



(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



1-0033074

(51)⁸ C07K 14/245; C12P 13/06; C12P 13/12; (13) B
C12N 15/70

(21) 1-2017-04998

(22) 03/06/2016

(86) PCT/KR2016/005951 03/06/2016

(87) WO/2016/195439 08/12/2016

(30) 10-2015-0079358 04/06/2015 KR

(45) 25/08/2022 413

(43) 26/04/2018 361A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) BAE, Jee Yeon (KR); SHIM, Ji Hyun (KR); KIM, Hyun Ah (KR); SEO, Juhee (KR); SHIN, Yong Uk (KR); LEE, Jae Hee (KR); KIM, Sang Kyoum (KR); KIM, So Young (KR).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH TIẾT O-AXETYLHOMOSERIN, VI SINH VẬT THUỘC CHI ESCHERICHIA TẠO RA O-AXETYLHOMOSERIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT O-AXETYLHOMOSERIN

(57) Sáng chế đề cập đến protein có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin và protein được cải biến mới của nó, vi sinh vật có khả năng tạo ra O-axetylhomoserin có sự biểu hiện protein được tăng cường và phương pháp sản xuất O-axetylhomoserin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein có hoạt tính tiết *O*-axetylhomoserin và protein cải biến mới của nó, vi sinh vật có khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin có sự biểu hiện protein tăng cường, và phương pháp sản xuất *O*-axetylhomoserin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Methionin có thể được sản xuất bằng cách tổng hợp hóa học hoặc sinh học, được sử dụng như nguyên liệu thô để tổng hợp thuốc tiêm và thuốc uống cũng như để tổng hợp thức ăn và phụ gia thực phẩm. Gần đây, quy trình hai bước để sản xuất L-methionin từ tiền chất L-methionin, được sản xuất bằng quá trình lên men, bởi phản ứng biến đổi enzym được bộc lộ (Công bố đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế quốc tế số WO 2008/013432). Công bố đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế quốc tế số WO 2008/013432 bộc lộ rằng *O*-sucxinylhomoserin và *O*-axetylhomoserin có thể được sử dụng dưới dạng tiền chất methionin trong quy trình hai bước, và đóng vai trò rất quan trọng để sản xuất tiền chất methionin có sản lượng cao để sản xuất methionin ở quy mô lớn có hiệu quả kinh tế.

LeuE đã được biết là protein tiết leuxin. Là một trong số các protein thuộc họ protein đào thải homoserin/homoserin lacton (RhtB) ra khỏi tế bào, LeuE là protein có mặt ở màng trong và đã biết có vai trò tiết leuxin và protein tương tự của nó được cho là protein vận chuyển chưa được xác định đặc tính.

Trong tình trạng kỹ thuật đã biết liên quan đến LeuE, đã biết rằng purin nucleosit hoặc purin nucleotit có thể được sản xuất nhờ tăng cường trình tự axit amin của gen leuE (yeaS) hoặc trình tự axit amin cải biến của nó, và lượng axit amin sinh ra có thể được cải thiện. Ngoài ra, leuE cải biến có hoạt tính tiết xystein đã được biết đến.

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết bởi sáng chế

Các tác giả của sáng chế đã rất nỗ lực để cải tiến tạo ra *O*-axetylhomoserin, và kết quả là, các tác giả sáng chế đã tìm ra protein có hoạt tính tiết *O*-axetylhomoserin và protein cải biến của nó, nhờ đó hoàn thành sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất polypeptit có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* tạo ra O-axetylhomoserin, trong đó bao gồm polypeptit có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin hoặc polypeptit này có biểu hiện quá mức.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất O-axetylhomoserin, bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* tạo ra O-axetylhomoserin trong môi trường; và thu O-axetylhomoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-methionin, bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* tạo ra O-axetylhomoserin trong môi trường; và chuyển hóa O-axetylhomoserin thành L-methionin bằng cách xử lý vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy hoặc O-axetylhomoserin thu được từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy có enzym methyl mercaptan và enzym chuyển hóa methionin.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Vi sinh vật theo sáng chế chứa LeuE cải biến hoặc LeuE, là các protein màng trong, có hoạt tính tăng cường tiết O-axetylhomoserin, và do đó có thể tăng hiệu quả tạo ra O-axetylhomoserin. Do đó, vi sinh vật của sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất hiệu quả O-axetylhomoserin. Ngoài ra, O-axetylhomoserin được sản xuất với hiệu quả cao có thể được sử dụng để sản xuất L-methionin quy mô lớn có hiệu quả kinh tế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để đạt được các mục đích nêu trên, khía cạnh của sáng chế đề xuất polypeptit có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin, trong đó ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm valin ở vị trí 1, phenylalanin ở vị trí 30, leuxin ở vị trí 95, và phenylalanin ở vị trí 165 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thể bởi axit amin khác.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “O-axetylhomoserin”, là nguyên liệu trung gian đặc trưng trong con đường sinh tổng hợp methionin của vi sinh vật, dùng để chỉ axetyl có nguồn gốc từ L-homoserin. Đã biết O-axetylhomoserin được sản xuất bằng cách cho homoserin phản ứng với axetyl-CoA được xúc tác bởi homoserin

axetyltransferaza, và nó có công thức $C_6H_{11}NO_4$.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “peptit có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin” dùng để chỉ polypeptit có chức năng tiết O-axetylhomoserin trong tế bào của vi sinh vật ra bên ngoài của tế bào. Cụ thể, peptit dùng để chỉ protein LeuE có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin và protein cải biến của nó, nhưng peptit không bị giới hạn cụ thể ở đó miễn là nó có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, liên quan đến chất vận chuyển axit amin, thuật ngữ “LeuE”, là protein thuộc họ protein đào thải homoserin/homoserin lacton (RhtB) ra khỏi tế bào, dùng để chỉ sự có mặt của protein ở màng trong, nhưng chức năng chính xác của nó là chưa biết. Về vấn đề này, các tác giả của sáng chế đã lần đầu tiên xác nhận rằng LeuE cụ thể tiết O-axetylhomoserin.

LeuE có thể là protein có nguồn gốc từ từ vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, và cụ thể là LeuE có nguồn gốc từ từ *E. coli*, nhưng phạm vi của sáng chế có thể bao gồm LeuE bất kỳ có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin mà không có giới hạn liên quan đến nguồn gốc vi sinh vật.

Cụ thể, peptit có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin có thể là protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, peptit có thể là protein trong đó có trình tự axit amin có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin gần như giống gần như giống hoặc tương đương với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, trong khi có độ tương đồng ít nhất 70%, cụ thể là ít nhất 80%, và cụ thể hơn là ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Theo cách khác, peptit có thể là trình tự axit amin có độ tương đồng này trong đó sự mất đoạn, cải biến, thay thế, hoặc bổ sung một phần của trình tự axit amin có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin gần như giống hoặc tương đương với sự mất đoạn, cải biến, thay thế, hoặc bổ sung một phần của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, và rõ ràng là peptit này cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “polypeptit cải biến” của polypeptit có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin dùng để chỉ polypeptit có hoạt tính tăng cường tiết O-axetylhomoserin so với hoạt tính tiết O-axetylhomoserin của polypeptit kiểu đại hoặc polypeptit không cải biến. Cụ thể, polypeptit cải biến là peptit có hoạt tính tăng cường tiết O-axetylhomoserin so với hoạt tính của polypeptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 do sự cải biến của ít nhất một axit amin trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Ví dụ, polypeptit cải biến có thể là polypeptit trong đó ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm valin ở vị trí 1, phenylalanin ở vị trí 30, leuxin ở vị trí 95, và phenylalanin ở vị trí 165 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi axit amin khác. Cụ thể, polypeptit cải biến có thể là polypeptit trong đó valin ở vị trí 1 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi methionin; phenylalanin ở vị trí 30 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi một axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, tryptophan, leuxin, valin, glyxin, serin, asparagin, axit aspartic, histidin, isoleuxin, prolin, tyrosin, glutamin, lysin, axit glutamic, xystein, threonin, và arginin; leuxin ở vị trí 95 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi một axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm valin, phenylalanin, alanin, glyxin, threonin, asparagin, axit aspartic, histidin, isoleuxin, serin, prolin, tyrosin, glutamin, lysin, axit glutamic, xystein, tryptophan, và arginin; hoặc phenylalanin ở vị trí 165 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi một axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, tryptophan, leuxin, valin, glyxin, serin, asparagin, axit aspartic, histidin, isoleuxin, prolin, tyrosin, glutamin, lysin, axit glutamic, xystein, threonin, và arginin. Cụ thể hơn, polypeptit cải biến có thể là polypeptit trong đó valin ở vị trí 1 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi methionin; phenylalanin ở vị trí 30 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi một axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, tryptophan, leuxin, valin, glyxin, serin, asparagin, axit aspartic, và histidin; leuxin ở vị trí 95 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi bất kỳ một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm valin, phenylalanin, alanin, glyxin, threonin, asparagin, axit aspartic, và histidin; hoặc phenylalanin ở vị trí 165 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi một axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, tryptophan, leuxin, valin, glyxin, serin, asparagin, axit aspartic, và histidin. Cụ thể hơn nữa, polypeptit cải biến có thể là polypeptit trong đó valin ở vị trí 1 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi methionin; và phenylalanin ở vị trí 30, leuxin ở vị trí 95, và phenylalanin ở vị trí 165 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi axit amin khác. Cụ thể hơn nữa, polypeptit cải biến có thể là polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 2, 133, 134, 137, 138, 141, hoặc 142. Cụ thể, polypeptit cải biến có thể là protein có trình tự axit amin có hoạt tính được tăng cường tiết O-acetylhomoserin gần như giống hoặc tương đương với hoạt tính của trình

tự axit amin của polypeptit cải biến, trong khi có độ tương đồng ít nhất 70%, cụ thể là ít nhất 80%, và cụ thể hơn là ít nhất 90% với các trình tự axit amin nêu trên. Theo cách khác, trong trình tự axit amin có độ tương đồng này và có hoạt tính tăng cường tiết O-axetylhomoserin gần như giống hoặc tương đương với hoạt tính của trình tự axit amin của polypeptit cải biến, trình tự axit amin có thể là một trình tự có sự mất đoạn, cải biến, thay thế, hoặc bổ sung một phần của trình tự axit amin. Polypeptit là ví dụ về polypeptit cải biến của polypeptit có hoạt tính tăng cường tiết O-axetylhomoserin so với hoạt tính của polypeptit kiểu dại hoặc polypeptit cải biến, nhưng polypeptit không giới hạn ở đó. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “trạng thái kiểu dại hoặc trạng thái không cải biến” dùng để chỉ trạng thái trong đó việc đưa vào polypeptit tương ứng hoặc sự đưa vào cải biến hoạt tính theo sáng chế không đạt được.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “độ tương đồng” dùng để chỉ mức độ đồng nhất giữa các nucleotit hoặc các gốc axit amin của hai trình tự axit amin hoặc các trình tự axit nucleic của gen mã hóa protein được xác định sau khi sắp thẳng hàng chúng khớp tối đa với nhau trong vùng so sánh cụ thể. Khi độ tương đồng đủ cao, thì các sản phẩm biểu hiện của gen tương ứng có thể có hoạt tính giống nhau hoặc tương tự. Tỷ lệ phần trăm về tính đồng nhất của trình tự có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình so sánh trình tự đã biết (ví dụ, BLAST (NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlign (ADNSTAR Inc), v.v.).

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin. Theo sáng chế, polypeptit có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin là giống nhau như được giải thích ở trên.

Ví dụ, polynucleotit có thể là một trình tự nucleotit trong đó bộ ba mã hóa mở đầu được thế bởi ATG và có thể là trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 4, 135, 136, 139, 140, 143, hoặc 144 nhưng trình tự nucleotit không giới hạn ở đó. Ngoài ra, liên quan đến polynucleotit, trình tự nucleotit và các trình tự nucleotit cải biến của nó mã hóa trình tự axit amin giống nhau cũng được bao gồm trong sáng chế dựa vào sự thoái hóa bộ ba mã hóa. Ví dụ, trình tự nucleotit có thể được cải biến để có bộ ba mã hóa tối ưu phụ thuộc vào vi sinh vật được sử dụng.

Cụ thể, trình tự nucleotit có thể là một trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin gần như giống hoặc tương đương với hoạt tính của các trình tự nucleotit nêu trên, trong khi có độ tương đồng ít nhất 70%, cụ thể ít nhất là

80%, và cụ thể hơn ít nhất là 90% với các trình tự axit amin nêu trên. Theo cách khác, trình tự nucleotit có thể là trình tự có khả năng lai với đầu dò, mà có thể được tạo ra từ trình tự gen đã biết (ví dụ, trình tự bổ sung cho tất cả hoặc một phần của các trình tự nucleotit nêu trên), trong các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa protein có hoạt tính tiết O-acetylhomoserin. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt” dùng để chỉ điều kiện trong đó lai đặc hiệu được tạo ra trong khi lai không đặc hiệu không được tạo ra. Ví dụ, điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm điều kiện mà trong đó các gen có độ tương đồng cao (ví dụ, 80% hoặc lớn hơn, cụ thể là 90% hoặc lớn hơn, cụ thể hơn nữa là 95% hoặc lớn hơn, thậm chí cụ thể là 97% hoặc lớn hơn, và cụ thể hơn nữa là 99% hoặc lớn hơn) có thể lai với nhau, trong khi các gen có độ tương đồng thấp không thể lai được với nhau; hoặc các điều kiện dùng để lai Southern thông thường (nghĩa là, các điều kiện để rửa giải một lần, và đặc biệt là hai hoặc ba lần dưới nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1× SSC, và 0,1% SDS; đặc biệt dưới 60°C, 0,1× SSC, và 0,1% SDS, và cụ thể hơn dưới 68°C, 0,1× SSC, và 0,1% SDS) (xem Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)). Đầu dò được sử dụng dùng cho việc lai có thể một cách tùy ý là một phần của trình tự nucleotit bổ sung với các trình tự nucleotit nêu trên. Đầu dò này có thể được tạo ra bằng cách PCR sử dụng oligonucleotit được tạo ra dựa vào trình tự đã biết làm đoạn mồi và đoạn gen chứa trình tự nucleotit này làm mẫu. Ví dụ, đầu dò, đoạn gen khoảng 300bp có thể được sử dụng. Cụ thể hơn, khi đoạn gen khoảng 300bp được sử dụng làm đầu dò, các điều kiện 50°C, 2× SSC, và 0,1% SDS được liệt kê là điều kiện rửa giải dùng cho việc lai.

Các gen được sử dụng trong sáng chế, các trình tự protein và các trình tự gen khởi động mà chúng mã hóa có thể thu được từ dữ liệu đã biết (ví dụ, ngân hàng gen của NCBI), nhưng không bị giới hạn ở đó.

Khía cạnh của sáng chế đề cập đến vi sinh vật trong đó bao gồm polypeptit có hoạt tính tiết O-acetylhomoserin hoặc có polypeptit cải biến của nó hoặc có polypeptit này biểu hiện quá mức. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật tạo ra O-acetylhomoserin hoặc polypeptit cải biến của nó, trong đó polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc polypeptit này biểu hiện quá mức.

Polypeptit có hoạt tính tiết O-acetylhomoserin và polypeptit cải biến của nó là tương tự như được giải thích trên đây.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vi sinh vật tạo ra *O*-axetylhomoserin” dùng để chỉ vi sinh vật có khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin bên trong vi sinh vật và tiết nó vào môi trường. Hoạt tính tạo ra *O*-axetylhomoserin có thể được tạo ra hoặc được tăng cường bởi đột biến tự nhiên hoặc đột biến nhân tạo hoặc cải tiến loài. Cụ thể, sáng chế bao gồm các vi sinh vật này tạo ra *O*-axetylhomoserin có thể bất kể nguồn gốc của chúng, miễn là chúng có thể sinh ra *O*-axetylhomoserin. Theo một phương án của sáng chế, vi sinh vật có thể thuộc chi *Escherichia*, và cụ thể hơn, *Escherichia coli*.

Trong khi đó, theo sáng chế, vi sinh vật tạo ra *O*-axetylhomoserin có thể là vi sinh vật cải biến trong đó cải biến đã biết được đưa vào bổ sung liên quan đến các cơ chế liên quan chẳng hạn như các con đường liên quan đến sinh tổng hợp homoserin và các cơ chế liên quan đến việc tiết *O*-axetylhomoserin, v.v. để tăng cường năng suất của *O*-axetylhomoserin ngoài LeuE.

Phương án cụ thể khác của sáng chế có thể đề cập đến vi sinh vật tạo ra *O*-axetylhomoserin trong nó, ngoài ra, hoạt tính của xystathionin synthaza là bất hoạt. Cụ thể, vi sinh vật có thể là vi sinh vật mà trong đó gen mã hóa xystathionin synthaza (*metB*) bị mất đoạn hoặc sự biểu hiện của nó bị yếu đi so với sự biểu hiện của vi sinh vật không cải biến, nhưng không giới hạn ở đó. Trình tự axit amin của gen *metB* có thể thu được từ dữ liệu đã biết và trình tự axit amin bất kỳ có hoạt tính tổng hợp xystathionin có thể được bao gồm mà không giới hạn (ví dụ, 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 được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 6, nhưng không giới hạn ở đó.

Ngoài ra, phương án cụ thể khác nữa của sáng chế có thể đề cập đến vi sinh vật tạo ra *O*-axetylhomoserin trong nó, ngoài ra, hoạt tính của homoserin kinaza là bất hoạt. Cụ thể, vi sinh vật có thể là một vi sinh vật mà trong đó hoạt tính của homoserin kinaza được làm giảm so với hoạt tính nội sinh của nó của vi sinh vật không cải biến hoặc bị loại bỏ. Ví dụ, vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó gen (*thrB*) mã hóa homoserin kinaza được liên kết với vùng gen khởi động yếu hơn so với vùng gen khởi động tự nhiên, hoặc được cải biến hoặc mất đoạn để có hoạt tính yếu, nhưng vùng gen khởi động không giới hạn ở đó. Trình tự axit amin của gen *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 được bao gồm mà không giới hạn (ví dụ, protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7). Protein

có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7 có thể là protein được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 8, nhưng không giới hạn ở đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khử hoạt tính” của protein dùng để chỉ trường hợp trong đó hoạt tính của protein của vi sinh vật được làm giảm so với hoạt tính của enzym có trong vi sinh vật trong protein kiểu dại hoặc protein không cải biến; trường hợp trong đó protein không được biểu hiện tất cả; hoặc trường hợp trong đó protein được biểu hiện nhưng không có hoạt tính. Khử hoạt tính là khái niệm bao gồm trường hợp trong đó hoạt tính của chính enzym được làm giảm hoặc được loại bỏ so với hoạt tính của enzym ban đầu có trong vi sinh vật do cải biến, v.v. của gen mã hóa enzym; trường hợp trong đó toàn bộ mức độ hoạt tính của enzym trong tế bào được làm giảm hoặc bị loại bỏ so với hoạt tính của enzym ban đầu có trong chủng kiểu dại của vi sinh vật do sự ức chế biểu hiện hoặc sự dịch mã của gen mã hóa enzym; trường hợp trong đó một phần hoặc toàn bộ gen bị mất đoạn; và tổ hợp của chúng; nhưng khử hoạt tính không giới hạn ở đó.

Khử hoạt tính của enzym có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ về các phương pháp này có thể bao gồm phương pháp thay thế gen mã hóa enzym trên nhiễm sắc thể với gen được cải biến để làm giảm hoạt tính của enzym, bao gồm trường hợp trong đó hoạt tính của enzym bị loại bỏ; phương pháp đưa cải biến vào trình tự đối chứng biểu hiện của gen mã hóa enzym trên nhiễm sắc thể; phương pháp thay thế trình tự đối chứng biểu hiện của gen mã hóa enzym với trình tự có hoạt tính yếu hoặc không có hoạt tính; phương pháp làm mất đoạn một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa enzym trên nhiễm sắc thể; phương pháp đưa vào oligonucleotit đối nghĩa (ví dụ, ARN đối nghĩa) liên kết bổ sung với bản sao của gen trên nhiễm sắc thể, nhờ đó ức chế sự dịch mã từ mRNA thành enzym; phương pháp kết hợp nhân tạo trình tự bổ sung vào trình tự SD thành trình tự phía trước của trình tự SD của gen mã hóa enzym, tạo ra cấu trúc thứ hai, nhờ đó làm cho ribosom không thể gắn kết trên đó; phương pháp kết hợp vùng gen khởi động với đầu 3' của khung đọc mở (ORF-open reading frame) tạo ra phiên mã ngược (kỹ thuật phiên mã ngược (RTE-reverse transcription engineering)), v.v., và cũng tổ hợp của chúng, nhưng phương pháp không giới hạn cụ thể ở đó.

Phương pháp cải biến trình tự đối chứng biểu hiện có thể được thực hiện bằng cách gây ra cải biến của trình tự đối chứng biểu hiện bởi mất đoạn, chèn đoạn, hoặc thay

thể bảo toàn hoặc không bảo toàn, hoặc sự tổ hợp của chúng trong trình tự axit nucleic của trình tự đối chứng biểu hiện để còn làm yếu hoạt tính của trình tự đối chứng biểu hiện; hoặc bằng cách thay thế bằng nucleic axit có hoạt tính yếu hơn. Trình tự đối chứng biểu hiện có thể bao gồm vùng gen khởi động, trình tự vận hành, trình tự mã hóa vùng liên kết ribosom, và các trình tự đối chứng kết thúc phiên mã và dịch mã, nhưng không giới hạn ở đó.

Hơn nữa, trình tự gen trên nhiễm sắc thể có thể được cải biến bằng cách gây ra cải biến trong trình tự bởi mất đoạn, chèn đoạn, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn, hoặc sự tổ hợp của chúng trong trình tự gen để làm yếu hoạt tính enzym hơn; hoặc bằng cách thay thế bằng trình tự gen được cải tiến để có hoạt tính yếu hơn hoặc trình tự gen được cải tiến để không có hoạt tính, nhưng phương pháp không giới hạn ở đó.

Ngoài ra, phương pháp làm mất đoạn một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa enzym có thể được thực hiện bằng cách thay thế polynucleotit mã hóa protein đích nội sinh nằm trong nhiễm sắc thể có polynucleotit hoặc gen đánh dấu có mất đoạn một phần trong trình tự axit nucleic bằng cách sử dụng vectơ để chèn nhiễm sắc thể nằm trong chủng vi khuẩn. Theo phương án ví dụ của phương pháp làm mất đoạn một phần hoặc toàn bộ gen, phương pháp làm mất đoạn gen bằng tái tổ hợp tương đồng có thể được sử dụng, nhưng phương pháp không giới hạn ở đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “phần” có thể thay đổi tùy thuộc vào loại polynucleotit, và cụ thể nó có thể dùng để chỉ từ 1 đến 300, cụ thể hơn là từ 1 đến 100, và cụ thể hơn nữa là từ 1 đến 50, nhưng không giới hạn cụ thể ở đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tái tổ hợp tương đồng” dùng để chỉ sự tái tổ hợp di truyền xảy ra thông qua trao đổi chéo ở các vị trí của chuỗi di truyền có độ tương đồng lẫn nhau.

Hơn nữa, phương án cụ thể khác nữa của sáng chế có thể đề cập đến vi sinh vật tạo ra *O*-axetylhomoserin trong nó, ngoài ra, hoạt tính của homoserin axetyltransferaza được tăng cường so với hoạt tính của vi sinh vật không cải biến. Cụ thể, vi sinh vật có thể là một loại vi sinh vật mà trong đó hoạt tính của homoserin axetyltransferaza được tăng cường so với hoạt tính vi sinh vật không cải biến, và cụ thể, có thể là một loại vi sinh vật mà trong đó gen *metA* cải biến mã hóa homoserin axetyltransferaza có hoạt tính tăng cường được đưa vào. Gen *metA* cải biến có thể là gen mã hóa một protein trong đó axit amin thứ 111 của homoserin axetyltransferaza được thế bởi axit glutamic và axit

amin thứ 112 của homoserin axetyltransferaza được thế bởi histidin, nhưng không giới hạn ở đó. Gen *metA* cải biến có thể bao gồm mà không giới hạn trình tự axit amin bất kỳ có hoạt tính được tăng cường của homoserin axetyltransferaza so với hoạt tính của kiểu đại của nó, và ví dụ, có thể là protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Các phương án điều chế gen *metA* cải biến và cách sử dụng nó, chúng có hoạt tính được tăng cường của homoserin axetyltransferaza, v.v. được bộc lộ trong Bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc số 10-1335841, và toàn bộ bản mô tả của bằng sáng chế có thể được viện dẫn trong bản mô tả này.

Ngoài ra, phương án cụ thể khác nữa của sáng chế có thể đề cập đến vi sinh vật tạo ra *O*-axetylhomoserin thuộc chi *Escherichia* trong đó, ngoài ra, hoạt tính của aspartat semialdehyt dehydrogenaza, pyridin nucleotit transhydrogenaza, hoặc tổ hợp của chúng được tăng cường so với hoạt tính của vi sinh vật không cải biến.

Ngoài ra, phương án cụ thể khác nữa của sáng chế có thể đề cập đến vi sinh vật tạo ra *O*-axetylhomoserin trong nó, ngoài ra, hoạt tính của phosphoenolpyruvat carboxylaza, aspartat aminotransferaza, hoặc sự tổ hợp của chúng được tăng cường so với hoạt tính của vi sinh vật không cải biến. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “sự tăng cường” dùng để chỉ việc tăng cường mức độ hoạt tính của protein có trong vi sinh vật. Sự tăng cường hoạt tính của protein không bị giới hạn miễn là nó có thể tăng cường hoạt tính của mỗi protein so với hoạt tính của protein kiểu đại hoặc protein không cải biến, như trong sự tăng cường hoạt tính của protein đích. Sự tăng cường có thể được thực hiện bởi phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm i) phương pháp làm tăng số bản sao của polynucleotit mã hóa mỗi protein, ii) phương pháp đưa cải biến vào trình tự đối chứng biểu hiện để làm tăng sự biểu hiện của polynucleotit, iii) phương pháp cải biến trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để tăng cường hoạt tính của mỗi protein, và iv) tổ hợp của chúng. Cụ thể, sự tăng cường có thể được thực hiện bởi phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm phương pháp chèn đoạn polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein thành nhiễm sắc thể, phương pháp đưa polynucleotit vào vi sinh vật sau khi đưa nó vào hệ thống vector, phương pháp đưa vùng gen khởi động có hoạt tính tăng cường vào vùng ngược hướng của trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein hoặc đưa mỗi protein có cải biến trên vùng gen khởi động của nó, phương pháp cải biến trình tự nucleotit trong vùng 5'-UTR, và phương pháp đưa trình tự nucleotit cải biến của trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein, nhưng phương pháp tăng

cường không giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất O-axetylhomoserin bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* tạo ra O-axetylhomoserin trong môi trường.

Cụ thể, phương án nêu trên đề cập đến phương pháp sản xuất O-axetylhomoserin bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* tạo ra O-axetylhomoserin trong môi trường, và thu O-axetylhomoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “nuôi cấy” dùng để chỉ sự sinh trưởng vi sinh vật trong môi trường được điều chỉnh thích hợp. Theo sáng chế, việc xử lý môi trường có thể được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường thích hợp và các điều kiện nuôi cấy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng điều chỉnh việc xử lý môi trường để sử dụng theo chi đã được chọn. Việc nuôi cấy có thể được thực hiện trong quy trình theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy bổ sung cơ chất, v.v. đã biết trong lĩnh vực này, nhưng không giới hạn cụ thể ở đó. Môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác được dùng để nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế có thể không bị giới hạn cụ thể, mà môi trường bất kỳ thường được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* có thể được sử dụng. Cụ thể, vi sinh vật theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong môi trường hiếu khí trong môi trường phổ biến chứa cacbon, nitơ, các nguồn phospho, các hợp chất vô cơ, các axit amin, và/hoặc vitamin thích hợp, v.v. trong khi điều chỉnh nhiệt độ, pH, v.v..

Theo sáng chế, các nguồn cacbon có thể bao gồm các carbohydrat như glucosơ, fructosơ, sucrosơ, maltosơ, manitol, socbitol, v.v.; rượu chẳng hạn như rượu đường, glyxerol, v.v.; axit hữu cơ chẳng hạn như axit pyruvic, axit lactic, axit xitric, v.v.; axit amin chẳng hạn như axit glutamic, methionin, lysin, v.v., nhưng các nguồn cacbon không giới hạn ở đó. Ngoài ra, các thành phần hữu cơ tự nhiên như sản phẩm thủy phân tinh bột, rỉ đường, mật mía, cám gạo, sắn, bã mía, rượu bắp ngô, v.v. có thể được sử dụng. Cụ thể, các carbohydrat như glucosơ và rỉ mật được xử lý sơ bộ khử trùng (tức là, rỉ đường được chuyển hóa thành đường khử) có thể được sử dụng, và ngoài ra, các nguồn cacbon khác với lượng thích hợp có thể được sử dụng mà không bị giới hạn. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với ít nhất hai loại khác.

Các ví dụ về các nguồn nitơ có thể bao gồm các nguồn nitơ vô cơ (ví dụ, amoniac,

amoni sulphat, amoni clorua, amoni axetat, amoni phosphat, amoni carbonat, amoni nitrat, v.v.); axit amin (axit glutamic, methionin, glutamin, v.v.); và các nguồn nitơ hữu cơ (ví dụ, pepton, N-Z amin, chiết xuất từ thịt, chiết xuất từ nấm men, chiết xuất từ lúa mạch, rượu bắp ngô, sản phẩm thủy phân casein, cá hoặc sản phẩm phân hủy của nó, bánh đậu nành khử béo hoặc sản phẩm phân hủy của nó, v.v.). Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với ít nhất hai loại, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Các ví dụ về các nguồn phospho có thể bao gồm monokali phosphat, dikali phosphat, và các muối chứa natri tương ứng của nó. Các ví dụ về các hợp chất vô cơ được sử dụng có thể bao gồm natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sulphat, sắt sulphat, mangan sulphat, canxi carbonat, v.v. Ngoài ra, axit amin, vitamin, và/hoặc các tiền chất thích hợp có thể được bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở đó. Các môi trường hoặc tiền chất này có thể được bổ sung vào quy trình nuôi cấy theo mẻ hoặc quy trình nuôi cấy liên tục để nuôi cấy, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Trong suốt thời kỳ nuôi cấy theo sáng chế, pH của môi trường có thể được điều chỉnh bằng cách bổ sung hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, axit sulfuric, v.v. vào môi trường nuôi cấy theo cách thích hợp. Ngoài ra, trong suốt thời kỳ nuôi cấy, chất chống tạo bọt như polyglycol este của axit béo, có thể được bổ sung để ngăn ngừa sự tạo bọt. Ngoài ra, để duy trì trạng thái hiếu khí của môi trường, thì oxy hoặc khí chứa oxy có thể được phun vào môi trường, trong khi duy trì trạng thái kỵ khí hoặc ít khí của môi trường khí nitơ, hydro, hoặc cacbon đioxit có thể được phun vào mà không phun không khí.

Nhiệt độ môi trường nuôi cấy thông thường có thể nằm trong khoảng từ 27°C đến 37°C, và cụ thể nằm trong khoảng từ 30°C đến 35°C, nhưng nhiệt độ môi trường nuôi cấy không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, việc nuôi cấy có thể được tiếp tục cho đến khi thu được lượng sản xuất (các) nguyên liệu mong muốn, và cụ thể nằm trong khoảng từ 10 giờ đến 100 giờ, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Sự thu hồi *O*-axetylhomoserin có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế. Ví dụ, *O*-axetylhomoserin đích có thể thu được từ môi trường bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, hoặc nuôi cấy bổ sung theo mẻ, v.v.). Ví dụ, các phương pháp như ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi ion, kết tinh, HPLC, v.v. có thể

được sử dụng, và ngoài ra, phương pháp kết hợp của các phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng.

Quy trình thu hồi có thể bao gồm quy trình phân tách và/hoặc quy trình tinh sạch.

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất L-methionin, bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* tạo ra O-axetylhomoserin trong môi trường; và chuyển hóa O-axetylhomoserin thành L-methionin bằng cách xử lý vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy hoặc O-axetylhomoserin thu được từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy có metyl mercaptan và enzym chuyển hóa methionin.

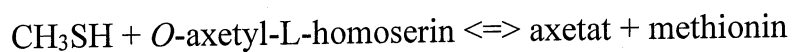
Ví dụ, methionin có thể được sản xuất từ O-axetylhomoserin, được thu hồi từ môi trường nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* tạo ra O-axetylhomoserin trong môi trường, bởi quy trình hai bước (bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc số 10-0905381).

Quy trình hai bước bao gồm quy trình sản xuất L-methionin và axit hữu cơ bởi enzym phản ứng sử dụng enzym có hoạt tính chuyển hóa O-axetylhomoserin thành methionin sử dụng O-axetylhomoserin và metyl mercaptan làm chất nền hoặc chủng chứa enzym.

Enzym chuyển hóa methionin bao gồm tất cả enzym chuyển hóa O-axetylhomoserin thành methionin, và cụ thể là O-axetylhomoserin sulfhydrylaza, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Cụ thể, O-axetylhomoserin sulfhydrylaza được sử dụng có thể là một enzym có nguồn gốc từ các chủng vi khuẩn thuộc chi *Leptospira*, chi *Chromobacterium*, và chi *Hyphomonas*, và cụ thể hơn, một enzym có nguồn gốc từ các chủng vi khuẩn thuộc chi *Leptospira meyeri*, *Pseudomonas aurogenosa*, *Hyphomonas neptunium*, và *Chromobacterium violaceum*.

Phản ứng nêu trên được thể hiện dưới đây:



Quy trình sản xuất methionin bổ sung này được bộc lộ trong bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc số 10-0905381, và toàn bộ nội dung của nó có thể được viện dẫn vào trong bản mô tả này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dựa vào các phương án ví dụ. Tuy nhiên, các phương án ví dụ này được trình bày chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm

mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ tham chiếu 1: Điều chế các chủng vi sinh vật tạo ra O-axetylhomoserin

1-1. Làm mất đoạn gen *metB* trong *E. coli* kiểu dại

Để cung cấp các chủng tạo ra O-axetylhomoserin, *E. coli*, là vi sinh vật đại diện trong số vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, được sử dụng. Với mục đích này, *E. coli K12 W3110* (ATCC 27325), *E. coli* kiểu dại, thu được từ bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC- American Type Culture Collection) và được sử dụng. Chủng có thiếu khuyết trong gen *metB* (SEQ ID NO: 6) mã hóa xystathionin gamma synthaza và gen *thrB* (SEQ ID NO: 8) mã hóa homoserin kinaza trong chủng *E. coli K12 W3110* được chuẩn bị. Chủng được tạo ra này tạo ra O-axetylhomoserin được đặt tên là *W3-BT*. Các phương án liên quan đến sự mất đoạn của gen *metB* và *thrB* được bộc lộ trong bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc số 10-0905381 hoặc công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế quốc tế WO 2008/013432 (cụ thể, xem, các ví dụ 1-1 và 1-2 của bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc số 10-0905381), và toàn bộ nội dung của nó có thể được viện dẫn vào trong bản mô tả này.

1.2 Chuẩn bị chủng được đưa vào có gen *metA* được cải biến có hoạt tính homoserin axetyltransferaza

Để tăng cường hoạt tính của homoserin axetyltransferaza trong chủng thu được trong ví dụ tham chiếu 1-1, các tác giả sáng chế đã nỗ lực để đưa gen *metA* được cải biến (SEQ ID NO: 10) mã hóa homoserin axetyltransferaza có hoạt tính được tăng cường vào chủng. Trong nỗ lực chuẩn bị chủng này, plasmid *pCL_Pcjl_metA* (EH) được tạo ra theo phương pháp được mô tả trong các ví dụ 1 và 3 của bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc số 10-1335841.

Sau đó, để tạo ra cassette thay thế bằng cách thay thế gen *metA* được cải biến được chuẩn bị ở trên bằng cách đưa nó vào chủng, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng vector *pKD3* làm mẫu cùng với các đoạn môi nêu trong SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24. Cụ thể, PCR được thực hiện lặp lại tổng số 30 chu kỳ, trong đó làm biến tính ở nhiệt độ 94°C trong khoảng thời gian 30 giây, ủ ở nhiệt độ 55°C trong khoảng thời gian 30 giây, và duỗi ở nhiệt độ 72°C trong khoảng thời gian 2 phút.

Đối với phần *metA* (EH) của cassette thay thế, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng *pCL-Pcjl-metA* (EH) làm mẫu cùng với các đoạn môi nêu trong SEQ ID NO: 19

và SEQ ID NO: 20, trong khi, đối với phần kiểu đại của *metA*, các đoạn môi nêu trong SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22 được sử dụng, và nhờ đó thu được các sản phẩm PCR tương ứng. Dựa vào 3 sản phẩm PCR, cassette thay thế *metA* (EH) chứa đầu cloramphenicol được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn môi nêu trong SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 22, và được đưa vào vào chủng *W3-BT* bằng cách điện di, được biến nạp với vectơ *pKD46*, được chuẩn bị trong ví dụ tham chiếu 1-1 nêu trên.

Các chủng được xác nhận là đã được đưa vào bởi quy trình nêu trên được biến nạp lần nữa với vectơ *pCP20* và được nuôi cấy trong môi trường LB. Chủng trong đó đầu cloramphenicol bị loại bỏ và gen *metA* được thế bằng *metA* (EH) được đặt tên là *W3-BTA*.

Phương án liên quan đến chủng có hoạt tính tăng cường của homoserin acetyltransferaza, v.v. được bộc lộ trong bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc số 10-1335841 hoặc công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế quốc tế số WO 2012/087039, và toàn bộ nội dung của nó có thể được viện dẫn vào trong bản mô tả này.

1-3. Chuẩn bị chủng chứa 2 bản sao của các gen *ppc*, *aspC*, và *asd*

Để tăng khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin của chủng *W3-BTA* được chuẩn bị trong ví dụ tham chiếu 1-2, kế hoạch tăng cường con đường sinh tổng hợp đã biết được đưa vào. Thực hiện việc chuẩn bị chủng trong đó các gen, được kết hợp với phosphoenolpyruvat carboxylaza tham gia vào quá trình sinh tổng hợp oxaloaxetat từ phosphoenolpyruvat, aspartat aminotransferaza tham gia vào quá trình sinh tổng hợp aspartat từ oxaloaxetat, và aspartat-semialdehyt dehydrogenaza tham gia vào quá trình sinh tổng hợp homoserin từ β -aspartyl phosphat được khuếch đại thành 2 bản sao, nghĩa là, các gen *ppc*, *aspC*, và *asd*, được khuếch đại thành 2 bản sao.

Để chuẩn bị các chủng, các plasmit *pSG-2ppc*, *pSG-2aspC*, và *pSG-2asd* được tạo ra bằng phương pháp được bộc lộ trong các ví dụ từ 1-1 đến 1-3 bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc số 10-1117012, các plasmit nêu trên được đưa vào chủng *W3-BTA*, và chủng trong đó 3 gen khác nhau được khuếch đại tuần tự thành 2 bản sao được tạo ra bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 1-5 bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc. Chủng được tạo ra này được đặt tên là *W3-BTA2PCD* (= *WCJM*).

Một phương án liên quan đến chủng có hoạt tính tăng cường của phosphoenolpyruvat carboxylaza, aspartat aminotransferaza, và aspartat-semialdehyt

dehydrogenaza, v.v., được bộc lộ trong bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc số 10-0905381 hoặc công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế quốc tế số WO 2008/013432, và toàn bộ nội dung của nó có thể được viện dẫn vào trong bản mô tả này.

1-4. Thí nghiệm nuôi cấy trong bình

Để thử nghiệm lượng O-axetylhomoserin tạo ra trong chủng được tạo ra trong các ví dụ tham chiếu 1-2 và 1-3, việc nuôi cấy trong bình Erlenmeyer được thực hiện. Các chủng *W3110*, *W3-BTA*, và *WCJM* được cấy trong môi trường LB và được nuôi cấy ở nhiệt độ 33°C qua đêm. Các cụm đơn lẻ được cấy trong 3mL của môi trường LB và được ủ ở nhiệt độ 33°C trong khoảng thời gian 5 giờ, pha loãng 200 lần trong bình 250mL Erlenmeyer chứa 25mL của môi trường để tạo ra O-axetylhomoserin, và được ủ lại ở nhiệt độ 33°C ở 200 vòng/phút trong khoảng thời gian 30 giờ, và lượng O-axetylhomoserin tạo ra được xác định bằng cách phân tích HPLC. Thành phần môi trường sử dụng được tổng hợp trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Thành phần của môi trường bình tạo ra O-axetylhomoserin

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

Lượng O-axetylhomoserin tạo ra được xác nhận bằng phân tích HPLC sau khi nuôi cấy trong khoảng thời gian 30 giờ sử dụng môi trường nêu trên, và các kết quả được tổng hợp trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Lượng O-axetylhomoserin tạo ra trong môi trường bình nuôi cấy

	OD (562nm)	Lượng tiêu thụ glucozo (g/L)	O-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

Như có thể thấy trong Bảng 2 nêu trên, *O*-axetylhomoserin không được sản xuất ở tất các chủng kiểu đại *W3110*, tuy nhiên, chủng *W3-BTA* đã tạo ra *O*-axetylhomoserin (O-AH) ở nồng độ 0,9 g/L, và chủng *WCJM* có con đường sinh tổng hợp được tăng cường đã tạo ra *O*-axetylhomoserin (O-AH) ở nồng độ 1,2 g/L.

Ví dụ 1: Lựa chọn protein màng làm tăng khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin

Các tác giả của sáng chế đã nỗ lực để ứng dụng *LeuE* (SEQ ID NO: 1) có nguồn gốc từ *Escherichia coli*, được bộc lộ dưới dạng protein màng mà đã không được được bộc lộ liên quan đến hoạt tính tiết *O*-axetylhomoserin và tạo ra *O*-axetylhomoserin, để tạo ra *O*-axetylhomoserin.

Để tăng cường gen *leuE* trong chủng, gen *leuE* được tạo dòng bằng cách sử dụng điểm hạn chế *SmaI* của vector *pCL*.

Trước tiên, để tạo ra gen *leuE*, PCR được thực hiện cho tổng cộng 30 chu kỳ bằng cách sử dụng các đoạn môi nêu trong các SEQ ID NO: 11 và 12, trong đó sự biến tính được thực hiện ở nhiệt độ 94°C trong khoảng thời gian 30 giây, ủ ở nhiệt độ 55°C trong khoảng thời gian 30 giây, và duỗi ở nhiệt độ 68°C trong khoảng thời gian 1 phút. Sản phẩm PCR thu được được điện di trên gel agarose 1,0% và ADN được tinh sạch từ dải 800bp. ADN được tinh sạch được xử lý với enzym ức chế *SmaI* ở nhiệt độ 37°C qua đêm, và sau khi tinh sạch bổ sung, gen *leuE* và vector *pCL* được tạo dòng bằng cách sử dụng T4 ligaza. Sau khi làm biến nạp *E. coli DH5* bằng cách sử dụng plasmit được tạo dòng, thì *E. coli DH5* được biến nạp được chọn trên môi trường đĩa LB chứa spectinomycin (50 µg/mL) để thu được plasmit. Plasmit được tạo ra này được đưa vào các chủng *W3-BTA* và *WCJM*, là các chủng tạo ra *O*-axetylhomoserin. Các chủng này lần lượt được đặt tên là *W3-BTA/pCL-leuE* và *WCJM/pCL-leuE*, và việc đánh giá khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin trong bình của chúng được thực hiện.

Ngoài ra, khi các nhóm đối chứng, vector rỗng *pCL1920* được đưa vào các chủng *W3-BTA* và *WCJM* theo cùng một phương pháp nêu trên, và lần lượt được đặt tên là *W3-*

BTA/pCL1920 và *WCJM/pCL1920*, và việc đánh giá khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin trong bình của chúng được thực hiện.

Cụ thể, mỗi chủng được trải trên môi trường rắn LB và được nuôi cấy qua đêm trong lò ủ nhiệt độ 33°C. Cụm đơn của chủng được nuôi cấy qua đêm trong môi trường đĩa LB được cấy trong 3mL của môi trường LB và được ủ ở nhiệt độ 33°C trong khoảng thời gian 5 giờ, pha loãng 200 lần trong bình Erlenmeyer 250mL chứa 25mL môi trường để tạo ra *O*-axetylhomoserin, và ủ lại lần nữa ở nhiệt độ 33°C ở 200 vòng/phút trong khoảng thời gian 30 giờ, và lượng *O*-axetylhomoserin tạo ra được xác nhận bằng phân tích HPLC. Các kết quả được tổng hợp trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Kết quả đo lượng *O*-axetylhomoserin tạo ra trong môi trường bình nuôi cấy

	OD (562nm)	Lượng tiêu thụ gluco (g/L)	O-AH (g/L)
<i>W3-BTA/pCL1920</i>	9,5	35	0,9
<i>W3-BTA/pCL-leuE</i>	8,2	36	1,0
<i>WCJM/pCL1920</i>	9,6	35	1,2
<i>WCJM/pCL-leuE</i>	8,4	36	1,5

Như có thể thấy trong Bảng 3 nêu trên, chủng *WCJM* được đưa vào với plasmit *leuE* thể hiện OD thấp hơn so với OD của chủng đối chứng được đưa vào với vector rỗng, và chủng *WCJM* cũng thể hiện lượng tiêu thụ glucosơ cao hơn. Tuy nhiên, chủng *WCJM* đã tạo ra *O*-axetylhomoserin ở nồng độ 1,5 g/L, và điều này không thể xác nhận rằng việc tăng lượng *O*-axetylhomoserin tạo ra là do đưa *leuE* kiểu dại vào. Tuy nhiên, các kết quả khả quan về đối chứng OD và sự tăng tốc độ tiêu thụ glucosơ xác nhận hoạt tính tiết tiềm năng của chủng. Theo đó, thí nghiệm được thực hiện để lựa chọn các chủng được cải biến có hoạt tính được tăng cường tiết *O*-axetylhomoserin so với hoạt tính của chủng kiểu dại thông qua mô hình hóa cấu trúc.

Ví dụ 2: Tạo ra plasmit có cải biến của bộ ba mã hóa mở đầu của *leuE* và đánh giá khả năng tạo ra *O*-axetyl homoserin

Bộ ba mã hóa mở đầu của *leuE* đã biết là gtg, mã hóa valin, axit amin. Để xác nhận hiệu quả tăng cường của protein *leuE* bằng cách thay đổi bộ ba mã hóa mở đầu thành atg (tức là, bộ ba mã hóa mã hóa methionin), thí nghiệm thay đổi bộ ba mã hóa mở đầu dựa vào plasmit được chuẩn bị trong ví dụ 1 được thực hiện. Cụ thể, axit amin

thứ nhất trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thể bởi methionin để tăng cường hoạt tính tiết O-axetylhomoserin. Cụ thể hơn, việc cải biến *leuE(ATG)* được tạo ra. Để tạo ra việc cải biến *leuE(ATG)*, các đoạn môi nêu trong SEQ ID NO: 145 và SEQ ID NO: 146 được sử dụng, và gen *leuE(ATG)* cải biến được tạo ra bởi đột biến điểm cụ thể (kit tạo đột biến điểm, Stratagene, USA). Plasmid kiểu đại đã biết được đặt tên là WT, và plasmid thay đổi bộ ba mã hóa mở đầu được đặt tên là *WT_ATG*, và plasmid được tạo ra này được đưa vào chủng *WCJM* và việc đánh giá khả năng tạo ra O-axetylhomoserin trong bình của chúng được thực hiện.

Cụ thể, mỗi chủng được trải trên môi trường rắn LB và được nuôi cấy qua đêm trong lò ủ nhiệt độ 33°C. Chủng được nuôi cấy qua đêm trong môi trường đĩa LB được cấy trong 25mL môi trường chuẩn độ và được ủ ở nhiệt độ 33°C ở 200 vòng/phút trong khoảng thời gian 40 giờ. Các kết quả được tổng hợp trên Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4: Kết quả đo lượng O-axetylhomoserin tạo ra trong môi trường bình nuôi cấy

	OD (562nm)	Lượng tiêu thụ glucozơ (g/L)	O-AH (g/L)
<i>WCJM/pCL-leuE WT</i>	8,4	36	1,5
<i>WCJM/pCL-leuE WT(ATG)</i>	7,6	39	2,6

Như có thể thấy trong Bảng 4 nêu trên, chủng được đưa vào cùng với plasmid *pCL-leuE WT(ATG)* có bộ ba mã hóa mở đầu cải biến thể hiện OD thấp hơn so với OD của chủng kiểu đại nhưng thể hiện lượng tiêu thụ glucozơ cao hơn. Chủng được đưa vào cùng với plasmid *pCL-leuE WT(ATG)* có bộ ba mã hóa mở đầu cải biến tạo ra O-axetylhomoserin ở nồng độ 2,6 g/L, làm tăng khả năng tạo ra bằng 173% so với chủng kiểu đại.

Ví dụ 3: Tạo ra plasmid được cải biến *leuE* và đánh giá khả năng tạo ra O-axetylhomoserin

3-1. Tạo ra plasmid được cải biến *leuE*

Các thí nghiệm để tạo ra mỗi trong số ba polypeptit cải biến được kỳ vọng có hoạt tính tiết cao hơn so với hoạt tính của *leuE* kiểu đại dựa vào hai loại plasmid, tức là, *plasmidpCL-leuE WT* và *pCL-leuE WT(ATG)* được tạo ra trong các ví dụ 1 và 2, được thực hiện. Cụ thể, các vị trí của cải biến *leuE* được chọn thông qua cấu trúc mô hình để tăng cường hoạt tính tiết O-axetylhomoserin, và các vị trí của axit amin ở 30, 95, và 165

trong các trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 1 và 2 lần lượt được thể bởi các axit amin khác nhau.

Cụ thể hơn, các cải biến L95V, F30A, và F165A được tạo ra. Để tạo ra cải biến L95V, các đoạn môi nêu trong các SEQ ID NO: 13 và 14 được sử dụng; đối với cải biến F30A, các đoạn môi nêu trong các SEQ ID NO: 25 và 26 được sử dụng; và đối với cải biến F165A, các đoạn môi nêu trong các SEQ ID NO: 27 và 28 được sử dụng. Các gen *leuE* được cải biến được tạo ra bằng cách sử dụng kit tạo đột biến điểm (Stratagene, USA) cùng với mỗi trong số tập hợp đoạn môi được nêu trên. Dựa vào plasmit *WT* kiểu đại đã biết, plasmit được cải biến *L95V* được đặt tên là *WT_M3*; plasmit được cải biến *F30A* là *WT_M4*, và plasmit được cải biến *F165A* là *WT_M6*, tương ứng. Ngoài ra, dựa vào plasmit có bộ ba mã hóa mở đầu cải biến (tức là là, *WT(ATG)*), plasmit được cải biến *L95V* được đặt tên là *WT(ATG)_M3*, plasmit được cải biến *F30A* là *WT(ATG)_M4*, và plasmit được cải biến *F165A* là *WT(ATG)_M6*, tương ứng. Các plasmit được cải biến được tạo ra này được đưa vào chủng *WCJM* để đánh giá khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin trong bình.

Cụ thể, mỗi chủng được trải trên môi trường đĩa LB và được nuôi cấy trong lò ủ nhiệt độ 33°C qua đêm. Chủng được nuôi cấy qua đêm trong môi trường rắn LB được cấy vào 25mL của môi trường chuẩn độ, và sau đó được nuôi cấy trong lò ủ ở nhiệt độ 33°C ở 200 vòng/phút trong khoảng thời gian 40 giờ. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5: Kết quả đo lượng *O*-axetylhomoserin tạo ra trong môi trường bình nuôi cấy

	OD (562nm)	Lượng tiêu thụ glucozo (g/L)	O-AH (g/L)
<i>WCJM/pCL1920</i>	9,6	35	1,3
<i>WCJM/pCL-leuE WT</i>	8,4	36	1,5
<i>WCJM/pCL-leuE WT_M3</i>	8,2	38	2,3
<i>WCJM/pCL-leuE WT_M4</i>	7,9	38	3,7
<i>WCJM/pCL-leuE WT_M6</i>	8,0	39	4,8
<i>WCJM/pCL-leuEWT(ATG)</i>	7,6	39	2,6
<i>WCJM/pCL-leuE WT(ATG)_M3</i>	7,5	40	3,1
<i>WCJM/pCL-leuE</i>	7,3	39	3,6

<i>WT(ATG)_M4</i>			
<i>WCJM/pCL-leuE</i>	7,5	40	4,9
<i>WT(ATG)_M6</i>			

Như có thể thấy trong Bảng 5, tất cả 3 chủng được đưa vào cùng với plasmit được cải biến *leuE* thể hiện sự giảm OD so với OD của kiểu dại, nhưng tất cả 3 chủng thể hiện lượng tiêu thụ glucosơ nhanh hơn so với lượng tiêu thụ chủng kiểu dại, và cụ thể, chủng *WT(ATG)_M6* được thể hiện để tạo ra *O*-axetylhomoserin ở nồng độ 4,9 g/L, do đó thể hiện khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin cao nhất. Do đó, tất cả 3 chủng được cải biến theo sáng chế được xác nhận rằng có khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin tăng cường. Ngoài ra, khi lượng biểu hiện protein được xác nhận là tăng nhờ cải biến bộ ba mã hóa mở đầu của *leuE*, thì khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin được tăng cường thêm.

3-2. Tạo ra con đường sinh tổng hợp các gen và các plasmit được cải biến

Để tối đa khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin, thì plasmit có khả năng tăng cường con đường sinh tổng hợp homoserin được tạo ra. Để tạo dòng aspartat semialdehyt dehydrogenaza, pyridin nucleotit transhydrogenaza, và *LeuE* kiểu dại và *LeuE* được cải biến vào vector *pCL*, các gen *asd* và *pntAB* được đưa vào vector *pCL* trước tiên.

Trước tiên, để thu được các gen *asd* và *pntAB* g, PCR được thực hiện trong tổng số 30 chu kỳ, trong đó sự biến tính được thực hiện ở nhiệt độ 94°C trong khoảng thời gian 30 giây, ủ ở nhiệt độ 55°C trong khoảng thời gian 30 giây, và duỗi ở nhiệt độ 68°C trong khoảng thời gian 3 phút, bằng cách sử dụng các đoạn mồi nêu trong các SEQ ID NO: 15 và 16 dùng cho gen *asd* và các đoạn mồi nêu trong các SEQ ID NO: 17 và 18 dùng cho gen *pntAB*. Các sản phẩm PCR thu được được điện di trên gel agarosa 1,0% và ADN lần lượt thu được từ các dải có kích thước 1,4kb (*asd*) và 3kb (*pntAB*) được tinh sạch.

Hai gen được tinh sạch được ghép bằng cách sử dụng PCR nối (kỹ thuật trong đó trước tiên các phần chồng phủ của hai gen được ghép mà không cần đoạn mồi bất kỳ và sau đó khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi ở cả hai đầu). Các điều kiện để PCR nối thực hiện PCR nêu trên trong 10 chu kỳ và sau đó thực hiện PCR trong 20 chu kỳ sau khi bổ sung các đoạn mồi nêu trong các SEQ ID NO: 15 và 18. Kết quả là, những đoạn được kết hợp của các gen *asd-pntAB* được tạo ra, và được tinh sạch bằng cách điện di. Các đoạn được tinh sạch và vector *pCL* được xử lý với *SmaI* ở nhiệt độ 37°C qua

đêm, được tinh sạch thêm, và plasmit *pCL-asd-pntAB* được tạo ra bằng cách sử dụng T4 ligaza.

Gen *leuE* được tạo dòng vào plasmit được tạo ra này. Trong tạo dòng, cụ thể, để thu được gen *leuE*, PCR được thực hiện trong tổng số 30 chu kỳ, trong đó thực hiện sự biến tính ở nhiệt độ 94°C trong khoảng thời gian 30 giây, ủ ở nhiệt độ 55°C trong khoảng thời gian 30 giây, và duỗi ở nhiệt độ 68°C trong khoảng thời gian 1 phút, bằng cách sử dụng các đoạn mồi nêu trong các SEQ ID NO: 29 và 30.

Sản phẩm PCR thu được được điện di trên gel agarosa 1,0% và ADN thu được từ 800bp được tinh sạch. ADN được tinh sạch và vectơ *pCL* được xử lý với *KpnI* ở nhiệt độ 37°C qua đêm, được tinh sạch thêm, và gen *leuE* và vectơ *pCL-asd-pntAB* được tạo dòng. Các plasmit được tạo dòng được biến nạp thành *E. coli DH5α*, và *E. coli DH5α* được biến nạp được chọn trong môi trường đĩa LB chứa spectinomycin (50 µg/mL) và các plasmit thu được từ đó. Plasmit được tạo ra này được đưa vào chủng *WCJM*, là chủng tạo ra *O*-axetylhomoserin, và việc đánh giá liên quan đến khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin của nó được thực hiện. Các plasmit được tạo ra này tổng cộng 4 loại gồm kiểu đại và 3 chủng được cải biến được chuẩn bị trong ví dụ 2-1 được sử dụng. 4 loại plasmit được đưa vào chủng *WCJM* bằng cách điện di và việc đánh giá bình nuôi cấy được thực hiện theo cách giống với cách trong ví dụ 3-1. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 6-1 dưới đây.

Bảng 6: Kết quả đo lường *O*-axetylhomoserin sinh ra trong môi trường bình nuôi cấy

	OD (562nm)	Lượng tiêu thụ glucosơ (g/L)	O-AH (g/L)
<i>WCJM/pCL-asd-pntAB</i>	9,8	36	1,8
<i>WCJM/pCL-asd-pntAB-leuE WT</i>	9,5	37	2,0
<i>WCJM/pCL-asd-pntAB-leuE WT_M3</i>	8,2	38	3,0
<i>WCJM/pCL-asd-pntAB-leuE WT_M4</i>	7,5	38	4,2
<i>WCJM/pCL-asd-pntAB-leuE WT_M6</i>	7,8	38	5,9

Như có thể thấy trong Bảng 6 nêu trên, kết quả của việc tăng cường đồng thời con đường sinh tổng hợp và cải biến *leuE*, khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin được cải thiện hơn nữa. Cụ thể, trong trường hợp của chủng trong đó plasmit *pCL-asd-pntAB-*

leuE WT_M6 được đưa vào, OD giảm so với OD của chủng kiểu dại, nhưng chủng thể hiện lượng tiêu thụ glucosơ nhanh hơn và tạo ra *O*-axetylhomoserin ở nồng độ 5,9 g/L, cao nhất trong số các chủng.

Ví dụ 4: Tạo ra cải biến *leuE* bằng cách gây đột biến bão hòa và đánh giá khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin

4-1. Chuẩn bị chủng có cải biến *leuE* bằng cách gây đột biến bão hòa và đánh giá nó

Các cải biến được tạo ra bằng cách gây đột biến bão hòa để tạo ra các loại khác nhau của việc thay thế axit amin của 3 chủng đột biến *leuE*, đã thể hiện khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin cao. Axit amin được thể được tạo ra bằng cách sử dụng 17 loại đột biến *M3*, đột biến *M4*, và đột biến *M6*, lần lượt, sử dụng plasmit được chuẩn bị trong ví dụ 2 làm các mẫu. Các chi tiết được thể hiện trên Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

Plasmit được cải biến	Axit amin được thể	SEQ ID NO của các đoạn môi
<i>M3</i>	L95F	SEQ ID NO: 31, 32
	L95A	SEQ ID NO: 33, 34
	L95G	SEQ ID NO: 35, 36
	L95T	SEQ ID NO: 37, 38
	L95N	SEQ ID NO: 39, 40
	L95D	SEQ ID NO: 41, 42
	L95H	SEQ ID NO: 43, 44
	L95I	SEQ ID NO: 45, 46
	L95S	SEQ ID NO: 47, 48
	L95P	SEQ ID NO: 49, 50
	L95Y	SEQ ID NO: 51, 52
	L95Q	SEQ ID NO: 53, 54
	L95K	SEQ ID NO: 55, 56
	L95E	SEQ ID NO: 57, 58
	L95C	SEQ ID NO: 59, 60
	L95W	SEQ ID NO: 61, 62
	L95R	SEQ ID NO: 63, 64

<i>M4</i>	F30W	SEQ ID NO: 65, 66
	F30L	SEQ ID NO: 67, 68
	F30V	SEQ ID NO: 69, 70
	F30G	SEQ ID NO: 71, 72
	F30S	SEQ ID NO: 73, 74
	F30N	SEQ ID NO: 75, 76
	F30D	SEQ ID NO: 77, 78
	F30H	SEQ ID NO: 79, 80
	F30I	SEQ ID NO: 81, 82
	F30P	SEQ ID NO: 83, 84
	F30Y	SEQ ID NO: 85, 86
	F30Q	SEQ ID NO: 87, 88
	F30K	SEQ ID NO: 89, 90
	F30E	SEQ ID NO: 91, 92
	F30C	SEQ ID NO: 93, 94
	F30T	SEQ ID NO: 95, 96
	F30R	SEQ ID NO: 97, 98
<i>M6</i>	F165W	SEQ ID NO: 99, 100
	F165L	SEQ ID NO: 101, 102
	F165V	SEQ ID NO: 103, 104
	F165G	SEQ ID NO: 105, 106
	F165S	SEQ ID NO: 107, 108
	F165N	SEQ ID NO: 109, 110
	F165D	SEQ ID NO: 111, 112
	F165H	SEQ ID NO: 113, 114
	F165I	SEQ ID NO: 115, 116
	F165P	SEQ ID NO: 117, 118
	F165Y	SEQ ID NO: 119, 120
	F165Q	SEQ ID NO: 121, 122
	F165K	SEQ ID NO: 123, 124
	F165E	SEQ ID NO: 125, 126

	F165C	SEQ ID NO: 127, 128
	F165T	SEQ ID NO: 129, 130
	F165R	SEQ ID NO: 131, 132

Cụ thể, các gen được cải biến *leuE* được tạo ra bằng cách thực hiện kit đột biến điểm (Stratagene, USA) sử dụng các đoạn mồi được thể hiện trong Bảng 7 nêu trên. Plasmid được đưa vào chủng *WCJM* và bình được đánh giá tương tự theo cách như trong ví dụ 3-1. Các kết quả được thể hiện trên Bảng 8 dưới đây.

Bảng 8: Kết quả đo lượng *O*-axetylhomoserin sinh ra trong môi trường bình nuôi cấy

Chủng	Plasmid	Vị trí cải biến	OD (562nm)	Lượng tiêu thụ glucozơ (g/L)	O-AH (g/L)
<i>WCJM</i>	<i>pCL1920</i>		9,6	35	1,3
	<i>pCL-leuE WT</i>		8,4	36	1,5
	<i>pCL-leuE WT_M3</i>	L95V	8,2	38	2,3
	<i>pCL-leuE WT_M4</i>	F30A	7,9	38	3,7
	<i>pCL-leuE WT_M6</i>	F165A	8,0	39	4,8
	Cải biến M3	L95F	8,6	38	2,3
		L95A	8,3	38	2,2
		L95G	9,2	37	2,1
		L95T	9,4	37,5	2,3
		L95N	8,8	38	2,4
		L95D	8,7	36	2,2
		L95H	9,5	35	2,3
		L95I	9,5	37,5	2,2
		L95S	9,3	37	2,5
		L95P	9,2	36	2,5
		L95Y	8,9	35	2,2
		L95Q	9,4	38	3,1
		L95K	9,2	38,5	2,2

		L95E	8,6	37	2,6
		L95C	8,9	37,5	2,4
		L95W	9,9	38	2,1
		L95R	9,3	38	2,3
	Cải biến M4	F30W	7,5	38	3,2
		F30L	7,2	36	3,1
		F30V	7,3	35	2,6
		F30G	8,3	36	3,4
		F30S	7,9	35	3,6
		F30N	8,2	37	3,5
		F30D	8,6	38	3,0
		F30H	8,8	34	2,9
		F30I	8,3	35	3,5
		F30P	8,6	35,5	3,1
		F30Y	7,9	34	2,9
		F30Q	8,6	34	2,8
		F30K	8,8	35	3,1
		F30E	7,6	35,5	2,5
		F30C	7,9	35	2,4
		F30T	8,9	36	3,0
		F30R	8,6	38,5	2,9
	Cải biến M6	F165W	8,2	39	4,2
		F165L	8,3	38	4,5
		F165V	8,4	38	4,1
		F165G	8,0	39	4,6
		F165S	7,9	37	4,7
		F165N	8,8	39	4,7
		F165D	7,8	38	4,5
		F165H	7,9	38	4,5
		F165I	7,8	37	4,1
		F165P	7,7	37,5	4,2

		F165Y	8,2	38	4,6
		F165Q	8,4	38	3,9
		F165K	7,6	39	4,0
		F165E	7,7	36,5	4,2
		F165C	7,6	36,5	4,3
		F165T	8,5	34	3,7
		F165R	8,3	38	3,9

Như có thể thấy trong Bảng 8 nêu trên, có sự khác biệt nhỏ về OD và tốc độ lượng tiêu thụ glucoso trong kết quả đánh giá mỗi chủng được cải biến. Tuy nhiên, tất cả các chủng được cải biến nêu trên được tìm thấy có lượng tăng cường *O*-axetylhomoserin sinh ra so với chủng *WCJM/pCL1920* và *WCJM/pCL-leuE WT* được sử dụng trong nhóm đối chứng.

4-2. Chuẩn bị chủng có cải biến *leuE* được tăng cường trong chủng có lượng *O*-axetylhomoserin sinh ra cao và đánh giá lượng *O*-axetylhomoserin sinh ra của nó

Phương pháp sản xuất chủng có khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin bằng cách sử dụng chủng có khả năng tạo ra threonin thông qua đột biến NTG có nguồn gốc từ *W3110* kiểu đại được bộc lộ (công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế quốc tế số WO 2012/087039). Cụ thể, các chủng được tạo ra này tạo ra lượng *O*-axetylhomoserin cao được gửi đến Trung tâm bảo tồn vi sinh vật Hàn Quốc với số đăng ký *KCCM11146P*.

Thí nghiệm được thực hiện để xác định xem việc đưa chủng chứa gen *leuE* và các chủng được cải biến của nó dựa trên chủng nêu trên có làm tăng khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin hay không.

Cụ thể, chủng chứa gen *leuE* và 3 chủng được cải biến của nó được đưa vào bằng cách điện di. Các chủng được này lần lượt được đặt tên là *KCCM11146P/pCL1920*, *KCCM11146P/pCL-leuE WT*, *KCCM11146P/pCL-leuE M3*, *KCCM11146P/pCL-leuE M4*, và *KCCM11146P/pCL-leuE M6*. Để đo khả năng tạo ra *O*-axetylhomoserin của chủng chứa gen *leuE* và 3 chủng được cải biến của nó, việc đánh giá nuôi cấy trong bình được thực hiện. Cụ thể, môi trường LB được cấy 4 loại của các chủng nêu trên và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 33°C. Sau đó, các cụm đơn được cấy vào 3mL môi trường LB và được nuôi cấy lần nữa ở nhiệt độ 33°C trong khoảng thời gian 5 giờ, pha loãng 200 lần

trong bình Erlenmeyer 250mL chứa 25mL môi trường để tạo ra *O*-axetylhomoserin, và ủ lại lần nữa ở nhiệt độ 33°C ở 200 vòng/phút trong khoảng thời gian 30 giờ, và lượng *O*-axetylhomoserin sinh ra được xác nhận bằng phân tích HPLC. Các kết quả của thí nghiệm trên được tổng hợp trong Bảng 9 dưới đây.

Bảng 9: Kết quả đo lượng *O*-axetylhomoserin sinh ra trong môi trường bình nuôi cấy

	OD (562nm)	Lượng tiêu thụ glucozo (g/L)	O-AH (g/L)
<i>KCCM11146P/pCL1920</i>	18,3	40	14,2
<i>KCCM11146P/pCL-leuE WT</i>	17,9	40	16,3
<i>KCCM11146P/pCL-leuE M3</i>	17,5	40	16,9
<i>KCCM11146P/pCL-leuE M4</i>	16,8	40	19,2
<i>KCCM11146P/pCL-leuE M6</i>	17,2	40	18,8

Như có thể thấy trong Bảng 9 nêu trên, chủng được tạo ra bằng cách chỉ đưa *pCL1920* vào chủng *KCCM11146P* được xác nhận rằng tạo ra 14,2 g/L *O*-axetylhomoserin, và chủng *leuE WT* cũng thể hiện việc tăng lượng *O*-axetylhomoserin sinh ra so với chủng gốc. Ngoài ra, tất cả 3 chủng được cải biến thể hiện sự giảm OD, trong khi chủng *M4* thể hiện lượng *O*-axetylhomoserin sinh ra cao nhất (19,2 g/L). Các chủng *M4* và *M6* thể hiện sự tăng lượng *O*-axetylhomoserin sinh ra.

Các tác giả của sáng chế xác nhận rằng lượng *O*-axetylhomoserin sinh ra tăng trong các chủng “*KCCM11146P/pCL-leuE M3*, *M4*, và *M6*”, là 3 chủng được cải biến của *M3*, *M4*, và *M6* dựa vào chủng *KCCM11146P*. Kết quả là, chúng được đặt tên chủng là “*CA05-4009*”, “*CA05-4010*”, và “*CA05-4011*”, và được gửi đến KCCM vào ngày 15 tháng 12, năm 2014, lần lượt có các số đăng ký *KCCM11645P*, *KCCM11646P*, và *KCCM11647P*.

Ví dụ 5: Lượng L-methionin tạo ra bằng cách sử dụng dung dịch nuôi cấy *O*-axetylhomoserin được tạo ra và transferaza

Thí nghiệm tạo ra L-methionin bằng cách sử dụng dung dịch nuôi cấy *O*-axetylhomoserin thu được trong ví dụ 4 và *O*-axetylhomoserin sulfhydrylaza, là enzym chuyển hóa *O*-axetylhomoserin thành methionin, được thực hiện.

O-Axetylhomoserin sulfhydrylaza, enzym chuyển hóa, được chuẩn bị bởi phương pháp được đề xuất trong ví dụ 1-2 của bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc

số 10-1250651, và lượng L-methionin được tạo ra bởi phản ứng chuyển hóa sử dụng phương pháp đề xuất trong ví dụ 3 bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc số 10-1250651 được đo. Đối với *O*-axetylhomoserin được sử dụng làm chất nền, dung dịch nuôi cấy *KCCM11146P-pCL-leuE M4* (O-AH nồng độ; 19,2 g/L) thu được trong ví dụ 4 theo sáng chế được sử dụng, và nồng độ của L-methionin tạo ra từ đó được thể hiện trong Bảng 10 dưới đây.

Bảng 10

		Thời gian (phút)				
		2	4	6	8	10
MetZ-rsp	Methionin (g/L)	3,21	4,34	4,52	4,78	5,04
	Chuyển hóa (%)	50%	68%	71%	75%	79%

Như có thể thấy trong Bảng 10 nêu trên, *O*-axetylhomoserin được chứa trong dung dịch nuôi cấy chủng *KCCM11146P-pCL-leuE M4* thu được trong ví dụ 4 được xác nhận rằng được chuyển hóa thành methionin ở tốc độ chuyển hóa 79% trong khoảng thời gian 10 phút. Từ kết quả này, methionin được xác nhận rằng có thể được sản xuất thành công bằng cách sử dụng chủng theo sáng chế.

Từ phần mô tả nêu trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể hiểu rằng sáng chế có thể bao gồm các dạng cụ thể khác mà không làm thay đổi các khái niệm kỹ thuật hoặc các đặc điểm cần thiết của sáng chế. Về vấn đề này, các ví dụ mẫu được bộc lộ trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa và không nên hiểu là để giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngược lại, sáng chế nhằm bao hàm không chỉ các phương án ví dụ mà còn các phương án thay thế, các cải biến, các dạng tương đương, và các phương án khác mà nằm trong phạm vi và nội dung của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin, trong đó ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm phenylalanin ở vị trí 30, leuxin ở vị trí 95, và phenylalanin ở vị trí 165 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi axit amin khác.
2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó phenylalanin ở vị trí 30 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi một axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, tryptophan, leuxin, valin, glyxin, serin, asparagin, axit aspartic, và histidin; leuxin ở vị trí 95 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi một axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm valin, phenylalanin, alanin, glyxin, threonin, asparagin, axit aspartic, và histidin; hoặc phenylalanin ở vị trí 165 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi một axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, tryptophan, leuxin, valin, glyxin, serin, asparagin, axit aspartic, và histidin.
3. Polypeptit theo điểm 1, trong đó valin ở vị trí 1 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 còn được thế bởi methionin.
4. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 133, 134, 137, 138, 141, và 142.
5. Polynucleotit mã hóa polypeptit có hoạt tính tiết O-axetylhomoserin, trong đó ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm phenylalanin ở vị trí 30, leuxin ở vị trí 95, và phenylalanin ở vị trí 165 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi axit amin khác.
6. Polynucleotit theo điểm 5, trong đó polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit nucleic nêu trong các SEQ ID NO: 135, 136, 139, 140, 143, và 144.
7. Vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* tạo ra O-axetylhomoserin, trong đó polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc polypeptit cải biến của nó được chứa hoặc biểu hiện quá mức, trong đó, liên quan đến polypeptit cải biến, ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm phenylalanin ở vị trí 30, leuxin ở vị trí 95, và phenylalanin ở vị trí 165 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi axit amin khác.
8. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó, liên quan đến polypeptit cải biến, phenylalanin ở vị trí 30 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi một axit amin

bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, tryptophan, leuxin, valin, glyxin, serin, asparagin, axit aspartic, và histidin; leuxin ở vị trí 95 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi một axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm valin, phenylalanin, alanin, glyxin, threonin, asparagin, axit aspartic, và histidin; hoặc phenylalanin ở vị trí 165 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được thế bởi một axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, tryptophan, leuxin, valin, glyxin, serin, asparagin, axit aspartic, và histidin.

9. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó, liên quan đến polypeptit cải biến, valin ở vị trí 1 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 còn được thế bởi methionin.

10. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* là *Escherichia coli*.

11. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó, ngoài ra, hoạt tính của xystathionin synthaza bị bất hoạt.

12. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó, ngoài ra, hoạt tính của homoserin kinaza bị bất hoạt.

13. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó, ngoài ra, hoạt tính của homoserin axetyltransferaza được tăng cường so với hoạt tính của vi sinh vật không cải biến.

14. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó, ngoài ra, hoạt tính của aspartat semialdehyt dehydrogenaza, pyridin nucleotit transhydrogenaza, hoặc tổ hợp của chúng được tăng cường so với hoạt tính của vi sinh vật không cải biến.

15. Phương pháp sản xuất O-axetylhomoserin, bao gồm các bước:

nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* tạo ra O-axetylhomoserin theo điểm 7 trong môi trường; và

thu O-axetylhomoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

16. Phương pháp sản xuất L-methionin, phương pháp này bao gồm các bước:

nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* tạo ra O-axetylhomoserin theo điểm 7 trong môi trường; và chuyển hóa O-axetylhomoserin thành L-methionin bằng cách xử lý vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy hoặc O-axetylhomoserin thu được từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy có metyl mercaptan và enzym chuyển hóa methionin.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó enzym chuyển hóa methionin là O-axetylhomoserin sulfhydrylaza.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

<120> POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH TIẾT O-AXETYLHOMOSERIN, VI SINH VẬT THUỘC CHI *ESCHERICHIA* TẠO RA O-AXETYLHOMOSERIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT O-AXETYLHOMOSERIN

<130> OPA16042

<150> KR 10-2015-0079358

<151> 2015-06-04

<160> 146

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 212

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Val Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly
1 5 10 15

Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu
20 25 30

Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys
35 40 45

Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly
50 55 60

Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg
65 70 75 80

Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr
85 90 95

Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln
100 105 110

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

Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val
130 135 140

Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu
145 150 155 160

Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala
 165 170 175

Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly
 180 185 190

Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala
 195 200 205

Thr Leu Gln Ser
 210

<210> 2
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể LeuE

<400> 2
 Met Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly
 1 5 10 15

Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu
 20 25 30

Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys
 35 40 45

Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly
 50 55 60

Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg
 65 70 75 80

Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr
 85 90 95

Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln
 100 105 110

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

Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val
 130 135 140

Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu

145	150	155	160
Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala			
	165	170	175
Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly			
	180	185	190
Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala			
	195	200	205
Thr Leu Gln Ser			
210			

<210> 3
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 3
 gtgttcgctg aatacgggggt tctgaattac tggacctatc tggttggggc catttttatt
 60
 gtgttggtgc cagggccaaa taccctgttt gtactcaaaa atagcgtcag tagcggatatg
 120
 aaaggcgggt atcttgcggc ctgcggtgta tttattggcg atgcggtatt gatgtttctg
 180
 gcatgggctg gaggggcgac attaatgaag accaccccgga tattattcaa cattgtacgt
 240
 tatcttgggt cgttttatatt gctctatctg gggagtaaaa ttctttacgc gaccctgaag
 300
 ggtaaaaata gcgaggccaa atccgatgag cccaataacg gtgctatatt taaacgcgcg
 360
 ttaattttga gcctgactaa tccgaaagcc attttgttct atgtgtcggt tttcgtacag
 420
 tttatcgatg ttaatgcccc acatacggga atttcattct ttattctggc ggcgacgctg
 480
 gaactgggtga gtttctgcta ttgagcttc ctgattatat ctggtgcttt tgtcacgcag
 540
 tacatacgta ccaaaaagaa actggctaaa gttggcaact cactgattgg tttgatgttc
 600
 gtgggtttcg ctgcccgact ggcgacgctg caatcctga

639

<210> 4
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể LeuE

<400> 4
 atgttcgctg aatacggggt tctgaattac tggacctatc tggttggggc cattttttatt
 60
 gtgttggtgc cagggccaaa taccctgttt gtactcaaaa atagcgtcag tagcggatatg
 120
 aaaggcgggt atcttgcggc ctgcggtgta tttattggcg atgcggtatt gatgtttctg
 180
 gcatgggctg gaggggcgac attaattaag accaccccgga tattattcaa cattgtacgt
 240
 tatcttggtg cgttttatatt gctctatctg gggagtaaaa ttctttacgc gaccctgaag
 300
 ggtaaaaata gcgaggccaa atccgatgag cccaatacgt gtgctatatt taaacgcgcg
 360
 ttaattttga gcctgactaa tccgaaagcc attttggtct atgtgtcgtt tttcgtacag
 420
 tttatcgaat ttaatgcccc acatacggga atttcattct ttattctggc ggcgacgctg
 480
 gaactgggtga gtttctgcta tttgagcttc ctgattatat ctgggtgcttt tgtcacgcag
 540
 tacatacgtg ccaaaaagaa actggctaaa gttggcaact cactgattgg tttgatgttc
 600
 gtgggtttcg ctgcccgaact ggcgacgctg caatcctga
 639

<210> 5
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 5
 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> 6
 <211> 1161
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 6
 atgacgcgta aacaggccac catcgcagtg cgtagcgggt taaatgacga cgaacagtat
 60
 gggtgcgttg tcccaccgat ccatctttcc agcacctata actttaccgg atttaatgaa
 120
 ccgcgcgcgc atgattactc gcgtcgcggc aaccaacgc gcgatgtggt tcagcgtgcg
 180
 ctggcagaac tggaaggtgg tgctggtgca gtacttacta ataccggcat gtccgcgatt
 240
 cacctggtaa cgaccgtctt tttgaaacct ggcgatctgc tggttgcgcc gcacgactgc
 300
 tacggcggta gctatcgctt gttcgacagt ctggcgaaac gcggttgcta tcgcgtgttg
 360
 tttgttgatc aaggcgatga acaggcatta cgggcagcgc tggcagaaaa acccaaactg

420

gtactggtag aaagcccaag taatccattg ttacgcgtcg tggatattgc gaaaatctgc
480

catctggcaa gggaagtcgg ggcggtgagc gtggtggata acaccttctt aagcccggca
540

ttacaaaatc cgctggcatt aggtgccgat ctggtgttgc attcatgcac gaaatatctg
600

aacggtcact cagacgtagt ggccggcgtg gtgattgcta aagacccgga cgttgtcact
660

gaactggcct ggtgggcaaa caatattggc gtgacgggcg gcgcgtttga cagctatctg
720

ctgctacgtg ggttgcgaaac gctggtgccg cgtatggagc tggcgcagcg caacgcgcag
780

gcgattgtga aatacctgca aaccagccg ttggtgaaaa aactgtatca cccgtcgttg
840

ccggaaaatc aggggcatga aattgccgcg cgccagcaaa aaggctttgg cgcaatgttg
900

agttttgaac tggatggcga tgagcagacg ctgcgtcgtt tcctgggagg gctgtcgttg
960

tttacgctgg cggaatcatt agggggagtg gaaagttaa tctctcacgc cgcaaccatg
1020

acacatgcag gcatggcacc agaagcgcgt gctgccgccg ggatctccga gacgctgctg
1080

cgtatctcca ccggtattga agatggcgaa gatttaattg ccgacctgga aaatggcttc
1140

cgggctgcaa acaaggggta a
1161

<210> 7
<211> 310
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 7
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> 8
 <211> 933
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 8
 atggttaaag tttatgcccc ggcttccagt gccaatatga gcgtcggggt 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 ccgatcgggt cgggcttagg ctccagtgcc
 300
 tgttcgggtg tcgcggcgct gatggcgatg aatgaacact gcggcaagcc gcttaatgac
 360
 actcgtttgc tggctttgat gggcgagctg gaaggccgta tctccggcag cattcattac
 420
 gacaacgtgg caccgtgttt tctcggtggt atgcagttga tgatcgaaga aaacgacatc
 480
 atcagccagc aagtgccagg gtttgatgag tggctgtggg tgctggcgta tccggggatt
 540
 aaagtctcga cggcagaagc cagggctatt ttaccggcgc agtatcgccg ccaggattgc
 600
 attgcgcacg ggcgacatct ggcaggcttc attcacgcct gctattcccc tcagcctgag
 660
 cttgccgcga agctgatgaa agatgttatc gctgaaccct accgtgaacg gttactgcca
 720
 ggcttccggc aggcgcggca ggcggtcgcg gaaatcggcg cggtagcgag cggtatctcc
 780

ggctccggcc cgaccttggt cgctctgtgt gacaagccgg aaaccgcca gcgcgttgcc
840

gactggttgg gtaagaacta cctgcaaaat caggaagggt ttgttcatat ttgccggctg
900

gatacggcgg gcgcacgagt actggaaaac taa
933

<210> 9
<211> 309
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223>
homoserin O-acetyl transferaza

<400> 9
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 Glu His
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
 225 230 235 240
 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> 10
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>
 homoserin O-acetyl transferaza

<400> 10
 atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc
 60
 tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa gggttctgatc
 120

```

cttaacctga  tgccgaagaa  gattgaaact  gaaaatcagt  ttctgcgctt  gctttcaaac
180
tcacctttgc  aggtcgatat  tcagctgttg  cgcatcgatt  cccgtgaatc  gcgcaacacg
240
cccgagagc  atctgaacaa  cttctactgt  aactttgaag  atattcagga  tcagaacttt
300
gacggtttga  ttgtaactgg  tgcgccgctg  gaacatgtgg  agtttaatga  tgtcgcttac
360
tggccgcaga  tcaaacaggt  gctggagtgg  tcgaaagatc  acgtcacctc  gacgctgttt
420
gtctgctggg  cggtacaggc  cgcgctcaat  atcctctacg  gcattcctaa  gcaaactcgc
480
accgaaaaac  tctctggcgt  ttacgagcat  catattctcc  atcctcatgc  gcttctgacg
540
cgtggctttg  atgattcatt  cctggcaccg  cattcgcgct  atgctgactt  tccggcagcg
600
ttgattcgtg  attacaccga  tctggaaatt  ctggcagaga  cggaagaagg  ggatgcatat
660
ctgtttgcca  gtaaagataa  gcgcattgcc  tttgtgacgg  gccatcccga  atatgatgcg
720
caaacgctgg  cgcaggaatt  tttccgcgat  gtggaagccg  gactagaccc  ggatgtaccg
780
tataactatt  tcccgcacaa  tgatccgcaa  aatacaccgc  gagcgagctg  gcgtagtcac
840
ggtaatttac  tgtttaccaa  ctggctcaac  tattacgtct  accagatcac  gccatacgat
900
ctacggcaca  tgaatccaac  gctggattaa
930

```

<210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 11
cccgggtttt cactggagca tgcctga
27

<210> 12
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 12
cccggggcgc tgaaaacggt ttattcc
27

<210> 13
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 13
gctactgacg ctattcgcga gtacaaacag ggtatt
36

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

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 14
cttcagggtc gcgtacacaa ttttactccc cagata
36

<210> 15
<211> 26
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 15

cccgggaact

26

caaattccct

gataat

<210> 16

<211> 38

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 16

agacagttac

38

accgtttaaa

gtaccctgct

ctatttaa

<210> 17

<211> 38

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 17

ttaaataagag

38

cagggtactt

taaacggtgt

aactgtct

<210> 18

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 18

cccgggcggc

26

ctcagcagag

gccgtc

<210> 19
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 19
 aattgatatc
 29

atgccgattc

gtgtgccgg

<210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 20
 aattaagcct
 27

gctgaggtac

gtttcgg

<210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 21
 cagcaggtga
 23

ataaatttta

ttc

<210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 22
cgcgaaatgga
20

agctgtttcc

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

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 23
tttccgaaac gtacctcagc aggtgtaggc tggagctgct tc
42

<210> 24
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 24
gaataaaatt tattcacctg ctgcatatga atatacctcct tag
43

<210> 25
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 25
gggccaaata ccctggcggt actcaaaaat agcgctc
36

<210> 26
<211> 36

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 26			
gacgctat	ttgagtaccg	ccagggtatt	tgccccc
36			

<210> 27
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 27			
aaagccatt	tggtctctgt	gtcgtttttc	gtacag
36			

<210> 28
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 28			
ctgtacgaaa	aacgacacag	agaacaaaat	ggcttt
36			

<210> 29
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 29		
ggtacctttt	cactggagca	tgccctga

27

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

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 30
 ggtaccgcgc tgaaaacggt ttattcc
 27

<210> 31
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 31
 tatctgggga gtaaaatttt ttacgcgacc ctgaag
 36

<210> 32
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 32
 cttcagggtc gcgtaaaaaa ttttactccc cagata
 36

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

<220>

<223> đoạn mồi

<400>	33			
tatctgggga		gtaaaattgc	gtacgcgacc	ctgaag
36				

<210> 34
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	34			
cttcaggggc		gcgtacgcaa	ttttactccc	cagata
36				

<210> 35
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	35			
tatctgggga		gtaaaattgg	ctacgcgacc	ctgaag
36				

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

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	36			
cttcaggggc		gcgtagccaa	ttttactccc	cagata
36				

<210> 37

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

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 37			
tatctgggga	gtaaaattac	ctacgcgacc	ctgaag
36			

<210> 38
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 38			
cttcagggtc	gcgtaggtaa	ttttactccc	cagata
36			

<210> 39
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 39			
tatctgggga	gtaaaattaa	ctacgcgacc	ctgaag
36			

<210> 40
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 40

cttcagggtc
36

gcgtagttaa

ttttactccc

cagata

<210> 41
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 41
tatctgggga
36

gtaaaattga

ttacgcgacc

ctgaag

<210> 42
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 42
cttcagggtc
36

gcgtaatcaa

ttttactccc

cagata

<210> 43
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 43
tatctgggga
36

gtaaaattca

ttacgcgacc

ctgaag

<210> 44
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 44

cttcagggtc

36

gcgtaatgaa

ttttactccc

cagata

<210> 45

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 45

tatctgggga

36

gtaaaattat

ttacgcgacc

ctgaag

<210> 46

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 46

cttcagggtc

36

gcgtaaataa

ttttactccc

cagata

<210> 47

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 47

tatctgggga

36

gtaaaatttc

ttacgcgacc

ctgaag

<210> 48

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 48			
cttcagggtc	gcgtaagaaa	ttttactccc	cagata
36			

<210> 49
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 49			
tatctgggga	gtaaaattcc	gtacgcgacc	ctgaag
36			

<210> 50
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 50			
cttcagggtc	gcgtacggaa	ttttactccc	cagata
36			

<210> 51
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 51

tatctgggga
36

gtaaaattta

ttacgcgacc

ctgaag

<210> 52
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 52
cttcagggtc
36

gcgtaataaa

ttttactccc

cagata

<210> 53
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 53
tatctgggga
36

gtaaaattca

gtacgcgacc

ctgaag

<210> 54
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 54
cttcagggtc
36

gcgtactgaa

ttttactccc

cagata

<210> 55
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 55

tatctgggga

36

gtaaaattaa

atacgcgacc

ctgaag

<210> 56

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 56

cttcagggtc

36

gcgtatttaa

ttttactccc

cagata

<210> 57

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 57

tatctgggga

36

gtaaaattga

atacgcgacc

ctgaag

<210> 58

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 58

cttcagggtc

36

gcgtattcaa

ttttactccc

cagata

<210> 59
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 59			
tatctgggga	gtaaaatttg	ctacgcgacc	ctgaag
36			

<210> 60
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 60			
cttcagggtc	gcgtagcaaa	ttttactccc	cagata
36			

<210> 61
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 61			
tatctgggga	gtaaaatttg	gtacgcgacc	ctgaag
36			

<210> 62
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	62			
cttcagggtc		gcgtaccaaa	ttttactccc	cagata
36				

<210> 63
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	63			
tatctgggga		gtaaaattcg	ttacgcgacc	ctgaag
36				

<210> 64
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	64			
cttcagggtc		gcgtaacgaa	ttttactccc	cagata
36				

<210> 65
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	65			
gggccaaata		ccctgtgggt	actcaaaaat	agcgctc
36				

<210> 66
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 66

gacgctatTT

36

ttgagTaccC

acagggtatt

tgGccc

<210> 67

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 67

ggGccaaata

36

ccctgctggt

actcaaaaat

agcgTc

<210> 68

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 68

gacgctatTT

36

ttgagTaccA

gcagggtatt

tgGccc

<210> 69

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 69

ggGccaaata

36

ccctggTggt

actcaaaaat

agcgTc

<210> 70
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 70			
gacgctat	ttgagtagc	ccagggtatt	tggtccc
36			

<210> 71
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 71			
gggccaata	ccctgggtagc	actcaaaaat	agcgctc
36			

<210> 72
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 72			
gacgctat	ttgagtagc	ccagggtatt	tggtccc
36			

<210> 73
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	73			
gggccaaata		ccctgtctgt	actcaaaaat	agcgtc
36				

<210> 74
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	74			
gagcctattt		ttgagtacag	acagggtatt	tggtccc
36				

<210> 75
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	75			
gggccaaata		ccctgaacgt	actcaaaaat	agcgtc
36				

<210> 76
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	76			
gagcctattt		ttgagtacgt	tcagggtatt	tggtccc
36				

<210> 77
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 77

gggccaata

36

ccctggatgt

actcaaaaat

agcgtc

<210> 78

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 78

gacgctattt

36

ttgagtacat

ccagggtatt

tggccc

<210> 79

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 79

gggccaata

36

ccctgcatgt

actcaaaaat

agcgtc

<210> 80

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 80

gacgctattt

36

ttgagtacat

gcagggtatt

tggccc

<210> 81
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 81			
gggccaaata	ccctgattgt	actcaaaaat	agcgtc
36			

<210> 82
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 82			
gacgctatatt	ttgagtacaa	tcagggtatt	tgccccc
36			

<210> 83
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 83			
gggccaaata	ccctgccggt	actcaaaaat	agcgtc
36			

<210> 84
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 84
gacgctatatt ttgagtaccg gcagggtatt tggccc
36

<210> 85
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 85
gggccaaata ccctgtatgt actcaaaaat agcgctc
36

<210> 86
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 86
gacgctatatt ttgagtacat acagggtatt tggccc
36

<210> 87
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 87
gggccaaata ccctgcaggt actcaaaaat agcgctc
36

<210> 88
<211> 36
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 88

gacgctatatt

36

ttgagttacct

gcagggtatt

tggtccc

<210> 89

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 89

gggccaata

36

ccctgaaagt

actcaaaaat

agcgctc

<210> 90

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 90

gacgctatatt

36

ttgagtactt

tcagggtatt

tggtccc

<210> 91

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 91

gggccaata

36

ccctggaagt

actcaaaaat

agcgctc

<210> 92
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 92			
gacgctatatt	ttgagtactt	ccagggtatt	tgccccc
36			

<210> 93
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 93			
gggccaata	ccctgtgcgt	actcaaaaat	agcgctc
36			

<210> 94
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 94			
gacgctatatt	ttgagtacgc	acagggtatt	tgccccc
36			

<210> 95
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 95

gggccaata

36

ccctgaccgt

actcaaaaat

agcgtc

<210> 96

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 96

gacgctattt

36

ttgagtagcg

tcagggtatt

tggccc

<210> 97

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 97

gggccaata

36

ccctgcgtgt

actcaaaaat

agcgtc

<210> 98

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 98

gacgctattt

36

ttgagtagac

gcagggtatt

tggccc

<210> 99

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 99

acgctggaac

36

tggtgagttg

gtgctatttg

agcttc

<210> 100

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 100

gaagctcaaa

36

tagcaccaac

tcaccagttc

cagcgt

<210> 101

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 101

acgctggaac

36

tggtgagtct

gtgctatttg

agcttc

<210> 102

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 102

gaagctcaaa

36

tagcacagac

tcaccagttc

cagcgt

<210> 103
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 103			
acgctggaac	tggtgagtg	gtgctatttg	agcttc
36			

<210> 104
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 104			
gaagctcaaa	tagcacacac	tcaccagttc	cagcgt
36			

<210> 105
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 105			
acgctggaac	tggtgagtg	ctgctatttg	agcttc
36			

<210> 106
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	106			
gaagctcaaa		tagcagccac	tcaccagttc	cagcgt
36				

<210> 107
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	107			
acgctggaac		tggtgagttc	ttgctatttg	agcttc
36				

<210> 108
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	108			
gaagctcaaa		tagcaagaac	tcaccagttc	cagcgt
36				

<210> 109
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	109			
acgctggaac		tggtgagtaa	ctgctatttg	agcttc
36				

<210> 110
 <211> 36

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 110			
gaagctcaaa	tagcagttac	tcaccagttc	cagcgt
36			

<210> 111
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 111			
acgctggaac	tggtgagtga	ttgctatttg	agcttc
36			

<210> 112
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 112			
gaagctcaaa	tagcaatcac	tcaccagttc	cagcgt
36			

<210> 113
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 113			
acgctggaac	tggtgagtca	ttgctatttg	agcttc

36

<210> 114
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 114			
gaagctcaaa	tagcaatgac	tcaccagttc	cagcgt
36			

<210> 115
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 115			
acgctggaac	tggtgagtat	ttgctatttg	agcttc
36			

<210> 116
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 116			
gaagctcaaa	tagcaaatac	tcaccagttc	cagcgt
36			

<210> 117
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400>	117			
acgctggaac		tggtgagtcc	gtgctatttg	agcttc
36				

<210> 118
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	118			
gaagctcaaa		tagcacggac	tcaccagttc	cagcgt
36				

<210> 119
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	119			
acgctggaac		tggtgagtta	ttgctatttg	agcttc
36				

<210> 120
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400>	120			
gaagctcaaa		tagcaataac	tcaccagttc	cagcgt
36				

<210> 121

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

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 121			
acgctggaac	tggtgagtca	gtgctatttg	agcttc
36			

<210> 122
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 122			
gaagctcaaa	tagcactgac	tcaccagttc	cagcgt
36			

<210> 123
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 123			
acgctggaac	tggtgagtaa	atgctatttg	agcttc
36			

<210> 124
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 124

gaagctcaaa
36

tagcatttac

tcaccagttc

cagcgt

<210> 125
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 125
acgctggaac
36

tggtgagtga

atgctatttg

agcttc

<210> 126
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 126
gaagctcaaa
36

tagcattcac

tcaccagttc

cagcgt

<210> 127
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 127
acgctggaac
36

tggtgagttg

ctgctatttg

agcttc

<210> 128
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 128

gaagctcaaa

36

tagcagcaac

tcaccagttc

cagcgt

<210> 129

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 129

acgctggaac

36

tggtgagtac

ctgctatttg

agcttc

<210> 130

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 130

gaagctcaaa

36

tagcaggtac

tcaccagttc

cagcgt

<210> 131

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 131

acgctggaac

36

tggtgagtcg

ttgctatttg

agcttc

<210> 132
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 132
 gaagctcaaa tagcaacgac tcaccagttc cagcgt
 36

<210> 133
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể LeuE

<400> 133
 Val Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly
 1 5 10 15
 Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu
 20 25 30
 Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys
 35 40 45
 Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly
 50 55 60
 Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Val Tyr
 85 90 95
 Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln
 100 105 110
 Tyr Gly Ala Ile Phe Lys Arg Ala Leu Ile Leu Ser Leu Thr Asn Pro
 115 120 125
 Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val
 130 135 140

Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu
 145 150 155 160

Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala
 165 170 175

Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly
 180 185 190

Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala
 195 200 205

Thr Leu Gln Ser
 210

<210> 134
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể LeuE

<400> 134
 Met Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly
 1 5 10 15

Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu
 20 25 30

Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys
 35 40 45

Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly
 50 55 60

Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg
 65 70 75 80

Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Val Tyr
 85 90 95

Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln
 100 105 110

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

Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val

130 135 140
 Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu
 145 150 155 160
 Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala
 165 170 175
 Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly
 180 185 190
 Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala
 195 200 205
 Thr Leu Gln Ser
 210

<210> 135
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể LeuE

<400> 135
 gtgttcgctg aatacggggt tctgaattac tggacctatc tggttggggc catttttatt
 60
 gtgttggtgc cagggccaaa taccctgttt gtactcaaaa atagcgtcag tagcggtatg
 120
 aaaggcggtt atcttgccgc ctgcggtgta tttattggcg atgcggtatt gatgtttctg
 180
 gcatgggctg gaggggcgac attaattaag accaccccgga tattattcaa cattgtacgt
 240
 tatcttggtg cgttttatatt gctctatctg gggagtaaaa ttgtgtacgc gaccctgaag
 300
 ggtaaaaata gcgaggccaa atccgatgag cccaatacgt gtgctatatt taaacgcgcg
 360
 ttaattttga gcctgactaa tccgaaagcc attttgttct atgtgtcggt tttcgtacag
 420
 tttatcgatg ttaatgcccc acatacggga atttcattct ttattctggc ggcgacgctg

480

gaactggtga gtttctgcta tttgagcttc ctgattatat ctggtgcttt tgtcacgcag
540

tacatacgta ccaaaaagaa actgggctaaa gttggcaact cactgattgg tttgatgttc
600

gtgggtttcg ctgcccgact ggcgacgctg caatcctga
639

<210> 136

<211> 639

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể LeuE

<400> 136

atgttcgctg aatacggggt tctgaattac tggacctatc tggttggggc catttttatt
60

gtgttggtgc cagggccaaa taccctgttt gtactcaaaa atagcgctcag tagcggtatg
120

aaaggcggtt atcttgcggc ctgcggtgta tttattggcg atgcggtatt gatgtttctg
180

gcatgggctg gaggggcgac attaattaag accaccccga tattattcaa cattgtacgt
240

tatcttggtg cgttttatct gctctatctg gggagtaaaa ttgtgtacgc gaccctgaag
300

ggtaaaaata gcgaggccaa atccgatgag cccaatacgt gtgctatctt taaacgcgcg
360

ttaattttga gcctgactaa tccgaaagcc attttgttct atgtgtcgtt tttcgtacag
420

tttatcgatg ttaatgcccc acatacggga atttcattct ttattctggc ggcgacgctg
480

gaactggtga gtttctgcta tttgagcttc ctgattatat ctggtgcttt tgtcacgcag
540

tacatacgta ccaaaaagaa actgggctaaa gttggcaact cactgattgg tttgatgttc
600

gtgggtttcg
639

ctgcccgact

ggcgacgctg

caatcctga

<210> 137
<211> 212
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể LeuE

<400> 137
Val Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly
1 5 10 15
Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Ala Val Leu
20 25 30
Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys
35 40 45
Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly
50 55 60
Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg
65 70 75 80
Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr
85 90 95
Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln
100 105 110
Tyr Gly Ala Ile Phe Lys Arg Ala Leu Ile Leu Ser Leu Thr Asn Pro
115 120 125
Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val
130 135 140
Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu
145 150 155 160
Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala
165 170 175
Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly
180 185 190

Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala
 195 200 205

Thr Leu Gln Ser
 210

<210> 138
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể LeuE

<400> 138
 Met Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly
 1 5 10 15

Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Ala Val Leu
 20 25 30

Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys
 35 40 45

Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly
 50 55 60

Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg
 65 70 75 80

Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr
 85 90 95

Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln
 100 105 110

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

Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val
 130 135 140

Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu
 145 150 155 160

Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala
 165 170 175

Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly

	180		185		190
Asn	Ser	Leu	Ile	Gly	Leu
				Met	Phe
				Val	Gly
					Phe
					Ala
					Ala
					Arg
					Leu
					Ala
	195		200		205
Thr	Leu	Gln	Ser		
	210				

<210> 139
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể LeuE

<400> 139
 gtgttcgctg aatacggggt tctgaattac tggacctatc tggttggggc catttttatt
 60
 gtgttggtgc cagggccaaa taccctggcg gtactcaaaa atagcgtcag tagcggatatg
 120
 aaaggcgggt atcttgcggc ctgcggtgta tttattggcg atgcggtatt gatgtttctg
 180
 gcatgggctg gaggggcgac attaattaag accaccccgga tattattcaa cattgtacgt
 240
 tatcttggtg cgttttattt gctctatctg gggagtaaaa ttctttacgc gaccctgaag
 300
 ggtaaaaata gcgaggccaa atccgatgag cccaatacgt gtgctatttt taaacgcgcg
 360
 ttaattttga gcctgactaa tccgaaagcc attttgttct atgtgtcgtt tttcgtacag
 420
 tttatcgatg ttaatgcccc acatacggga atttcattct ttattctggc ggcgacgctg
 480
 gaactgggtga gtttctgcta tttgagcttc ctgattatat ctgggtgcttt tgtcacgcag
 540
 tacatacgta ccaaaaagaa actgggctaaa gttggcaact cactgattgg tttgatgttc
 600
 gtgggtttcg ctgcccgact ggcgacgctg caatcctga
 639

<210> 140
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể LeuE

<400> 140
 atgttcgctg aatacggggt tctgaattac tggacctatc tggttggggc catttttatt
 60
 gtgttggtgc cagggccaaa taccctggcg gtactcaaaa atagcgtcag tagcggatatg
 120
 aaaggcgggt atcttgccggc ctgcggtgta tttattggcg atgcggtatt gatgtttctg
 180
 gcatgggctg gaggggcgac attaattaag accaccccga tattattcaa cattgtacgt
 240
 tatcttggtg cgttttatatt gctctatctg gggagtaaaa ttctttacgc gaccctgaag
 300
 ggtaaaaata gcgaggccaa atccgatgag cccaatacgt gtgctatttt taaacgcgcg
 360
 ttaattttga gcctgactaa tccgaaagcc attttggtct atgtgtcgtt tttcgtacag
 420
 tttatcgatg ttaatgcccc acatacggga atttcattct ttattctggc ggcgacgctg
 480
 gaactgggtga gtttctgcta tttgagcttc ctgattatat ctgggtgcttt tgtcacgcag
 540
 tacatacgta ccaaaaagaa actggctaaa gttggcaact cactgattgg tttgatgttc
 600
 gtgggtttcg ctgcccgact ggcgacgctg caatcctga
 639

<210> 141
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bién thể LeuE

<400> 141

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

<210> 142

<211> 212

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể LeuE

<400> 142

Met Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly
1 5 10 15

Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu
20 25 30

Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys
35 40 45

Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly
50 55 60

Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg
65 70 75 80

Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr
85 90 95

Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln
100 105 110

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

Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val
130 135 140

Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu
145 150 155 160

Glu Leu Val Ser Ala Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala
165 170 175

Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly
180 185 190

Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala
195 200 205

Thr Leu Gln Ser
210

<210> 143
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể LeuE

<400> 143
 gtgttcgctg aatacggggt tctgaattac tggacctatc tggttggggc catttttatt
 60
 gtgttggtgc cagggccaaa taccctgttt gtactcaaaa atagcgtcag tagcggtatg
 120
 aaaggcggtt atcttgcggc ctgcggtgta tttattggcg atgcggtatt gatgtttctg
 180
 gcatgggctg gagtggcgac attaattaag accaccccga tattattcaa cattgtacgt
 240
 tatcttggtg cgttttattht gctctatctg gggagtaaaa ttctttacgc gacctgaag
 300
 ggtaaaaata gcgaggccaa atccgatgag cccaatacgt gtgctattht taaacgcgcg
 360
 ttaatthtga gcctgactaa tccgaaagcc atthtgttct atgtgtcgtt tttcgtacag
 420
 tttatcgatg ttaatgcccc acatacggga atthtcattct ttattctggc ggcgacgctg
 480
 gaactggtga gtgcgtgcta tttgagcttc ctgattatat ctggtgcttht tgtcacgcag
 540
 tacatacgta ccaaaaagaa actggctaaa gttggcaact cactgattgg tttgatgttc
 600
 gtgggtthtcg ctgcccgaact ggcgacgctg caatcctga
 639

<210> 144
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể LeuE

<400> 144
 atgttcgctg aatacggggt tctgaattac tggacctatc tggttggggc catttttatt
 60
 gtgttggtgc cagggccaaa taccctgttt gtactcaaaa atagcgtcag tagcggatg
 120
 aaaggcggtt atcttgcggc ctgcggtgta tttattggcg atgcggtatt gatgtttctg
 180
 gcatgggctg gagtggcgac attaattaag accaccccga tattattcaa cattgtacgt
 240
 tatcttggtg cgttttatatt gctctatctg gggagtaaaa ttctttacgc gaccctgaag
 300
 ggtaaaaata gcgaggccaa atccgatgag cccaatacgt gtgctatttt taaacgcgcg
 360
 ttaattttga gcctgactaa tccgaaagcc attttgttct atgtgtcgtt tttcgtacag
 420
 tttatcgatg ttaatgcccc acatacggga atttcattct ttattctggc ggcgacgctg
 480
 gaactgggtga gtgcgtgcta tttgagcttc ctgattatat ctgggtgcttt tgtcacgcag
 540
 tacatacgta ccaaaaagaa actggctaaa gttggcaact cactgattgg tttgatgttc
 600
 gtgggtttcg ctgcccgact ggcgacgctg caatcctga
 639

<210> 145
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 145
 ataattaaag aggttaatat gttcgtgaa tacggg

36

<210> 146
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 146
cccgtattca gcgaacatat taacctcttt aattat

36