Ile
275 280 285

Gly Thr Met Val Leu Pro Asp Val Phe Asp Arg Glu Asn Tyr Pro Glu
290 295 300

Gly Thr Val Phe Arg Lys Asp Asp Lys Asp Gly Glu Leu
305 310 315

<210> 35

<211> 391

<212> PRT

<213> Acetyl ornithin aminotransferaza (ArgD)

<400> 35

Met Ser Thr Leu Glu Thr Trp Pro Gln Val Ile Ile Asn Thr Tyr Gly
1 5 10 15

Thr Pro Pro Val Glu Leu Val Ser Gly Lys Gly Ala Thr Val Thr Asp
20 25 30

Asp Gln Gly Asn Val Tyr Ile Asp Leu Leu Ala Gly Ile Ala Val Asn
35 40 45

Ala Leu Gly His Ala His Pro Ala Ile Ile Glu Ala Val Thr Asn Gln
50 55 60

Ile Gly Gln Leu Gly His Val Ser Asn Leu Phe Ala Ser Arg Pro Val
65 70 75 80

Val Glu Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Arg Phe Ser Leu Asp Asp Ala
85 90 95

Thr Leu Ala Ala Gln Thr Arg Val Phe Phe Cys Asn Ser Gly Ala Glu
100 105 110

Ala Asn Glu Ala Ala Phe Lys Ile Ala Arg Leu Thr Gly Arg Ser Arg
115 120 125

Ile Leu Ala Ala Val His Gly Phe His Gly Arg Thr Met Gly Ser Leu
130 135 140

Ala Leu Thr Gly Gln Pro Asp Lys Arg Glu Ala Phe Leu Pro Met Pro
145 150 155 160

Ser Gly Val Glu Phe Tyr Pro Tyr Gly Asp Thr Asp Tyr Leu Arg Lys

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

<210> 36
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Ornithin carbamoyl transferaza (argF)
 <400> 36

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

His Cys Leu Pro Ala Tyr Arg Gly Lys Glu Val Ala Ala Ser Val Ile
275 280 285

Asp Gly Pro Ala Ser Lys Val Phe Asp Glu Ala Glu Asn Arg Leu His
290 295 300

Ala Gln Lys Ala Leu Leu Val Trp Leu Leu Ala Asn Gln Pro Arg
305 310 315

<210> 37

<211> 533

<212> PRT

<213> Chất vận chuyển ti ế t glutamat (NCgl1221)

<400> 37

Met Ile Leu Gly Val Pro Ile Gln Tyr Leu Leu Tyr Ser Leu Trp Asn
1 5 10 15

Trp Ile Val Asp Thr Gly Phe Asp Val Ala Ile Ile Leu Val Leu Ala
20 25 30

Phe Leu Ile Pro Arg Ile Gly Arg Leu Ala Met Arg Ile Ile Lys Arg
35 40 45

Arg Val Glu Ser Ala Ala Asp Ala Asp Thr Thr Lys Asn Gln Leu Ala
50 55 60

Phe Ala Gly Val Gly Val Tyr Ile Ala Gln Ile Val Ala Phe Phe Met
65 70 75 80

Leu Ala Val Ser Ala Met Gln Ala Phe Gly Phe Ser Leu Ala Gly Ala
85 90 95

Ala Ile Pro Ala Thr Ile Ala Ser Ala Ala Ile Gly Leu Gly Ala Gln
100 105 110

Ser Ile Val Ala Asp Phe Leu Ala Gly Phe Phe Ile Leu Thr Glu Lys
115 120 125

Gln Phe Gly Val Gly Asp Trp Val Arg Phe Glu Gly Asn Gly Ile Val
130 135 140

Val Glu Gly Thr Val Ile Glu Ile Thr Met Arg Ala Thr Lys Ile Arg
145 150 155 160

Thr Ile Ala Gln Glu Thr Val Ile Ile Pro Asn Ser Thr Ala Lys Val
165 170 175

Cys Ile Asn Asn Ser Asn Asn Trp Ser Arg Ala Val Val Ile Pro
180 185 190

Ile Pro Met Leu Gly Ser Glu Asn Ile Thr Asp Val Ile Ala Arg Ser
 195 200 205
 Glu Ala Ala Thr Arg Arg Ala Leu Gly Gln Glu Lys Ile Ala Pro Glu
 210 215 220
 Ile Leu Gly Glu Leu Asp Val His Pro Ala Thr Glu Val Thr Pro Pro
 225 230 235 240
 Thr Val Val Gly Met Pro Trp Met Val Thr Met Arg Phe Leu Val Gln
 245 250 255
 Val Thr Ala Gly Asn Gln Trp Leu Val Glu Arg Ala Ile Arg Thr Glu
 260 265 270
 Ile Ile Ser Glu Phe Trp Glu Glu Tyr Gly Ser Ala Thr Thr Thr Ser
 275 280 285
 Gly Thr Leu Ile Asp Ser Leu His Val Glu His Glu Glu Pro Lys Thr
 290 295 300
 Ser Leu Ile Asp Ala Ser Pro Gln Ala Leu Lys Glu Pro Lys Pro Glu
 305 310 315 320
 Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Leu Ala Ala Ser Ser Asn Asp Asp Ala
 325 330 335
 Asp Asn Ala Asp Ala Ser Val Ile Asn Ala Gly Asn Pro Glu Lys Glu
 340 345 350
 Leu Asp Ser Asp Val Leu Glu Gln Glu Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu
 355 360 365
 Glu Thr Ala Lys Pro Asp His Ser Leu Arg Gly Phe Phe Arg Thr Asp
 370 375 380
 Tyr Tyr Pro Asn Arg Trp Gln Lys Ile Leu Ser Phe Gly Gly Arg Val
 385 390 395 400
 Arg Met Ser Thr Ser Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 405 410 415
 Phe Lys Val Met Thr Val Glu Pro Ser Glu Asn Trp Gln Asn Ser Ser
 420 425 430
 Gly Trp Leu Ser Pro Ser Thr Ala Thr Ser Thr Ala Val Thr Thr Ser
 435 440 445
 Glu Thr Ser Ala Pro Val Ser Thr Pro Ser Met Thr Val Pro Thr Thr
 450 455 460

Val Glu Glu Thr Pro Thr Met Glu Ser Asn Val Glu Thr Gln Gln Glu
465 470 475 480

Thr Ser Thr Pro Ala Thr Ala Thr Pro Gln Arg Ala Asp Thr Ile Glu
485 490 495

Pro Thr Glu Glu Ala Thr Ser Gln Glu Glu Thr Thr Ala Ser Gln Thr
500 505 510

Gln Ser Pro Ala Val Glu Ala Pro Thr Ala Val Gln Glu Thr Val Ala
515 520 525

Pro Thr Ser Thr Pro
530

<210> 38
<211> 711
<212> PRT
<213> Ornithin decarboxylaza (ODC)

<400> 38
Met Lys Ser Met Asn Ile Ala Ala Ser Ser Glu Leu Val Ser Arg Leu
1 5 10 15

Ser Ser His Arg Arg Val Val Ala Leu Gly Asp Thr Asp Phe Thr Asp
20 25 30

Val Ala Ala Val Val Ile Thr Ala Ala Asp Ser Arg Ser Gly Ile Leu
35 40 45

Ala Leu Leu Lys Arg Thr Gly Phe His Leu Pro Val Phe Leu Tyr Ser
50 55 60

Glu His Ala Val Glu Leu Pro Ala Gly Val Thr Ala Val Ile Asn Gly
65 70 75 80

Asn Glu Gln Gln Trp Leu Glu Leu Glu Ser Ala Ala Cys Gln Tyr Glu
85 90 95

Glu Asn Leu Leu Pro Pro Phe Tyr Asp Thr Leu Thr Gln Tyr Val Glu
100 105 110

Met Gly Asn Ser Thr Phe Ala Cys Pro Gly His Gln His Gly Ala Phe
115 120 125

Phe Lys Lys His Pro Ala Gly Arg His Phe Tyr Asp Phe Phe Gly Glu
130 135 140

Asn Val Phe Arg Ala Asp Met Cys Asn Ala Asp Val Lys Leu Gly Asp

145 150 155 160
 Leu Leu Ile His Glu Gly Ser Ala Lys Asp Ala Gln Lys Phe Ala Ala
 165 170 175
 Lys Val Phe His Ala Asp Lys Thr Tyr Phe Val Leu Asn Gly Thr Ser
 180 185 190
 Ala Ala Asn Lys Val Val Thr Asn Ala Leu Leu Thr Arg Gly Asp Leu
 195 200 205
 Val Leu Phe Asp Arg Asn Asn His Lys Ser Asn His His Gly Ala Leu
 210 215 220
 Ile Gln Ala Gly Ala Thr Pro Val Tyr Leu Glu Ala Ser Arg Asn Pro
 225 230 235 240
 Phe Gly Phe Ile Gly Gly Ile Asp Ala His Cys Phe Asn Glu Glu Tyr
 245 250 255
 Leu Arg Gln Gln Ile Arg Asp Val Ala Pro Glu Lys Ala Asp Leu Pro
 260 265 270
 Arg Pro Tyr Arg Leu Ala Ile Ile Gln Leu Gly Thr Tyr Asp Gly Thr
 275 280 285
 Val Tyr Asn Ala Arg Gln Val Ile Asp Thr Val Gly His Leu Cys Asp
 290 295 300
 Tyr Ile Leu Phe Asp Ser Ala Trp Val Gly Tyr Glu Gln Phe Ile Pro
 305 310 315 320
 Met Met Ala Asp Ser Ser Pro Leu Leu Leu Glu Leu Asn Glu Asn Asp
 325 330 335
 Pro Gly Ile Phe Val Thr Gln Ser Val His Lys Gln Gln Ala Gly Phe
 340 345 350
 Ser Gln Thr Ser Gln Ile His Lys Lys Asp Asn His Ile Arg Gly Gln
 355 360 365
 Ala Arg Phe Cys Pro His Lys Arg Leu Asn Asn Ala Phe Met Leu His
 370 375 380
 Ala Ser Thr Ser Pro Phe Tyr Pro Leu Phe Ala Ala Leu Asp Val Asn
 385 390 395 400
 Ala Lys Ile His Glu Gly Glu Ser Gly Arg Arg Leu Trp Ala Glu Cys
 405 410 415
 Val Glu Ile Gly Ile Glu Ala Arg Lys Ala Ile Leu Ala Arg Cys Lys

420 425 430
 Leu Phe Arg Pro Phe Ile Pro Pro Val Val Asp Gly Lys Leu Trp Gln
 435 440 445
 Asp Tyr Pro Thr Ser Val Leu Ala Ser Asp Arg Arg Phe Phe Ser Phe
 450 455 460
 Glu Pro Gly Ala Lys Trp His Gly Phe Glu Gly Tyr Ala Ala Asp Gln
 465 470 475 480
 Tyr Phe Val Asp Pro Cys Lys Leu Leu Leu Thr Thr Pro Gly Ile Asp
 485 490 495
 Ala Glu Thr Gly Glu Tyr Ser Asp Phe Gly Val Pro Ala Thr Ile Leu
 500 505 510
 Ala His Tyr Leu Arg Glu Asn Gly Ile Val Pro Glu Lys Cys Asp Leu
 515 520 525
 Asn Ser Ile Leu Phe Leu Leu Thr Pro Ala Glu Ser His Glu Lys Leu
 530 535 540
 Ala Gln Leu Val Ala Met Leu Ala Gln Phe Glu Gln His Ile Glu Asp
 545 550 555 560
 Asp Ser Pro Leu Val Glu Val Leu Pro Ser Val Tyr Asn Lys Tyr Pro
 565 570 575
 Val Arg Tyr Arg Asp Tyr Thr Leu Arg Gln Leu Cys Gln Glu Met His
 580 585 590
 Asp Leu Tyr Val Ser Phe Asp Val Lys Asp Leu Gln Lys Ala Met Phe
 595 600 605
 Arg Gln Gln Ser Phe Pro Ser Val Val Met Asn Pro Gln Asp Ala His
 610 615 620
 Ser Ala Tyr Ile Arg Gly Asp Val Glu Leu Val Arg Ile Arg Asp Ala
 625 630 635 640
 Glu Gly Arg Ile Ala Ala Glu Gly Ala Leu Pro Tyr Pro Pro Gly Val
 645 650 655
 Leu Cys Val Val Pro Gly Glu Val Trp Gly Gly Ala Val Gln Arg Tyr
 660 665 670
 Phe Leu Ala Leu Glu Glu Gly Val Asn Leu Leu Pro Gly Phe Ser Pro
 675 680 685
 Glu Leu Gln Gly Val Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Gly Val Lys Arg

690 695 700

Leu Tyr Gly Tyr Val Leu Lys

705 710

<210> 39

<211> 289

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen khởi đầu lysCP1

<400> 39

ccgatgctag ggcgaaaagc acggcgagca gattgctttg cacttgattc agggtagttg 60

actaaagagt tgctcgcgaa gtagcacctg tcacttttgt ctcaaatatt aaatcgaata 120

tcaatatatg gtctgtttat tggaacgctt cccagtggct gagacgcata cgctaaagcc 180

ccaggaaccc tgtgcagaaa gaaaacactc ctctggctag gtagacacag tttattgtgg 240

tagagttgag cgggtaactg tcagcacgta gatcgaaagg tgcacaaaag 289