



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

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

(11)



1-0032436

(51)⁷

C12N 1/21; C12P 13/06; C12N 15/54;
C12N 15/09; C12N 15/52

(13) B

(21) 1-2016-04873

(22) 05/06/2015

(86) PCT/KR2015/005659 05/06/2015

(87) WO2015/186990 10/12/2015

(30) 10-2014-0068613 05/06/2014 KR

(45) 25/07/2022 412

(43) 27/03/2017 348A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

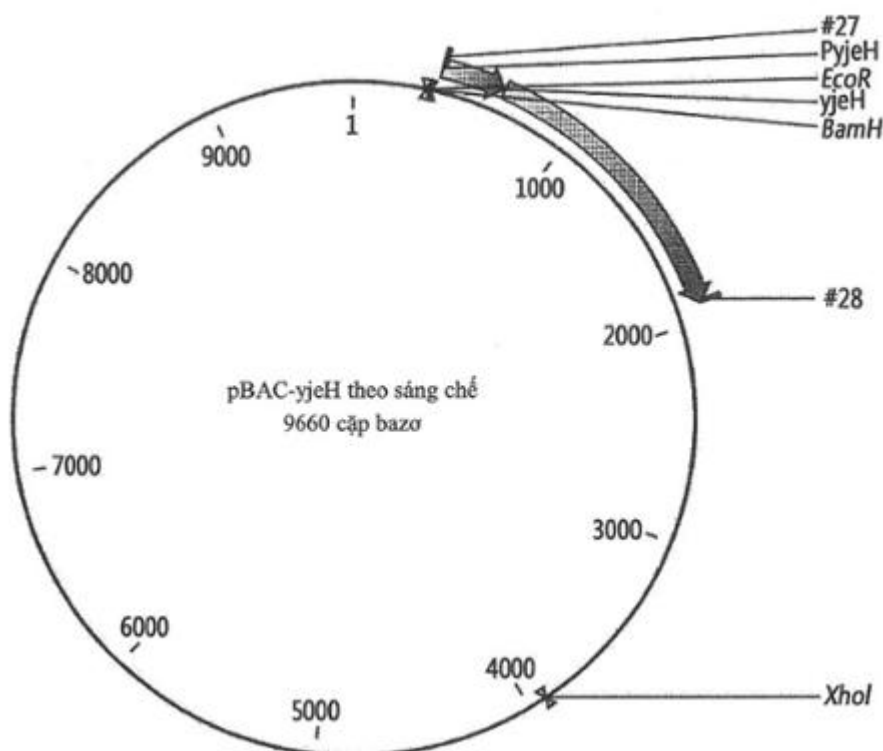
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea

(72) BAE, Jee Yeon (KR); KIM, Hyun Ah (KR); SHIN, Yong Uk (KR); KIM, So Young (KR); KIM, Sang Kyoum (KR); NA, Kwang Ho (KR); SEO, Ju Hee (KR); SON, Sung Kwang (KR); YOO, Hye Ryun (KR); CHOI, Jin Geun (KR).

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

(54) VI SINH VẬT SẢN SINH O-AXETYLHOMOSERIN, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT O-AXETYLHOMOSERIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-METHIONIN BẰNG CÁCH SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản sinh *O*-axetylhomoserin với hiệu suất cao và phương pháp sản xuất *O*-axetylhomoserin và *L*-methionin bằng cách sử dụng vi sinh vật này. Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản sinh *O*-axetylhomoserin có hoạt tính protein gia tăng mà dự đoán được khả năng sinh ra *O*-axetylhomoserin, và phương pháp sản xuất *O*-axetylhomoserin và *L*-methionin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản sinh *O*-axetylhomoserin với hiệu suất cao và phương pháp sản xuất *O*-axetylhomoserin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

O-axetylhomoserin hoạt động như tiền chất của methionin, là loại axit amin thiết yếu trong cơ thể. Methionin không những được sử dụng làm chất phụ gia cho thức ăn và thực phẩm mà còn làm nguyên liệu thô cho dung dịch dùng để tiêm truyền và dược phẩm.

Methionin được sản xuất bằng cách tổng hợp hóa học và sinh học. Gần đây, quy trình hai bước để sản xuất *L*-methionin từ tiền chất *L*-methionin, mà đã được sản xuất bằng cách lên men, bằng cách chuyển hóa enzym đã được công bố (Công bố đơn quốc tế số WO 2008/013432).

Quy trình hai bước này dùng các tiền chất là *O*-sucxinylhomoserin và *O*-axetylhomoserin, và điều quan trọng là tạo ra *O*-axetylhomoserin với hiệu suất cao nhằm mục đích sản xuất với quy mô lớn mà ít tốn kém.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Trong tình trạng này, các tác giả sáng chế đã nỗ lực nhằm cải tiến quy trình sản xuất *O*-axetylhomoserin, và do đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng loại protein có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin, nhờ đó đã tạo ra sáng chế.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin gia tăng.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất *O*-axetylhomoserin có hiệu

quả bằng cách sử dụng vi sinh vật có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin gia tăng.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Vi sinh vật theo sáng chế có hoạt tính YjeH gia tăng, là protein màng trong, có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin được cải thiện và do đó, hiệu quả sản xuất *O*-axetylhomoserin có thể được tăng lên. Do đó, vi sinh vật theo sáng chế có thể được sử dụng rộng rãi để sản xuất *O*-axetylhomoserin.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện bản đồ phân cắt của vector *yjeH* (vector *pBAC-yjeH*) theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vi sinh vật có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin, trong đó hoạt tính của YjeH, là protein màng trong, được gia tăng hơn so với vi sinh vật không được cải biến.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “*O*-axetylhomoserin” được dùng để chỉ dẫn xuất axetyl của *L*-homoserin, là chất trung gian cụ thể trong quá trình sinh tổng hợp methionin trong vi sinh vật. Đã biết rằng *O*-axetylhomoserin được tạo ra bởi phản ứng giữa homoserin và axetyl-CoA được xúc tác bởi homoserin axetyltransferaza. Nó có công thức hóa học là $C_6H_{11}NO_4$.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vi sinh vật có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin” được dùng để chỉ vi sinh vật mà, khi được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy, có thể sản sinh *O*-axetylhomoserin trong cơ thể sinh vật và tiết nó vào môi trường nuôi cấy này. Năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin có thể thu được hoặc được gia tăng bằng cách cải tạo loài. Đặc biệt, vi sinh vật có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin có thể là vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin, và đặc biệt hơn là *E. coli*. Ví dụ, vi sinh vật có thể là *E. coli* có khả năng sản sinh lysin, threonin, isoleuxin, hoặc methionin, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “YjeH” được biết là protein, là thành viên của họ Axit amin-Polyamin-Organocation (APC) đối với chất vận chuyển axit amin, có mặt trong màng trong. Kỳ vọng rằng YjeH có tác dụng làm chất vận chuyển axit amin nhưng chức năng chính xác của nó vẫn chưa được biết đến. Do vậy, trước tiên các tác giả sáng chế khẳng định rằng YjeH có thể

tạo ra *O*-axetylhomoserin theo cách đặc hiệu.

Đặc biệt, YjeH có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, và đặc biệt hơn là từ *E. coli*. Cụ thể, YjeH có thể là protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc trình tự axit amin bất kỳ có mức độ tương đồng là 70% hoặc cao hơn, đặc biệt là 80% hoặc cao hơn, hoặc đặc biệt hơn là 90% hoặc cao hơn, so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, rõ ràng rằng trình tự axit amin bất kỳ mà có trình tự axit amin tương tự như trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc trình tự axit amin bất kỳ có hoạt tính tạo ra *O*-axetylhomoserin, có thể nằm trong phạm vi của sáng chế, mặc dù trình tự này có thể có đoạn khuyết, cải biến, thế, hoặc xen một phần vào đó. Ngoài ra, dựa trên mức thoái biến codon di truyền, các trình tự nucleotit mã hóa cùng một axit amin và các biến thể của chúng cũng nằm trong phạm vi của sáng chế, ví dụ, trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, nhưng không chỉ giới hạn ở trình tự này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “mức độ tương đồng” được dùng để chỉ mức độ giống nhau giữa hai trình tự nucleotit hoặc gốc axit amin khác nhau trong vùng so sánh cụ thể chứa các trình tự nucleotit hoặc axit amin của gen mã hóa protein, sau khi sắp hàng cả hai trình tự này để phù hợp một cách tối đa. Khi mức độ tương đồng đủ lớn, thì các sản phẩm biểu hiện gen tương ứng có thể có hoạt tính như nhau hoặc có hoạt tính tương tự nhau. Mức độ tương đồng có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình so sánh trình tự đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, BLAST (NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlign™ (DNASTAR Inc.), v.v..

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vi sinh vật không được cải biến” được dùng để chỉ vi sinh vật không được đưa vào bằng cách cải biến hoạt tính của protein tương ứng, và vi sinh vật được dùng để chỉ chủng cơ bản cần được đưa vào bằng cách cải biến hoạt tính của protein tương ứng, mà có thể là vi sinh vật tự nhiên hoặc đã được cải biến.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “gia tăng” hoạt tính của protein được dùng để chỉ việc cải thiện tình trạng hoạt tính của các protein được tạo ra bởi vi sinh vật. Mức gia tăng hoạt tính của protein không chỉ giới hạn miễn là hoạt tính của mỗi protein có thể được gia tăng hơn so với hoạt tính của vi sinh vật không được cải biến, như trong trường hợp gia tăng hoạt tính của protein đích. Ví dụ, việc làm gia tăng này có thể được thực hiện bằng các phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm i) tăng số lượng bản sao polynucleotit mã hóa mỗi protein, ii) cải biến trình tự đối chứng biểu hiện để làm tăng mức biểu hiện của polynucleotit này, iii) cải biến trình

tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để gia tăng hoạt tính của mỗi protein; và iv) tổ hợp của các phương pháp này. Đặc biệt, việc làm gia tăng hoạt tính của protein có thể được thực hiện bằng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm phương pháp đưa trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein vào nhiễm sắc thể, phương pháp đưa trình tự nucleotit vào vi sinh vật sau khi đưa nó vào hệ vector, phương pháp đưa gen khởi đầu có hoạt tính được cải thiện vào phía sau trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein hoặc đưa mỗi protein vào bằng cách cải biến gen khởi đầu, phương pháp cải biến trình tự nucleotit của vùng 5'-UTR, và phương pháp đưa biến thể của trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, hoạt tính của YjeH có thể được làm gia tăng hơn so với hoạt tính của vi sinh vật không được cải biến, bằng cách làm tăng số lượng bản sao hoặc tăng cường hoạt tính của gen khởi đầu nhất định. Đặc biệt, hoạt tính của YjeH có thể được gia tăng bằng cách đưa gen khởi đầu có hoạt tính được cải thiện vào YjeH, mà là màng trong. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, gen khởi đầu có hoạt tính được cải thiện có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen khởi đầu bất kỳ có hoạt tính được cải thiện hơn so với hoạt tính của gen tự khởi đầu của *yjeH*. Ví dụ về gen khởi đầu này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen khởi đầu bất kỳ của gen có hoạt tính về mức biểu hiện gen mạnh hơn hơn so với hoạt tính của gen tự khởi đầu của *yjeH*, hoặc gen khởi đầu đã được cải biến có hoạt tính được cải thiện do việc cải biến gen này trong gen tự khởi đầu của *yjeH*, v.v.. Đặc biệt, gen khởi đầu theo sáng chế có hoạt tính được cải thiện có thể được chọn từ nhóm bao gồm gen khởi đầu *icd*, gen khởi đầu *pro*, và gen khởi đầu *cysK*. Đặc biệt, gen khởi đầu *icd* có thể chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 51; gen khởi đầu *pro* có thể chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 52; và gen khởi đầu *cysK* có thể chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 53, nhưng mỗi gen trong số các gen khởi đầu này có thể chứa trình tự nucleotit có mức độ tương đồng là 70% hoặc cao hơn, đặc biệt là 80% hoặc cao hơn, và đặc biệt hơn là 90% hoặc cao hơn, so với mỗi trình tự trong số các trình tự nucleotit nêu trên.

Theo khía cạnh cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* có khả năng sản sinh O-acetylhomoserin có thể là vi sinh vật, trong đó hoạt tính của xystathionin syntaza được làm suy yếu hoặc bất hoạt tiếp. Đặc biệt, vi sinh vật này có thể là vi sinh vật, trong đó hoạt tính của xystathionin syntaza được làm suy yếu hoặc bất hoạt hơn so với hoạt tính của vi sinh vật không được cải biến, và đặc biệt gen, *metB* mà mã hóa xystathionin syntaza, được làm khuyết,

nhưng không chỉ giới hạn ở vi sinh vật này. Trình tự axit amin của *metB* có thể thu được từ dữ liệu đã biết, và trình tự axit amin bất kỳ có hoạt tính của xystathionin syntaza có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, nó có thể được dùng để chỉ protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3. Protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 có thể là protein mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 4, nhưng không chỉ giới hạn ở protein này. Ngoài ra, theo một khía cạnh khác của sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* có thể là vi sinh vật, trong đó hoạt tính của homoserin kinaza được làm suy yếu tiếp hoặc bất hoạt. Đặc biệt, vi sinh vật có thể là vi sinh vật, trong đó hoạt tính của homoserin kinaza được làm suy yếu hoặc bất hoạt hơn so với hoạt tính nội sinh của vi sinh vật không được cải biến, và đặc biệt là vi sinh vật, trong đó gen, *thrB* mã hóa homoserin kinaza, bị khuyết, nhưng không chỉ giới hạn ở vi sinh vật này. Trình tự axit amin của *thrB* có thể thu được từ dữ liệu đã biết, và trình tự axit amin bất kỳ có hoạt tính của homoserin kinaza có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, nó có thể được dùng để chỉ protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5. Protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 có thể là protein mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 6, nhưng không chỉ giới hạn ở protein này.

Theo sáng chế, việc “làm suy yếu” hoạt tính của protein có thể được thực hiện bằng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm i) làm khuyết một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa mỗi protein, ii) cải biến trình tự đối chứng biểu hiện để làm giảm mức biểu hiện của gen, iii) cải biến trình tự gen trên nhiễm sắc thể để làm suy yếu hoạt tính của protein; và iv) tổ hợp của các phương pháp này, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Đặc biệt, thuật ngữ “làm suy yếu hoạt tính của protein” được dùng để chỉ sự giảm hoạt tính của enzym hơn so với hoạt tính nội sinh của enzym tạo ra bởi vi sinh vật ở tình trạng tự nhiên hoặc chủng cơ bản của nó. Việc làm suy yếu là khái niệm bao gồm trường hợp khi có sự giảm về hoạt tính của enzym trong vi sinh vật so với hoạt tính vốn có ban đầu bởi chính enzym này do sự cải biến gen mã hóa enzym gây ra, v.v., trường hợp khi hoạt tính toàn phần của enzym trong tế bào thấp hơn so với hoạt tính của chủng kiểu hoang do việc ức chế sự biểu hiện hoặc ức chế sự dịch mã của gen mã hóa enzym, hoặc tổ hợp của các trường hợp này, nhưng không chỉ giới hạn ở các trường hợp này.

“Bất hoạt” được dùng để chỉ trường hợp khi gen mã hóa enzym trong vi sinh vật hoàn toàn không được biểu hiện và trường hợp khi gen được biểu hiện nhưng không có hoạt tính, so với hoạt tính của chủng kiểu hoang.

Quá trình làm bất hoạt enzym có thể được thực hiện bằng cách dùng các phương pháp đã

biết khác nhau trong lĩnh vực này. Ví dụ về các phương pháp có thể bao gồm phương pháp thể gen mã hóa enzym trên nhiễm sắc thể bằng gen đột biến để làm giảm hoạt tính của enzym, bao gồm trường hợp khi hoạt tính enzym bị loại bỏ; phương pháp đưa đoạn cải biến trong trình tự đối chứng biểu hiện của gen mã hóa enzym trên nhiễm sắc thể vào; phương pháp thể trình tự đối chứng biểu hiện của gen mã hóa enzym bằng trình tự có hoạt tính yếu hoặc không có hoạt tính; phương pháp làm khuyết toàn bộ hoặc một phần gen mã hóa enzym trên nhiễm sắc thể; phương pháp đưa oligonucleotit đối nghĩa (ví dụ, ARN đối nghĩa) mà gắn kết bổ trợ với phần tử phiên mã của gen trên nhiễm sắc thể, nhờ đó ức chế quá trình dịch mã từ ARN thông tin thành enzym; phương pháp kết hợp nhân tạo trình tự bổ sung với trình tự SD thành trình tự nằm trước trình tự SD của gen mã hóa enzym, tạo ra cấu trúc bậc hai, nhờ đó có thể gắn kết ribosom vào đó; phương pháp kết hợp gen khởi đầu với đầu 3' của khung đọc mở (open reading frame - ORF) của trình tự tương ứng để phiên mã ngược (kỹ thuật phiên mã ngược (RTE)), v.v., và cũng như tổ hợp của các phương pháp này, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Đặc biệt, phương pháp làm khuyết toàn bộ hoặc một phần gen mã hóa enzym có thể được thực hiện bằng cách thể polynucleotit mã hóa protein đích nội sinh trong nhiễm sắc thể bằng polynucleotit hoặc gen đánh dấu có đoạn khuyết một phần trong trình tự axit nucleic bằng cách sử dụng vector để xen nhiễm sắc thể trong chúng. Theo phương án làm ví dụ về phương pháp làm khuyết một phần hoặc toàn bộ gen, phương pháp làm khuyết gen bằng cách tái tổ hợp đồng nhất có thể được sử dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “một phần” có thể thay đổi tùy thuộc vào loại polynucleotit, và đặc biệt nó có thể được dùng để chỉ 1 đến 300, đặc biệt hơn là 1 đến 100, và đặc biệt hơn nữa là 1 đến 50, nhưng không chỉ giới hạn cụ thể ở các loại này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “tái tổ hợp đồng nhất” được dùng để chỉ quá trình tái tổ hợp di truyền mà xảy ra bằng cách trao đổi chéo ở locut của chuỗi gen có tính tương hỗ tương đồng.

Đặc biệt, trình tự điều hòa biểu hiện có thể được cải biến bằng cách tạo ra quá trình cải biến trình tự đối chứng biểu hiện bởi đoạn khuyết, xen, thể không bảo toàn hoặc bảo toàn, hoặc tổ hợp của chúng để làm suy yếu tiếp hoạt tính của trình tự đối chứng biểu hiện; hoặc bằng cách thể bằng gen khởi đầu có hoạt tính suy yếu mạnh. Trình tự đối chứng biểu hiện có thể chứa gen khởi đầu, trình tự điều khiển, trình tự mã hóa vùng gắn kết với ribosom, và trình tự kiểm soát quá trình kết thúc sự phiên mã và dịch mã, nhưng không chỉ giới hạn ở các trình tự này.

Hơn thế nữa, trình tự gen trên nhiễm sắc thể có thể được cải biến bằng cách cải biến trình tự bởi đoạn khuyết, xen, thế không bảo toàn hoặc bảo toàn, hoặc tổ hợp của chúng trong trình tự gen để làm suy yếu tiếp hoạt tính enzym; hoặc bằng cách thế bằng gen trình tự mà đã được cải tạo để có hoạt tính suy yếu hơn hoặc trình tự gen mà đã được cải tạo không có hoạt tính, nhưng không chỉ giới hạn ở các trình tự này.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, hoạt tính của mỗi protein được làm suy yếu bằng cách làm khuyết gen *metB* mã hóa xystathionin syntaza và/hoặc gen *thrB* bằng quá trình tái tổ hợp đồng nhất.

Ngoài ra, theo một phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* có thể là vi sinh vật, trong đó hoạt tính của homoserin axetyltransferaza được gia tăng hơn nữa so với hoạt tính của vi sinh vật không được cải biến. Đặc biệt, vi sinh vật này có thể là vi sinh vật, trong đó hoạt tính của homoserin axetyltransferaza được gia tăng hơn so với hoạt tính của vi sinh vật không được cải biến, và cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật, trong đó gen *metA* đã được cải biến mã hóa homoserin axetyltransferaza có hoạt tính gia tăng được đưa vào. Gen *metA* đã được cải biến có thể là gen mã hóa homoserin axetyltransferaza, trong đó axit amin thứ 111 của homoserin axetyltransferaza được thế bằng axit glutamic và axit amin thứ 112 được thế bằng histidin, và cụ thể là gen chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 8, nhưng không chỉ giới hạn ở các gen này. Gen *metA* được cải biến có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin bất kỳ trong đó hoạt tính của homoserin axetyltransferaza được gia tăng hơn so với hoạt tính của kiểu hoang, ví dụ, protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7. Phương án làm ví dụ đối với việc tạo ra, sử dụng gen *metA* đã được cải biến, chúng có hoạt tính homoserin axetyltransferaza gia tăng, v.v., được bộc lộ trong đơn Hàn Quốc số 10-1335841, và toàn bộ Patent Hàn Quốc này có thể được đưa vào đây làm tài liệu patent cho sáng chế.

Ngoài ra, theo khía cạnh cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* có thể là vi sinh vật, trong đó hoạt tính của aspartat kinaza (EC 2.7.2.4) được gia tăng hơn so với hoạt tính của vi sinh vật không được cải biến. Đặc biệt, vi sinh vật này có thể là vi sinh vật, trong đó hoạt tính của aspartat kinaza được gia tăng hơn so với hoạt tính nội sinh của vi sinh vật, nhưng không chỉ giới hạn ở vi sinh vật này.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, quá trình sinh tổng hợp được tăng cường tiếp nhằm mục đích tăng tối đa năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin. Đặc biệt, aspartat kinaza và homoserin *O*-axetyltransferaza được đưa vào bằng cách sử dụng plasmit, và mức thay đổi năng

suất tạo ra *O*-axetylhomoserin được xác định sau khi tăng cường tiếp YjeH trong chủng này bằng quá trình sinh tổng hợp gia tăng đối với homoserin. Do đó, việc tăng cường đồng thời quá trình sinh tổng hợp lẫn *yjeH*, đã khẳng định được rằng năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin được cải thiện tiếp. Cụ thể, đã khẳng định được rằng khi hoạt tính của YjeH được gia tăng bằng cách sử dụng gen khởi đầu *cysK*, thì năng suất tạo ra YjeH được tăng lên khoảng 93% (2,8g/L → 5,4g/L) (Bảng 5).

Ngoài ra, theo một phương án cụ thể của sáng chế, đã xem liệu việc làm gia tăng hoạt tính của YjeH trong chủng hiện có có năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin cao có thể làm tăng tiếp năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin của nó hay không. Đặc biệt hơn, lượng tạo ra *O*-axetylhomoserin đã được xem xét bằng cách sử dụng chủng *KCCM11146P* (Công bố đơn quốc tế số WO2012/087039) sản sinh *O*-axetylhomoserin đã được tạo ra từ chủng có năng suất tạo ra threonin bằng cách gây đột biến NTG, là chủng có nguồn gốc từ W3110 kiểu hoang sau khi thể gen khởi đầu của gen *yjeH* nội sinh bằng gen khởi đầu có hoạt tính biểu hiện ở mức cao. Do đó, đã khẳng định được rằng chủng mà có năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin cao, có thể làm tăng tiếp hoạt tính sản sinh *O*-axetylhomoserin bằng cách làm gia tăng hoạt tính của YjeH lên khoảng 14% (14,2 g/L → 18,2 g/L), và cụ thể là bằng cách làm gia tăng hoạt tính của YjeH nhờ sử dụng gen khởi đầu *cysK* (Bảng 7).

Thông tin về gen dùng trong sáng chế, trình tự của các protein mã hóa bởi các gen này, và trình tự khởi đầu có thể thu được từ dữ liệu đã biết, ví dụ, Ngân hàng Gen NCBI, nhưng không chỉ giới hạn ở các gen này.

Các gen mã hóa mỗi protein trong số các protein và các gen khởi đầu theo sáng chế không những chứa các trình tự nucleotit được thể hiện trong mỗi trình tự trong số các trình tự nêu trong các trình tự mà còn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự gen bất kỳ có mức độ tương đồng là 80% hoặc cao hơn, đặc biệt là 90% hoặc cao hơn, đặc biệt hơn là 95% hoặc cao hơn, đặc biệt hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và đặc biệt nhất là 99% hoặc cao hơn, so với các trình tự này, miễn là trình tự gen mã hóa enzym có tác dụng hầu như tương tự như hoặc tương ứng với tác dụng của mỗi enzym trong số các enzym nêu trên. Ngoài ra, rõ ràng rằng trình tự nucleotit bất kỳ có mức độ tương đồng trình tự nêu trên cũng thuộc phạm vi của sáng chế, mặc dù axit amin có thể bị khuyết, cải biến, thế, hoặc thêm vào một phần của trình tự này.

Ngoài ra, rõ ràng rằng axit amin bất kỳ cấu thành mỗi protein trong số các protein nêu

trên theo sáng chế cũng thuộc phạm vi của sáng chế, mặc dù axit amin này có thể bị khuyết, cải biến, thế, hoặc thêm vào một phần của trình tự này, miễn là axit amin này có trình tự tương tự được thể hiện trong mỗi trình tự trong số các trình tự hoặc có mức độ tương đồng theo đó đồng thời có tác dụng hầu như tương tự như hoặc tương ứng tác dụng của protein trong số các protein này.

Hiệu quả của việc làm gia tăng đồng nhất năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin bằng cách gia tăng hoạt tính của YjeH đã được khẳng định dựa vào các vi sinh vật có môi trường di truyền và năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin khác nhau. Điều này có thể xảy ra bằng cách thúc đẩy quá trình tạo ra chất trung gian riêng bởi YjeH trong quá trình sinh tổng hợp. Tuy nhiên, khi xem xét các đặc tính của YjeH, là màng trong và là loại thuộc họ chất vận chuyển axit amin, đã nghĩ rằng việc tăng năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin có thể thu được bằng cách làm tăng khả năng sinh ra *O*-axetylhomoserin, là sản phẩm cuối cùng và là loại axit amin, nhờ đó thúc đẩy các phản ứng nội bào.

Vấn theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất *O*-sucxinylhomoserin bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* sản sinh *O*-axetylhomoserin theo sáng chế và việc thu hồi môi trường nuôi cấy.

Môi trường dùng để nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế và các điều kiện nuôi cấy khác không chỉ giới hạn một cách cụ thể nhưng môi trường bất kỳ dùng để nuôi cấy thông thường vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* có thể được sử dụng. Đặc biệt, vi sinh vật theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong môi trường thông thường chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, hợp chất vô cơ, axit amin và/hoặc vitamin thích hợp, v.v., trong điều kiện hiếu khí đồng thời điều chỉnh nhiệt độ, độ pH, v.v..

Theo sáng chế, nguồn cacbon có thể bao gồm các hydrat cacbon (ví dụ, glucoza, fructoza, sucroza, maltoza, manitol, sorbitol, v.v.); các rượu (ví dụ, rượu đường, glyxerol, axit pyruvic, axit lactic, axit xitric, v.v.); các axit amin (ví dụ, axit glutamic, methionin, lysin, v.v.); v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này. Ngoài ra, nguồn cacbon có thể bao gồm chất dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên như chất thủy phân tinh bột, rỉ đường, mật rỉ đường, cám gạo, bột sắn, rỉ đường từ đường mía, dịch ngâm ngũ cốc, v.v.. Đặc biệt, các hydrat cacbon như glucoza và rỉ đường đã được xử lý sơ bộ và đã được khử trùng (tức là rỉ đường đã được chuyển hóa thành đường khử) có thể được sử dụng, và ngoài ra, các nguồn cacbon khác nhau với lượng thích hợp

có thể được sử dụng mà không chỉ giới hạn ở các nguồn này. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp ít nhất hai loại.

Ví dụ về nguồn nitơ có thể bao gồm nguồn nitơ vô cơ (ví dụ, amoniac, amoni sulfat, amoni clorua, amoni cacbonat, amoni phosphat, amoni nitrat, v.v.); axit amin (axit glutamic, methionin, glutamin, v.v.); và nguồn nitơ hữu cơ (ví dụ, pepton, N-Z amin, nước thịt, dịch chiết nấm men, dịch chiết mạch nha, dịch ngâm ngũ cốc, casein hydrolysat, cá hoặc sản phẩm phân hủy của chúng, bánh đậu tương khử mỡ hoặc sản phẩm phân hủy của chúng, v.v.). Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp ít nhất hai loại, nhưng không chỉ giới hạn ở các nguồn này.

Ví dụ về nguồn phospho có thể bao gồm monokali phosphat, đikali phosphat, và muối chứa natri tương ứng. Ví dụ về hợp chất vô cơ cần dùng có thể bao gồm natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sulfat, sắt sulfat, mangan sulfat, canxi cacbonat, v.v.. Ngoài ra, axit amin, vitamin, và/hoặc các tiền chất thích hợp có thể được bao gồm. Môi trường hoặc các tiền chất này có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trong quy trình nuôi cấy theo mẻ hoặc quy trình nuôi cấy liên tục, nhưng không chỉ giới hạn ở các quy trình này.

Theo sáng chế, độ pH của môi trường nuôi này có thể được điều chỉnh trong quá trình nuôi dưỡng bằng cách bổ sung hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, và axit sulfuric vào môi trường nuôi cấy theo cách thích hợp. Trong quá trình nuôi dưỡng, chất chống tạo bọt, như polyglycol este của axit béo, cũng có thể được bổ sung để ngăn ngừa quá trình tạo bọt. Ngoài ra, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được phun vào môi trường nuôi cấy để duy trì tình trạng hiếu khí của môi trường nuôi cấy này; hoặc khí nitơ, hydro, hoặc cacbon dioxit có thể được phun mà không cần phun khí để duy trì tính trạng kỵ khí hoặc tình trạng vi hiếu khí của môi trường nuôi cấy này.

Nói chung, nhiệt độ nuôi cấy có thể nằm trong khoảng từ 27°C đến 37°C, và đặc biệt hơn là nằm trong khoảng từ 30°C đến 35°C, nhưng không chỉ giới hạn ở nhiệt độ này. Quá trình nuôi dưỡng có thể được tiếp tục cho đến khi thu được lượng nguyên liệu hữu ích mong muốn, và đặc biệt là trong khoảng thời gian từ 10 giờ đến 100 giờ, nhưng không chỉ giới hạn ở thời gian này.

Phương pháp sản xuất *O*-axetylhomoserin theo sáng chế có thể còn bao gồm phương pháp thu hồi *O*-axetylhomoserin ra khỏi vi sinh vật đã được nuôi cấy hoặc môi trường đã được nuôi cấy.

Đặc biệt, việc thu hồi *O*-axetylhomoserin có thể được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế, ví dụ, phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này như quy

trình theo mẻ, quy trình theo mẻ liên tục, hoặc quy trình cấp theo mẻ.

Việc thu hồi có thể bao gồm quy trình tinh chế.

Việc thu hồi *O*-axetylhomoserin theo đó có thể được sử dụng để sản xuất methionin theo quy trình hai bước được phát triển bởi các tác giả sáng chế (Đơn Hàn Quốc số 10-0905381), nghĩa là quy trình hai bước.

Quy trình hai bước bao gồm quy trình sản xuất *L*-methionin và axit hữu cơ bằng phản ứng enzym sử dụng enzym có hoạt tính của *O*-axetylhomoserin sulfhydrylaza hoặc chủng chứa enzym này bằng cách sử dụng *O*-axetylhomoserin đã được sản sinh bởi chủng sản sinh các cơ chất là tiền chất *L*-methionin và methyl mercaptan.

Đặc biệt hơn, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất *L*-methionin bằng phản ứng enzym sử dụng enzym như *O*-axetylhomoserin sulfhydrylaza bằng cách sử dụng cơ chất là *O*-axetylhomoserin đã được thu gom bởi phương pháp nêu trên.

Trong quy trình hai bước, khi *O*-axetylhomoserin được dùng làm tiền chất của *L*-methionin, đặc biệt, *O*-axetylhomoserin sulfhydrylaza có nguồn gốc từ chủng vi sinh vật thuộc chi *Leptospira*, chi *Chromobacterium*, và chi *Hyphomonas*, và đặc biệt hơn, từ vi sinh vật chủng thuộc *Leptospira meyeri*, *Pseudomonas aurogenosa*, *Hyphomonas neptunium*, và *Chromobacterium violaceum* có thể được sử dụng.

Phản ứng được thể hiện như sau.



Quy trình sản xuất methionin bổ sung này được bộc lộ trong Đơn Hàn Quốc số 10-0905381, và toàn bộ phần mô tả của Patent Hàn Quốc nêu trên có thể được bao gồm làm tài liệu viện dẫn cho sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn bằng cách viện dẫn tới các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, chứ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Tạo ra các chủng có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin

1-1. Khuyết gen *metB* trong *E. coli* kiểu hoang

Để tạo ra chủng sản sinh *O*-axetylhomoserin, *E. coli*, vi sinh vật đại diện thuộc chi *Escherichia*, được sử dụng. Nhằm mục đích này, *W3110* (ATCC27325) của *E. coli* kiểu hoang (*K12*) thu được từ Trung tâm nuôi cấy Hoa Kỳ (the American Type Culture Collection - ATCC) và được sử dụng. Trước tiên, để phong bế quá trình sản sinh xystathionin từ *O*-succinyl-*L*-homoserin, gen *metB* (SEQ ID NO: 4) mã hóa xystathionin syntaza được làm khuyết.

Đặc biệt, phương pháp làm khuyết PCR một bước FRT được sử dụng để làm khuyết gen *metB* (Wanner BL., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640 - 6645, 2000). Cát-xét làm khuyết được tạo ra bằng cách thực hiện PCR dựa vào vector *pKD3* (Wanner BL., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640 - 6645, 2000) làm khuôn mẫu bằng cách sử dụng các đoạn mồi TKd có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 13 và 14. Cụ thể, PCR được thực hiện trong tổng số 30 vòng trong các điều kiện sau: làm biến tính ở 94°C trong 30 giây, ghép ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút.

Sản phẩm PCR thu được theo đó được tạo xung điện trên gel agarosa 1,0%, và ADN thu được từ dải 1,2 kb được tinh chế. Mảnh ADN thu hồi được đưa vào chủng *W3110* của *E. coli* (*K12*), mà được biến nạp với vector *pKD46* (Wanner BL., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640 - 6645, 2000), bằng xung điện. Chủng *W3110* đã được biến nạp với *pKD46* được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường LB chứa ampicillin (100 µg/L) và *L*-arabinoza (5 mM) cho đến khi môi trường nuôi cấy đạt được OD₆₀₀ = 0,6 ở 30°C, và được sử dụng sau khi rửa hai lần bằng nước cất vô trùng và một lần bằng glyxerol 10%. Việc tạo xung điện được thực hiện ở 2500V. Chủng thu hồi được dàn lên đĩa môi trường nuôi cấy LB chứa chloramphenicol (25 µg/L), được nuôi cấy qua đêm ở 37°C, và các chủng kháng được chọn.

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng chủng đã được chọn theo đó làm khuôn mẫu cùng với các đoạn mồi tương tự (SEQ ID NO: 13 và 14), và việc khuyết gen *metB* được khẳng định bằng cách quan sát sự có mặt của dải gen 1,2 kb trên gel agarosa 1,0%. Chủng, trong đó việc khuyết gen *metB* được khẳng định, được biến nạp với vector *pCP20* (Wanner BL., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640 - 6645, 2000) và được nuôi cấy trong cùng một môi trường nuôi cấy LB. Sau đó, PCR được thực hiện trong cùng một điều kiện, tiếp đó là tạo xung điện trên gel agarosa 1,0% để quan sát sự có mặt của dải gen 1,2kb, từ đó khẳng định rằng có sự khuyết gen *metB*. Khi được khẳng định rằng có sự khuyết gen này, chủng được biến nạp với vector *pCP20* (Wanner BL., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640 - 6645, 2000) và được nuôi cấy trong cùng

một môi trường nuôi cấy LB. Sau đó, PCR được thực hiện trong cùng một điều kiện tiếp đó là tạo xung điện trên gel agarosa 1,0% để lựa chọn chủng cuối cùng cùng với sự khuyết gen *metB* được thể hiện trên dải gen, mà được giảm tới kích cỡ 150bp, từ đó khẳng định được rằng đã loại bỏ được chất đánh dấu chloramphenicol ra khỏi chủng này.

Chủng đã điều chế và được chọn theo đó khuyết gen *metB*, mã hóa xystathionin syntaza được gọi là “*W3-B*”.

1-2. Khuyết gen *thrB*

Để làm tăng lượng tổng hợp *O*-succinylhomoserin từ chủng *W3-B* đã được điều chế trong ví dụ 1-1, gen *thrB* (SEQ ID NO: 6) mã hóa homoserin kinaza được bị loại bỏ ra khỏi chủng này. Để làm khuyết gen *thrB*, phương pháp làm khuyết PCR một bước FRT tương tự, mà được sử dụng trong quá trình làm khuyết gen *metB* trong ví dụ 1-1, được sử dụng.

Trước tiên, để tạo ra cát-xét làm khuyết *thrB*, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng vectơ *pKD4* (Wanner BL., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640 - 6645, 2000) làm khuôn mẫu và từ đó cát-xét làm khuyết được tạo ra. Đặc biệt, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự nêu trong SEQ ID NOS: 15 và 16 trong tổng số 30 vòng trong các điều kiện sau: làm biến tính ở 94°C trong 30 giây, ghép ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút.

Sản phẩm PCR thu được theo đó được tạo xung điện trên gel agarosa 1,0%, và ADN thu được từ dải 1,6kb được tinh chế. Mảnh ADN thu hồi được đưa vào chủng *W3-B*, mà được biến nạp với vectơ *pKD46* bằng cách tạo xung điện. Chủng thu hồi được dàn lên đĩa môi trường nuôi cấy LB chứa kanamycin (50 µg/L), được nuôi cấy qua đêm ở 37°C, và các chủng kháng được chọn.

PCR được thực hiện trong cùng một điều kiện bằng cách sử dụng chủng được chọn bằng quy trình nêu trên làm khuôn mẫu cùng với các đoạn môi (SEQ ID NO: 15 và 16), và việc khuyết gen *thrB* được khẳng định bằng cách quan sát sự có mặt của gen 1,6kb trên gel agarosa 1,0%. Đã khẳng định được rằng chủng này được biến nạp tiếp với vectơ *pCP20* và được nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy LB, và sau đó, PCR được thực hiện trong cùng một điều kiện, tiếp đó là tạo xung điện trên gel agarosa 1,0% để lựa chọn chủng cuối cùng bị khuyết gen *thrB* đã có mặt trên dải gen này, mà bị giảm kích cỡ xuống 150bp, từ đó khẳng định được rằng đã loại bỏ được chất đánh dấu kanamycin ra khỏi chủng này. Chủng đã được điều chế và được chọn từ đó, bị khuyết gen *thrB*, mã hóa homoserin kinaza được gọi là “*W3-BT*”.

Các phương án làm ví dụ đối với các chủng bị khuyết gen *metB* và gen *thrB*, v.v., được

bộc lộ trong Đơn Hàn Quốc số 10-0905381 hoặc Công bố đơn quốc tế số WO 2008/013432, và toàn bộ phần mô tả của Patent Hàn Quốc hoặc Công bố đơn quốc tế này có thể được bao hàm trong bản mô tả này làm tài liệu viện dẫn cho sáng chế.

1-3. Tạo ra chủng chứa gen *metA* cải biến có hoạt tính của homoserin axetyltransferaza

Để tăng cường hoạt tính của homoserin axetyltransferaza trong chủng được điều chế trong ví dụ 1-2, đã nỗ lực đưa gen *metA* cải biến (SEQ ID NO: 8), mã hóa homoserin axetyltransferaza có hoạt tính gia tăng, vào chủng.

Về mặt này, để tạo ra gen *metA* cải biến có hoạt tính gia tăng, trước tiên gen *metA* này t. được khuếch đại và thu được bởi PCR bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của chủng *W3110* làm khuôn mẫu cùng với các đoạn mồi (SEQ ID NO: 17 và 18). Các đoạn mồi (SEQ ID NO: 17 và 18) được sử dụng trong PCR được tạo ra để lần lượt chứa vị trí giới hạn *EcoRV* và vị trí giới hạn *HindIII*, dựa trên trình tự nucleotit nhiễm sắc thể *E. coli* của NC_000913 đã đăng ký trong Ngân hàng Gen NIH.

Sản phẩm PCR thu được theo đó và plasmit *pCL1920* bao gồm *pcj1* được xử lý bằng *EcoRV* và *HindIII* và được tách dòng. *DH5a* của *E. coli* được biến nạp với plasmit đã được tách dòng và được nuôi cấy trong đĩa môi trường nuôi cấy LB chứa spectinomycin (50 µg/L), và *DH5a* của *E. coli* đã được biến nạp được chọn và từ đó thu được plasmit. Plasmit thu được theo đó được gọi là “*pCL_Pcj1_metA*”.

Gen *metA* cải biến được tạo ra bằng cách sử dụng kit tạo đột biến hướng vị trí (Stratagene, USA) dựa trên *pCL_Pcj1_metA* thu được nêu trên. Đặc biệt, axit amin thứ 111 (Gly) của homoserin axetyltransferaza được thế bằng axit glutamic (Glu) (G111E). Plasmit được tạo ra theo đó được gọi là “*pCL_Pcj1_metA(EL)*”.

Ngoài ra, axit amin thứ 111 (Gly) của homoserin axetyltransferaza được thế bằng axit glutamic (Glu), và ngoài ra, axit amin thứ 112 (Leu) được thế bằng histidin (His) bằng cách sử dụng các đoạn mồi (SEQ ID NO: 21 và 22). Do đó, plasmit bao gồm gen *metA*, trong đó axit amin thứ 111 được chuyển từ glyxin thành axit glutamic và axit amin thứ 112 được chuyển từ leuxin thành histidin, được gọi là “*pCL_Pcj1_metA(EH)*”.

Sau đó, để tạo ra cát-xét thay thế để thế bằng gen *metA* cải biến sau khi đưa nó vào chủng, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng vectơ *pKD3* làm khuôn mẫu cùng với các đoạn mồi (SEQ ID NO: 27 và 28) trong tổng số 30 vòng trong các điều kiện sau: làm biến tính ở 94°C

trong 30 giây, ghép ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút. Một phần *metA(EH)* của cát-xét thay thế thu được là sản phẩm PCR lần lượt bằng cách sử dụng *pCL-Pcj1-metA(EH)* làm khuôn mẫu cùng với các đoạn mồi (SEQ ID NO: 23 và 24) và một phần *metA* kiểu hoang thu được bằng cách sử dụng các đoạn mồi (SEQ ID NO: 25 và 26). Ba sản phẩm PCR được sử dụng để tạo ra cát-xét thay thế *metA(EH)*, kể cả chất đánh dấu chloramphenicol, sử dụng các đoạn mồi (SEQ ID NOS: 23 và 26), và gen *metA* cải biến được đưa vào chủng *W3-BT*, mà được biến nạp với vectơ *pKD46*, được điều chế trong ví dụ 1-2 bằng cách tạo xung điện. Chủng, trong đó việc đưa vào được khẳng định, được biến nạp lại với vectơ *pCP20*, được nuôi cấy trong môi trường LB, và chủng này trong đó chất đánh dấu chloramphenicol được loại bỏ và gen *metA* được thế bằng *metA(EH)* được gọi là “*W3-BTA*”.

Các phương án làm ví dụ đối với các chủng có hoạt tính gia tăng của homoserin axetyltransferaza, v.v., được bộc lộ trong Đơn Hàn Quốc số 10-1335841 hoặc Công bố đơn quốc tế số WO 2012/087039, và toàn bộ phần mô tả của Patent Hàn Quốc hoặc Công bố đơn quốc tế có thể được bao hàm trong bản mô tả này làm tài liệu viện dẫn cho sáng chế.

1-4. Tạo ra các chủng bao gồm 2 bản sao của các gen *ppc*, *aspC* và *asd*

Để tăng năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin của *W3-BTA* đã được tạo ra trong ví dụ 1-3, cần tăng cường quá trình sinh tổng hợp. Đã có nhiều nỗ lực để tạo ra chủng này, trong đó phosphoenolpyruvat carboxylaza có liên quan tới quá trình sinh tổng hợp oxaloacetat từ phosphoenolpyruvat, aspartat aminotransferaza liên quan tới quá trình sinh tổng hợp aspartat từ oxaloacetat, và aspartat-semialdehyt dehydrogenaza liên quan tới quá trình sinh tổng hợp homoserin từ aspartat-semialdehyt dehydrogenaza (tức là, gen *ppc*, gen *aspC*, và gen *asd*) được khuếch đại thành 2 bản sao.

Do đó, lần lượt gen *ppc* được khuếch đại thành 2 bản sao bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 29, 30, 31, và 32; gen *aspC* được khuếch đại thành 2 bản sao bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 33 và 34; và gen *asd* được khuếch đại thành 2 bản sao bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 35, 36, 37, và 38.

Chủng, trong đó quá trình sinh tổng hợp *O*-axetylhomoserin được gia tăng dựa trên chủng *W3-BTA* bằng quy trình nêu trên, được gọi là “*W3-BTA2PCD* (= WCJM)”.

Các phương án làm ví dụ đối với các chủng có hoạt tính của homoserin axetyltransferaza gia tăng, v.v., được bộc lộ trong Đơn Hàn Quốc số 10-0905381 hoặc Công bố đơn quốc tế số

WO 2008/013432, và toàn bộ phần mô tả của Patent Hàn Quốc hoặc Công bố đơn quốc tế có thể được bao hàm trong bản mô tả này làm tài liệu viện dẫn cho sáng chế.

1-5. Thử nghiệm môi trường nuôi cấy trong bình cầu

Để thử nghiệm lượng tạo ra *O*-axetylhomoserin bởi các chủng đã được điều chế trong ví dụ 1-3 và 1-4, môi trường trong bình cầu Erlenmeyer được sử dụng. Các chủng *W3110*, *W3-BTA*, và *WCJM* được cấy truyền vào môi trường LB, được nuôi cấy ở 33°C qua đêm. Sau đó, một khuẩn lạc được cấy truyền vào môi trường LB (3mL), được nuôi cấy ở 33°C trong 5 giờ, được pha loãng lại 200 lần trong bình cầu Erlenmeyer dung tích 250mL chứa 25mL môi trường để sản sinh *O*-axetylhomoserin, được nuôi cấy ở 33°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 30 giờ, và lượng tạo ra *O*-axetylhomoserin được khẳng định bằng cách phân tích HPLC. Thành phần của môi trường đã dùng được tóm tắt trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Thành phần của môi trường trong bình cầu để sản sinh *O*-axetylhomoserin

Thành phần	Nồng độ (trên 1L)
Glucosa	40 g
Amoni sulfat	17 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·8H ₂ O	5 mg
ZnSO ₄	5 mg
Canxi cacbonat	30 g
Dịch chiết nấm men	2 g
Methionin	0,15 g
Threonin	0,15 g

Các chủng được nuôi cấy trong môi trường nêu trên trong 30 giờ và lượng tạo ra *O*-axetylhomoserin được khẳng định bằng cách phân tích HPLC. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin bởi môi trường nuôi cấy trong bình cầu

	OD (562 nm)	Mức tiêu thụ glucoza (g/L)	<i>O</i> -AH (g/L)
<i>W3110</i>	14,2	40	0
<i>W3-BTA</i>	8,4	36	0,9
<i>WCJM</i>	9,6	35	1,2

Có thể khẳng định từ Bảng 2, chủng *W3110* kiểu hoang không sản sinh toàn bộ *O*-axetylhomoserin, tuy nhiên chủng *W3-BTA* lại sản sinh *O*-axetylhomoserin với nồng độ là 0,9 g/L, và chủng *WCJM*, trong đó quá trình sinh tổng hợp được gia tăng, sản sinh *O*-axetylhomoserin với nồng độ là 1,2 g/L.

Ví dụ 2: Nhận biết protein màng làm tăng năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin

Các tác giả sáng chế đã dùng *yjeH* (SEQ ID NO: 1), có liên quan tới việc xuất *O*-axetylhomoserin và tạo ra *O*-axetylhomoserin công suất không được nêu.

Gen *yjeH* của chủng được gia tăng bằng cách tách dòng gen *yjeH* này vào vector *bac* bằng cách sử dụng vị trí giới hạn *HindIII* có mặt trong vector *bac*. Đối với vector *bac*, kit tạo dòng CopyControl BAC (Số Cat. CCBAC1H-*HindIII*, Epicentre) được sử dụng.

Trước tiên, để thu được gen *yjeH*, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi (SEQ ID NO: 9 và 10) trong tổng số 30 vòng trong các điều kiện sau: làm biến tính ở 94°C trong 30 giây, ghép ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 68°C trong 1 phút. Sản phẩm PCR thu được được tạo xung điện trên gel agarosa 1,0%, và ADN thu được từ dải 1,2 kb được tinh chế. ADN đã được tinh chế được xử lý bằng *HindIII* ở 37°C qua đêm, được tinh chế một lần nữa, và *yjeH* và vector *BAC* được tách dòng bằng cách sử dụng T4 ligaza. *DH5α* của *E. coli* được biến nạp với plasmit đã được tách dòng, và *DH5α* biến nạp của *E. coli* được chọn từ Môi trường đĩa nuôi cấy LB chứa chloramphenicol 50 µg/mL. Plasmit được tạo ra theo đó được đưa vào các chủng *W3-BTA* và *WCJM*, sản sinh *O*-axetylhomoserin, và thực hiện đánh giá năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin của chúng trong bình cầu.

Sản phẩm PCR thu được được tạo xung điện trên gel agarosa 1,0%, và ADN thu được từ dải 1,2kb được tinh chế. ADN đã được tinh chế được xử lý bằng *HindIII* ở 37°C qua đêm, được tinh chế một lần nữa, và *yjeH* và vector *BAC* được tách dòng bằng cách sử dụng T4 ligaza. *DH5α* của *E. coli* được biến nạp với plasmit đã được tách dòng, và *DH5α* biến nạp của *E. coli* được chọn từ môi trường đĩa nuôi cấy LB chứa chloramphenicol 50 µg/mL và plasmit thu được

từ đó. Plasmid được tạo ra theo đó được đưa vào các chủng *W3-BTA* và *WCJM*, sản sinh *O*-axetylhomoserin, và thực hiện đánh giá năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin của chúng trong bình cầu.

Đặc biệt, mỗi chủng được dần lên môi trường LB rắn và được nuôi cấy trong tủ ủ 33°C qua đêm. Các khuẩn lạc riêng rẽ đối với mỗi chủng này được nuôi cấy trong môi trường LB rắn qua đêm được cấy truyền vào môi trường LB (3mL), được nuôi cấy ở 33°C trong 5 giờ. Tiếp theo, khuẩn lạc thu được được pha loãng 200 lần trong bình cầu Erlenmeyer dung tích 250mL chứa 25mL môi trường để sản sinh *O*-axetylhomoserin, được nuôi cấy ở 33°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 30 giờ, và lượng tạo ra *O*-axetylhomoserin được khẳng định bằng cách phân tích HPLC. Các kết quả được tóm tắt trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Đánh giá năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin trong môi trường bình cầu

	OD (562 nm)	Mức tiêu thụ glucoza (g/L)	<i>O</i> -AH (g/L)
<i>W3-BTA/pBAC</i>	9,5	35	0,8
<i>WCJM/pBAC</i>	9,6	35	1,2
<i>W3-BTA/pBAC-yjeH</i>	9,8	36	1,5
<i>WCJM/pBAC-yjeH</i>	10,1	37	2,3

Như có thể được khẳng định từ Bảng 3, việc đưa plasmid *yjeH* vào chủng *WCJM* sẽ thu được trị số OD cao hơn so với hoạt tính của chủng đối chứng, và cũng như tốc độ tiêu thụ glucoza cao hơn. Chủng *WCJM/pBAC-yjeH* sản sinh *O*-axetylhomoserin với nồng độ là 2,3g/L, từ đó khẳng định được rằng chủng này có thể có năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin tăng lên bằng cách đưa *yjeH* vào.

Ví dụ 3: Tạo ra plasmid chứa gen khởi đầu *yjeH* tăng cường và đánh giá năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin

3-1. Tạo ra plasmid chứa gen khởi đầu *yjeH* tăng cường

Thử nghiệm được thực hiện để thay thế gen khởi đầu *yjeH* nội sinh bằng 3 gen khởi đầu khác nhau có hoạt tính mạnh gây ra do sự biểu hiện hơn so với hoạt tính của gen khởi đầu *yjeH* nội sinh, dựa trên plasmid được tạo ra trong ví dụ 2.

Đặc biệt, các vector *PCL* có gen khởi đầu có hoạt tính gia tăng được tạo ra bằng cách các sử dụng gen khởi đầu *pro*, *cysK*, hoặc *icd*. Vector *PCL* được tạo ra bằng cách sử dụng vị trí giới

hạn *Sma*I của vector *PCL*, và gen khởi đầu *icd* (SEQ ID NO: 51) được tạo ra bằng cách khuếch đại PCR sử dụng các đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 39 và 40; gen khởi đầu *pro* (SEQ ID NO: 52) sử dụng các đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41 và 42; và gen khởi đầu *cysk* (SEQ ID NO: 53) sử dụng các đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 và 44. Các plasmit được tạo ra theo đó được lần lượt đưa vào chủng *WCJM*, và năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin của chúng được đánh giá trong các bình cầu.

Đặc biệt, mỗi chủng được dàn lên đĩa môi trường nuôi cấy LB và được nuôi cấy trong tủ ủ 33°C qua đêm. Mỗi chủng này được nuôi cấy qua đêm trên môi trường đĩa nuôi cấy LB được cấy truyền vào môi trường chuẩn độ 25mL và được nuôi cấy trong tủ ủ 33°C ở 200 vòng/phút qua đêm. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4. Đánh giá năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin trong môi trường nuôi cấy trong bình cầu

	OD (562 nm)	Mức tiêu thụ glucoza (g/L)	<i>O</i> -AH (g/L)
<i>WCJM/pCL1920</i>	9,6	35	1,2
<i>WCJM/pCL-yjeH</i>	10,1	37	2,3
<i>WCJM/pCL-Picd-yjeH</i>	10,5	38	3,1
<i>WCJM/pCL-Ppro-yjeH</i>	10,7	38	3,5
<i>WCJM/pCL-Pcysk-yjeH</i>	9,4	39	4,4

Như có thể được khẳng định từ Bảng 4, chủng này đã được đưa plasmit *pCL-Pcysk-yjeH* vào có sự giảm về trị số OD hơn so với hoạt tính của gen tự khởi đầu, nhưng chủng này lại có tốc độ tiêu thụ glucoza cao hơn và năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin cao nhất (4,4 g/L).

3-2. Tạo ra plasmit để tăng cường gen và gen khởi đầu trong quá trình sinh tổng hợp

Để tạo ra tối đa *O*-axetylhomoserin, plasmit để tăng cường quá trình sinh tổng hợp homoserin được tạo ra. Để tách dòng aspartat kinaza, homoserin *O*-axetyltransferaza, và *yjeH* được đưa vào vector *PCL*, plasmit *pCL-thrA-metX*, đã được điều chế, được sử dụng.

Đặc biệt, để thu được gen *yjeH*, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi (SEQ ID NO: 11 và 12) trong tổng số 30 vòng trong các điều kiện sau: làm biến tính ở 94°C trong 30 giây, ghép ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 68°C trong 1 phút.

Sản phẩm PCR thu được được tạo xung điện trên gel agarosa 1,0%, và tADN thu được từ dải 1,2 kb được tinh chế. ADN đã được tinh chế được xử lý bằng *Kpn*I ở 37°C qua đêm, được

ting chế một lần nữa, và *yjeH* và vectơ *BAC* được tách dòng bằng cách sử dụng T4 ligaza. *DH5α* của *E. coli* được biến nạp với plasmid đã được tách dòng, và *DH5α* của *E. coli* đã được biến nạp được chọn từ môi trường đĩa nuôi cấy LB chứa spectinomycin 50 µg/mL và plasmid thu được từ đó. Plasmid được tạo ra theo đó được đưa vào chủng *WCJM*, mà sản sinh *O*-axetylhomoserin, và thực hiện đánh giá năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin trong bình cầu. Các plasmid được tạo ra theo đó có tất cả 3 loại và chúng được tạo ra bằng cách sử dụng 3 gen khởi đầu khác nhau được tạo ra trong ví dụ 3-1. 3 loại plasmid khác nhau được đưa vào chủng *WCJM* và đánh giá trong bình cầu được thực hiện theo cùng cách như nêu trong ví dụ 3-1. Kết quả được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5. Đánh giá năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin trong môi trường nuôi cấy trong bình cầu

	OD (562 nm)	Mức tiêu thụ glucoza (g/L)	<i>O</i> -AH (g/L)
<i>WCJM/pC2</i>	9,6	35	1,5
<i>WCJM/pC2-yjeH</i>	10,1	37	2,8
<i>WCJM/pC2-Picd-yjeH</i>	10,5	38	4,2
<i>WCJM/pC2-Ppro-yjeH</i>	10,7	38	4,5
<i>WCJM/pC2-Pcysk-yjeH</i>	9,4	39	5,4

Như có thể được khẳng định từ Bảng 5, khi quá trình sinh tổng hợp và *yjeH* được gia tăng đồng thời, năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin được cải thiện hơn. Thứ tự tăng năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin là như sau: theo cùng cách như được mô tả trên đây, chủng được đưa vào bởi plasmid *pC2-Pcysk-yjeH* có sự giảm về trị số OD hơn so với hoạt tính của chủng này, trong đó gen tự khởi đầu được sử dụng, nhưng chủng được đưa vào bởi plasmid *pC2-Pcysk-yjeH* tốc độ tiêu thụ glucoza cao nhất, và cũng có năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin cao nhất (5,4 g/L).

Ví dụ 4: Tạo ra chủng chứa gen khởi đầu *yjeH* nội sinh gia tăng và đánh giá năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin

4-1. Tạo ra chủng chứa *yjeH* nội sinh gia tăng và đánh giá nó

Để tạo ra chủng có hoạt tính gia tăng chứa gen *yjeH* nội sinh của chủng *WCJM*, mà sản sinh *O*-axetylhomoserin, thử nghiệm thay thế gen khởi đầu được thực hiện. Chủng *WCJM* theo

sáng chế có một bản sao gen *yjeH*, và chủng này được tạo ra để làm tăng gen *yjeH* bằng cách tăng cường gen khởi đầu thay vì tăng số lượng bản sao gen *yjeH*.

Đặc biệt, đối với gen khởi đầu để thay thế, các gen khởi đầu *icd*, *cysK*, và *pro* (Picd, Pcysk, và Ppro), mà tác động của chúng được khẳng định trong ví dụ 3, và phương pháp khuếch đại PCR một bước FRT cụ thể nêu trên được sử dụng (Wanner BL., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640 - 6645, 2000). Cát-xét xen được tạo ra bằng cách sử dụng vector *pKD4* làm khuôn mẫu cùng với các đoạn môi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45 và 46 đối với gen khởi đầu *icd*, các đoạn môi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47 và 48 v *cysk*, và các đoạn môi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49 và 50 đối với gen khởi đầu *pro*. PCR được thực hiện trong tổng số 30 vòng trong các điều kiện sau: làm biến tính ở 94°C trong 30 giây, ghép ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút.

Sản phẩm PCR thu được theo đó được tạo xung điện trên gel agarosa 1,0%, và ADN thu được từ dải 2,5kb được tinh chế. Mảnh ADN thu hồi được đưa vào chủng *WCJM*, mà được biến nạp với vector *pKD46* (Wanner BL., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640 - 6645, 2000), bằng cách tạo xung điện. Chủng *WCJM* đã được biến nạp với *pKD46* được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường LB chứa ampicillin 100µg/L và *L-arabinoza* 5mM cho đến khi môi trường nuôi cấy đạt được OD₆₀₀ = 0,6 ở 30°C, và được sử dụng sau khi rửa hai lần bằng nước cất vô trùng và một lần bằng glyxerol 10%. Quá trình tạo xung điện được thực hiện ở 2500V. Chủng thu hồi được dàn lên đĩa môi trường nuôi cấy LB chứa chloramphenicol 25µg/L, được nuôi cấy qua đêm ở 37°C, và các chủng kháng được chọn.

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng chủng đã được chọn theo đó làm khuôn mẫu cùng với các đoạn môi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45 và 46 đối với gen khởi đầu *icd*, các đoạn môi có trình tự nêu trong các of SEQ ID NO: 47 và 48 đối với gen khởi đầu *cysk*, và các đoạn môi có trình tự nêu trong các of SEQ ID NO: 49 và 50 đối với gen khởi đầu *pro* trong cùng một điều kiện nêu trên, việc thay thế gen khởi đầu nội sinh là gen *yjeH* bằng mỗi gen trong số các gen khởi đầu ngoại lai được khẳng định bằng cách quan sát sự có mặt của dải gen 2,5kb trên gel agarosa 1,0%. Các chủng, trong đó có sự thay thế gen khởi đầu được khẳng định, được biến nạp với vector *pCP20* (Wanner BL., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640 - 6645, 2000) và được nuôi cấy trong môi trường LB. Sau đó, PCR được thực hiện trong cùng một điều kiện, tiếp đó là tạo xung điện trên gel agarosa 1,0% để điều chế các chủng cuối cùng chứa gen khởi đầu thay thế có mặt trong dải gen, mà có kích cỡ giảm là 1kb, từ đó khẳng định được rằng chất đánh dấu kanamycin bị loại ra khỏi các chủng. Các chủng đã được điều chế theo đó được gọi tên theo gen

khởi đầu tương ứng của chúng: tức là, “*WCJM-PIY*” đối với chủng chứa gen khởi đầu thay thế *icd*, “*WCJM-PCY*” đối với chủng chứa gen khởi đầu thay thế *cysK*, và “*WCJM-PCY*” đối với chủng chứa gen khởi đầu thay thế *pro*. Năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin của các chủng này, trong đó gen khởi đầu là gen *yjeH* được thay thế được xác định được bằng thực hiện đánh giá môi trường nuôi cấy trong bình cầu và kết quả được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây.

Bảng 6. Đánh giá năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin trong môi trường nuôi cấy trong bình cầu

	OD (562 nm)	Mức tiêu thụ glucoza (g/L)	<i>O</i> -AH (g/L)
<i>WCJM</i>	9,6	35	1,2
<i>WCJM-PIY</i>	9,2	38	1,8
<i>WCJM-PCY</i>	10,5	38	3,1
<i>WCJM-PPY</i>	10,1	38	1,9

Như có thể được khẳng định từ Bảng 6, khi sự biểu hiện gen *yjeH* của chủng *WCJM* được gia tăng bằng cách thay thế gen khởi đầu nội sinh là gen *yjeH* trong nhiễm sắc thể bằng gen khởi đầu có hoạt tính biểu hiện mạnh, năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin không bị thay đổi nhanh chóng so với kết quả của Ví dụ 3, trong đó chủng này được biến nạp bằng cách đưa vào bởi plasmid (5 bản sao), nhưng nhận thấy rằng năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin của mỗi chủng trong số các chủng tăng hơn so với hoạt tính của chủng *WCJM*, là chủng sản sinh *O*-axetylhomoserin.

4-2. Tạo ra chủng chứa gen khởi đầu tăng cường là gen *yjeH* trong chủng có *O*-axetylhomoserin với hiệu suất cao và đánh giá năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin của chủng này

Phương pháp tạo ra chủng sản sinh *O*-axetylhomoserin bằng cách sử dụng chủng có nguồn gốc từ *W3110* kiểu hoang, có năng suất tạo ra threonin bằng cách gây đột biến NTG, là đã biết (Công bố đơn quốc tế số WO 2012/087039). Cụ thể, chủng được điều chế theo đó có năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin cao được ký gửi ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms - KCCM) với số truy cập KCCM11468P.

Chủng với số truy cập KCCM11146P có năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin cao, mà tiêu thụ 40 g/L glucoza và sản sinh khoảng từ 15g/L đến 16g/L trong quá trình nuôi cấy trong bình cầu. Về mặt này, các tác giả sáng chế đã thử nghiệm xem các chủng, mà có năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin cao, có thể cải thiện tiếp năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin của chúng bằng cách tăng cường gen *yjeH* trong các chủng này.

Đặc biệt, gen khởi đầu là gen *yjeH* được thay thế bằng gen khởi đầu có hoạt tính tạo ra mức biểu hiện cao, và điều này thực hiện theo cùng cách như được nêu trong ví dụ 4-1. Các chủng đã được điều chế theo đó, trong đó gen khởi đầu là gen *yjeH* của chủng KCCM11146P, được gọi là “KCCM11146P-PIY” đối với chủng chứa gen khởi đầu thay thế *icd*, “KCCM11146P-PCY” đối với chủng lần lượt chứa gen khởi đầu thay thế *cysK*, và “KCCM11146P-PPY” đối với chủng chứa gen khởi đầu thay thế *pro*.

Năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin của các chủng này, trong đó gen khởi đầu là gen *yjeH* được thay thế, được xác định bằng cách đánh giá môi trường nuôi cấy trong bình cầu. Đặc biệt, các chủng KCCM11146P, KCCM11146P-PIY, KCCM11146P-PCY, và KCCM11146P-PPY được cấy truyền vào môi trường LB và được nuôi cấy ở 33°C qua đêm. Các khuẩn lạc riêng rẽ thu được được cấy truyền vào 3mL môi trường LB, được nuôi cấy ở 33°C trong 5 giờ, được pha loãng 200 lần trong bình cầu Erlenmeyer dung tích 250mL chứa 25mL môi trường để sản sinh *O*-axetylhomoserin, được nuôi cấy ở 33°C với tốc độ 200 vòng/phút trong 30 giờ, và lượng tạo ra *O*-axetylhomoserin được phân tích bằng HPLC. Kết quả được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7. Đánh giá năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin trong môi trường nuôi cấy trong bình cầu

	OD (562 nm)	Mức tiêu thụ glucoza (g/L)	<i>O</i> -AH (g/L)
KCCM11146P	18,3	40	14,2
KCCM11146P-PIY	16,2	40	16,3
KCCM11146P-PCY	19,2	40	18,2
KCCM11146P-PPY	18,8	40	16,2

Như có thể được khẳng định từ Bảng 7, chủng KCCM11146P sản sinh 14,2g/L *O*-axetylhomoserin, trong khi đó trong trường hợp các chủng chứa gen khởi đầu đã được thay thế, chủng PCY có năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin lớn nhất (18,2 g/L) và các chủng PIY và PPY chủng có năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin cao hơn so với hoạt tính của chủng ban đầu.

Các tác giả sáng chế đã khẳng định được rằng chủng dựa trên chủng KCCM11146P, trong đó hoạt tính của gen *yjeH* được gia tăng, có thể làm tăng năng suất tạo ra *O*-axetylhomoserin. Do đó, tác giả sáng chế đã gọi tên chủng này là “CA05-4008”, và được ký gửi chủng này ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM), theo Hiệp định Budapest, vào ngày 22 tháng 11 năm 2013, với số truy cập KCCM11484P.

Như nêu trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu được rằng sáng chế có thể được minh họa bởi các phương án cụ thể khác mà không làm thay đổi ý tưởng kỹ thuật hoặc các đặc tính cần thiết của 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 dự định không chỉ bao hàm các phương án làm ví dụ mà còn các sửa đổi, cải biến, dạng tương đương khác nhau, và các phương án khác có thể cũng nằm trong ý tưởng và phạm vi bảo hộ 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, Hongjengae-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 통제동 361-221 유림빌딩 Tel: 02-391-0950, 396-0950 Fax: 02-392-2859 E-mail: kccmkicc@kccm.or.kr

KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

KOREAN FEDERATION OF CULTURE COLLECTIONS

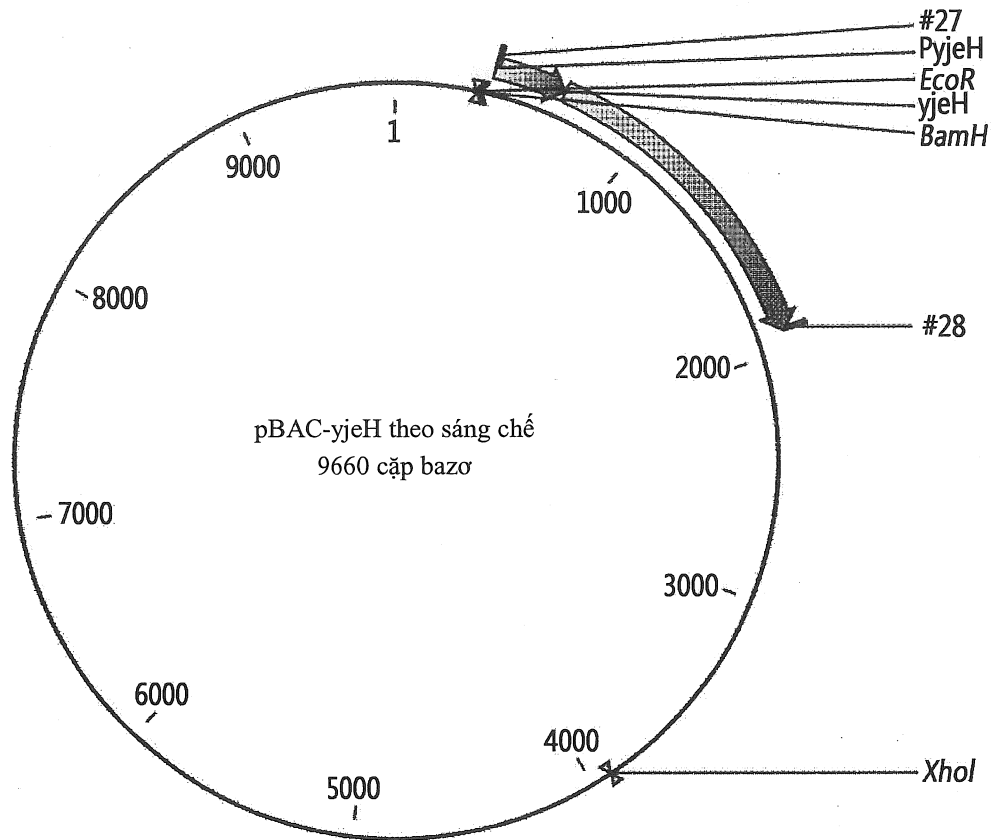
Yoolim Bldg., 361-221 Hongja-1dong, Seodaemun-gu, Seoul, 120-0191, Korea Tel: 82-2-391-0950, 396-0950 Fax: 82-2-392-2859 E-mail: kccmkicc@kccm.or.kr

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* sản sinh *O*-axetylhomoserin, trong đó hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 gia tăng so với vi sinh vật không được cải biến; và trong đó hoạt tính của xystathionin syntaza được làm suy yếu hoặc bất hoạt so với vi sinh vật không được cải biến.
2. Vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này là *Escherichia coli*.
3. Vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* theo điểm 1, trong đó hoạt tính của homoserin kinaza được làm suy yếu hoặc bất hoạt tiếp.
4. Vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* theo điểm 1, trong đó hoạt tính của homoserin acetlyltransferaza được gia tăng tiếp so với vi sinh vật không được cải biến.
5. Vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* theo điểm 1, trong đó hoạt tính của ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm phosphoenolpyruvat carboxylaza, aspartat aminotransferaza, và aspartat semialdehyt dehydrogenaza được gia tăng tiếp.
6. Vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* theo điểm 1, trong đó hoạt tính của aspartat kinaza được gia tăng so với vi sinh vật không được cải biến.
7. Phương pháp sản xuất *O*-axetylhomoserin bao gồm bước
nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* sản sinh *O*-axetylhomoserin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 để thu được môi trường nuôi cấy.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu gom *O*-axetylhomoserin ra khỏi vi sinh vật đã được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.
9. Phương pháp sản xuất L-methionin, bao gồm các bước
nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* sản sinh *O*-axetylhomoserin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, nhờ đó tích lũy *O*-axetylhomoserin; và

sản xuất L-methionin từ *O*-axetylhomoserin tích lũy bằng phản ứng enzym.

Fig.1



<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> VI SINH VẬT SẢN SINH O-AXETYL-HOMOSERIN, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT O-AXETYLHOMOSERIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-METHIONIN BẰNG CÁCH SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

<130> OPA15135

<150> KR10-2014-0068613

<151> 2014-06-05

<160> 53

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 418

<212> PRT

<213> E.coli yjeH

<400> 1

Met Ser Gly Leu Lys Gln Glu Leu Gly Leu Ala Gln Gly Ile Gly Leu

1

5

10

15

Leu Ser Thr Ser Leu Leu Gly Thr Gly Val Phe Ala Val Pro Ala Leu

20

25

30

Ala Ala Leu Val Ala Gly Asn Asn Ser Leu Trp Ala Trp Pro Val Leu

35

40

45

Ile Ile Leu Val Phe Pro Ile Ala Ile Val Phe Ala Ile Leu Gly Arg

50

55

60

His Tyr Pro Ser Ala Gly Gly Val Ala His Phe Val Gly Met Ala Phe

65 70 75 80

Gly Ser Arg Leu Glu Arg Val Thr Gly Trp Leu Phe Leu Ser Val Ile

85 90 95

Pro Val Gly Leu Pro Ala Ala Leu Gln Ile Ala Ala Gly Phe Gly Gln

100 105 110

Ala Met Phe Gly Trp His Ser Trp Gln Leu Leu Leu Ala Glu Leu Gly

115 120 125

Thr Leu Ala Leu Val Trp Tyr Ile Gly Thr Arg Gly Ala Ser Ser Ser

130 135 140

Ala Asn Leu Gln Thr Val Ile Ala Gly Leu Ile Val Ala Leu Ile Val

145 150 155 160

Ala Ile Trp Trp Ala Gly Asp Ile Lys Pro Ala Asn Ile Pro Phe Pro

165 170 175

Ala Pro Gly Asn Ile Glu Leu Thr Gly Leu Phe Ala Ala Leu Ser Val

180 185 190

Met Phe Trp Cys Phe Val Gly Leu Glu Ala Phe Ala His Leu Ala Ser

195 200 205

Glu Phe Lys Asn Pro Glu Arg Asp Phe Pro Arg Ala Leu Met Ile Gly

210 215 220

Leu Leu Leu Ala Gly Leu Val Tyr Trp Gly Cys Thr Val Val Val Leu

225 230 235 240

His Phe Asp Ala Tyr Gly Glu Lys Met Ala Ala Ala Ala Ser Leu Pro

245 250 255

Lys Ile Val Val Gln Leu Phe Gly Val Gly Ala Leu Trp Ile Ala Cys

260 265 270

Val Ile Gly Tyr Leu Ala Cys Phe Ala Ser Leu Asn Ile Tyr Ile Gln

275 280 285

Ser Phe Ala Arg Leu Val Trp Ser Gln Ala Gln His Asn Pro Asp His

290 295 300

Tyr Leu Ala Arg Leu Ser Ser Arg His Ile Pro Asn Asn Ala Leu Asn

305 310 315 320

Ala Val Leu Gly Cys Cys Val Val Ser Thr Leu Val Ile His Ala Leu

325 330 335

Glu Ile Asn Leu Asp Ala Leu Ile Ile Tyr Ala Asn Gly Ile Phe Ile

340 345 350

Met Ile Tyr Leu Leu Cys Met Leu Ala Gly Cys Lys Leu Leu Gln Gly

355 360 365

Arg Tyr Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Leu Leu Cys Val Leu Leu

370 375 380

Leu Ala Met Val Gly Trp Lys Ser Leu Tyr Ala Leu Ile Met Leu Ala

385 390 395 400

Gly Leu Trp Leu Leu Leu Pro Lys Arg Lys Thr Pro Glu Asn Gly Ile

405 410 415

Thr Thr

<210> 2

<211> 1257

<212> ADN

<213> E.coli yjeH

<400> 2

atgagtggac tcaaacaaga actggggctg gcccagggca ttggcctgct atcgacgtca 60

ttattaggca ctggcgtggt tgccgttcct gcgttagctg cgctggtagc gggcaataac 120

agcctgtggg cgtggcccgt ttgattatc ttagtggtcc cgattgcgat tgtgtttgcg 180

attctgggtc gccactatcc cagcgcaggc ggcgtcgcgc acttcgtcgg tatggcggtt 240

ggttcgcggc ttgagcgagt caccggctgg ctgtttttat cggtcattcc cgtggggttg 300

cctgccgcac tacaaattgc cgccgggttc ggccaggcga tgtttggtg gcatagctgg 360

caactgttgt tggcagaact cggtacgctg gcgctggtgt ggtatatcgg tactcgcggt 420

gccagttcca gtgctaactc acaaaccgtt attgccggac ttatcgtcgc gctgattgtc	480
gctatctggg gggcgggcga tatcaaacct gcgaatatcc cctttccggc acctggtaat	540
atcgaactta ccgggttatt tgctgcgtta tcagtgatgt tctgggtgtt tgctcgtctg	600
gaggcatttg cccatctcgc ctccgaattt aaaaatccag agcgtgattt tcctcgtgct	660
ttgatgattg gtctgctgct ggcaggatta gtctactggg gctgtacggt agtcgtctta	720
cacttcgacg cctatgggtga aaaaatggcg gcggcagcat cgcttccaaa aattgtagtg	780
cagttgttcg gtgtaggagc gttatggatt gcctgcgtga ttggctatct ggctgcttt	840
gccagtctca acatttatat acagagcttc gcccgctgg tctggtcgca ggcgcaacat	900
aatcctgacc actacctggc acgcctctct tctcgccata tcccgaataa tgccctcaat	960
gcggtgctcg gctgctgtgt ggtgagcact ttggtgattc atgctttaga gatcaatctg	1020
gacgctctta ttatttatgc caatggcatc tttattatga tttatctggt atgcatgctg	1080
gcaggctgta aattattgca aggacgttat cgactactgg cggtggttgg cgggctgtta	1140
tcggttctgt tactggcaat ggtcggctgg aaaagtctct atgcgctgat catgctggcg	1200
gggttatggc tgttgctgcc aaaacgaaaa acgccgaaa atggcataac cacataa	1257

<210> 3

<211> 386

<212> PRT

<213> E.coli metB

<400> 3

Met Thr Arg Lys Gln Ala Thr Ile Ala Val Arg Ser Gly Leu Asn Asp

1 5 10 15

Asp Glu Gln Tyr Gly Cys Val Val Pro Pro Ile His Leu Ser Ser Thr

20 25 30

Tyr Asn Phe Thr Gly Phe Asn Glu Pro Arg Ala His Asp Tyr Ser Arg

35 40 45

Arg Gly Asn Pro Thr Arg Asp Val Val Gln Arg Ala Leu Ala Glu Leu

50 55 60

Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Leu Thr Asn Thr Gly Met Ser Ala Ile

65 70 75 80

His Leu Val Thr Thr Val Phe Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Val Ala

85 90 95

Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala

100 105 110

Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Leu Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Gln

115 120 125

Ala Leu Arg Ala Ala Leu Ala Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu

130

135

140

Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys

145

150

155

160

His Leu Ala Arg Glu Val Gly Ala Val Ser Val Val Asp Asn Thr Phe

165

170

175

Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val

180

185

190

Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala

195

200

205

Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Asp Val Val Thr Glu Leu Ala Trp

210

215

220

Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu

225

230

235

240

Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln

245

250

255

Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val

260

265

270

Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile

275

280

285

Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu

290

295

300

Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu

305

310

315

320

Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His

325

330

335

Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala

340

345

350

Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp

355

360

365

Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn

370

375

380

Lys Gly

385

<210> 4

<211> 1161

<212> ADN

<213> E.coli metB

<400> 4

atgacgcgta aacaggccac catcgagtg cgtagcgggt taaatgacga cgaacagtat

60

ggttgcggtg tcccaccgat ccatctttcc agcacctata actttaccgg atttaatgaa	120
ccgcgcgcgc atgattactc gcgtcgcggc aacccaacgc gcgatgtggt tcagcgtgcg	180
ctggcagaac tggaaggtgg tgctggtgca gtacttacta ataccggcat gtccgcgatt	240
cacctggtaa cgaccgtctt ttgaaacct ggcgatctgc tggttgcgcc gcacgactgc	300
tacggcggtg gctatgcct gttegacagt ctggcgaaac gcggttgcta tcgctgttg	360
tttgttgatc aaggcgatga acaggcatta cgggcagcgc tggcagaaaa acccaaactg	420
gtactggtag aaagcccaag taatccattg ttacgcgtcg tggatattgc gaaaatctgc	480
catctggcaa gggaagtcgg ggcggtgagc gtggtggata acaccttctt aagcccgga	540
ttacaaaatc cgctggcatt aggtgccgat ctggtgttgc attcatgcac gaaatatctg	600
aacggtcact cagacgtagt ggccggcgtg gtgattgcta aagaccgga cgttgtcact	660
gaactggcct ggtgggcaaa caatattggc gtgacgggcg gcgcgttga cagctatctg	720
ctgctacgtg ggttgcaaac gctggtgccg cgtatggagc tggcgcagcg caacgcgcag	780
gcgattgtga aatacctgca aaccagccg ttggtgaaaa aactgtatca cccgtcgttg	840
ccggaaaatc aggggcatga aattgccgcg cgccagcaaa aaggcttttg cgcaatgttg	900
agttttgaac tggatggcga tgagcagacg ctgcgtcgtt tcctgggcgg gctgtcgttg	960

tttacgctgg cggaatcatt aggggggagtg gaaagtttaa tctctcacgc cgcaaccatg 1020

acacatgcag gcatggcacc agaagcgcggt gctgccgccg ggatctccga gacgctgctg 1080

cgatatctcca ccggtattga agatggcgaa gatttaattg ccgacctgga aaatggcttc 1140

cgggctgcaa acaaggggta a 1161

<210> 5

<211> 310

<212> PRT

<213> E.coli thrB

<400> 5

Met Val Lys Val Tyr Ala Pro Ala Ser Ser Ala Asn Met Ser Val Gly

1 5 10 15

Phe Asp Val Leu Gly Ala Ala Val Thr Pro Val Asp Gly Ala Leu Leu

20 25 30

Gly Asp Val Val Thr Val Glu Ala Ala Glu Thr Phe Ser Leu Asn Asn

35 40 45

Leu Gly Arg Phe Ala Asp Lys Leu Pro Ser Glu Pro Arg Glu Asn Ile

50 55 60

Val Tyr Gln Cys Trp Glu Arg Phe Cys Gln Glu Leu Gly Lys Gln Ile

65 70 75 80

Pro Val Ala Met Thr Leu Glu Lys Asn Met Pro Ile Gly Ser Gly Leu

85 90 95

Gly Ser Ser Ala Cys Ser Val Val Ala Ala Leu Met Ala Met Asn Glu

100 105 110

His Cys Gly Lys Pro Leu Asn Asp Thr Arg Leu Leu Ala Leu Met Gly

115 120 125

Glu Leu Glu Gly Arg Ile Ser Gly Ser Ile His Tyr Asp Asn Val Ala

130 135 140

Pro Cys Phe Leu Gly Gly Met Gln Leu Met Ile Glu Glu Asn Asp Ile

145 150 155 160

Ile Ser Gln Gln Val Pro Gly Phe Asp Glu Trp Leu Trp Val Leu Ala

165 170 175

Tyr Pro Gly Ile Lys Val Ser Thr Ala Glu Ala Arg Ala Ile Leu Pro

180 185 190

Ala Gln Tyr Arg Arg Gln Asp Cys Ile Ala His Gly Arg His Leu Ala

195 200 205

Gly Phe Ile His Ala Cys Tyr Ser Arg Gln Pro Glu Leu Ala Ala Lys

210 215 220

Leu Met Lys Asp Val Ile Ala Glu Pro Tyr Arg Glu Arg Leu Leu Pro

225 230 235 240

Gly Phe Arg Gln Ala Arg Gln Ala Val Ala Glu Ile Gly Ala Val Ala

245

250

255

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Pro Thr Leu Phe Ala Leu Cys Asp Lys

260

265

270

Pro Glu Thr Ala Gln Arg Val Ala Asp Trp Leu Gly Lys Asn Tyr Leu

275

280

285

Gln Asn Gln Glu Gly Phe Val His Ile Cys Arg Leu Asp Thr Ala Gly

290

295

300

Ala Arg Val Leu Glu Asn

305

310

<210> 6

<211> 933

<212> ADN

<213> E,coli thrB

<400> 6

atgggttaaag tttatgcccc ggcttccagt gccaatatga gcgtcgggtt tgatgtgctc 60

ggggcggcgg tgacacctgt tgatggtgca ttgctcggag atgtagtcac ggttgaggcg 120

gcagagacat tcagtctcaa caacctcgga cgctttgccg ataagctgcc gtcagaacca 180

cgggaaaata tcgtttatca gtgctgggag cgtttttgcc aggaactggg taagcaaatt 240

ccagtggcga tgaccctgga aaagaatatg cccgatcggtt cgggcttagg ctccagtgcc 300
 tggttcggtgg tcgcggcgct gatggcgatg aatgaacact gcggcaagcc gcttaatgac 360
 actcgtttgc tggtttgat gggcgagctg gaaggccgta tctccggcag cattcattac 420
 gacaacgtgg caccgtgttt tctcgggtgt atgcagttga tgatcgaaga aaacgacatc 480
 atcagccagc aagtgccagg gtttgatgag tggctgtggg tgctggcgta tccggggatt 540
 aaagtctcga cggcagaagc cagggctatt ttaccggcgc agtatcgccg ccaggattgc 600
 attgcgcacg ggcgacatct ggcaggcttc attcacgcct gctattcccg tcagcctgag 660
 cttgccgcga agctgatgaa agatgttatc gctgaaccct accgtgaacg gttactgcca 720
 ggcttcgggc aggcgcggca ggcggtcgcg gaaatcggcg cggtagcgag cggtatctcc 780
 ggctccggcc cgacctgtt cgctctgtgt gacaagccgg aaaccgcca gcgcgttgcc 840
 gactggttgg gtaagaacta cctgcaaaat caggaagggt ttgttcatat ttgccggctg 900
 gatacggcgg gcgcacgagt actggaaaac taa 933

<210> 7

<211> 309

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> metaA

<400> 7

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg

1 5 10 15

Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu

20 25 30

Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile

35 40 45

Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln

50 55 60

Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr

65 70 75 80

Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln

85 90 95

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu

100 105 110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu

115 120 125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala

130	135	140	
Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg			
145	150	155	160
Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His			
	165	170	175
Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser			
	180	185	190
Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu			
	195	200	205
Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser			
	210	215	220
Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala			
	225	230	235
Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp			
	245	250	255
Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr			
	260	265	270
Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp			
	275	280	285
Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met			

290	295	300	
Asn Pro Thr Leu Asp			
305			
<210>	8		
<211>	933		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	metA		
<400>	8		
atggttaaag tttatgcccc ggcttcagat gccaatatga gcgtcgggtt tgatgtgctc		60	
ggggcggcgg tgacacctgt tgatggtgca ttgctcggag atgtagtcac gggtgaggcg		120	
gcagagacat tcagtctcaa caacctcgga cgctttgccg ataagctgcc gtcagaacca		180	
cgggaaaata tcgtttatca gtgctgggag cgtttttgcc aggaactggg taagcaaatt		240	
ccagtggcga tgaccctgga aaagaatatg ccgacgggtt cgggcttagg ctccagtgcc		300	
tgttcgggtgg tcgcggcgct gatggcgatg aatgaacact gcggcaagcc gcttaatgac		360	
actcgtttgc tggctttgat gggcgagctg gaaggccgta tctccggcag cattcattac		420	

gacaacgtgg caccgtgttt tctcgggtgt atgcagttga tgatcgaaga aaacgacatc 480
 atcagccagc aagtgccagg gtttgatgag tggctgtggg tgctggcgta tccggggatt 540
 aaagtctcga cggcagaagc cagggctatt ttaccggcgc agtatcgccg ccaggattgc 600
 attgcgcacg ggcgacatct ggcaggcttc attcacgcct gctattcccg tcagcctgag 660
 cttgccgcga agctgatgaa agatgttata gctgaaccct accgtgaacg gttactgcca 720
 ggcttcgggc aggcgcggca ggcggtcgcg gaaatcggcg cggtagcgag cggtatctcc 780
 ggctccggcc cgaccttggt cgctctgtgt gacaagccgg aaaccgcccc gcgcgttgcc 840
 gactggttgg gtaagaacta cctgcaaaat caggaaggtt ttgttcatat ttgccggctg 900
 gatacggcgg gcgcacgagt actggaaaac taa 933

<210> 9

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi yjeH

<400> 9

aagctttgat aactctcctt tg 22

<210> 10

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi yjeH

<400> 10

aagcttttatg tggttatgcc at

22

<210> 11

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen yjeH

<400> 11

ggtaccaggt cgactctaga ggatcccc

28

<210> 12

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen yjeH

<400> 12

ggtaccttat gtggttatgc cat

23

<210> 13

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi MetB

<400> 13

ttacccttg tttgcagccc ggaagccatt ttccaggtcg gcaattaaat catatgaata

60

tcctccttag

70

<210> 14

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi MetB

<400> 14

ttactctggg gcctgacatt tcaccgacaa agcccaggga acttcacac gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 15

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi thrB

<400> 15

aaagaatatg ccgatcggtt cgggcttagg ctccagtgcc tgttcggtgg gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 16

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi thrB

<400> 16

agacaaccga catcgctttc aacattggcg accggagccg ggaaggcaaa catatgaata 60

tcctccttag 70

<210> 17

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi metA

<400> 17

aattgatatc atgccgattc gtgtgccgg 29

<210> 18

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi meta

<400> 18

aattaagctt ttaatccagc gttggattca tgtg

34

<210> 19

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gây đột biến gen meta G111E

<400> 19

ttgtaactgg tgcgccgctg gaactggtgg ggtttaatga tgtc

44

<210> 20

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gây đột biến gen meta G111E

<400> 20

gacatcatta aaccccacca gttccagcgg cgcaccagtt acaa

44

<210> 21

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gây đột biến gen metA EH

<400> 21

tgtaactggt gcgccgctgg aacatgtggg gtttaatgat gtcg

44

<210> 22

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gây đột biến gen metA EH

<400> 22

cgacatcatt aaaccccaca tgttccagcg gcgcaccagt taca

44

<210> 23

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi metA EH

<400> 23

aattgatatc atgccgattc gtgtgccgg

29

<210> 24

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi metA EH

<400> 24

aattaagcct gctgaggtac gtttcgg

27

<210> 25

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi metA WT

<400> 25

cagcaggtga ataaatttta ttc

23

<210> 26

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi metA WT

<400> 26

cgcgaaatgga agctgtttcc

20

<210> 27

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi pKD3

<400> 27

tttccgaaac gtacctcagc aggtgtaggc tggagctgct tc

42

<210> 28

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi pKD3

<400> 28

gaataaaatt tattcacctg ctgcatatga atatacctoct tag

43

<210> 29

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi bản sao ppc 2

<400> 29

gccggaattc tgcggatgc gataacttgcg c

31

<210> 30

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi bản sao ppc 2

<400> 30

gaaggagctc agaaaaccct cgcgcaaaag

30

<210> 31

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi bản sao ppc 2

<400> 31

gccggagctc tgtcggatgc gatacttgcg c

31

<210> 32

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi bản sao ppc 2

<400> 32

gaagggtacc agaaaaccct cgcgcaaaag

30

<210> 33

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi bản sao aspC 2

<400> 33

tccgagctca taagcgtagc gcatcaggca

30

<210> 34

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi bản sao aspC 2

<400> 34

tccgagctcg tccacctatg ttgactacat

30

<210> 35

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi bản sao asd 2

<400> 35

ccggaattcc caggagagca ataagca

27

<210> 36

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi bản sao asd 2

<400> 36

ctagtctaga tgctctattt aactcccg

28

<210> 37

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi bản sao asd 2

<400> 37

ctagtctaga ccaggagagc aataagca

28

<210> 38

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi bản sao asd 2

<400> 38

ccggaattct gctctattta actcccg

27

<210> 39

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen khởi đầu icd

<400> 39

cccggggtat tttcagagat tat

23

<210> 40

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen khởi đầu icd

<400> 40

cccgggatcc tccttcgagc gctactggtt

30

<210> 41

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen khởi đầu pro

<400> 41

cccggggatc ctctgtgtgg aattctcgga ca

32

<210> 42

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen khởi đầu pro

<400> 42

cccgggaatt cattaaagag gagaaaggat

30

<210> 43

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen khởi đầu cysk

<400> 43

cccgggagct tccagcctgt ttacgatga

29

<210> 44

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen khởi đầu cysk

<400> 44

cccgggtccc aatttcatac agttaagga

29

<210> 45

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen khởi đầu icd

<400> 45

gaaaaagaaa aaaaattctg gcgatttgtt aggctggagc tgct

44

<210> 46

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen khởi đầu icd

<400> 46

cggcaattca taatctctga aaatacgcca tggccatat gaatatcc

48

<210> 47

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen khởi đầu cysk

<400> 47

gaaaaagaaa aaaaattctg gcgattgtgt aggctggagc tgct

44

<210> 48

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen khởi đầu cysk

<400> 48

gcgggatcat cgtaaacagg ctgccatggt ccatatgaat atcc

44

<210> 49

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen khởi đầu pro

<400> 49

gaaaaagaaa aaaaattctg gcgatttgtt aggctggagc tgct

44

<210> 50

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi gen khởi đầu pro

<400> 50

tggtccgagaa ttccacacag aggatcgcca tgggtccatat gaatatcc

48

<210> 51

<211> 197

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> gen khởi đầu icd

<400> 51

gtatttttcag agattatgaa ttgccgcatt atagcctaataaacgcgcatt tttcatgacg

60

gcaaacaata gggtagtatt gacaagccaa ttacaaatca ttaacaaaaa attgctctaa

120

agcatccgta tcgcaggacg caaacgcata tgcaacgtgg tggcagacga gcaaaccagt

180

agcgctcgaa ggaggat

197

<210> 52

<211> 197

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> gen khởi đầu pro

<400> 52

gtattttcag agattatgaa ttgccgcatt atagcctaataacgcgcattc tttcatgacg 60

gcaaacaata gggtagtatt gacaagccaa ttacaaatca ttaacaaaaa attgctctaa 120

agcatccgta tcgcaggacg caaacgcata tgcaacgtgg tggcagacga gcaaaccagt 180

agcgctcgaa ggaggat 197

<210> 53

<211> 299

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> gen khởi đầu cysk

<400> 53

agcttccagc ctgtttacga tgatcccgct gcttaatctg ttcattcatgc ccgttgccgt 60

ttgtggcgcg acggcgatgt gggtcgattg ctatcgcgat aaacacgcga tgtggcggtta 120

acaatctacc gggtattttg taaaccgttt gtgtgaaaca ggggtggctt atgccgcccc 180

ttattccatc ttgcattgca ttatttcctt tctgtatata gatatgctaa atccttactt 240

ccgcattatc tctgagcggg tatgtacct gttgtatccc aatttcatac agttaagga 299