



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

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

(11)



1-0033299

(51)⁸ C12N 1/21; C12P 13/14

(13) B

(21) 1-2018-01280

(22) 27/03/2018

(30) 2017-073937 03/04/2017 JP

(45) 25/09/2022 414

(43) 25/10/2018 367A

(73) AJINOMOTO CO., INC. (JP)

15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-8315 Japan

(72) Kosuke YOKOTA (JP); Kazuyuki HAYASHI (JP).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-AXIT AMIN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất L-axit amin như axit L-glutamic. Cụ thể hơn, L-axit amin được sản xuất bằng cách nuôi cấy vi khuẩn có khả năng sản xuất L-axit amin, mà được biến đổi sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không hệ enzym phosphotransferaza (Phosphotransferase System - PTS) và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng, trong môi trường chứa fructoza, và thu gom L-axit amin từ môi trường hoặc tế bào của vi khuẩn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất L-axit amin như axit L-glutamic bằng quá trình lên men bằng cách sử dụng vi khuẩn. L-axit amin là hữu dụng trong công nghiệp làm nguyên liệu thô cho gia vị và các ứng dụng khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

L-axit amin được sản xuất trong công nghiệp bằng, ví dụ, quá trình lên men bằng cách sử dụng vi sinh vật như vi khuẩn có khả năng sản xuất L-axit amin (Tài liệu phi sáng chế 1). Do đó các vi sinh vật, ví dụ, các chủng được phân lập từ tự nhiên và chủng đột biến của chúng đã được sử dụng. Ngoài ra, khả năng sản xuất L-axit amin của vi sinh vật có thể được nâng cao bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Ví dụ, đối với phương pháp nâng cao khả năng sản xuất axit L-glutamic của vi khuẩn, phương pháp đã biết là làm tăng hoạt tính phosphoketolaza (Tài liệu sáng chế 1) và tận dụng gen *yggB* đột biến (Tài liệu sáng chế 2).

Vi khuẩn có thể hấp thụ các sacarit khác nhau từ bên ngoài tế bào để tận dụng chúng làm nguồn cacbon. Ví dụ về hệ hấp thụ sacarit của vi khuẩn bao gồm hệ enzym phosphotransferaza (Phosphotransferase System - PTS), mà tham gia vào quá trình phosphoryl hóa sacarit, và không PTS, mà không tham gia vào quá trình phosphoryl hóa sacarit. Ví dụ, vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* có protein FruA, mà là chất mang hấp thụ fructoza PTS, trong khi đó nó không có chất mang hấp thụ fructoza không PTS bất kỳ. Fructoza được hấp thụ vào trong tế bào thông qua protein FruA trong khi đó được phosphoryl hóa thành fructoza-1-phosphat. Trong khi đó, ví dụ về chất mang hấp thụ fructoza không PTS bao gồm protein FucP. Protein FucP còn được gọi là L-fucoza permeaza, mà là chất mang hấp thụ fucoza, trong khi đó nó còn có hoạt tính hấp thụ fructoza (Tài liệu phi sáng chế 2). Fructoza được hấp thụ vào trong tế bào thông qua protein FucP mà không cần phosphoryl hóa. Fructoza có trong tế bào có thể, ví dụ, được phosphoryl hóa thành fructoza-6-phosphat bằng fructokinaza và sau đó được tận dụng (Tài liệu phi sáng chế 3).

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO2006/016705

Tài liệu sáng chế 2: WO2006/070944

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Akashi, K. Et al., Amino Acid Fermentation. Japan Scientific Societies Press, p.195 to 215, 1986.

Tài liệu phi sáng chế 2: Kornberg H, and Lourenco C., A route for fructose utilization by *Escherichia coli* involving the fucose regulon. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 19;103(51):19496-9.

Tài liệu phi sáng chế 3: Caescu CI. Et al., *Bifidobacterium longum* requires a fructokinase (Frk; ATP:D-fructose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.4) for fructose catabolism. J Bacteriol. 2004 Oct;186(19):6515-25.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết

Mục đích của sáng chế là phát triển kỹ thuật để nâng cao khả năng sản xuất L-axit amin của vi khuẩn, và do đó đề xuất phương pháp sản xuất hiệu quả L-axit amin.

Cách thức giải quyết vấn đề

Để đạt được mục đích trên đây, các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu sâu rộng. Nhờ đó, các tác giả đã phát hiện ra rằng khả năng sản xuất L-axit amin của vi khuẩn khi sử dụng fructoza làm nguồn cacbon có thể được nâng cao bằng cách biến đổi vi khuẩn sao cho sự biểu hiện gen mã hóa chất mang hấp thụ fructoza không PTS và gen mã hóa fructokinaza được làm tăng, và đã tạo ra sáng chế.

Do đó, sáng chế đề xuất:

[1] Phương pháp sản xuất L-axit amin, phương pháp này bao gồm bước:

nuôi cấy vi khuẩn có khả năng sản xuất L-axit amin trong môi trường chứa fructoza để tích lũy L-axit amin trong môi trường và/hoặc tế bào của vi khuẩn; và

thu gom L-axit amin từ môi trường và/hoặc tế bào,

trong đó vi khuẩn được biến đổi sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng so với chủng không được biến đổi.

[2] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó chất mang hấp thụ fructoza không PTS protein được mã hóa bằng gen *fucP*.

[3] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó fructokinaza protein được mã hóa bằng gen *frk*.

[4] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó gen *fucP* là gen mã hóa protein được xác định theo mục (a), (b), hoặc (c) được mô tả dưới đây:

(a) protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 27 hoặc 29;

(b) protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 27 hoặc 29, mà còn bao gồm sự thể, sự loại bỏ, sự chèn, và/hoặc sự bổ sung 1 đến 10 gốc axit amin, và có hoạt tính hấp thụ fructoza không PTS;

(c) protein chứa trình tự axit amin có độ tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin SEQ ID NO: 27 hoặc 29, và có hoạt tính hấp thụ fructoza không PTS.

[5] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó gen *frk* là gen mã hóa protein được xác định theo mục (a), (b), hoặc (c) được mô tả dưới đây:

(a) protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 31, 33, hoặc 35;

(b) protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 31, 33, hoặc 35, mà còn bao gồm sự thể, sự loại bỏ, sự chèn, và/hoặc sự bổ sung 1 đến 10 gốc axit amin, và có hoạt tính fructokinaza;

(c) protein chứa trình tự axit amin có độ tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin SEQ ID NO: 31, 33, hoặc 35, và có hoạt tính fructokinaza.

[6] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng bằng cách làm tăng sự biểu hiện gen mã hóa chất mang hấp thụ fructoza không PTS và gen mã hóa fructokinaza.

[7] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó sự biểu hiện của mỗi trong số các gen được làm tăng bằng cách làm tăng số lượng bản sao của mỗi gen và/hoặc biến đổi trình tự kiểm soát sự biểu hiện của mỗi gen.

[8] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó vi khuẩn còn được biến đổi sao cho hoạt tính của phosphoketolaza được làm tăng so với chủng không được biến đổi.

[9] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó phosphoketolaza bao gồm D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và/hoặc fructoza-6-phosphat phosphoketolaza.

[10] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó hoạt tính của phosphoketolaza được làm tăng bằng cách làm tăng sự biểu hiện gen mã hóa phosphoketolaza.

[11] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn coryneform hoặc vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae*.

- [12] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn thuộc chi *Corynebacterium*.
- [13] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó vi khuẩn là *Corynebacterium glutamicum*.
- [14] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn thuộc chi *Pantoea* hoặc *Escherichia*.
- [15] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó vi khuẩn là *Pantoea ananatis* hoặc *Escherichia coli*.
- [16] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó L-axit amin là L-axit amin của họ glutamat.
- [17] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó L-axit amin của họ glutamat bao gồm một hoặc nhiều L-axit amin được chọn từ axit L-glutamic, L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-xitrulin, và L-ornithin.
- [18] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó L-axit amin của họ glutamat là axit L-glutamic.
- [19] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó axit L-glutamic là monoamoni L-glutamat hoặc mononatri L-glutamat.
- [20] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó vi khuẩn còn được biến đổi sao cho hoạt tính của α -ketoglutarat dehydrogenaza và/hoặc succinat dehydrogenaza được làm giảm so với chủng không được biến đổi.
- [21] Phương pháp được mô tả trên đây,
 trong đó vi khuẩn là vi khuẩn coryneform, và
 trong đó vi khuẩn còn được biến đổi để chứa gen *yggB* đột biến.
- [22] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó gen *yggB* đột biến là gen *yggB* có đột biến mà nâng cao khả năng sản xuất axit L-glutamic của vi khuẩn coryneform.
- [23] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó gen *yggB* đột biến là gen *yggB* có đột biến được xác định theo mục (1), (2), hoặc (3) được mô tả dưới đây:
- (1) đột biến trong vùng mã hóa gốc axit amin ở vị trí 419 đến 533 của protein *YggB* kiểu dại,
- (2) đột biến trong vùng mã hóa vùng xuyên màng của protein *YggB* kiểu dại,
- và

(3) dạng kết hợp của chúng.

[24] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó protein *YggB* kiểu đại là protein được xác định theo mục (a), (b), hoặc (c) được mô tả dưới đây:

(a) protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 10;

(b) protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, mà còn bao gồm sự thể, sự loại bỏ, sự chèn, và/hoặc sự bổ sung 1 đến 10 gốc axit amin, và có đặc tính mà sự biểu hiện được làm tăng của chúng trong vi khuẩn coryneform tạo ra khả năng sản xuất axit L-glutamic được nâng cao của vi khuẩn coryneform;

(c) protein chứa trình tự axit amin có độ tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, và có đặc tính mà sự biểu hiện được làm tăng của chúng trong vi khuẩn coryneform tạo ra khả năng sản xuất axit L-glutamic được nâng cao của vi khuẩn coryneform.

[25] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó môi trường còn bao gồm nguồn cacbon khác với fructoza.

[26] Phương pháp được mô tả trên đây, trong đó nguồn cacbon là glucoza.

Theo sáng chế, khả năng sản xuất L-axit amin của vi khuẩn khi sử dụng fructoza làm nguồn cacbon có thể được nâng cao, và L-axit amin có thể được sản xuất một cách hiệu quả.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện kết quả của việc nuôi cấy sản xuất axit glutamic trong môi trường chứa fructoza làm nguồn cacbon bằng cách sử dụng chủng *C. Glutamicum* có sự biểu hiện được nâng cao của gen *fucP-frk*.

Fig.2 là biểu đồ thể hiện kết quả của việc nuôi cấy sản xuất axit glutamic trong môi trường bao gồm glucoza và fructoza làm nguồn cacbon bằng cách sử dụng chủng *C. Glutamicum* có sự biểu hiện được nâng cao của gen *fucP-frk*.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất L-axit amin bao gồm bước nuôi cấy vi khuẩn có khả năng sản xuất L-axit amin trong môi trường chứa fructoza để tích lũy L-axit amin trong môi trường và/hoặc tế bào của vi khuẩn, và thu gom L-axit amin từ môi trường và/hoặc tế bào của vi khuẩn, trong đó vi khuẩn được biến đổi sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của

fructokinaza được làm tăng. Vi khuẩn được sử dụng trong phương pháp này còn được gọi là "vi khuẩn của sáng chế".

<1> Vi khuẩn của sáng chế

Vi khuẩn của sáng chế vi khuẩn có khả năng sản xuất L-axit amin, mà được biến đổi sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng.

<1-1> Vi khuẩn có khả năng sản xuất L-axit amin

Theo sáng chế, thuật ngữ "vi khuẩn có khả năng sản xuất L-axit amin" đề cập đến vi khuẩn có khả năng tạo ra và tích lũy L-axit amin đích trong môi trường và/hoặc tế bào của vi khuẩn với lượng mà L-axit amin có thể được thu gom, khi vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường, như môi trường chứa fructoza. Vi khuẩn có khả năng sản xuất L-axit amin có thể là vi khuẩn mà có thể tích lũy L-axit amin đích trong môi trường và/hoặc tế bào của vi khuẩn với lượng lớn hơn mà có thể thu được với chủng không được biến đổi. Thuật ngữ "chủng không được biến đổi" đề cập đến chủng đối chứng mà không được biến đổi sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc hoạt tính của fructokinaza được làm tăng. Cụ thể là, ví dụ về chủng không được biến đổi bao gồm chủng kiểu dại và chủng gốc. Vi khuẩn có khả năng sản xuất L-axit amin có thể là vi khuẩn mà có thể tích lũy L-axit amin đích trong môi trường với lượng tốt hơn là 0,5 g/L hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 1,0 g/L hoặc nhiều hơn.

Ví dụ về L-axit amin bao gồm axit amin bazơ như L-lysin, L-ornithin, L-arginin, L-histidin, và L-xitrulin; axit amin béo như L-isoleuxin, L-alanin, L-valin, L-leuxin, và glyxin; axit amin mà là axit hydroxy-monoaminocarboxylic như L-threonin và L-serin; axit amin vòng như L-prolin; axit amin thơm như L-phenylalanin, L-tyrosin, và L-tryptophan; axit amin chứa lưu huỳnh như L-xystein, L-xystin, và L-metionin; axit amin có tính axit như axit L-glutamic và axit L-aspartic; và axit amin có nhóm amit trong mạch nhánh như L-glutamin và L-asparagin. Ví dụ cụ thể về L-axit amin bao gồm L-axit amin của họ glutamat. Thuật ngữ "L-axit amin của họ glutamat" nói chung đề cập đến axit L-glutamic và L-axit amin mà được sinh tổng hợp thông qua axit L-glutamic làm chất trung gian. Ví dụ về L-axit amin mà được sinh tổng hợp thông qua axit L-glutamic làm chất trung gian bao gồm L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-xitrulin, và L-ornithin. Vi khuẩn của sáng chế có thể có khả năng sản xuất một loại của L-axit amin, hoặc hai hoặc nhiều hơn các loại của L-axit amin.

Theo sáng chế, thuật ngữ "axit amin" đề cập đến L-axit amin, trừ khi được chỉ

ra theo cách cụ thể khác. Theo sáng chế, thuật ngữ "L-axit amin" đề cập đến L-axit amin ở dạng tự do, muối của chúng, hoặc hỗn hợp của chúng, trừ khi được chỉ ra theo cách cụ thể khác. Ví dụ về muối sẽ được mô tả sau đây.

Ví dụ về vi khuẩn bao gồm vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* và vi khuẩn coryneform.

Ví dụ về vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* bao gồm vi khuẩn thuộc chi *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Photobacterium*, *Providencia*, *Salmonella*, *Morganella*, hoặc vi khuẩn tương tự khác. Cụ thể hơn, vi khuẩn được phân loại thành họ *Enterobacteriaceae* theo nguyên tắc phân loại được sử dụng trong cơ sở dữ liệu Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia của Mỹ (National Center for Biotechnology Information - NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>) có thể được sử dụng.

Vi khuẩn *Escherichia* không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về chúng bao gồm các vi khuẩn được phân loại thành chi *Escherichia* theo nguyên tắc phân loại đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực về vi trùng học. Ví dụ về *Escherichia* vi khuẩn bao gồm, ví dụ, các vi khuẩn được mô tả trong công trình của Neidhardt và các cộng sự (Backmann B.J., 1996, Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, pp.2460-2488, Table 1, In F.D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology/Second Edition, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.). Ví dụ về vi khuẩn *Escherichia* bao gồm, ví dụ, *Escherichia coli*. Ví dụ cụ thể về *Escherichia coli* bao gồm, ví dụ, chủng *Escherichia coli* K-12 như chủng W3110 (ATCC 27325) và chủng MG1655 (ATCC 47076); chủng *Escherichia coli* K5 (ATCC 23506); chủng *Escherichia coli* B như chủng BL21 (DE3); và chủng biến đổi của chúng.

Vi khuẩn *Enterobacter* không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ bao gồm các vi khuẩn được phân loại thành chi *Enterobacter* theo nguyên tắc phân loại đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực về vi trùng học. Ví dụ vi khuẩn *Enterobacter* bao gồm, ví dụ, *Enterobacter agglomerans* và *Enterobacter aerogenes*. Ví dụ cụ thể về *Enterobacter agglomerans* bao gồm, ví dụ, chủng *Enterobacter agglomerans* ATCC 12287. Ví dụ cụ thể về *Enterobacter aerogenes* bao gồm, ví dụ, chủng *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, chủng NBRC 12010 (Biotechnol. Bioeng., 2007, Mar. 27;98(2):340-348), và chủng AJ110637 (FERM BP-10955). Ví dụ vi khuẩn *Enterobacter* còn bao gồm, ví dụ, chủng được mô tả trong Công bố đơn châu Âu (EP-A) số 0952221. Ngoài ra, *Enterobacter agglomerans* còn bao gồm một số chủng được

phân loại thành *Pantoea agglomerans*.

Vi khuẩn *Pantoea* không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ bao gồm các vi khuẩn được phân loại thành chi *Pantoea* theo nguyên tắc phân loại đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực về vi trùng học. Ví dụ vi khuẩn *Pantoea* bao gồm, ví dụ, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*, *Pantoea agglomerans*, và *Pantoea citrea*. Ví dụ cụ thể về *Pantoea ananatis* bao gồm, ví dụ, chủng *Pantoea ananatis* LMG20103, chủng AJ13355 (FERM BP-6614), chủng AJ13356 (FERM BP-6615), chủng AJ13601 (FERM BP-7207), chủng SC17 (FERM BP-11091), chủng SC17(0) (VKPM B-9246), và chủng SC17sucA (FERM BP-8646). Một số vi khuẩn *Enterobacter* và vi khuẩn *Erwinia* được phân loại lại thành chi *Pantoea* (Int. J. Syst. Bacteriol., 39, 337-345 (1989); Int. J. Syst. Bacteriol., 43, 162-173 (1993)). Ví dụ, gần đây một số chủng của *Enterobacter agglomerans* được phân loại lại thành *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*, hoặc chủng tương tự khác trên cơ sở của việc phân tích trình tự nucleotit của đoạn gen 16S rARN v.v. (Int. J. Syst. Bacteriol., 39, 337-345 (1989)). Theo sáng chế, vi khuẩn *Pantoea* bao gồm các vi khuẩn được phân loại lại thành chi *Pantoea* như được mô tả trên đây.

Ví dụ về vi khuẩn *Erwinia* bao gồm *Erwinia amylovora* và *Erwinia carotovora*. Ví dụ về vi khuẩn *Klebsiella* bao gồm *Klebsiella planticola*.

Ví dụ về vi khuẩn coryneform bao gồm vi khuẩn thuộc chi *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, hoặc vi khuẩn tương tự khác.

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform bao gồm loài sau đây.

Corynebacterium acetoaxitophilum

Corynebacterium acetoglutamicum

Corynebacterium alkanolyticum

Corynebacterium callunae

Corynebacterium crenatum

Corynebacterium glutamicum

Corynebacterium lilium

Corynebacterium melassecola

Corynebacterium thermoaminogen (*Corynebacterium efficiens*)

Corynebacterium herculis

Brevibacterium divaricatum (*Corynebacterium glutamicum*)

Brevibacterium flavum (*Corynebacterium glutamicum*)

Brevibacterium immariophilum

Brevibacterium lactofermentum (*Corynebacterium glutamicum*)

Brevibacterium roseum

Brevibacterium saccharolyticum

Brevibacterium thiogenitalis

Corynebacterium ammoniagen (*Corynebacterium stationis*)

Brevibacterium album

Brevibacterium cerinum

Microbacterium ammoniaphilum

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform bao gồm chủng sau đây.

Corynebacterium acetoaxitophilum ATCC 13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium crenatum AS1,542

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060, ATCC 13869, FERM BP-734

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

Corynebacterium efficiens (*Corynebacterium thermoaminogen*) AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Brevibacterium divaricatum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 14020

Brevibacterium flavum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13826, ATCC 14067, AJ12418 (FERM BP-2205)

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

Brevibacterium lactofermentum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13869

Brevibacterium roseum ATCC 13825

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240

Corynebacterium ammoniagen (*Corynebacterium stationis*) ATCC 6871, ATCC 6872

Brevibacterium album ATCC 15111

Brevibacterium cerinum ATCC 15112

Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354

Vi khuẩn *Corynebacterium* bao gồm vi khuẩn mà đã được phân loại thành chi *Brevibacterium*, nhưng hiện nay được kết hợp vào trong chi *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1991)). Ngoài ra, *Corynebacterium stationis* bao gồm vi khuẩn mà đã được phân loại thành *Corynebacterium ammoniagen*, nhưng hiện nay được phân loại lại thành *Corynebacterium stationis* trên cơ sở của việc phân tích trình tự nucleotit của đoạn gen 16S rARN v.v. (Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 874-879 (2010)).

Các chủng này có sẵn từ, ví dụ, American Type Culture Collection (Địa chỉ: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America). Cụ thể là, số đăng ký đã được xác định cho chủng tương ứng, và chủng này có thể được thu mua bằng cách sử dụng số đăng ký này (xem, <http://www.atcc.org/>). Số đăng ký của chủng được liệt kê trong danh mục của American Type Culture Collection. Các chủng này có thể còn thu được từ, ví dụ, cơ quan lưu trữ trong đó chủng này được lưu trữ.

Vi khuẩn theo sáng chế có thể là vi khuẩn tự có khả năng sản xuất L-axit amin, hoặc có thể là vi khuẩn được biến đổi sao cho nó có khả năng sản xuất L-axit amin. Vi khuẩn có khả năng sản xuất L-axit amin có thể thu được bằng cách tạo ra khả năng sản xuất L-axit amin cho vi khuẩn này như được mô tả trên đây, hoặc bằng cách làm tăng khả năng sản xuất L-axit amin của vi khuẩn này như được mô tả trên đây.

Để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-axit amin, phương pháp thường được sử dụng trong việc nhân giống chủng sản xuất axit amin của vi khuẩn coryneform, vi khuẩn *Escherichia*, và các chủng tương tự khác (xem, "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center (Ltd.), 1st Edition, pp.77-100, được công bố ngày 30, tháng năm, năm 1986) có thể được sử dụng. Ví dụ về phương pháp này bao gồm bước, ví dụ, tạo ra chủng đột biến dinh dưỡng thụ động, tạo ra chủng kháng đối với chất tương tự L-axit amin, tạo ra chủng đột biến điều hòa chuyển hóa, và tạo cấu trúc chủng tái tổ hợp trong đó hoạt tính của enzym sinh tổng hợp L-axit amin được

làm tăng. Trong việc nhân giống vi khuẩn sản xuất L-axit amin, một trong các đặc tính được mô tả trên đây như hiện tượng dinh dưỡng thụ động, đặc tính kháng đối với chất tương tự, và sự đột biến điều hòa chuyển hóa có thể được tạo ra một cách riêng rẽ, hoặc hai hoặc ba hoặc nhiều hơn trong số các đặc tính này có thể được tạo ra ở dạng kết hợp. Ngoài ra, trong việc nhân giống vi khuẩn sản xuất L-axit amin, hoạt tính của một trong các enzym sinh tổng hợp L-axit amin có thể được làm tăng một cách riêng rẽ, hoặc hoạt tính của hai hoặc ba hoặc nhiều hơn trong số các enzym này có thể được làm tăng ở dạng kết hợp. Ngoài ra, việc tạo ra (các) đặc tính như hiện tượng dinh dưỡng thụ động, đặc tính kháng đối với chất tương tự, và sự đột biến điều hòa chuyển hóa có thể được kết hợp với việc làm tăng (các) hoạt tính của (các) enzym sinh tổng hợp.

Chủng đột biến dinh dưỡng thụ động, chủng kháng đối với chất tương tự, hoặc chủng đột biến điều hòa chuyển hóa có khả năng sản xuất L-axit amin có thể thu được bằng cách cho chủng gốc hoặc chủng kiểu đại để quá trình xử lý gây đột biến thông thường, và sau đó chọn chủng có đặc tính tự dưỡng, đặc tính kháng đối với chất tương tự, hoặc sự đột biến điều hòa chuyển hóa, và có khả năng sản xuất L-axit amin từ chủng đột biến thu được. Ví dụ về quá trình xử lý gây đột biến thông thường bao gồm sự chiếu xạ của tia X hoặc tia cực tím và quá trình xử lý với chất gây đột biến như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), etyl metansulfonat (EMS), và metyl metansulfonat (MMS).

Khả năng sản xuất L-axit amin có thể còn được tạo ra hoặc được làm tăng bằng cách làm tăng hoạt tính của enzym tham gia vào trong quá trình tổng hợp L-axit amin đích. Hoạt tính enzym có thể được làm tăng bằng, ví dụ, biến đổi vi khuẩn sao cho sự biểu hiện gen mã hóa enzym được làm tăng. Phương pháp để làm tăng sự biểu hiện gen được mô tả trong WO00/18935, EP1010755A, và các công bố khác. Chi tiết về quá trình để làm tăng hoạt tính enzym sẽ được mô tả sau đây.

Ngoài ra, khả năng sản xuất L-axit amin có thể còn được tạo ra hoặc được làm tăng bằng cách làm giảm hoạt tính của enzym mà xúc tác cho phản ứng phân nhánh từ con đường sinh tổng hợp của L-axit amin đích để tạo ra hợp chất khác với L-axit amin đích. "Enzym mà xúc tác cho phản ứng phân nhánh từ con đường sinh tổng hợp của L-axit amin đích để tạo ra hợp chất khác với L-axit amin đích" trong bản mô tả này bao gồm enzym tham gia vào trong quá trình phân hủy axit amin đích. Phương pháp để làm giảm hoạt tính enzym sẽ được mô tả sau đây.

Sau đây, vi khuẩn sản xuất L-axit amin và phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-axit amin sẽ được minh họa một cách cụ thể hơn. Tất cả các đặc tính của vi khuẩn sản xuất L-axit amin và sự biến đổi để tạo ra hoặc làm tăng khả

năng sản xuất L-axit amin có thể được sử dụng một cách độc lập hoặc ở dạng kết hợp bất kỳ thích hợp.

<Vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic>

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn này có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp axit L-glutamic. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, glutamat dehydrogenaza (*gdhA*), glutamin synthetaza (*glnA*), glutamat synthaza (*gltBD*), isoxitrat dehydrogenaza (*icdA*), aconitat hydrataza (*acnA*, *acnB*), xitrat synthaza (*gltA*), metylxitrat synthaza (*prpC*), pyruvat carboxylaza (*pyc*), pyruvat dehydrogenaza (*aceEF*, *lpdA*), pyruvat kinaza (*pykA*, *pykF*), phosphoenolpyruvat synthaza (*ppsA*), enolaza (*eno*), phosphoglyxeromutaza (*pgmA*, *pgmI*), phosphoglyxerat kinaza (*pgk*), glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (*gapA*), trioza phosphat isomeraza (*tpiA*), fructoza bisphosphat aldolaza (*fbp*), glucoza phosphat isomeraza (*pgi*), 6-phosphogluconat dehydrataza (*edd*), 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconat aldolaza (*eda*), và transhydrogenaza. Được thể hiện trong dấu ngoặc đơn sau tên gọi của các enzym là các ví dụ về gen mã hóa enzym này (phần mô tả này cũng được áp dụng cho các trường hợp tương tự sau đây). Tốt hơn là làm tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ, ví dụ, glutamat dehydrogenaza, xitrat synthaza, phosphoenol pyruvat carboxylaza, và metylxitrat synthaza, trong số các enzym này.

Ví dụ về chủng thuộc họ *Enterobacteriaceae* và được biến đổi sao cho sự biểu hiện của gen xitrat synthaza, gen phosphoenolpyruvat carboxylaza, và/hoặc gen glutamat dehydrogenaza được làm tăng bao gồm các vi khuẩn được bộc lộ trong EP1078989A, EP955368A, và EP952221A. Ngoài ra, ví dụ về chủng thuộc họ *Enterobacteriaceae* và được biến đổi sao cho sự biểu hiện gen của con đường Entner-Doudoroff (*edd*, *eda*) được làm tăng bao gồm các vi khuẩn được bộc lộ trong EP1352966B. Ví dụ về vi khuẩn coryneform được biến đổi sao cho sự biểu hiện của gen glutamat synthetaza (*gltBD*) được làm tăng bao gồm các vi khuẩn được bộc lộ trong WO99/07853.

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic còn bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm giảm của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym mà xúc tác cho phản ứng phân nhánh từ con đường tổng hợp của axit L-glutamic để tạo ra hợp chất khác với axit L-glutamic. Ví dụ về enzym này bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, isoxitrat lyaza (*aceA*), α -ketoglutarat dehydrogenaza (*sucA*, *odhA*), axetolactat synthaza (*ilvI*), format axetyltransferaza (*pfl*), lactat dehydrogenaza (*ldh*), rượu dehydrogenaza (*adh*), glutamat decarboxylaza (*gadAB*), và succinat dehydrogenaza (*sdhABCD*). Tốt hơn là làm giảm hoặc loại bỏ, ví dụ, hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza, trong số các enzym này.

Vì khuẩn *Escherichia* có hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza được làm giảm hoặc bị thiếu hụt về hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza, và phương pháp thu được chúng được mô tả trong Patent Mỹ số US 5,378,616 và 5,573,945. Ngoài ra, phương pháp để làm giảm hoặc loại bỏ hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza của vi khuẩn *Enterobacteriaceae* như vi khuẩn *Pantoea*, vi khuẩn *Enterobacter*, vi khuẩn *Klebsiella*, và vi khuẩn *Erwinia* được bộc lộ trong Patent Mỹ số US 6,197,559, 6,682,912, 6,331,419, và 8,129,151, và Công bố đơn quốc tế WO2008/075483. Ví dụ cụ thể về vi khuẩn *Escherichia* có hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza được làm giảm hoặc bị thiếu hụt về hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza bao gồm chủng sau đây.

E. Coli W3110*sucA::Km^r*

E. Coli AJ12624 (FERM BP-3853)

E. Coli AJ12628 (FERM BP-3854)

E. Coli AJ12949 (FERM BP-4881)

E. Coli W3110*sucA::Km^r* là chủng thu được bằng cách phá vỡ gen *sucA* mã hóa α -ketoglutarat dehydrogenaza của *E. Coli* W3110. Chủng này bị thiếu hụt hoàn toàn về hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza.

Vì khuẩn coryneform trong đó hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza được làm giảm hoặc bị loại bỏ, và phương pháp thu được vi khuẩn này được bộc lộ trong WO2008/075483. Ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform trong đó hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza được làm giảm hoặc bị loại bỏ bao gồm, ví dụ, chủng sau đây.

Chủng *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) L30-2 (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2006-340603)

Chủng *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) Δ S (WO95/34672)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12821 (FERM BP-4172, Patent Pháp số 9401748)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ12822 (FERM BP-4173, Patent Pháp số 9401748)

Corynebacterium glutamicum AJ12823 (FERM BP-4174, Patent Pháp số 9401748)

Ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm vi khuẩn *Pantoea*, như chủng *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614), chủng *Pantoea ananatis* SC17 (FERM BP-11091), và chủng *Pantoea ananatis* SC17(0) (VKPM B-9246). Chủng AJ13355 là chủng được phân lập từ đất trong vùng Iwata-shi, Shizuoka-ken, Nhật Bản làm chủng mà có thể tăng sinh trong môi trường có pH thấp bao gồm axit L-glutamic và nguồn cacbon. Chủng SC17 là chủng được chọn làm chủng đột biến ít tạo ra đờm dãi từ chủng AJ13355 (Patent Mỹ số US 6,596,517). Chủng SC17 được lưu trữ ở cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository (cơ quan hành chính độc lập hiện hành, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depository, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Nhật Bản) vào ngày 4, tháng 2, năm 2009, và được ấn định mã số nhận biết đặc hiệu là FERM BP-11091. Chủng AJ13355 được lưu trữ ở National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology (cơ quan hành chính độc lập hiện hành, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depository, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Nhật Bản) vào ngày 19, tháng 2, năm 1998 và được ấn định mã số nhận biết đặc hiệu là FERM P-16644. Sau đó, việc lưu giữ được chuyển thành việc lưu giữ quốc tế theo điều khoản của Hiệp ước Budapest vào ngày 11, tháng 1, năm 1999, và được ấn định mã số nhận biết đặc hiệu là FERM BP-6614.

Ngoài ra, ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm vi khuẩn *Pantoea* có hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza được làm giảm hoặc bị thiếu hụt về hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza. Ví dụ về chủng này bao gồm chủng AJ13356 (Patent Mỹ số US 6,331,419), mà là chủng thiếu gen tiểu đơn vị α -ketoglutarat dehydrogenaza E1 (*sucA*) của chủng AJ13355, và chủng SC17*sucA* (Patent Mỹ số US 6,596,517), mà chủng thiếu gen *sucAe* của chủng SC17. Chủng AJ13356 được lưu trữ ở National Institute of BioScience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (cơ quan hành chính độc lập hiện hành, National Institute of Technology và Evaluation, International Patent Organism Depository, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-

0818, Nhật Bản) vào ngày 19, tháng 2, năm 1998, và được ấn định mã số nhận biết đặc hiệu là FERM P-16645. Sau đó, việc lưu giữ được chuyển thành việc lưu giữ quốc tế theo điều khoản của Hiệp ước Budapest vào ngày 11, tháng 1, năm 1999, và được ấn định mã số nhận biết đặc hiệu là FERM BP-6616. Chủng SC17*sucA* được ấn định mã số nhận biết riêng là AJ417, và được lưu trữ ở cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary (cơ quan hành chính độc lập hiện hành, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depositary, #120, 2-5-8 Kazusakamatori, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Nhật Bản) vào ngày 26, tháng 2, năm 2004, với mã số nhận biết đặc hiệu là FERM BP-8646.

Chủng AJ13355 được xác định làm *Enterobacter agglomerans* khi nó được phân lập, nhưng nó gần đây được phân loại lại thành *Pantoea ananatis* trên cơ sở của việc giải trình tự nucleotit của đoạn gen 16S rARN và phương pháp tương tự. Do đó, mặc dù chủng AJ13355 và AJ13356 được lưu trữ ở cơ quan lưu trữ trên đây làm *Enterobacter agglomerans*, chúng còn được gọi là *Pantoea ananatis* trong bản mô tả này.

Ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm chủng đột biến dinh dưỡng thụ động. Ví dụ cụ thể về chủng đột biến dinh dưỡng thụ động bao gồm, ví dụ, *E. Coli* VL334thrC⁺ (VKPM B-8961, EP1172433). *E. Coli* VL334 (VKPM B-1641) là chủng dinh dưỡng thụ động L-isoleuxin và L-threonin có đột biến trong gen *thrC* và *ilvA* (Patent Mỹ số US 4,278,765). *E. Coli* VL334thrC⁺ là vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic dinh dưỡng thụ động L-isoleuxin thu được bằng cách bổ sung gen đẳng vị kiểu đại của gen *thrC* vào trong chủng VL334. Gen đẳng vị kiểu đại của gen *thrC* được bổ sung bằng phương pháp nạp tải chung bằng cách sử dụng thể thực khuẩn P1 được phát triển trên tế bào của chủng *E. Coli* K-12 kiểu đại (VKPM B-7).

Ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm chủng có resistance để chất tương tự axit aspartic. Chủng này có thể còn bị thiếu hụt về hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza. Ví dụ cụ thể về chủng có đặc tính kháng đối với chất tương tự axit aspartic và bị thiếu hụt về hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza bao gồm, ví dụ, *E. Coli* AJ13199 (FERM BP-5807, Patent Mỹ số US 5,908,768), *E. Coli* FFRM P-12379, mà còn có khả năng phân hủy axit L-glutamic ít hơn (Patent Mỹ số US 5,393,671), và *E. Coli* AJ13138 (FERM BP-5565, Patent Mỹ số US 6,110,714).

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit L-

glutamic còn bao gồm, ví dụ, phương pháp của làm tăng sự biểu hiện của gen tiết axit L-glutamic, như gen *yhfK* (WO2005/085419) hoặc gen *ybjL* (WO2008/133161).

Ngoài ra, ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic đối với hoặc trong vi khuẩn coryneform còn bao gồm phương pháp tạo ra đặc tính kháng đối với chất tương tự axit hữu cơ, chất ức chế hô hấp, hoặc chất tương tự khác, và phương pháp tạo ra độ nhạy đối với chất ức chế tổng hợp thành tế bào. Ví dụ cụ thể về phương pháp này bao gồm, ví dụ, phương pháp tạo ra đặc tính kháng axit monofloaxetic (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 50-113209), phương pháp tạo ra đặc tính kháng adenin hoặc đặc tính kháng thymine (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 57-065198), phương pháp làm giảm ureaza (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 52-038088), phương pháp tạo ra đặc tính kháng axit malonic (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 52-038088), phương pháp tạo ra đặc tính kháng đối với benzopyron hoặc naphthoquinon (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-1889), phương pháp tạo ra đặc tính kháng HOQNO (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-140895), phương pháp tạo ra đặc tính kháng axit α -ketomalonic (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 57-2689), phương pháp tạo ra đặc tính kháng guanidin (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-35981), phương pháp tạo ra độ nhạy đối với penicillin (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 4-88994), và phương pháp tương tự khác.

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn nhạy hoặc kháng này bao gồm chủng sau đây.

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ3949 (FERM BP-2632, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 50-113209)

Corynebacterium glutamicum AJ11628 (FERM P-5736, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 57-065198)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11355 (FERM P-5007, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-1889)

Corynebacterium glutamicum AJ11368 (FERM P-5020, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-1889)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11217 (FERM P-4318, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 57-2869)

Corynebacterium glutamicum AJ11218 (FERM P-4319, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 57-2869)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11564 (FERM BP-5472, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-140895)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11439 (FERM BP-5136, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-35981)

Corynebacterium glutamicum H7684 (FERM BP-3004, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 04-88994)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ11426 (FERM P-5123, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-048890)

Corynebacterium glutamicum AJ11440 (FERM P-5137, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-048890)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ11796 (FERM P-6402, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 58-158192)

Ngoài ra, ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic đối với hoặc trong vi khuẩn coryneform còn bao gồm phương pháp làm tăng sự biểu hiện gen *YggB* và phương pháp bổ sung gen *YggB* đột biến có đột biến trong vùng mã hóa (WO2006/070944). Cụ thể là, vi khuẩn theo sáng chế có thể được biến đổi sao cho sự biểu hiện gen *YggB* được làm tăng, hoặc có thể được biến đổi để chứa (có) gen *YggB* đột biến.

Gen *YggB* là gen mã hóa kênh nhạy cảm cơ học. Ví dụ về gen *YggB* bao gồm gen *YggB* của vi khuẩn coryneform. Ví dụ cụ thể về gen *YggB* của vi khuẩn coryneform bao gồm, ví dụ, gen *YggB* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC14967, và *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 (WO2006/070944). Gen *YggB* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 tương ứng với trình tự bổ trợ cho trình tự có số lượng nucleotit 1.336.091 đến 1.337.692 trong trình tự bộ gen được đăng ký với số nhận biết đặc hiệu trong Ngân hàng gen (Genbank) NC_003450 theo cơ sở dữ liệu NCBI, và còn được gọi là *NCgl1221*. Protein *YggB* được mã hóa bằng gen *YggB* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 được đăng ký với số nhận biết đặc hiệu trong Ngân hàng gen NP_600492. Ngoài ra, trình tự nucleotit của gen *YggB* của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) và trình tự axit amin của protein *YggB* được mã hóa bằng gen lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 9 và 10.

Theo sáng chế, gen *YggB* có "đột biến đặc hiệu" được mô tả sau đây còn được gọi là "gen *YggB* đột biến", và do đó protein được mã hóa còn được gọi là "protein *YggB* đột biến". Ngoài ra, theo sáng chế, gen *YggB* không có "đột biến đặc hiệu" được mô tả sau đây còn được gọi là "gen *YggB* kiểu dại", và do đó protein được mã hóa còn được gọi là "protein *YggB* kiểu dại". Đáng ngạc nhiên là, đối với protein *YggB*, sự thay

đổi về trình tự axit amin được gây ra bởi "đột biến đặc hiệu" trong gen *YggB* còn được gọi là "đột biến đặc hiệu". Thuật ngữ "kiểu đại" trong bản mô tả này được sử dụng để tạo thuận lợi cho việc phân biệt gen *YggB* hoặc protein *YggB* "kiểu đại" với gen *YggB* hoặc protein *YggB* "đột biến", và gen *YggB* hoặc protein *YggB* "kiểu đại" không chỉ giới hạn ở các thành phần thu được dưới dạng chất tự nhiên, miễn là nó không có "đột biến đặc hiệu". Ví dụ về protein *YggB* kiểu đại bao gồm protein *YggB* được minh họa trên đây, như protein *YggB* có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10. Ví dụ về protein *YggB* kiểu đại còn bao gồm biến thể bảo thủ (biến thể trong đó chức năng ban đầu của chúng được duy trì) của protein *YggB* được minh họa trên đây, miễn là biến thể bảo thủ này không có "đột biến đặc hiệu". "Chức năng ban đầu" liên quan đến protein *YggB* có thể là, ví dụ, chức năng làm kênh nhạy cảm cơ học hoặc đặc tính mà sự biểu hiện được làm tăng của chúng trong vi khuẩn coryneform tạo ra khả năng sản xuất axit L-glutamic được nâng cao của vi khuẩn coryneform.

"Đột biến đặc hiệu" không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là nó thay đổi trình tự axit amin của protein *YggB* như các trình tự axit amin được mô tả trên đây để do đó nâng cao khả năng sản xuất axit L-glutamic của vi khuẩn coryneform. Ví dụ về "đột biến đặc hiệu" bao gồm đột biến trên phía đầu cuối C và đột biến trong vùng xuyên màng. "Đột biến đặc hiệu" có thể còn là dạng kết hợp của chúng.

(1) Đột biến trên phía đầu cuối C

Đột biến trên phía đầu cuối C là đột biến được bổ sung vào trong vùng của gen *YggB* kiểu đại mã hóa gốc axit amin của vị trí 419 đến 533 của protein *YggB* kiểu đại. Đột biến trên phía đầu cuối C có thể được bổ sung ở một hoặc nhiều vị trí trong vùng này. Kiểu thay đổi về trình tự axit amin được gây ra bởi đột biến trên phía đầu cuối C không bị giới hạn một cách cụ thể. Đột biến trên phía đầu cuối C có thể là đột biến mà gây ra sự thay thế axit amin (đột biến sai nghĩa), sự chèn gốc axit amin, sự loại bỏ gốc axit amin, sự bổ sung bộ ba mã kết thúc (đột biến vô nghĩa), đột biến lệch khung, hoặc dạng kết hợp của chúng. Đột biến trên phía đầu cuối C tốt hơn là, ví dụ, đột biến để chèn trình tự nucleotit như sự chèn trình tự (sau đây còn được gọi là "IS") hoặc gen nhảy (transposon).

(1-1) Sự chèn trình tự nucleotit

Ví dụ về đột biến trên phía đầu cuối C bao gồm, ví dụ, đột biến mà chèn trình tự nucleotit ở vị trí mã hóa gốc valin ở vị trí 419 của protein *YggB* kiểu đại (đột biến kiểu 2A-1). Đột biến kiểu 2A-1 có thể là, ví dụ, đột biến mà gây ra sự loại bỏ hoặc sự thay thế một phần hoặc tất cả các gốc axit amin của vị trí 419 đến 533 của protein *YggB* kiểu đại. Ví dụ cụ thể về gen *YggB* đột biến có đột biến kiểu 2A-1 bao gồm, ví dụ, gen

YggB bao gồm IS được chèn vào trong sát ngay của "G" ở vị trí 1255 trong SEQ ID NO: 9, và do đó mã hóa protein *YggB* đột biến có chiều dài hoàn chỉnh 423 gốc amino, mà ngắn hơn chiều dài của protein *YggB* kiểu dại ban đầu (SEQ ID NO: 10). Trình tự nucleotit của gen *YggB* đột biến này (V419::IS) và trình tự axit amin protein *YggB* đột biến được mã hóa bằng gen lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 11 và 12. Trong SEQ ID NO: 11, vị trí 1 đến 1269 tương ứng với CDS đối với protein *YggB* đột biến này (V419::IS). Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic có gen *YggB* đột biến (V419::IS) bao gồm, ví dụ, chủng *C. Glutamicum* 2256 Δ *sucA* Δ *ldhA* *YggB** (WO2014/185430).

(1-2) Sự thế đổi với gốc prolin

Ví dụ về đột biến trên phía đầu cuối C còn bao gồm, ví dụ, đột biến mà thay thế gốc prolin có mặt ở vị trí 419 đến 533 của protein *YggB* kiểu dại bằng gốc axit amin khác. Ví dụ về gốc prolin này bao gồm gốc prolin ở vị trí 424, 437, 453, 457, 462, 469, 484, 489, 497, 515, 529, và 533 của protein *YggB* kiểu dại. Đặc biệt được ưu tiên là thế gốc (các)prolin của (các)vị trí 424 và/hoặc 437 với (các)gốc axit amin khác. "Axit amin khác" không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là axit amin có trong tự nhiên khác với prolin. Ví dụ về "axit amin khác" bao gồm Lys, Glu, Thr, Val, Leu, Ile, Ser, Asp, Asn, Gln, Arg, Cys, Met, Phe, Trp, Tyr, Gly, Ala, và His. Ví dụ, gốc prolin ở vị trí 424 có thể được thế bằng, tốt hơn là, gốc của axit amin kỵ nước (Ala, Gly, Val, Leu, hoặc Ile), tốt hơn nữa là gốc của axit amin mạch nhánh (Leu, Val, hoặc Ile). Ngoài ra, ví dụ, gốc prolin ở vị trí 437 có thể được thế tốt hơn là bằng gốc của axit amin có nhóm hydroxyl trong mạch nhánh (Thr, Ser, hoặc Tyr), tốt hơn nữa là với gốc Ser.

(2) Đột biến trong vùng xuyên màng

Protein *YggB* được cho là có năm vùng xuyên màng. Vùng xuyên màng tương ứng với gốc axit amin của vị trí 1 đến 23 (vùng xuyên màng thứ nhất), vị trí 25 đến 47 (vùng xuyên màng thứ hai), vị trí 62 đến 84 (vùng xuyên màng thứ ba), vị trí 86 đến 108 (vùng xuyên màng thứ tư), và vị trí 110 đến 132 (vùng xuyên màng thứ năm) của protein *YggB* kiểu dại. Đột biến trong vùng xuyên màng là đột biến trong vùng mã hóa các vùng xuyên màng này của gen *YggB* kiểu dại. Đột biến trong vùng xuyên màng có thể được bổ sung vào trong một hoặc nhiều vị trí trong các vùng này. Đột biến trong vùng xuyên màng tốt hơn là đột biến mà gây ra sự thế, sự loại bỏ, sự bổ sung, sự chèn, hoặc sự đảo ngược của một hoặc một số gốc axit amin, nhưng không bao gồm bất kỳ đột biến lệch khung đọc hoặc đột biến vô nghĩa. Số được thể hiện bằng thuật ngữ "một hoặc một số" tốt hơn là 1 đến 20, tốt hơn nữa là 1 đến 10, tốt hơn nữa là 1 đến 5, đặc

biệt tốt hơn là 1 đến 3. Ví dụ về đột biến trong vùng xuyên màng bao gồm đột biến mà chèn một hoặc một số gốc axit amin, như Cys-Ser-Leu, giữa gốc leuxin ở vị trí 14 và gốc tryptophan ở vị trí 15; đột biến mà thay thế gốc alanin ở vị trí 100 bằng gốc axit amin khác, như gốc của axit amin có nhóm hydroxyl trong mạch nhánh (cụ thể là Thr, Ser, hoặc Tyr), tốt hơn là gốc Thr; đột biến mà thay thế gốc alanin ở vị trí 111 bằng gốc axit amin khác như gốc Val hoặc gốc của axit amin có nhóm hydroxyl trong mạch nhánh (cụ thể là Thr, Ser, hoặc Tyr), tốt hơn là gốc Val hoặc gốc Thr; trong protein *YggB* kiểu dại.

Theo sáng chế, "gốc axit amin ở vị trí X của protein *YggB* kiểu dại" nghĩa là gốc axit amin tương ứng với gốc ở vị trí X trong SEQ ID NO: 10, trừ khi được chỉ ra theo cách cụ thể khác. "Vị trí X" trong trình tự axit amin là vị trí thứ X được tính từ đầu cuối N của trình tự axit amin, và gốc axit amin của đầu cuối N là gốc axit amin ở vị trí 1. Cụ thể là, vị trí trên đây của gốc axit amin thể hiện vị trí tương đối, và vị trí chính xác của chúng có thể thay đổi do sự loại bỏ, sự chèn, sự bổ sung, hoặc quá trình tương tự khác của gốc axit amin hoặc gốc. Ví dụ, "gốc axit amin ở vị trí 419 của protein *YggB* kiểu dại" nghĩa là gốc axit amin tương ứng với gốc ở vị trí 419 trong SEQ ID NO: 10, và khi một gốc axit amin được loại bỏ ở vị trí trên phía đầu cuối N ở vị trí 419, gốc axit amin số 418 từ đầu cuối N là "gốc axit amin ở vị trí 419 của protein *YggB* kiểu dại". Ngoài ra, khi một gốc axit amin được chèn vị trí trên phía đầu cuối N ở vị trí 419, gốc axit amin số 420 từ đầu cuối N là "gốc axit amin ở vị trí 419 của protein *YggB* kiểu dại". Cụ thể hơn, ví dụ, gốc axit amin ở vị trí 419 đến 529 của protein *YggB* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14967 tương ứng với gốc axit amin ở vị trí 419 đến 533 của protein *YggB* kiểu dại.

Gốc axit amin là "gốc axit amin tương ứng với gốc ở vị trí X trong SEQ ID NO: 10" trong trình tự axit amin protein *YggB* tùy ý có thể được xác định bằng cách sắp xếp thẳng hàng giữa trình tự axit amin protein *YggB* tùy ý và trình tự axit amin SEQ ID NO: 10. Việc sắp xếp thẳng hàng có thể được thực hiện bằng, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm phân tích gen đã biết. Ví dụ cụ thể về phần mềm này bao gồm DNASIS được sản xuất bởi Hitachi Solutions, GENETYX được sản xuất bởi Genetyx, và các phần mềm tương tự khác (Elizabet C. Tyler et al., Computers and Biomedical Research, 24 (1) 72-96, 1991; Barton GJ et al., Journal of Molecular Biology, 198 (2), 327-37, 1987).

Gen *YggB* đột biến có thể thu được bằng cách biến đổi gen *YggB* kiểu dại để có "đột biến đặc hiệu" trên đây. Sự biến đổi của ADN có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết. Ví dụ, đột biến đích có thể được bổ sung vào trong vị trí đích của

ADN bằng phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí. Ví dụ cụ thể về phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí bao gồm, ví dụ, phương pháp sử dụng PCR (Higuchi, R., 61, in PCR Technology, Erlich, H.A. Eds., Stockton Press, 1989; Carter P., Met. in Enzymol., 154, 382, 1987), và phương pháp sử dụng phage (Kramer, W. Và Frits, H.J., Met. in Enzymol., 154, 350, 1987; Kunkel, T.A. Et al., Met. in Enzymol., 154, 367, 1987). Ngoài ra, gen *YggB* đột biến có thể còn thu được bằng cách tổng hợp hóa học.

Sự biến đổi này của vi khuẩn mà là vi khuẩn có gen *YggB* đột biến có thể thu được bằng cách bổ sung gen *YggB* đột biến vào trong vi khuẩn. Sự biến đổi này của vi khuẩn mà là vi khuẩn có gen *YggB* đột biến có thể còn thu được bằng cách bổ sung đột biến vào trong gen *YggB* của vi khuẩn thông qua đột biến tự nhiên hoặc quá trình xử lý với chất gây đột biến.

Phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic có thể còn hữu hiệu để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-axit amin mà được sinh tổng hợp thông qua axit L-glutamic làm chất trung gian, như L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-xitruilin, và L-ornithin. Do đó, vi khuẩn có khả năng sản xuất bất kỳ trong số các L-axit amin mà được sinh tổng hợp thông qua axit L-glutamic có thể có, nếu cần, đặc tính này được tạo ra bởi vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic như được mô tả trên đây. Ví dụ, vi khuẩn có khả năng sản xuất bất kỳ trong số các L-axit amin mà được sinh tổng hợp thông qua axit L-glutamic có thể được biến đổi sao cho hoạt tính của α -ketoglutarat dehydrogenaza và/hoặc succinat dehydrogenaza được làm giảm.

<Vi khuẩn sản xuất L-Glutamin>

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-Glutamin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-glutamin được làm tăng. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, glutamat dehydrogenaza (*gdhA*) và glutamin synthetaza (*glnA*). Hoạt tính glutamin synthetaza có thể còn được làm tăng bằng cách phá vỡ gen glutamin adenyltransferaza (*glnE*) hoặc phá vỡ gen protein kiểm soát PII (*glnB*) (EP1229121).

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-Glutamin còn bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym mà xúc tác cho phản ứng phân nhánh từ con đường tổng hợp của L-glutamin để tạo ra hợp chất khác với L-glutamin được làm giảm. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, glutaminaza.

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-Glutamin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, vi khuẩn coryneform trong đó hoạt tính hoặc các hoạt tính của glutamat dehydrogenaza (*gdhA*) và/hoặc glutamin synthetaza (*glnA*) (EP1229121, EP1424398) được làm tăng, và vi khuẩn coryneform trong đó hoạt tính glutaminaza (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2004-187684) được làm giảm. Ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-Glutamin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm chủng thuộc chi *Escherichia* và có glutamin synthetaza đột biến trong đó gốc tyrosin ở vị trí 397 của glutamin synthetaza được thế bằng gốc axit amin khác (US2003/0148474A).

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-Glutamin hoặc trong vi khuẩn coryneform còn bao gồm phương pháp tạo ra đặc tính kháng 6-diazo-5-oxo-norleuxin (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 3-232497), phương pháp tạo ra đặc tính kháng đối với chất tương tự purin và đặc tính kháng metionin sulfoxit (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 61-202694), và phương pháp tạo ra đặc tính kháng axit α -ketomalonic (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-151495). Ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-Glutamin bao gồm, ví dụ, chủng sau đây.

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11573 (FERM P-5492, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-151495)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11576 (FERM BP-10381, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-151495)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ12212 (FERM P-8123, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 61-202694)

<Vi khuẩn sản xuất L-Prolin>

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-Prolin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-prolin. Ví dụ về enzym này bao gồm glutamat-5-kinaza (*proB*), γ -glutamylphosphat reductaza, và pyrolin-5-carboxylat reductaza (*putA*). Để làm tăng hoạt tính của enzym này, ví dụ, gen *proB* mã hóa glutamat kinaza được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bằng L-prolin (Patent Đức số 3127361) có thể được ưu tiên sử dụng.

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-Prolin còn bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính được làm giảm của enzym tham gia vào trong quá trình phân hủy L-prolin. Ví dụ về enzym này bao gồm prolin dehydrogenaza và ornithin aminotransferaza.

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-Prolin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, *E. Coli* NRRL B-12403 và NRRL B-12404 (Patent Anh số 2075056), *E. Coli* VKPM B-8012 (Công bố đơn Nga số 2000124295), chủng đột biến plasmit *E. Coli* được mô tả trong Patent Đức số 3127361, chủng đột biến plasmit *E. Coli* được mô tả trong Bloom F.R. et al. (The 15th Miami winter symposium, 1983, p. 34), chủng *E. Coli* 702 (VKPM B-8011), mà là chủng kháng 3,4-dehydroxyprolin và azetidin-2-carboxylat, và chủng *E. Coli* 702ilvA (VKPM B-8012), mà là chủng thiếu gen *ilvA* của chủng 702 (EP1172433).

<Vi khuẩn sản xuất L-Threonin>

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-threonin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym sinh tổng hợp L-threonin. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, aspartokinaza III (*lysC*), aspartat semialdehyt dehydrogenaza (*asd*), aspartokinaza I (*thrA*), homoserin kinaza (*thrB*), threonin synthaza (*thrC*), và aspartat aminotransferaza (aspartat transaminase) (*aspC*). Trong số các enzym này, tốt hơn là làm tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ aspartokinaza III, aspartat semialdehyt dehydrogenaza, aspartokinaza I, homoserin kinaza, aspartat aminotransferaza, và threonin synthaza. Gen bất kỳ trong số các gen mã hóa enzym sinh tổng hợp L-threonin có thể được bổ sung vào trong vi khuẩn có khả năng phân hủy threonin được làm giảm. Ví dụ về chủng này trong đó sự phân hủy threonin bị ức chế bao gồm, ví dụ, chủng *E. Coli* TDH6, mà bị thiếu hụt về hoạt tính threonin dehydrogenaza (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2001-346578).

Hoạt tính của enzym sinh tổng hợp L-threonin bị ức chế bởi sản phẩm cuối, L-threonin. Do đó, để tạo cấu trúc chủng sản xuất L-threonin, tốt hơn nếu gen của enzym sinh tổng hợp L-threonin được biến đổi sao cho enzym này được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi L-threonin. Gen *thrA*, *thrB*, và *thrC* trên đây cấu thành các gen cấu trúc có liên quan về chức năng thường được phân bố liên nhau thành từng cụm có chung một cơ chế điều hòa (hay operon) threonin, mà tạo ra cấu trúc đoạn kìm hãm phiên mã. Sự biểu hiện của operon threonin bị ức chế bởi isoleuxin và threonin trong môi trường canh dinh dưỡng và còn bị ức chế bởi sự. Do đó, sự biểu hiện của operon threonin có thể được làm tăng bằng cách loại bỏ trình tự dẫn đầu hoặc đoạn kìm hãm phiên mã trong vùng suy giảm (Lynn, S.P., Burton, W.S., Donohue, T.J., Gould, R.M., Gumport, R.L, và Gardner, J.F., J. Mol. Biol. 194:59-69 (1987); WO02/26993;

WO2005/049808; và WO2003/097839).

Vùng khởi động tự nhiên của operon threonin có mặt sau operon threonin, và có thể được thế bằng vùng khởi động không tự nhiên (WO98/04715). Ngoài ra, operon threonin có thể được tạo cấu trúc sao cho gen sinh tổng hợp threonin được biểu hiện dưới sự kiểm soát của gen kìm hãm và vùng khởi động của thực thể khuẩn λ (EP0593792B). Ngoài ra, vi khuẩn được biến đổi sao cho nó được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi L-threonin có thể còn thu được bằng chọn chủng kháng đối với axit α -amino- β -hydroxyisovaleric (AHV), mà là chất tương tự L-threonin.

Tốt hơn nếu mức biểu hiện của operon threonin mà được biến đổi để được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi L-threonin như được mô tả trên đây được làm tăng trong vật chủ bằng cách làm tăng số lượng bản sao của chúng hoặc bằng cách buộc nó vào vùng khởi động hiệu quả. Số lượng bản sao có thể được làm tăng bằng cách bổ sung plasmit bao gồm operon threonin vào trong vật chủ. Số lượng bản sao có thể còn được làm tăng bằng cách chuyển operon threonin vào bộ gen của vật chủ bằng cách sử dụng gen nhảy, thực thể khuẩn Mu, hoặc cách tương tự khác.

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-threonin còn bao gồm, ví dụ, phương pháp tạo ra đặc tính kháng đối L-threonin cho vật chủ, và phương pháp tạo ra đặc tính kháng đối L-homoserin cho vật chủ. Đặc tính kháng này có thể được tạo ra bằng, ví dụ, làm tăng sự biểu hiện gen mà tạo ra đặc tính kháng L-threonin hoặc gen mà tạo ra đặc tính kháng L-homoserin. Ví dụ về gen mà tạo ra đặc tính kháng trên đây bao gồm gen *rhtA* (Res. Microbiol. 154:123-135 (2003)), gen *rhtB* (EP0994190A), gen *rhtC* (EP1013765A), gen *yfiK*, và gen *yeaS* (EP1016710A). Đối với phương pháp để tạo ra đặc tính kháng L-threonin cho vật chủ, các vi khuẩn được mô tả trong EP0994190A và WO90/04636 có thể được sử dụng.

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-Threonin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, *E. Coli* TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996, Patent Mỹ số US 5,175,107 và 5,705,371), *E. Coli* 472T23/pYN7 (ATCC 98081, Patent Mỹ số US 5,631,157), *E. Coli* NRRL-21593 (Patent Mỹ số US 5,939,307), *E. Coli* FERM BP-3756 (Patent Mỹ số US 5,474,918), *E. Coli* FERM BP-3519 và FERM BP-3520 (Patent Mỹ số US 5,376,538), *E. Coli* MG442 (Gusyatiner et al., Genetika (in Russian), 14, 947-956 (1978)), *E. Coli* VL643 và VL2055 (EP1149911A), và *E. Coli* VKPM B-5318 (EP0593792B).

Chủng VKPM B-3996 là chủng thu được bằng cách bổ sung plasmit pVIC40 vào trong chủng TDH-6. Chủng TDH-6 có khả năng đồng hóa sucroza và bị thiếu hụt về gen *thrC*, và gen *ilvA* của chúng có đột biến dò. Chủng TDH-6 còn có đột biến về

gen *rhtA*, mà tạo ra đặc tính kháng đối với nồng độ cao của threonin hoặc homoserin. Plasmid pVIC40 là plasmid thu được bằng các chèn operon *thrA*BC* bao gồm gen *thrA* đột biến mã hóa aspartokinaza-homoserin dehydrogenaza I kháng đối với sự ức chế ngược bởi threonin và gen *thrBC* kiểu dại vào trong vector được tạo ra từ SF1010 (Patent Mỹ số US 5,705,371). Gen *thrA* đột biến mã hóa aspartokinaza-homoserin dehydrogenaza I mà về cơ bản được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi threonin. Chủng B-3996 được lưu trữ vào ngày 19, tháng 11, năm 1987 ở The All-Union Scientific Center of Antibiotics (Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscow, Nga) với mã số nhận biết đặc hiệu RIA 1867. Chủng này còn được lưu trữ ở The Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, FGUP GosNII Genetika, 1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Nga) vào ngày 7, tháng tư, năm 1987 với mã số nhận biết đặc hiệu VKPM B-3996.

Chủng VKPM B-5318 là nguyên dưỡng đối với isoleuxin, và chứa plasmid pPRT614, mà tương ứng với plasmid pVIC40 trong đó vùng điều hòa của operon threonin được thế bằng gen kìm hãm Cl và vùng khởi động PR thực thể khuẩn λ nhạy với nhiệt độ. Chủng VKPM B-5318 được lưu trữ ở The Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, FGUP GosNII Genetika, 1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Nga) vào ngày 3, tháng 5, năm 1990 với mã số nhận biết đặc hiệu là VKPM B-5318.

Gen *thrA* mã hóa aspartokinaza-homoserin dehydrogenaza I của *E. Coli* đã được làm sáng tỏ (số nucleotit là 337 đến 2799, mã số nhận biết đặc hiệu trong Ngân hàng gen NC_000913.2, gi: 49175990). Gen *thrA* được định vị giữa gen *thrL* và *thrB* trên nhiễm sắc thể *E. Coli* K-12. Gen *thrB* mã hóa homoserin kinaza của *Escherichia coli* đã được làm sáng tỏ (số nucleotit là 2801 đến 3733, mã số nhận biết đặc hiệu trong Ngân hàng gen NC_000913.2, gi: 49175990). Gen *thrB* được định vị giữa gen *thrA* và *thrC* trên nhiễm sắc thể *E. Coli* K-12. Gen *thrC* mã hóa threonin synthaza của *E. Coli* đã được làm sáng tỏ (số nucleotit là 3734 đến 5020, mã số nhận biết đặc hiệu trong Ngân hàng gen NC_000913.2, gi: 49175990). Gen *thrC* được định vị giữa gen *thrB* và khung đọc mở *yaaX* trên nhiễm sắc thể *E. Coli* K-12. Operon *ThrA*BC* bao gồm gen *thrA* đột biến mã hóa aspartokinaza-homoserin dehydrogenaza I kháng đối với sự ức chế ngược bởi threonin và gen *thrBC* kiểu dại có thể thu được từ plasmid đã biết pVIC40, mà có trong chủng *E. Coli* sản xuất threonin VKPM B-3996 (Patent Mỹ số US 5,705,371).

Gen *rhtA* của *E. Coli* được định vị ở 18 min trên nhiễm sắc thể *E. Coli* gần với operon *glnHPQ*, mà mã hóa các thành phần của hệ vận chuyển glutamin. Gen *rhtA*

giống với ORF1 (gen *ybiF*, số nucleotit là 764 đến 1651, mã số nhận biết đặc hiệu trong Ngân hàng gen AAA218541, gi:440181) và định vị giữa gen *pexB* và *ompX*. Đơn vị biểu hiện protein được mã hóa bằng ORF1 được định danh là gen *rhtA* (rht: đặc tính kháng đối với homoserin và threonin). Đột biến *rhtA23* được xác định là tạo ra đặc tính kháng đối với nồng độ cao của threonin hoặc homoserin là sự thế A-đối với-G ở vị trí 1 tương ứng với mã bộ ba bắt đầu ATG (ABSTRACTS of the 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with Annual Meeting of American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, abstract No. 457; EP1013765A).

Gen *asd* của *E. Coli* đã được làm sáng tỏ (số nucleotit là 3572511 đến 3571408, mã số nhận biết đặc hiệu trong Ngân hàng gen NC_000913.1, gi:16131307), và có thể thu được bằng PCR (White, T.J., et al., Trends Genet, 5:185-189, 1989) bằng cách tận dụng đoạn môi được điều chế trên cơ sở trình tự nucleotit của gen. Gen *asd* của vi sinh vật khác có thể còn thu được theo cách tương tự.

Gen *aspC* gen của *E. Coli* cũng đã được làm sáng tỏ (số nucleotit là 983742 đến 984932, mã số nhận biết đặc hiệu trong Ngân hàng gen NC_000913.1, gi:16128895), và có thể thu được bằng PCR tận dụng đoạn môi được điều chế trên cơ sở của trình tự nucleotit của gen. Gen *aspC* của vi sinh vật khác có thể còn thu được theo cách tương tự.

Ngoài ra, ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-threonin bao gồm, ví dụ, *Corynebacterium axetoaxitophilum* AJ12318 (FERM BP-1172, Patent Mỹ số US 5,188,949).

<Vi khuẩn sản xuất L-Lysin>

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-lysine bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym sinh tổng hợp L-lysine. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, dihydrodipicolinate synthase (*dapA*), aspartokinase III (*lysC*), dihydrodipicolinate reductase (*dapB*), diaminopimelate decarboxylase (*lysA*), diaminopimelate dehydrogenase (*ddh*) (Patent Mỹ số US 6,040,160), phosphoenolpyruvate carboxylase (*ppc*), aspartate semialdehyde dehydrogenase (*asd*), aspartate aminotransferase (aspartate transaminase) (*aspC*), diaminopimelate epimerase (*dapF*), tetrahydrodipicolinate succinylase (*dapD*), succinyl diaminopimelate deacetylase (*dapE*), và aspartase (*aspA*) (EP1253195A). Tốt hơn là làm tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ, ví dụ, dihydrodipicolinate reductase, diaminopimelate

decarboxylaza, diaminopimelat dehydrogenaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, aspartat aminotransferaza, diaminopimelat epimeraza, aspartat semialdehyt dehydrogenaza, tetrahydrodipicolinat succinylaza, và succinyl diaminopimelat deaxylaza, trong số các enzym này. Ngoài ra, vi khuẩn sản xuất L-Lysin và chủng gốc để tạo ra chúng có thể biểu hiện mức được làm tăng của gen tham gia vào trong hiệu suất năng lượng (*cyo*) (EP1170376A), gen mã hóa nicotinamit nucleotit transhydrogenaza (*pntAB*) (Patent Mỹ số US 5,830,716), gen *ybjE* (WO2005/073390), hoặc dạng kết hợp của chúng. Vì aspartokinaza III (*lysC*) bị ức chế ngược bởi L-lysin, gen *lysC* đột biến mã hóa aspartokinaza III được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi L-lysin (Patent Mỹ số US 5,932,453) có thể được sử dụng để làm tăng hoạt tính của enzym này. Ví dụ về aspartokinaza III được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi L-lysin bao gồm aspartokinaza III được tạo ra từ *Escherichia coli* và có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ đột biến để thay thế gốc metionin ở vị trí 318 với gốc isoleuxin; đột biến để thay thế gốc glyxin ở vị trí 323 với gốc axit aspartic; và đột biến để thay thế gốc threonin ở vị trí 352 với gốc isoleuxin (Patent Mỹ số US 5,661,012 và 6,040,160). Ngoài ra, vi dihydrodipicolinat synthaza (*dapA*) bị ức chế ngược bởi L-lysin, gen *dapA* đột biến mã hóa dihydrodipicolinat synthaza được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi L-lysin có thể được sử dụng để làm tăng hoạt tính của enzym này. Ví dụ về dihydrodipicolinat synthaza được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi L-lysin bao gồm dihydrodipicolinat synthaza được tạo ra từ *Escherichia coli* và có đột biến để thay thế gốc histidin ở vị trí 118 bằng gốc tyrosin (Patent Mỹ số US 6,040,160).

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-lysin còn bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm giảm của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym mà xúc tác cho phản ứng phân nhánh từ con đường sinh tổng hợp của L-lysin để tạo ra hợp chất khác với L-lysin. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, homoserin dehydrogenaza, lysin decarboxylaza (Patent Mỹ số US 5,827,698), và enzym malic (WO2005/010175).

Ngoài ra, ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-lysin hoặc trong vi khuẩn coryneform còn bao gồm phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho hoạt tính của hệ bài tiết lysin (*lysE*) được làm tăng (WO97/23597). Gen *lysE* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 tương ứng với trình tự bộ gen được đăng ký với số nhận biết đặc hiệu trong Ngân hàng gen NC_006958 (VERSION NC_006958.1 GI:62388892) theo cơ sở dữ liệu NCBI. Protein *lysE* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 được đăng ký với số nhận biết đặc hiệu trong Ngân hàng gen

YP_225551 (YP_225551.1 GI:62390149).

Ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-Lysin và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm chủng đột biến có đặc tính kháng đối với chất tương tự L-lysine. Chất tương tự L-lysine ức chế sự phát triển của vi khuẩn như vi khuẩn của họ *Enterobacteriaceae* và vi khuẩn coryneform, nhưng sự ức chế này được giải phóng hoàn toàn hoặc một phần khi L-lysine có trong môi trường này. Ví dụ về các chất tương tự L-lysine này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, oxalysine, lysine hydroxamate, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine (AEC), γ -methyllysine, và α -clocaprolactam. Chủng đột biến có đặc tính kháng đối với các chất tương tự lysine này có thể thu được bằng cách cho vi khuẩn tham gia quá trình xử lý gây đột biến nhân tạo thông dụng.

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-Lysin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm *E. Coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185, Patent Mỹ số US 4,346,170) và *E. Coli* VL611. Trong các chủng này, aspartokinase được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi L-lysine.

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-Lysin và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm chủng *E. Coli* WC196. Chủng WC196 được nhân giống bằng cách tạo ra đặc tính kháng AEC chủng đối với W3110, mà được tạo ra từ *E. Coli* K-12 (Patent Mỹ số US 5,827,698). Chủng WC196 được gọi tên là *E. Coli* AJ13069 và được lưu trữ ở the National Institute of BioScience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (cơ quan hành chính độc lập hiện hành, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depositary, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Nhật Bản) vào ngày 6, tháng 12, năm 1994 và được ấn định mã số nhận biết đặc hiệu là FERM P-14690. Sau đó, việc lưu giữ được chuyển thành việc lưu giữ quốc tế theo điều khoản của Hiệp ước Budapest vào ngày 29, tháng 9, năm 1995, và được ấn định mã số nhận biết đặc hiệu là FERM BP-5252 (Patent Mỹ số US 5,827,698).

Ví dụ được ưu tiên về vi khuẩn sản xuất L-Lysin bao gồm *E. Coli* WC196 Δ cadA Δ ldc và *E. Coli* WC196 Δ cadA Δ ldc/pCABD2 (WO2010/061890). Chủng *E. Coli* WC196 Δ cadA Δ ldc được tạo cấu trúc từ chủng WC196 bằng cách phá vỡ gen *cadA* và *ldcC* mã hóa lysine decarboxylase. Chủng WC196 Δ cadA Δ ldc/pCABD2 được tạo cấu trúc bằng cách bổ sung plasmit pCABD2 bao gồm gen enzyme sinh tổng hợp lysine (Patent Mỹ số US 6,040,160) vào trong chủng WC196 Δ cadA Δ ldc. Chủng WC196 Δ cadA Δ ldc, được gọi tên là AJ110692, được lưu trữ ở cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary (cơ quan hành chính độc

lập hiện hành, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depositary, #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Nhật Bản) vào ngày 7, tháng 10, năm 2008 theo tiêu chuẩn lưu giữ quốc tế, và được ấn định mã số nhận biết đặc hiệu là FERM BP-11027. Plasmid pCABD2 bao gồm gen *dapA* đột biến được tạo ra từ *Escherichia coli* và mã hóa dihydrodipicolinat synthaza (DDPS) có đột biến đối với desensitization để sự ức chế ngược bởi L-lysin (H118Y), đột biến *lysC* gen được tạo ra từ *Escherichia coli* và mã hóa aspartokinaza III có đột biến để khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi L-lysin (T352I), gen *dapB* được tạo ra từ *Escherichia coli* và mã hóa dihydrodipicolinat reductaza, và gen *ddh* được tạo ra từ *Brevibacterium lactofermentum* và mã hóa diaminopimelat dehydrogenaza.

Ví dụ được ưu tiên về vi khuẩn sản xuất L-Lysin còn bao gồm *E. Coli* AJIK01 (NITE BP-01520). Chủng AJIK01 được gọi tên là *E. Coli* AJ111046, và được lưu trữ ở cơ quan hành chính độc lập, National Institute of Technology and Evaluation, International Patent Organism Depositary (#122, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Nhật Bản) vào ngày 29, tháng 1, năm 2013. Sau đó, nó được chuyển thành việc lưu giữ quốc tế theo điều khoản của Hiệp ước Budapest vào ngày 15, tháng 5, năm 2014, và được ấn định mã số nhận biết đặc hiệu là NITE BP-01520,

Ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-lysin bao gồm, ví dụ, chủng đột biến kháng AEC (chủng *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum* AJ11082) (NRRL B-11470) v.v., Công bố đơn Nhật (Kokoku) số 56-1914, 56-1915, 57-14157, 57-14158, 57-30474, 58-10075, 59-4993, 61-35840, 62-24074, 62-36673, 5-11958, 7-112437, và 7-112438); chủng đột biến cần axit amin như L-homoserin để phát triển (Công bố đơn Nhật số 48-28078 và 56-6499); chủng đột biến có đặc tính kháng đối với AEC và còn cần axit amin như L-leuxin, L-homoserin, L-prolin, L-serin, L-arginin, L-alanin, và L-valin (Patent Mỹ số US 3,708,395 và 3,825,472); chủng đột biến có đặc tính kháng đối với DL- α -amino- ϵ -caprolactam, α -amino-lauryllactam, chất tương tự axit aspartic, thuốc sulfa, quinoit, và N-lauroylleuxin; chủng đột biến có đặc tính kháng đối với chất ức chế oxaloacetat decarboxylaza hoặc chất ức chế enzym chuỗi hô hấp (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 50-53588, 50-31093, 52-102498, 53-9394, 53-86089, 55-9783, 55-9759, 56-32995, 56-39778, Công bố đơn Nhật số 53-43591 và 53-1833); chủng đột biến cần inositol hoặc axit axetic (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 55-9784 và 56-8692); chủng đột biến mà nhạy đối với axit flopyruvic hoặc nhiệt độ là 34°C hoặc cao hơn (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 55-9783 và 53-86090); và chủng đột biến có đặc tính kháng đối với etylen glycol (Patent Mỹ số US 4,411,997).

< Vi khuẩn sản xuất L-Arginin>

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-arginin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym sinh tổng hợp L-arginin. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, N-axetylglutamat synthaza (*argA*), N-axetylglutamat kinaza (*argB*), N-axetylglutamyl phosphat reductaza (*argC*), axetylornithin transaminaza (*argD*), axetylornithin deaxetylaza (*argE*), ornithin carbamoyl transferaza (*argF*, *argI*), argininosuccinat synthetaza (*argG*), argininosuccinat lyaza (*argH*), ornithin axetyl transferaza (*argJ*), và carbamoyl phosphat synthetaza (*carAB*). Đối với gen N-axetylglutamat synthaza (*argA*), ví dụ, gen mã hóa N-axetylglutamat synthaza đột biến được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi L-arginin bằng sự thế đổi với các gốc axit amin tương ứng với vị trí 15 đến 19 của enzym kiểu đại (EP1170361A) có thể tốt hơn được sử dụng.

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-arginin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, chủng *E. Coli* 237 (VKPM B-7925, US2002/058315A1), chủng biến đổi của chúng được bổ sung với gen *argA* mã hóa N-axetyl glutamat synthaza đột biến (Công bố đơn Nga số 2001112869, EP1170361A1), chủng *E. Coli* 382 được tạo ra từ chủng 237 và có khả năng đồng hóa axit axetic được nâng cao (VKPM B-7926, EP1170358A1), và *E. Coli* 382ilvA+ chủng, mà là chủng thu được từ chủng 382 bằng cách bổ sung thêm gen *ilvA* kiểu đại từ chủng *E. Coli* K-12. Chủng *E. Coli* 237 được lưu trữ ở The Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, FGUP GosNII Genetika, 1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Nga) vào ngày 10, tháng 4, năm 2000 với mã số nhận biết đặc hiệu là VKPM B-7925, và việc lưu giữ được chuyển thành việc lưu giữ quốc tế theo điều khoản của Hiệp ước Budapest vào ngày 18, tháng năm, năm 2001. Chủng *E. Coli* 382 được lưu trữ ở The Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, FGUP GosNII Genetika, 1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Nga) vào ngày 10, tháng 4, năm 2000 với mã số nhận biết đặc hiệu là VKPM B-7926.

Ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-arginin và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm chủng có đặc tính kháng đối với chất tương tự axit amin, và chủng tương tự khác. Ví dụ về chủng này bao gồm chủng *E. Coli* đột biến có đặc tính kháng đối với α -metylmethionin, p-flophenylalanin, D-arginin, arginin hydroxamat, S-(2-aminoetyl)-xystein, α -metylserin, β -2-thienylalanin, hoặc sulfaguanidin (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-106598).

Ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-arginin và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm vi khuẩn coryneform này làm chủng bị thiếu hụt về ArgR, mà là gen kìm hãm arginin (US2002-0045223A), và chủng trong đó hoạt tính glutamin synthetaza được làm tăng (US2005-0014236A).

Ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-arginin và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm chủng đột biến của vi khuẩn coryneform, chủng đột biến có đặc tính kháng đối với chất tương tự axit amin hoặc chủng tương tự khác. Ví dụ về chủng này bao gồm, ví dụ, chủng có đặc tính kháng đối với 2-thiazolealanin và còn có hiện tượng dinh dưỡng thụ động đối với L-histidin, L-prolin, L-threonin, L-isoleuxin, L-metionin, hoặc L-tryptophan (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 54-44096); chủng kháng đối với axit ketomalonic, axit flomalonic, hoặc axit monofloaxetic (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 57-18989); chủng kháng đối với argininol (Công bố Patent Nhật số 62-24075); chủng kháng đối với X-guanidin (X là mạch béo hoặc dẫn xuất của chúng, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2-186995); và chủng kháng đối với arginin hydroxamat và 6-azauraxil (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 57-150381). Ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-arginin bao gồm chủng sau đây.

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11169 (FERM BP-6892)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12092 (FERM BP-6906)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11336 (FERM BP-6893)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11345 (FERM BP-6894)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12430 (FERM BP-2228)

<Vi khuẩn sản xuất L-Xitrulin và vi khuẩn sản xuất L-ornithin >

L-xitrulin và L-ornithin là các chất trung gian của con đường sinh tổng hợp của L-arginin. Do đó, ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-xitrulin và/hoặc L-ornithin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym sinh tổng hợp L-arginin. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, N-axetylglutamat synthaza (*argA*), N-axetylglutamat kinaza (*argB*), N-axetylglutamyl phosphat reductaza (*argC*),

axetylornithin transaminaza (*argD*), axetylornithin deaxetylaza (*argE*), ornithin carbamoyl transferaza (*argF*, *argI*), ornithin axetyl transferaza (*argJ*), và carbamoyl phosphat synthetaza (*carAB*), đối với L-xitrulin. Ngoài ra, ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, N-axetylglutamat synthaza (*argA*), N-axetylglutamat kinaza (*argB*), N-axetylglutamyl phosphat reductaza (*argC*), axetylornithin transaminaza (*argD*), axetylornithin deaxetylaza (*argE*), và ornithin axetyl transferaza (*argJ*), đối với L-ornithin.

Vi khuẩn sản xuất L-xitrulin có thể thu được một cách dễ dàng từ, ví dụ, vi khuẩn L-arginin như chủng *E. Coli* 382 (VKPM B-7926) bằng cách làm giảm hoạt tính của argininosuccinat synthetaza được mã hóa bằng gen *argG*. Ngoài ra, L-ornithin vi khuẩn sản xuất có thể thu được một cách dễ dàng từ, ví dụ, vi khuẩn L-arginin như chủng *E. Coli* 382 (VKPM B-7926) bằng cách làm giảm hoạt tính của ornithin carbamoyl transferaza được mã hóa bằng gen *argF* và *argI*.

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-xitrulin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, chủng thuộc chi *Escherichia*, như chủng *E. Coli* 237/pMADS11, 237/pMADS12, và 237/pMADS13, mà có N-axetylglutamat synthaza đột biến (Patent Nga số 2,215,783, Patent Mỹ số US 6,790,647, và EP1170361B1), chủng *E. Coli* 333 (VKPM B-8084) và 374 (VKPM B-8086), mà có carbamoyl phosphat synthetaza kháng đối với sự ức chế ngược (Patent Nga số 2,264,459), và chủng *E. Coli* có hoạt tính được làm tăng của α -ketoglutarat synthaza và có hoạt tính được biến đổi của ferredoxin NADP⁺ reductaza, pyruvat synthaza, và/hoặc α -ketoglutarat dehydrogenaza (EP2133417A).

<Vi khuẩn sản xuất L-Histidin >

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-histidin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym sinh tổng hợp L-histidin. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, ATP phosphoribosyltransferaza (*hisG*), phosphoribosyl AMP cyclohydrolaza (*hisI*), phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolaza (*hisI*), phosphoribosylformimino-5-aminoimidazol carboxamid ribotit isomeraza (*hisA*), amidotransferaza (*hisH*), histidinol phosphat aminotransferaza (*hisC*), histidinol phosphataza (*hisB*), và histidinol dehydrogenaza (*hisD*).

Trong số các enzym này, enzym sinh tổng hợp L-histidin được mã hóa bằng *hisG* và *hisBHAFI* đã biết là bị ức chế bởi L-histidin. Do đó, khả năng sản xuất L-histidin có thể được tạo ra hoặc được làm tăng bằng cách, ví dụ, bổ sung đột biến để

tạo ra đặc tính kháng đối với sự ức chế ngược vào trong gen mã hóa ATP phosphoribosyltransferaza (*hisG*) (Patent Nga số 2,003,677 và 2,119,536).

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-histidin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, chủng thuộc chi *Escherichia*, như chủng *E. Coli* 24 (VKPM B-5945, RU2003677), *E. Coli* NRRL B-12116 đến B-12121 (Patent Mỹ số US 4,388,405), *E. Coli* H-9342 (FERM BP-6675) và H-9343 (FERM BP-6676, Patent Mỹ số US 6,344,347), *E. Coli* H-9341 (FERM BP-6674, EP1085087), *E. Coli* AI80/pFM201 (Patent Mỹ số US 6,258,554), *E. Coli* FERM P-5038 và FERM P-5048, mà được bổ sung với vectơ mang ADN mã hóa enzym sinh tổng hợp L-histidin (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 56-005099), chủng *E. Coli* được bổ sung với gen để vận chuyển axit amin (EP1016710A), và chủng *E. Coli* 80, mà được tạo ra với đặc tính kháng đối với sulfaguanidin, DL-1,2,4-triazol-3-alanin, và streptomycin (VKPM B-7270, Patent Nga số 2119536).

<Vi khuẩn sản xuất L-xystein>

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-xystein bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym sinh tổng hợp L-xystein. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, serin axetyltransferaza (*cysE*) và 3-phosphoglyxerat dehydrogenaza (*serA*). Hoạt tính serin axetyltransferaza có thể được làm tăng bằng cách, ví dụ, bổ sung gen *cysE* đột biến mã hóa serin axetyltransferaza đột biến kháng đối với sự ức chế ngược bởi xystein vào trong vi khuẩn. Serin axetyltransferaza đột biến này được bộc lộ trong, ví dụ, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 11-155571 và Công bố đơn Mỹ số US2005-0112731A. Ngoài ra, hoạt tính 3-phosphoglyxerat dehydrogenaza có thể được làm tăng bằng cách, ví dụ, bổ sung gen *serA* đột biến mã hóa 3-phosphoglyxerat dehydrogenaza đột biến kháng đối với sự ức chế ngược bởi serin vào trong vi khuẩn. 3-phosphoglyxerat dehydrogenaza đột biến này được bộc lộ trong, ví dụ, Patent Mỹ số US 6,180,373.

Ngoài ra, ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-xystein còn bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm giảm của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym mà xúc tác cho phản ứng phân nhánh từ con đường tổng hợp của L-xystein để tạo ra hợp chất khác với L-xystein. Ví dụ về enzym này bao gồm, ví dụ, enzym tham gia vào trong quá trình phân hủy L-xystein. Ví dụ về enzym tham gia vào trong quá trình phân hủy L-xystein bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở,

xystathionin- β -lyaza (*metC*, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 11-155571; Chandra et al., Biochemistry, 21 (1982) 3064-3069), tryptophanaza (*tnaA*, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2003-169668; Austin Newton et al., J. Biol. Chem., 240 (1965) 1211-1218), O-axetylserin sulphydrylaza B (*cysM*, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2005-245311), sản phẩm gen *malY* (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2005-245311), sản phẩm gen *d0191* của *Pantoea ananatis* (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2009-232844), và xystein desulphydraza (*aecD*, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2002-233384).

Ngoài ra, ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-xystein còn bao gồm, ví dụ, phương pháp làm tăng hệ bài tiết L-xystein, và phương pháp làm tăng hệ vận chuyển sulfat/thiosulfat. Ví dụ về protein của hệ bài tiết L-xystein bao gồm protein được mã hóa bằng gen *ydeD* (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2002-233384), protein được mã hóa bằng gen *yfiK* (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2004-49237), protein được mã hóa bằng gen *emrAB*, *emrKY*, *yoiJH*, *acrEF*, *bcr*, và *cusA* (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2005-287333), và protein được mã hóa bằng gen *yeaS* (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2010-187552). Ví dụ về protein của hệ vận chuyển sulfat/thiosulfat bao gồm protein được mã hóa bằng cụm gen *cysPTWAM*.

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-xystein và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, *E. Coli* JM15 được biến nạp với các gen đẳng vị *cysE* khác nhau mã hóa serin axetyltransferaza kháng ngược (Patent Mỹ số US 6,218,168, Công bố đơn Nga số 2003121601), *E. Coli* W3110 có gen được biểu hiện quá mức mã hóa protein thích hợp cho sự tiết chất gây độc tế bào (Patent Mỹ số US 5,972,663), chủng *E. Coli* có hoạt tính xystein desulfohydraza được làm giảm (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 11-155571), và *E. Coli* W3110 có hoạt tính được làm tăng của chất điều hòa quá trình phiên mã dương tính đối với đơn vị điều hòa xystein được mã hóa bằng gen *cysB* (WO01/27307A1).

Ngoài ra, ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-xystein bao gồm vi khuẩn coryneform có serin axetyltransferaza được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi L-xystein, nhờ đó thể hiện được làm tăng hoạt tính serin axetyltransferaza nội bào (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2002-233384).

<Vi khuẩn sản xuất L-Serin>

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-serin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym sinh tổng hợp L-serin. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, 3-phosphoglyxerat dehydrogenaza (*serA*), phosphoserin transaminaza (*serC*), và

phosphoserin phosphatase (*serB*) (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 11-253187). Hoạt tính 3-phosphoglycerat dehydrogenase có thể được làm tăng bằng, ví dụ, bổ sung gen *serA* đột biến mã hóa 3-phosphoglycerat dehydrogenase đột biến kháng đối với sự ức chế ngược bởi L-serin vào trong vi khuẩn. 3-phosphoglycerat dehydrogenase đột biến được bộc lộ trong, ví dụ, Patent Mỹ số US 6,180,373.

Ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-Serin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, vi khuẩn coryneform kháng đối với azaserin hoặc β -(2-thienyl)-DL-alanin và bị thiếu hụt về khả năng phân hủy L-serin (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 10-248588). Ví dụ cụ thể về vi khuẩn này coryneform bao gồm, ví dụ, *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ13324 (FERM P-16128), mà kháng đối với azaserin và bị thiếu hụt về khả năng phân hủy L-serin, và *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ13325 (FERM P-16129), mà kháng đối với β -(2-thienyl)-DL-alanin và bị thiếu hụt về khả năng phân hủy L-serin (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 10-248588).

<Vi khuẩn sản xuất L-Metionin>

Ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-metionin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm chủng thụ động dinh dưỡng L-threonin và chủng đột biến kháng đối với norleuxin (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2000-139471). Ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-metionin và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm chủng bao gồm homoserin transsuccinylase đột biến kháng đối với sự ức chế ngược bởi L-metionin (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2000-139471, US2009-0029424A). Vì L-metionin được sinh tổng hợp thông qua L-cysteine làm chất trung gian, khả năng sản xuất L-metionin có thể còn được nâng cao bằng cách nâng cao khả năng sản xuất L-cysteine (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2000-139471, US2008-0311632A).

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-metionin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, *E. Coli* AJ11539 (NRRL B-12399), *E. Coli* AJ11540 (NRRL B-12400), *E. Coli* AJ11541 (NRRL B-12401), *E. Coli* AJ11542 (NRRL B-12402, Patent Anh số 2075055), chủng *E. Coli* 218 (VKPM B-8125, Patent Nga số 2209248) và chủng 73 (VKPM B-8126, Patent Nga số 2215782), mà kháng đối với norleuxin, mà là chất tương tự của L-metionin, và *E. Coli* AJ13425 (FERMP-16808, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2000-139471). Chủng AJ13425 là chủng thụ động dinh dưỡng L-threonin được tạo ra từ *E. Coli* W3110, trong đó gen kìm hãm metionin được loại bỏ, hoạt tính S-adenosylmetionin synthetase nội bào bị làm giảm, và hoạt tính homoserin transsuccinylase nội bào, hoạt tính cystathionin γ -synthase, và hoạt tính aspartokinase-homoserin dehydrogenase II được làm tăng.

<Vi khuẩn sản xuất L-Leuxin>

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-leuxin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym sinh tổng hợp L-leuxin. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, enzym được mã hóa bằng gen của operon *leuABCD*. Ngoài ra, để làm tăng hoạt tính của enzym này, ví dụ, gen *leuA* đột biến mã hóa isopropyl maleat synthaza được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi L-leuxin (Patent Mỹ số US 6,403,342) có thể được ưu tiên sử dụng.

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-leuxin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, chủng thuộc chi *Escherichia*, như chủng *E. Coli* kháng đối với leuxin (ví dụ, chủng 57 (VKPM B-7386, Patent Mỹ số US 6,124,121)), chủng *E. Coli* kháng đối với chất tương tự leuxin như β -2-thienylalanin, 3-hydroxyleuxin, 4-azaleuxin, và 5,5,5-trifloleuxin (Công bố Patent Nhật (Kokoku) số 62-34397 và Công bố đơn Nhật (Kokai) số 8-70879), *E. Coli* là chủng thu được bằng kỹ thuật biến đổi gen được mô tả trong WO96/06926, và *E. Coli* H-9068 (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 8-70879).

Ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-leuxin bao gồm, ví dụ, *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ3718 (FERM P-2516), mà kháng đối với 2-thiazol alanin và β -hydroxyleuxin và dinh dưỡng thụ động đối với isoleuxin và metionin.

<Vi khuẩn sản xuất L-Isoleuxin>

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-isoleuxin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều enzym được chọn từ enzym sinh tổng hợp L-isoleuxin. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, threonin deaminaza và axetohydroxy axit synthaza (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2-458, EP0356739A, Patent Mỹ số US 5,998,178).

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-isoleuxin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, vi khuẩn *Escherichia* như chủng đột biến có đặc tính kháng đối với 6-dimethylaminopurin (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 5-304969), chủng đột biến có đặc tính kháng đối với chất tương tự isoleuxin như thiaisoleuxin và isoleuxin hydroxamat, và chủng đột biến có đặc tính kháng đối với chất tương tự isoleuxin này và còn có đặc tính kháng đối với DL-etionin và/hoặc arginin hydroxamat (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 5-130882).

Ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-isoleuxin bao gồm, ví dụ, vi khuẩn coryneform trong đó gen *brnE* mã hóa protein tiết axit amin mạch nhánh được khuếch đại (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2001-169788), vi khuẩn coryneform trong đó khả năng sản xuất L-isoleuxin được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào trần với vi khuẩn sản xuất L-Lysin (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 62-74293), vi khuẩn coryneform trong đó homoserin dehydrogenaza được làm tăng (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 62-91193), chủng kháng threonin hydroxamat (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 62-195293), chủng kháng axit α -ketomalonic (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 61-15695), chủng kháng metyllysine (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 61-15696), và *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ12149 (FERM BP-759, Patent Mỹ số US 4,656,135).

<Vi khuẩn sản xuất L-Valin>

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-valin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym sinh tổng hợp L-valin. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, enzym được mã hóa bằng gen của operon *ilvGMEDA* và enzym được mã hóa bằng operon *ilvBNC*. Gen *ilvBN* mã hóa axetohydroxy axit synthaza, và gen *ilvC* mã hóa isomeroreductaza (WO00/50624). Sự biểu hiện của operon *ilvGMEDA* và operon *ilvBNC* bị ức chế (bị làm giảm) bằng L-valin, L-isoleuxin, và/hoặc L-leuxin. Do đó, để làm tăng hoạt tính của enzym này, tốt hơn nếu việc ức chế của sự biểu hiện bởi L-valin được sản xuất được giải phóng bằng cách loại bỏ hoặc biến đổi vùng cần cho việc làm giảm. Ngoài ra, threonin deaminaza được mã hóa bằng gen *ilvA* là enzym mà xúc tác phản ứng khử amin của L-threonin tạo ra axit 2-ketobutyric, mà là bước hạn chế tỷ lệ của hệ sinh tổng hợp L-isoleuxin. Do đó, đối với quá trình sản xuất L-valin, tốt hơn nếu gen *ilvA*, ví dụ, bị phá vỡ, và do đó hoạt tính threonin deaminaza bị làm giảm.

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-valin còn bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm giảm của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ enzym mà xúc tác cho phản ứng phân nhánh từ con đường tổng hợp của L-valin để tạo ra hợp chất khác với L-valin. Ví dụ về enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, threonin dehydrataza tham gia vào trong quá trình tổng hợp L-leuxin, và enzym tham gia vào trong quá trình tổng hợp axit D-pantothenic (WO00/50624).

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-valin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, chủng *E. Coli* được biến đổi để biểu hiện quá mức operon *ilvGMEDA*

(Patent Mỹ số US 5,998,178).

Ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-valin và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm chủng đột biến có đột biến trong amino-axyl t-ARN synthetaza (Patent Mỹ số US 5,658,766). Ví dụ về chủng này bao gồm, ví dụ, *E. Coli* VL1970, mà có đột biến trong gen *ileS* mã hóa isoleuxin t-ARN synthetaza. *E. Coli* VL1970 được lưu trữ ở The Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, FGUP GosNII Genetika, 1 Dorozhny Proezd, 1 Moscow 117545, Nga) vào ngày 24, tháng 6, năm 1988 với mã số nhận biết đặc hiệu là VKPM B-4411, Ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-valin và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm chủng đột biến cần axit lipoic để phát triển và/hoặc thiếu hụt H^+ -ATPaza (WO96/06926).

Ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-valin và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm chủng kháng đối với axit amin chất tương tự hoặc vi khuẩn tương tự khác. Ví dụ về chủng này bao gồm, ví dụ, chủng vi khuẩn coryneform mà là dinh dưỡng thụ động đối với L-isoleuxin và L-metionin, và kháng đối với D-riboza, purin ribonucleosit, hoặc pyrimidin ribonucleosit, và có khả năng sản xuất L-valin (FERM P-1841, FERM P-29) (Công bố Patent Nhật số 53-025034), chủng vi khuẩn coryneform kháng đối với polyketid (FERM P-1763, FERM P-1764) (Công bố Patent Nhật số 06-065314), và chủng vi khuẩn coryneform kháng đối với L-valin trong môi trường bao gồm axit axetic làm nguồn cacbon duy nhất và nhạy với chất tương tự axit pyruvic (axit flopyruvic v.v.) trong môi trường bao gồm glucoza làm nguồn cacbon duy nhất (FERM BP-3006, BP-3007) (Patent Nhật số 3006929).

<Vi khuẩn sản xuất L-Alanin>

Ví dụ về vi khuẩn sản xuất L-alanin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm vi khuẩn coryneform bị thiếu hụt về H^+ -ATPaza (Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001 Nov., 57(4):534-40) và vi khuẩn coryneform trong đó hoạt tính aspartat β -decarboxylaza được làm tăng (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 07-163383).

<Vi khuẩn sản xuất L-Tryptophan, vi khuẩn sản xuất L-phenylalanin, và vi khuẩn sản xuất L-tyrosin >

Ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-tryptophan, khả năng sản xuất L-phenylalanin, và/hoặc khả năng sản xuất L-tyrosin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp L-tryptophan, L-phenylalanin, và/hoặc L-tyrosin.

Ví dụ về enzym thông dụng đối với hệ sinh tổng hợp của các axit amin thơm

này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, 3-deoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat synthaza (*aroG*), 3-dehydroquinat synthaza (*aroB*), shikimat dehydrogenaza (*aroE*), shikimat kinaza (*aroL*), 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza (*aroA*), và chorismat synthaza (*aroC*) (EP763127B). Sự biểu hiện của gen mã hóa các enzym này được kiểm soát bằng gen kìm hãm tyrosin (*tyrR*), và hoạt tính của các enzym này có thể được làm tăng bằng loại bỏ gen *tyrR* (EP763127B).

Ví dụ về enzym sinh tổng hợp L-tryptophan bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, anthranilat synthaza (*trpE*), tryptophan synthaza (*trpAB*), và phosphoglyxerat dehydrogenaza (*serA*). Ví dụ, bằng cách bổ sung ADN bao gồm operon tryptophan, khả năng sản xuất L-tryptophan có thể được tạo ra hoặc được làm tăng. Tryptophan synthaza bao gồm tiểu đơn vị α và β lần lượt được mã hóa bằng gen *trpA* và *trpB*. Vì anthranilat synthaza bị ức chế ngược bởi L-tryptophan, gen mã hóa enzym này được bổ sung với đột biến để khử nhạy đối với sự ức chế ngược có thể được sử dụng để làm tăng hoạt tính của enzym này. Vì phosphoglyxerat dehydrogenaza bị ức chế ngược bởi L-serin, gen mã hóa enzym này được bổ sung với đột biến để khử nhạy đối với sự ức chế ngược có thể được sử dụng để làm tăng hoạt tính enzym này. Ngoài ra, bằng cách làm tăng sự biểu hiện của operon (*ace* operon) bao gồm gen maleat synthaza (*aceB*), gen isoxitrat lyaza (*aceA*), và gen isoxitrat dehydrogenaza kinase/phosphataza (*aceK*), khả năng sản xuất L-tryptophan có thể được tạo ra hoặc được làm tăng (WO2005/103275).

Ví dụ về enzym sinh tổng hợp L-phenylalanin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, chorismat mutaza và prephenat dehydrataza. Chorismat mutaza và prephenat dehydrataza được mã hóa bằng gen *pheA* làm enzym chức năng kép. Vì chorismat mutaza và prephenat dehydrataza bị ức chế ngược bởi L-phenylalanin, gen mã hóa các enzym này được bổ sung với đột biến để khử nhạy đối với sự ức chế ngược có thể được sử dụng để làm tăng hoạt tính của các enzym này.

Ví dụ về enzym sinh tổng hợp L-tyrosin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn một cách cụ thể ở, chorismat mutaza và prephenat dehydrogenaza. Chorismat mutaza và prephenat dehydrogenaza được mã hóa bằng gen *tyrA* làm enzym chức năng kép. Vì chorismat mutaza và prephenat dehydrogenaza bị ức chế ngược bởi L-tyrosin, gen mã hóa các enzym này được bổ sung với đột biến để khử nhạy đối với sự ức chế ngược có thể được sử dụng để làm tăng hoạt tính của các enzym này.

Vi khuẩn sản xuất L-tryptophan, L-phenylalanin, và/hoặc L-tyrosin có thể được biến đổi sao cho quá trình sinh tổng hợp axit amin thơm khác với axit amin thơm đích được làm giảm. Ngoài ra, vi khuẩn sản xuất L-tryptophan, L-phenylalanin,

và/hoặc L-tyrosin có thể được biến đổi sao cho hệ hấp thụ sản phẩm phụ được làm tăng. Ví dụ về sản phẩm phụ bao gồm axit amin thơm khác với axit amin thơm đích. Ví dụ về gen mã hóa hệ hấp thụ sản phẩm phụ này bao gồm, ví dụ, *tnaB* và *mtr*, mà là gen mã hóa hệ hấp thụ L-tryptophan, *pheP*, mà là gen mã hóa hệ hấp thụ L-phenylalanin, và *tyrP*, mà là gen mã hóa hệ hấp thụ L-tyrosin (EP1484410).

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-tryptophan và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, *E. Coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) và JP6015/pMU91 (DSM10123), mà có gen *trpS* đột biến mã hóa tryptophanyl-tARN synthetaza bất hoạt một phần (Patent Mỹ số US 5,756,345), *E. Coli* SV164, mà có gen đồng vị *trpE* mã hóa anthranilat synthaza được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi tryptophan, *E. Coli* SV164 (pGH5), mà có gen đồng vị *serA* mã hóa phosphoglyxerat dehydrogenaza được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi serin và gen đồng vị *trpE* mã hóa anthranilat synthaza được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi tryptophan (Patent Mỹ số US 6,180,373), chủng được bổ sung với operon tryptophan bao gồm gen đồng vị *trpE* mã hóa anthranilat synthaza được khử nhạy đối với sự ức chế ngược bởi tryptophan (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 57-71397 và 62-244382, Patent Mỹ số US 4,371,614), *E. Coli* AGX17(pGX44) (NRRL B-12263) và AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264), mà thiếu hụt tryptophanaza (Patent Mỹ số US 4,371,614), *E. Coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps, mà có khả năng sản xuất phosphoenolpyruvat được làm tăng (WO97/08333, Patent Mỹ số US 6,319,696), và chủng thuộc chi *Escherichia* có hoạt tính được làm tăng của protein được mã hóa bằng gen *yedA* hoặc *yddG* (US2003-0148473A1 và US2003-0157667A1).

Ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-tryptophan bao gồm, ví dụ, *Corynebacterium glutamicum* AJ12118 (FERM BP-478, Patent Nhật số 1681002), mà kháng đối với sulfaguanidin, chủng được bổ sung với operon tryptophan (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 63-240794), và chủng được bổ sung với gen mã hóa shikimat kinaza được tạo ra từ vi khuẩn coryneform (Patent Nhật số 1994749).

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-phenylalanin và chủng gốc để tạo ra chúng bao gồm, ví dụ, *E. Coli* AJ12739 (*tyrA*::Tn10, *tyrR*) (VKPM B-8197), mà bị thiếu hụt về chorismat mutaza-prephenat dehydrogenaza và gen kìm hãm tyrosin (WO03/044191), *E. Coli* HW1089 (ATCC 55371), mà bao gồm gen *pheA34* đột biến mã hóa chorismat mutaza-prephenat dehydrataza được khử nhạy đối với sự ức chế ngược (Patent Mỹ số US 5,354,672), *E. Coli* MWEC101-b (KR8903681), *E. Coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146, và NRRL B-12147 (Patent Mỹ số US 4,407,952). Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-phenylalanin và chủng gốc để tạo

ra chúng còn bao gồm, ví dụ, *E. Coli* K-12 <W3110(tyrA)/pPHAB> (FERM BP-3566), *E. Coli* K-12 <W3110(tyrA)/pPHAD> (FERM BP-12659), *E. Coli* K-12 <W3110(tyrA)/pPHATerm> (FERM BP-12662), và *E. Coli* K-12 AJ12604 <W3110(tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB> (FERM BP-3579), mà bao gồm gen mã hóa chorismat mutaza-prephenat dehydrataza được khử nhạy đối với sự ức chế ngược (EP488424B1). Ví dụ cụ thể về vi khuẩn sản xuất L-phenylalanin và chủng gốc để tạo ra chúng còn bao gồm, ví dụ, chủng thuộc chi *Escherichia* có hoạt tính được làm tăng của protein được mã hóa bằng gen *yedA* hoặc gen *yddG* (US2003-0148473A, US2003-0157667A, WO03/044192).

Ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-phenylalanin bao gồm, ví dụ, chủng *Corynebacterium glutamicum* BPS-13 (FERM BP-1777), K77 (FERM BP-2062), và K78 (FERM BP-2063) (EP331145A, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 02-303495), trong đó hoạt tính phosphoenolpyruvat carboxylaza hoặc pyruvat kinaza được làm giảm, và chủng thụ động dinh dưỡng tyrosin (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 05-049489).

Ví dụ về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-tyrosin bao gồm, ví dụ, *Corynebacterium glutamicum* AJ11655 (FERM P-5836, Công bố Patent Nhật số 2-6517), và *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12081 (FERM P-7249, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 60-70093).

Ngoài ra, ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-axit amin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính được làm tăng để tiết L-axit amin từ tế bào vi khuẩn. Hoạt tính tiết L-axit amin này có thể được làm tăng bằng cách, ví dụ, làm tăng sự biểu hiện gen mã hóa protein chịu trách nhiệm cho việc tiết L-axit amin. Ví dụ về gen mã hóa protein chịu trách nhiệm cho việc tiết các axit amin bao gồm, ví dụ, gen *b2682* (*ygaZ*), gen *b2683* (*ygaH*), gen *b1242* (*yche*), và gen *b3434* (*yhgN*) (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2002-300874).

Ngoài ra, ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-axit amin còn bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho vi khuẩn có hoạt tính hoặc các hoạt tính được làm tăng của một hoặc nhiều protein được chọn từ protein tham gia vào trong quá trình chuyển hóa đường và protein tham gia vào trong quá trình chuyển hóa năng lượng.

Ví dụ về protein tham gia vào trong quá trình chuyển hóa đường bao gồm protein tham gia vào trong quá trình hấp thụ sacarit và enzym hệ thủy phân glucoza. Ví dụ về gen mã hóa protein tham gia vào trong quá trình chuyển hóa đường bao gồm gen glucoza-6-phosphat isomeraza (*pgi*, WO01/02542), gen pyruvat carboxylaza (*pyc*,

WO99/18228, EP1092776A), gen phosphoglucomutaza (*pgm*, WO03/04598), gen fructoza bisphosphat aldolaza (*pfkB*, *fbp*, WO03/04664), gen transaldolaza (*talB*, WO03/008611), gen fumaraza (*fum*, WO01/02545), gen hấp thụ sucroza không PTS (*csc*, EP1149911A), và gen đồng hóa sucroza (operon *scrAB*, Patent Mỹ số US 7,179,623).

Ví dụ về gen mã hóa protein tham gia vào trong quá trình chuyển hóa năng lượng bao gồm gen transhydrogenaza (*pntAB*, Patent Mỹ số US 5,830,716) và gen oxidaza loại bo của sắc tố tế bào (*cyoB*, EP1070376A).

Ngoài ra, ví dụ về phương pháp để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất các chất hữu dụng như L-axit amin bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho hoạt tính của phosphoketolaza được làm tăng (WO2006/016705). Do đó, vi khuẩn theo sáng chế có thể được biến đổi sao cho hoạt tính của phosphoketolaza được làm tăng. Phương pháp này có thể đặc biệt hiệu quả để tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản xuất L-axit amin của họ glutamat như axit L-glutamic. Ví dụ về phosphoketolaza bao gồm D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và fructoza-6-phosphat phosphoketolaza. Một trong số hoạt tính D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và hoạt tính fructoza-6-phosphat phosphoketolaza có thể được làm tăng, hoặc cả hai hoạt tính này có thể được làm tăng.

Thuật ngữ "hoạt tính D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza" đề cập đến hoạt tính đối với việc chuyển hóa xyluloza-5-phosphat thành glyxaldehyt-3-phosphat và axetyl phosphat với việc tiêu thụ axit phosphoric để giải phóng một phân tử H₂O. Hoạt tính này có thể được xác định bằng phương pháp được mô tả bởi Goldberg, M. Và các cộng sự (Methods Enzymol., 9, 515-520, 1996) hoặc phương pháp được mô tả bởi L. Meile (J. Bacteriol., 183:2929-2936, 2001). Ví dụ về D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza bao gồm các enzym của vi khuẩn thuộc chi *Axetobacter*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Thiobacillus*, *Streptococcus*, *metylcoccus*, *Butyrivibrio*, và *Fibrobacter*, và men thuộc chi *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, và *Wingea*. Ví dụ cụ thể về D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và gen mã hóa chúng được bộc lộ trong WO2006/016705.

Thuật ngữ "hoạt tính fructoza-6-phosphat phosphoketolaza" đề cập đến hoạt tính đối với việc chuyển hóa fructoza-6-phosphat thành erythroza-4-phosphat và axetyl phosphat với việc tiêu thụ axit phosphoric để giải phóng một phân tử H₂O. Hoạt tính này có thể được xác định bằng phương pháp được mô tả bởi Racker, E. (Methods Enzymol., 5, 276-280, 1962) hoặc phương pháp được mô tả bởi L. Meile (J. Bacteriol.,

183:2929-2936, 2001). Ví dụ về fructoza-6-phosphat phosphoketolaza bao gồm các enzym của vi khuẩn thuộc chi *Axetobacter*, *Bifidobacterium*, *Clobium*, *Brucella*, *metylococcus*, và *Gardnerella*, và men thuộc chi *Rhodotorula*, *Candida*, và *Saccharomyces*. Ví dụ cụ thể về fructoza-6-phosphat phosphoketolaza và gen mã hóa chúng được bộc lộ trong WO2006/016705.

Cả hai hoạt tính D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và hoạt tính fructoza-6-phosphat phosphoketolaza có thể còn được duy trì bằng một enzym duy nhất (cụ thể là D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza/fructoza-6-phosphat phosphoketolaza).

Trình tự nucleotit của gen phosphoketolaza (gen *xfp*) của *Bifidobacterium longum* JCM1217 và trình tự axit amin phosphoketolaza được mã hóa bằng gen này (protein Xfp) lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 13 và 14.

Gen và protein được sử dụng để nhân giống vi khuẩn sản xuất L-axit amin có thể có, ví dụ, trình tự nucleotit và trình tự axit amin của gen và protein đã biết, như các trình tự được minh họa trên đây. Ngoài ra, gen và protein được sử dụng để nhân giống vi khuẩn sản xuất L-axit amin có thể là biến thể bảo thủ của gen và protein đã biết, như các biến thể bảo thủ được minh họa trên đây lần lượt. Cụ thể hơn, ví dụ, mỗi gen được sử dụng để nhân giống vi khuẩn sản xuất L-axit amin có thể là gen mã hóa protein có trình tự axit amin của protein đã biết, nhưng bao gồm sự thế, sự loại bỏ, sự chèn, hoặc sự bổ sung một hoặc một số gốc axit amin ở một hoặc một số vị trí, miễn là chức năng ban đầu của chúng được duy trì. Đối với biến thể bảo thủ của gen và protein, phần mô tả liên quan đến biến thể bảo thủ của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và fructokinaza và gen mã hóa chúng được mô tả sau đây có thể được sử dụng, với các thay đổi cần thiết.

<1-2> Làm tăng hoạt tính chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính fructokinaza

Vi khuẩn theo sáng chế được biến đổi sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng. Vi khuẩn theo sáng chế được biến đổi cụ thể hơn sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng so với chủng không được biến đổi. Vi khuẩn theo sáng chế có thể thu được bằng cách biến đổi vi khuẩn có khả năng sản xuất L-axit amin sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng. Vi khuẩn theo sáng chế có thể còn thu được bằng cách biến đổi vi khuẩn sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng, và sau đó tạo ra hoặc làm tăng khả năng sản

xuất L-axit amin. Vi khuẩn theo sáng chế có thể còn là vi khuẩn mà có được khả năng sản xuất L-axit amin bằng cách được biến đổi sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng. Vi khuẩn theo sáng chế có thể có, nếu cần, các đặc tính này được tạo ra bởi vi khuẩn sản xuất L-axit amin như được mô tả trên đây, cũng như được biến đổi sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng. Ví dụ, vi khuẩn theo sáng chế có thể được biến đổi sao cho hoạt tính của phosphoketolaza được làm tăng. Ví dụ, cụ thể hơn, trong vi khuẩn *Pantoea*, việc kết hợp làm tăng hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của fructokinaza với việc làm tăng hoạt tính của phosphoketolaza, như sự bổ sung gen *xfp*, có thể tạo ra tác dụng hiệp đồng trong việc làm nâng cao trong quá trình sản xuất axit L-glutamic. Sự biến đổi để tạo cấu trúc vi khuẩn theo sáng chế có thể được thực hiện trong thứ tự tùy ý.

Bằng cách biến đổi vi khuẩn sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng, khả năng sản xuất L-axit amin của vi khuẩn có thể được nâng cao, và cụ thể là, quá trình sản xuất L-axit amin bằng cách sử dụng vi khuẩn này có thể được làm tăng. Cụ thể hơn, bằng cách biến đổi vi khuẩn sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng, khả năng sản xuất L-axit amin của vi khuẩn dưới điều kiện sử dụng fructoza làm nguồn cacbon có thể được nâng cao, và cụ thể là, quá trình sản xuất L-axit amin bằng cách sử dụng vi khuẩn này có thể được làm tăng.

Sau đây, chất mang hấp thụ fructoza không PTS và fructokinaza, và gen mã hóa chúng sẽ được mô tả chi tiết hơn.

Thuật ngữ "chất mang hấp thụ fructoza không PTS" đề cập đến protein có hoạt tính hấp thụ fructoza không PTS. Thuật ngữ "hoạt tính hấp thụ fructoza không PTS" đề cập đến hoạt tính hấp thụ fructoza từ bên ngoài tế bào vào trong tế bào không thông qua hệ phosphotransferaza (Phosphotransferase System - PTS). Thuật ngữ "hệ phosphotransferaza (PTS)" đề cập đến hệ hấp thụ sacarit mà hấp thụ sacarit đồng thời phosphoryl hóa nó. Ví dụ, fructoza được hấp thụ thông qua PTS ở dạng fructoza-1-phosphat. Cụ thể là, thuật ngữ "hoạt tính hấp thụ fructoza không PTS" có thể đề cập đến, cụ thể hơn, hoạt tính hấp thụ fructoza từ bên ngoài tế bào vào trong tế bào mà không cần phosphoryl hóa fructoza, hoặc nhiều hơn cụ thể hơn, hoạt tính hấp thụ fructoza từ bên ngoài tế bào vào trong tế bào mà không cần phosphoryl hóa vị trí số 1 của fructoza. Gen mã hóa chất mang hấp thụ fructoza không PTS còn được gọi là "gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS".

Ví dụ về gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS bao gồm gen *fucP*.

Protein (chất mang hấp thụ fructoza không PTS) được mã hóa bằng gen *fucP* còn được gọi là "Protein *FucP*". Protein *FucP* còn được gọi là L-fucoza permeaza, mà là chất mang hấp thụ fucoza, đồng thời nó còn có hoạt tính hấp thụ fructoza. Hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS có thể được làm tăng bằng, ví dụ, làm tăng sự biểu hiện của gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS. Cụ thể là, thuật ngữ "hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS được làm tăng" có thể có nghĩa là, ví dụ, sự biểu hiện của gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS được làm tăng. Thuật ngữ "hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không PTS được làm tăng" có thể còn có nghĩa là, cụ thể hơn, ví dụ, sự biểu hiện gen *fucP* được làm tăng.

Thuật ngữ "fructokinaza" đề cập đến protein có hoạt tính fructokinaza. Thuật ngữ "hoạt tính fructokinaza" đề cập đến hoạt tính xúc tác cho phản ứng phosphoryl hóa vị trí số 6 của fructoza để tạo ra fructoza-6-phosphat (EC 2.7.1.4). Chất cho nhóm phosphat như ATP có thể được sử dụng đối với quá trình phosphoryl hóa fructoza bằng fructokinaza. Gen mã hóa fructokinaza còn được gọi là "gen fructokinaza".

Ví dụ về gen fructokinaza bao gồm gen *frk*. Gen *frk* còn được gọi là gen *mak*, gen *scrK*, gen *sacK*, gen *cscK*, v.v. Protein (fructokinaza) được mã hóa bằng gen *frk* còn được gọi là "protein Frk". Hoạt tính của fructokinaza có thể được làm tăng bằng cách, ví dụ, làm tăng sự biểu hiện của gen fructokinaza. Cụ thể là, thuật ngữ "hoạt tính của fructokinaza được làm tăng" có thể có nghĩa là, ví dụ, sự biểu hiện của gen fructokinaza được làm tăng. Thuật ngữ "hoạt tính của fructokinaza được làm tăng" có thể còn có nghĩa là, cụ thể hơn, ví dụ, sự biểu hiện gen *frk* được làm tăng.

Ví dụ về gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS và gen fructokinaza bao gồm gen của các sinh vật như vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae*, vi khuẩn coryneform, và vi khuẩn lactic axit. Trình tự nucleotit của gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS và gen fructokinaza được tạo ra từ các sinh vật và trình tự axit amin của chất mang hấp thụ fructoza không PTS và fructokinaza được mã hóa do đó có thể thu được từ, ví dụ, cơ sở dữ liệu công khai như NCBI. Ví dụ cụ thể về gen *fucP* bao gồm, ví dụ, gen *fucP* của *Corynebacterium ammoniagen* và gen *fucP* của *Pantoea ananatis*. Trình tự nucleotit của gen *fucP* của *C. ammoniagen* ATCC 6872 và trình tự axit amin của protein được mã hóa bằng gen này lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 26 và 27. Trình tự nucleotit của gen *fucP* của *P. ananatis* AJ13355 và trình tự axit amin của protein được mã hóa bằng gen này lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 28 và 29. Ví dụ cụ thể về gen *frk* bao gồm, ví dụ, gen *frk* của *Bifidobacterium longum* và *frk* (*mak*) và gen *frk* (*scrK*) của *Pantoea ananatis*. Trình tự nucleotit của gen *frk* của *B. Longum* JCM1217 và trình tự axit amin của protein được mã hóa bằng gen này lần

lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 30 và 31. Trình tự nucleotit của gen *frk* (*mak*) của *P. ananatis* AJ13355 và trình tự axit amin của protein được mã hóa bằng gen này lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 32 và 33. Trình tự nucleotit của gen *frk* (*scrK*) của *P. ananatis* AJ13355 và trình tự axit amin của protein được mã hóa bằng gen này lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 34 và 35. Cụ thể là, gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS có thể là, ví dụ, gen có trình tự nucleotit của gen bất kỳ trong số các gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS được minh họa trên đây, như trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 26 hoặc 28. Ngoài ra, chất mang hấp thụ fructoza không PTS có thể là, ví dụ, protein có trình tự axit amin của chất mang bất kỳ trong số các chất mang hấp thụ fructoza không PTS được minh họa trên đây, như trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 27 hoặc 29. Ngoài ra, gen fructokinaza có thể là, ví dụ, gen có trình tự nucleotit của gen bất kỳ trong số các gen fructokinaza được minh họa trên đây, như trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 30, 32, hoặc 34. Ngoài ra, fructokinaza có thể là, ví dụ, protein có trình tự axit amin của fructokinaza bất kỳ trong số các fructokinaza được minh họa trên đây, như trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 31, 33, hoặc 35. Thuật ngữ "gen hoặc protein có nucleotit hoặc trình tự axit amin" nghĩa là gen hoặc protein chứa nucleotit hoặc trình tự axit amin này trừ khi được chỉ ra theo cách cụ thể khác, và còn bao gồm các trường hợp trong đó gen hoặc protein bao gồm nucleotit hoặc trình tự axit amin này.

Gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS có thể là biến thể của gen bất kỳ trong số các gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS được minh họa trên đây (ví dụ, gen có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 26 hoặc 28), miễn là chức năng ban đầu của chúng được duy trì. Tương tự, chất mang hấp thụ fructoza không PTS có thể là biến thể của chất mang bất kỳ trong số các chất mang hấp thụ fructoza không PTS được minh họa trên đây (ví dụ, protein có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 27 hoặc 29), miễn là chức năng ban đầu của chúng được duy trì. Ngoài ra, gen fructokinaza có thể là biến thể của gen bất kỳ trong số các gen fructokinaza được minh họa trên đây (ví dụ, gen có trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 30, 32, hoặc 34), miễn là chức năng ban đầu của chúng được duy trì. Tương tự, fructokinaza có thể là biến thể của fructokinaza bất kỳ trong số các fructokinaza được minh họa trên đây (ví dụ, protein có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 31, 33, hoặc 35), miễn là chức năng ban đầu của chúng được duy trì. Biến thể này mà duy trì chức năng ban đầu của chúng còn được gọi là "biến thể bảo thủ". Thuật ngữ "gen *fucP*" và "gen *frk*" không chỉ bao gồm gen *fucP* và gen *frk* lần lượt được minh họa trên đây, mà còn bao gồm biến thể bảo thủ của chúng. Tương

tự, thuật ngữ "protein *FucP*" và "protein *Frk*" không chỉ bao gồm protein *FucP* và protein *frk* lần lượt được minh họa trên đây, mà còn bao gồm biến thể bảo thủ của chúng. Ví dụ về biến thể bảo thủ bao gồm, ví dụ, dạng tương đồng và dạng được biến đổi nhân tạo của gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS, gen fructokinaza, chất mang hấp thụ fructoza không PTS, và fructokinaza được minh họa trên đây.

Thuật ngữ "chức năng ban đầu được duy trì" nghĩa là biến thể của gen hoặc protein có chức năng (như hoạt tính hoặc đặc tính) tương ứng với chức năng (như hoạt tính hoặc đặc tính) của gen hoặc protein ban đầu. Thuật ngữ "chức năng ban đầu được duy trì" được sử dụng đối với gen nghĩa là biến thể của gen mã hóa protein mà duy trì chức năng ban đầu. Cụ thể là, thuật ngữ "chức năng ban đầu được duy trì" được sử dụng đối với gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS nghĩa là biến thể của gen mã hóa protein có hoạt tính hấp thụ fructoza không PTS. Ngoài ra, thuật ngữ "chức năng ban đầu được duy trì" được sử dụng đối với chất mang hấp thụ fructoza không PTS nghĩa là biến thể của protein có hoạt tính hấp thụ fructoza không PTS. Ngoài ra, thuật ngữ "chức năng ban đầu được duy trì" được sử dụng đối với gen fructokinaza nghĩa là biến thể của gen mã hóa protein có hoạt tính fructokinaza. Ngoài ra, thuật ngữ "chức năng ban đầu được duy trì" được sử dụng đối với fructokinaza nghĩa là biến thể của protein có hoạt tính fructokinaza.

Hoạt tính hấp thụ fructoza không PTS của protein có thể được xác định bằng cách, ví dụ, ủ tế bào vi khuẩn biểu hiện protein với fructoza, và xác định lượng hấp thụ phụ thuộc vào protein của fructoza vào trong tế bào.

Hoạt tính fructokinaza của protein có thể được xác định bằng cách, ví dụ, ủ protein với cơ chất (cụ thể là fructoza) với sự có mặt của ATP, và xác định lượng tạo thành phụ thuộc vào protein và cơ chất của fructoza-6-phosphat.

Sau đây, ví dụ về biến thể bảo thủ sẽ được mô tả chi tiết hơn.

Dạng tương đồng của gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc gen fructokinaza hoặc dạng tương đồng của chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc fructokinaza có thể thu được một cách dễ dàng từ cơ sở dữ liệu công khai bằng cách, ví dụ, tra cứu BLAST hoặc tra cứu FASTA bằng cách sử dụng trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nucleotit của gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc gen fructokinaza được minh họa trên đây hoặc trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin của chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc fructokinaza được minh họa trên đây làm trình tự tra cứu. Ngoài ra, dạng tương đồng của gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc gen fructokinaza có thể thu được bằng, ví dụ, PCR bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể các sinh vật khác nhau làm mẫu, và oligonucleotit được

điều chế trên cơ sở của trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nucleotit của các gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc gen fructokinaza đã biết làm đoạn môi.

Gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc gen fructokinaza có thể là gen mã hóa protein có trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin trên đây (ví dụ, trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 27 hoặc 29 đối với chất mang hấp thụ fructoza không PTS, hoặc trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 31, 33, hoặc 35 đối với fructokinaza), mà còn bao gồm sự thế, sự loại bỏ, sự chèn, và/hoặc sự bổ sung một hoặc một số gốc axit amin ở một hoặc một số vị trí, miễn là chức năng ban đầu được duy trì. Ví dụ, đầu cuối N và/hoặc đầu cuối C của protein được mã hóa có thể được kéo dài hoặc được làm ngắn lại. Mặc dù số được thể hiện bằng thuật ngữ "một hoặc một số" được mô tả trên đây có thể khác nhau phụ thuộc vào vị trí của gốc axit amin trong cấu trúc ba chiều của protein hoặc loại gốc axit amin, cụ thể hơn, nó là, ví dụ, 1 đến 50, 1 đến 40, hoặc 1 đến 30, tốt hơn là 1 đến 20, tốt hơn nữa là 1 đến 10, tốt hơn nữa là 1 đến 5, đặc biệt tốt hơn là 1 đến 3.

Sự thế, sự loại bỏ, sự chèn, và/hoặc sự bổ sung một hoặc một số gốc axit amin trên đây là đột biến bảo thủ mà duy trì chức năng bình thường của protein. Ví dụ đặc trưng về đột biến bảo thủ là sự thế bảo thủ. Sự thế bảo thủ là đột biến trong đó sự thế xảy ra qua lại trong số các Phe, Trp, và Tyr, nếu vị trí thế là axit amin thơm; trong số Leu, Ile, và Val, nếu nó là axit amin kỵ nước; giữa Gln và Asn, nếu nó là axit amin phân cực; trong số Lys, Arg, và His, nếu nó là axit amin bazơ; giữa Asp và Glu, nếu nó là axit amin có tính axit; và giữa Ser và Thr, nếu nó là axit amin có nhóm hydroxyl. Ví dụ về sự thế được xem là sự thế bảo thủ bao gồm, cụ thể hơn, sự thế của Ser hoặc Thr đối với Ala, sự thế của Gln, His, hoặc Lys đối với Arg, sự thế của Glu, Gln, Lys, His, hoặc Asp đối với Asn, sự thế của Asn, Glu, hoặc Gln đối với Asp, sự thế của Ser hoặc Ala đối với Cys, sự thế của Asn, Glu, Lys, His, Asp, hoặc Arg đối với Gln, sự thế của Gly, Asn, Gln, Lys, hoặc Asp đối với Glu, sự thế của Pro đối với Gly, sự thế của Asn, Lys, Gln, Arg, hoặc Tyr đối với His, sự thế của Leu, met, Val, hoặc Phe đối với Ile, sự thế của Ile, Met, Val, hoặc Phe đối với Leu, sự thế của Asn, Glu, Gln, His, hoặc Arg đối với Lys, sự thế của Ile, Leu, Val, hoặc Phe đối với Met, sự thế của Trp, Tyr, Met, Ile, hoặc Leu đối với Phe, sự thế của Thr hoặc Ala đối với Ser, sự thế của Ser hoặc Ala đối với Thr, sự thế của Phe hoặc Tyr đối với Trp, sự thế của His, Phe, hoặc Trp đối với Tyr, và sự thế của Met, Ile, hoặc Leu đối với Val. Ngoài ra, sự thế, sự loại bỏ, sự chèn, hoặc sự bổ sung gốc axit amin này như được mô tả trên đây bao gồm đột biến tự nhiên do sự khác nhau của cá thể, hoặc sự khác nhau của loài của sinh vật mà từ đó gen được tạo ra (đột biến hoặc biến thể).

Gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc gen fructokinaza có thể là gen mã hóa protein có trình tự axit amin có sự tương đồng, ví dụ, 50% hoặc nhiều hơn, 65% hoặc nhiều hơn, hoặc 80% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 95% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 97% hoặc nhiều hơn, đặc biệt tốt hơn là 99% hoặc nhiều hơn, với tổng trình tự axit amin của trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin trên đây, miễn là chức năng ban đầu được duy trì. Trong bản mô tả này, "sự tương đồng" nghĩa là "độ tương đồng".

Gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc gen fructokinaza có thể còn là ADN mà có thể lai giống dưới điều kiện nghiêm ngặt với đoạn dò mà có thể được điều chế từ trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nucleotit trên đây trình tự nucleotit (ví dụ, trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 26 hoặc 28 đối với gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS, hoặc trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 30, 32, hoặc 34 đối với gen fructokinaza), như trình tự bổ trợ cho một phần hoặc toàn bộ trình tự của trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nucleotit trên đây, miễn là chức năng ban đầu được duy trì. Thuật ngữ "điều kiện nghiêm ngặt" đề cập đến điều kiện trong đó con lai cụ thể được tạo ra, và con lai không cụ thể không được tạo ra. Ví dụ về điều kiện nghiêm ngặt bao gồm các vi khuẩn trong đó ADN có tính tương đồng cao lai giống với nhau, ví dụ, ADN không ít hơn 50%, 65%, hoặc 80% tương đồng, tốt hơn là không ít hơn 90% tương đồng, tốt hơn nữa là không ít hơn 95% tương đồng, tốt hơn nữa là không ít hơn 97% tương đồng, đặc biệt tốt hơn là không ít hơn 99% tương đồng, lai giống với nhau, và ADN ít tương đồng hơn so với ADN trên đây không lai giống với nhau, hoặc điều kiện làm sạch của quá trình lai Southern đặc trưng, cụ thể là, điều kiện làm sạch một lần, tốt hơn là 2 hoặc 3 lần, ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 1 x SSC, 0,1% SDS ở 60°C, tốt hơn là 0,1 x SSC, 0,1% SDS ở 60°C, tốt hơn nữa là 0,1 x SSC, 0,1% SDS ở 68°C.

Đoạn dò được sử dụng đối với quá trình lai trên đây có thể là một phần của trình tự mà bổ trợ cho gen như được mô tả trên đây. Đoạn dò này có thể được điều chế bằng PCR bằng cách sử dụng oligonucleotit được điều chế trên cơ sở của trình tự gen đã biết làm đoạn môi và mảnh ADN bao gồm bất kỳ trong số các trình tự gen làm mẫu. Đối với đoạn dò, ví dụ, mảnh ADN có chiều dài khoảng 300 bp có thể được sử dụng. Khi mảnh ADN có chiều dài khoảng 300 bp được sử dụng làm đoạn dò, điều kiện làm sạch của quá trình lai có thể là, ví dụ, 50°C, 2 x SSC và 0,1% SDS.

Ngoài ra, vì sự thoái biến của mã bộ ba khác nhau phụ thuộc vào vật chủ, mã bộ ba tùy ý trong gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc gen fructokinaza có thể được thể bằng mã bộ ba tương đương tương ứng. Cụ thể là, gen chất mang hấp thụ

fructoza không PTS hoặc gen fructokinaza có thể là biến thể của gen bất kỳ trong số các gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc gen fructokinaza được minh họa trên đây do sự thoái biến của mã di truyền. Ví dụ, gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS hoặc gen fructokinaza có thể là gen được biến đổi sao cho nó có mã bộ ba tối ưu theo tần số mã bộ ba trong vật chủ được sử dụng.

Phần trăm của độ tương đồng trình tự giữa hai trình tự có thể được xác định bằng cách, ví dụ, sử dụng thuật toán toán học. Ví dụ về thuật toán toán học này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thuật toán của Myers và Miller được mô tả trong Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17, thuật toán tương đồng cục bộ của Smith trong Smith et al. (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, thuật toán xếp thẳng hàng theo tính tương đồng của Needleman và Wunsch trong Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453, phương pháp tra cứu sự tương đồng của Pearson và Lipman trong Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448, và các dạng được biến đổi của thuật toán của Karlin và Altschul trong Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, như được mô tả trong tài liệu Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877.

Bằng cách sử dụng chương trình trên cơ sở thuật toán toán học này, việc so sánh trình tự (cụ thể là việc sắp xếp thẳng hàng) để xác định độ tương đồng trình tự có thể được thực hiện. Chương trình có thể được thực hiện một cách thích hợp bằng máy tính. Ví dụ về này chương trình bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, CLUSTAL của chương trình PC/Gene (có sẵn từ Intelligenetics, mountain View, Calif.), chương trình ALIGN (Version 2.0), và GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, và TFASTA của phần mềm Wisconsin Genetics Software Package, Version 8 (có sẵn từ Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wis., Mỹ). Việc sắp xếp thẳng hàng bằng cách sử dụng các chương trình này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, thông số ban đầu. Chương trình CLUSTAL được mô tả chi tiết trong Higgins et al. (1988) Gene 73:237-244 (1988), Higgins et al. (1989) CABIOS 5:151-153, Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90, Huang et al. (1992) CABIOS 8:155-65, và Pearson et al. (1994) Met. Mol. Biol. 24:307-331,

Để thu được trình tự nucleotit tương đồng với trình tự nucleotit đích, cụ thể hơn, ví dụ, việc tra cứu nucleotit BLAST có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLASTN với điểm là 100 và số lượng từ là 12. Để thu được trình tự axit amin tương đồng với protein đích, cụ thể hơn, ví dụ, việc tra cứu protein BLAST có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLASTX với điểm 50 và số lượng từ là 3. Xem, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> đối với việc tra cứu nucleotit BLAST và

việc tra cứu protein BLAST. Ngoài ra, Gapped BLAST (BLAST 2.0) có thể được sử dụng để thực hiện việc sắp xếp thẳng hàng bao gồm các(khoảng trống) để so sánh. Ngoài ra, PSI-BLAST có thể được sử dụng để thực hiện lặp lại việc tra cứu để phát hiện mối quan hệ xa giữa các trình tự. Xem, Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 đối với Gapped BLAST và PSI-BLAST. Khi sử dụng BLAST, Gapped BLAST, hoặc PSI-BLAST, thông số ban đầu của mỗi chương trình (ví dụ, BLASTN đối với trình tự nucleotit, và BLASTX đối với trình tự axit amin) có thể được sử dụng. Việc sắp xếp thẳng hàng có thể còn được thực hiện bằng tay.

Độ tương đồng trình tự giữa hai trình tự được xác định theo tỷ lệ của gốc phù hợp trong hai trình tự khi xếp thẳng hàng hai trình tự để làm phù hợp để mức tối đa với nhau.

Phần mô tả trên đây liên quan đến biến thể bảo thủ của gen và protein có thể được sử dụng, với các thay đổi cần thiết, đối với biến thể của protein tùy ý như enzym hệ sinh tổng hợp L-axit amin và gen mã hóa chúng.

<1-3> Phương pháp làm tăng hoạt tính của protein

Sau đây, phương pháp làm tăng hoạt tính của protein như chất mang hấp thụ fructoza không PTS và fructokinaza sẽ được mô tả chi tiết hơn.

Thuật ngữ "hoạt tính của protein được làm tăng" nghĩa là hoạt tính của protein được làm tăng so với chủng không được biến đổi. Cụ thể hơn, thuật ngữ "hoạt tính của protein được làm tăng" nghĩa là hoạt tính của protein trên mỗi tế bào được làm tăng so với hoạt tính của chủng không được biến đổi. Thuật ngữ "chủng không được biến đổi" được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến chủng đối chứng mà không được biến đổi sao cho hoạt tính của protein đích được làm tăng. Ví dụ về chủng không được biến đổi bao gồm chủng kiểu dại và chủng gốc. Ví dụ cụ thể về chủng không được biến đổi bao gồm chủng loại tương ứng của loài vi khuẩn. Ví dụ cụ thể về chủng không được biến đổi còn bao gồm chủng được minh họa trên đây liên quan đến phần mô tả đối với vi khuẩn. Cụ thể là, theo một phương án, hoạt tính của protein có thể được làm tăng so với chủng loại, cụ thể là chủng loại của loài mà bao gồm vi khuẩn theo sáng chế. Theo một phương án khác, hoạt tính của protein có thể còn được làm tăng so với chủng *C. Glutamicum* ATCC 13032. Theo một phương án khác, hoạt tính của protein có thể còn được làm tăng so với chủng *C. Glutamicum* 2256 (ATCC 13869). Theo một phương án khác, hoạt tính của protein có thể còn được làm tăng so với chủng *E. Coli* K-12 MG1655. Trạng thái mà "hoạt tính của protein được làm tăng" có thể còn được gọi là "hoạt tính của protein được nâng cao". Cụ thể hơn nữa, thuật ngữ "hoạt tính của protein được làm tăng" có thể có nghĩa là số lượng phân tử của protein trên mỗi tế bào

được làm tăng, và/hoặc chức năng của mỗi phân tử protein được làm tăng so với các vi khuẩn của chủng không được biến đổi. Cụ thể là, thuật ngữ "hoạt tính" trong thuật ngữ "hoạt tính của protein được làm tăng" không chỉ giới hạn ở hoạt tính xúc tác của protein, mà có thể còn có nghĩa lượng phiên mã của gen (cụ thể là lượng của mARN) mã hóa protein, hoặc lượng dịch mã của gen (cụ thể là lượng của protein). Ngoài ra, trạng thái mà "hoạt tính của protein được làm tăng" không chỉ bao gồm trạng thái mà hoạt tính của protein đích được làm tăng trong chủng tự có hoạt tính của protein đích, mà còn là trạng thái mà hoạt tính của protein đích được tạo ra cho chủng vốn không có hoạt tính của protein đích. Ngoài ra, miễn là hoạt tính của protein được làm tăng, hoạt tính của protein đích tự có trong vật chủ có thể bị làm giảm và/hoặc bị loại bỏ, và sau đó loại protein đích thích hợp có thể được tạo ra cho vật chủ.

Mức tăng về hoạt tính của protein không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là hoạt tính của protein được làm tăng so với chủng không được biến đổi. Hoạt tính của protein có thể được làm tăng đến, ví dụ, 1,5 lần hoặc nhiều hơn, 2 lần hoặc nhiều hơn, hoặc 3 lần hoặc nhiều hơn hoạt tính của chủng không được biến đổi. Ngoài ra, khi chủng không được biến đổi không có hoạt tính của protein đích, có thể cho rằng protein được sản xuất do sự bổ sung gen mã hóa protein, và ví dụ, protein có thể được sản xuất với mức độ mà hoạt tính của chúng có thể được xác định.

Sự biến đổi làm tăng hoạt tính của protein có thể thu được bằng cách, ví dụ, làm tăng sự biểu hiện gen mã hóa protein. Thuật ngữ "sự biểu hiện gen được làm tăng" nghĩa là sự biểu hiện gen được làm tăng so với chủng không được biến đổi như chủng kiểu dại và chủng gốc. Cụ thể hơn, thuật ngữ "sự biểu hiện gen được làm tăng" nghĩa là mức biểu hiện của gen trên mỗi tế bào được làm tăng so với mà của chủng không được biến đổi. Cụ thể hơn nữa, thuật ngữ "sự biểu hiện gen được làm tăng" có thể có nghĩa là lượng phiên mã của gen (cụ thể là lượng của mARN) được làm tăng, và/hoặc lượng dịch mã của gen (cụ thể là lượng của protein được biểu hiện từ gen) được làm tăng. Trạng thái mà "sự biểu hiện gen được làm tăng" có thể còn được gọi là "sự biểu hiện gen được làm tăng". Sự biểu hiện gen có thể được làm tăng đến, ví dụ, 1,5 lần hoặc nhiều hơn, 2 lần hoặc nhiều hơn, hoặc 3 lần hoặc nhiều hơn trong đó của chủng không được biến đổi. Ngoài ra, trạng thái mà "sự biểu hiện gen được làm tăng" không chỉ bao gồm trạng thái mà mức biểu hiện của gen đích được làm tăng trong chủng mà tự biểu hiện gen đích, nhưng cũng là trạng thái mà gen được bổ sung vào trong chủng mà không tự biểu hiện gen đích, và được biểu hiện trong đó. Cụ thể là, thuật ngữ "sự biểu hiện gen được làm tăng" có thể còn có nghĩa là, ví dụ, gen đích được bổ sung vào trong chủng mà không có gen này, và được biểu hiện trong đó.

Sự biểu hiện gen có thể được làm tăng bằng cách, ví dụ, làm tăng số lượng bản sao của gen.

Số lượng bản sao của gen có thể được làm tăng bằng cách bổ sung gen vào trong nhiễm sắc thể vật chủ. Gen có thể được bổ sung vào trong nhiễm sắc thể bằng cách, ví dụ, bằng cách sử dụng sự tái tổ hợp tương đồng (Miller, J.H., *Experiments in Molecular Genetics*, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory). Ví dụ về phương pháp chuyển gen tận dụng sự tái tổ hợp tương đồng bao gồm, ví dụ, phương pháp sử dụng ADN mạch thẳng như phương pháp tích hợp hướng Red (Datsenko, K.A., and Wanner, B.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:6640-6645 (2000)), phương pháp sử dụng plasmit bao gồm vị trí bắt đầu sao chép nhạy với nhiệt độ, phương pháp sử dụng plasmit có khả năng truyền tiếp hợp, phương pháp sử dụng vector tự sát không có vị trí bắt đầu sao chép mà có chức năng trong vật chủ, và phương pháp tải nạp bằng cách sử dụng thực thể khuẩn. Chỉ một bản sao, hoặc hai hoặc nhiều hơn bản sao của gen có thể được bổ sung. Ví dụ, bằng cách thực hiện sự tái tổ hợp tương đồng bằng cách sử dụng trình tự mà có trong các bản sao trên nhiễm sắc thể làm đích, các bản sao của gen có thể được bổ sung vào trong nhiễm sắc thể. Ví dụ về trình tự này mà có trong các bản sao trên nhiễm sắc thể bao gồm ADN lặp lại, và hai trình tự lặp lại đảo ngược được định vị ở cả hai đầu cuối của gen nhảy. Ngoài ra, sự tái tổ hợp tương đồng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng trình tự thích hợp trên nhiễm sắc thể như gen không cần thiết đối với quá trình sản xuất chất đích làm đích. Ngoài ra, gen có thể còn được bổ sung một cách ngẫu nhiên vào trong nhiễm sắc thể bằng cách sử dụng gen nhảy hoặc Mini-Mu (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2-109985, Patent Mỹ số US 5,882,888, EP805867B1).

Sự bổ sung đích gen vào trong nhiễm sắc thể có thể được xác định bằng quá trình lai Southern bằng cách sử dụng đoạn dò có trình tự bổ trợ cho toàn bộ gen hoặc một phần của chúng, PCR bằng cách sử dụng đoạn mồi được điều chế trên cơ sở của trình tự của gen, hoặc quá trình tương tự khác.

Ngoài ra, số lượng bản sao của gen có thể còn được làm tăng bằng cách bổ sung vector bao gồm gen vào trong vật chủ. Ví dụ, số lượng bản sao của gen đích có thể được làm tăng bằng cách buộc mảnh ADN bao gồm gen đích với vector mà có chức năng trong vật chủ để tạo cấu trúc vector biểu hiện của gen, và biến nạp vật chủ với vector biểu hiện. Mảnh ADN bao gồm gen đích có thể thu được bằng, ví dụ, PCR bằng cách sử dụng ADN bộ gen của vi sinh vật có gen đích làm mẫu. Đối với vector, vector có thể tự sao chép trong tế bào của vật chủ có thể được sử dụng. Vector tốt hơn là vector nhiều bản sao. Ngoài ra, vector tốt hơn là có phân tử chỉ thị như gen kháng kháng sinh

để chọn thể biến nạp. Ngoài ra, vector có thể có vùng khởi động và/hoặc vùng kết thúc để biểu hiện gen được bổ sung. Vector có thể là, ví dụ, vector được tạo ra từ plasmit vi khuẩn, vector được tạo ra từ plasmit men, vector được tạo ra từ thể thực khuẩn, cosmit, phagemit, hoặc các vector tương tự khác. Ví dụ cụ thể về vector có thể tự sao chép trong vi khuẩn *Enterobacteriaceae* như *Escherichia coli* bao gồm, ví dụ, pUC19, pUC18, pHSG299, pHSG399, pHSG398, pBR322, pSTV29 (tất cả chúng có sẵn từ Takara Bio), pACYC184, pMW219 (NIPPON gen), pTrc99A (Pharmacia), chuỗi các vector pPROK (Clontech), pKK233-2 (Clontech), chuỗi các vector pET (Novagen), chuỗi các vector pQE (QIAGEN), pCold TF ADN (Takara Bio), chuỗi các vector pACYC, và vector phổ vật chủ rộng RSF1010, Ví dụ cụ thể về vector có thể tự sao chép trong vi khuẩn coryneform bao gồm, ví dụ, pHM1519 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)); pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)); plasmit thu được bằng cách cải thiện chúng và có gen kháng thuốc; plasmit pCRY30 (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 3-210184); plasmit pCRY21, pCRY2KE, pCRY2KX, pCRY31, pCRY3KE, và pCRY3KX (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2-72876 và Patent Mỹ số US 5,185,262); plasmit pCRY2 và pCRY3 (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 1-191686); pAJ655, pAJ611, và pAJ1844 (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 58-192900); pCG1 (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 57-134500); pCG2 (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 58-35197); pCG4 và pCG11 (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 57-183799); pVK7 (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 10-215883); pVK9 (US2006-0141588); pVC7 (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 9-070291); pVS7 (WO2013/069634).

Khi gen được bổ sung, có thể cho rằng gen được biểu hiện vật chủ. Cụ thể hơn, có thể cho rằng gen này nằm trong vật chủ sao cho nó được biểu hiện dưới sự kiểm soát bằng vùng khởi động mà chức năng trong vật chủ. Vùng khởi động không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó có chức năng trong vật chủ. Thuật ngữ "vùng khởi động mà có chức năng trong vật chủ" đề cập đến vùng khởi động mà có hoạt tính khởi động trong vật chủ. Vùng khởi động có thể là vùng khởi động được tạo ra từ vật chủ, hoặc vùng khởi động dị thể. Vùng khởi động có thể là vùng khởi động tự nhiên của gen được bổ sung, hoặc vùng khởi động của gen khác. Đối với vùng khởi động, ví dụ, vùng khởi động hoạt tính mạnh như được mô tả sau đây có thể còn được sử dụng.

Vùng kết thúc để kết thúc sự phiên mã gen có thể được định vị sau gen này. Vùng kết thúc không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó chức năng trong vật chủ. Vùng kết thúc có thể là vùng kết thúc được tạo ra từ vật chủ, hoặc vùng kết thúc dị thể. Vùng kết thúc có thể là vùng kết thúc tự nhiên của gen được bổ sung, hoặc vùng kết thúc của gen khác. Ví dụ cụ thể về vùng kết thúc bao gồm, ví dụ, vùng kết thúc T7, vùng kết thúc T4, vùng kết thúc thực thể khuẩn fd, vùng kết thúc *tet*, và vùng kết thúc

trpA.

Vector, vùng khởi động, và vùng kết thúc có sẵn trong các vi sinh vật được mô tả chi tiết trong "Fundamental Microbiology Vol. 8, Genetic Engineering, KYORITSU SHUPPAN CO., LTD, 1987", và các vector, vùng khởi động, và vùng kết thúc khác có thể được sử dụng.

Ngoài ra, khi hai hoặc nhiều hơn gen được bổ sung, có thể cho rằng mỗi gen được biểu hiện vật chủ. Ví dụ, tất cả gen có thể được mang bởi một vector biểu hiện hoặc nhiễm sắc thể. Ngoài ra, gen có thể được mang một cách riêng rẽ bởi hai hoặc nhiều hơn vector biểu hiện, hoặc được mang một cách riêng rẽ bởi một hoặc hai hoặc nhiều hơn vector biểu hiện và nhiễm sắc thể. Operon được cấu thành bởi hai hoặc nhiều hơn gen có thể còn được bổ sung. Trường hợp "bổ sung hai hoặc nhiều hơn gen" bao gồm, ví dụ, trường hợp bổ sung gen tương ứng mã hóa hai hoặc nhiều hơn các loại protein (như enzym), bổ sung gen tương ứng mã hóa hai hoặc nhiều hơn tiểu đơn vị cấu thành một phức hợp protein (như phức hợp enzym), và dạng kết hợp của các trường hợp trên đây.

Gen được bổ sung không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó mã hóa protein mà có chức năng trong vật chủ. Gen được bổ sung có thể là gen được tạo ra từ vật chủ, hoặc có thể là gen dị thể. Gen được bổ sung có thể thu được bằng, ví dụ, PCR bằng cách sử dụng đoạn mồi được thiết kế trên cơ sở của trình tự nucleotit của gen, và bằng cách sử dụng ADN bộ gen của sinh vật có gen, plasmit mang gen, hoặc vi khuẩn tương tự khác làm mẫu. Gen được bổ sung có thể còn được tổng hợp một cách hoàn toàn, ví dụ, trên cơ sở của trình tự nucleotit của gen (Gene, 60(1), 115-127 (1987)). Gen thu được có thể được sử dụng ở dạng nguyên dạng, hoặc sau khi được biến đổi nếu cần. Cụ thể là, gen có thể được biến đổi để thu được biến thể của chúng. Gen có thể được biến đổi bằng kỹ thuật đã biết. Ví dụ, đột biến đích có thể được bổ sung vào trong vị trí đích của ADN bằng phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí. Cụ thể là, vùng mã hóa của gen có thể được biến đổi bằng phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí sao cho vị trí đặc hiệu của protein được mã hóa bao gồm sự thế, sự loại bỏ, sự chèn, và/hoặc sự bổ sung gốc axit amin. Ví dụ về phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí bao gồm phương pháp tận dụng PCR (Higuchi, R., 61, in PCR Technology, Erlich, H.A. Eds., Stockton Press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987)), và phương pháp tận dụng thực thể khuôn (Kramer, W. and Frits, H.J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T.A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)). Ngoài ra, biến thể của gen có thể được tổng hợp một cách hoàn toàn.

Đáng ngạc nhiên là, khi protein chức năng ở dạng phức hợp bao gồm các tiểu

đơn vị, một phần hoặc tất cả các tiểu đơn vị có thể được biến đổi, miễn là hoạt tính của protein được làm tăng. Cụ thể là, ví dụ, khi hoạt tính của protein được làm tăng bằng cách làm tăng sự biểu hiện gen, sự biểu hiện của một phần hoặc tất cả các gen mã hóa tiểu đơn vị có thể được làm tăng. Thường tốt hơn là làm tăng sự biểu hiện của tất cả các gen mã hóa tiểu đơn vị. Ngoài ra, tiểu đơn vị cấu thành phức hợp có thể được tạo ra từ một loại sinh vật hoặc hai hoặc nhiều hơn các loại sinh vật, miễn là phức hợp có chức năng của protein đích. Cụ thể là, ví dụ, gen của cùng một sinh vật mã hóa các tiểu đơn vị có thể được bổ sung vào trong vật chủ, hoặc gen của các sinh vật khác nhau mã hóa các tiểu đơn vị có thể được bổ sung vào trong vật chủ.

Ngoài ra, sự biểu hiện gen có thể được làm tăng bằng cách nâng cao hiệu quả phiên mã của gen. Ngoài ra, sự biểu hiện gen có thể còn được làm tăng bằng cách nâng cao hiệu quả dịch mã của gen. Hiệu quả phiên mã của gen và hiệu quả dịch mã của gen có thể được nâng cao bằng cách, ví dụ, biến đổi trình tự kiểm soát sự biểu hiện gen. Thuật ngữ "trình tự kiểm soát sự biểu hiện" nói chung đề cập đến vị trí mà ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen. Ví dụ về trình tự kiểm soát sự biểu hiện bao gồm, ví dụ, vùng khởi động, trình tự Shin-Dalgarno (SD) (còn được gọi là vị trí gắn kết ribosom (ribosome binding site - RBS)), và vùng đệm giữa RBS và codon ban đầu. Trình tự kiểm soát sự biểu hiện có thể được xác định bằng cách sử dụng vector tra cứu vùng khởi động hoặc phần mềm phân tích gen như GENETYX. Các trình tự kiểm soát sự biểu hiện này có thể được biến đổi bằng cách, ví dụ, phương pháp sử dụng vector nhảy với nhiệt độ, hoặc phương pháp tích hợp hướng Red (WO2005/010175).

Hiệu quả phiên mã của gen có thể được nâng cao bằng cách, ví dụ, thay vùng khởi động của gen trên nhiễm sắc thể với vùng khởi động mạnh hơn. Thuật ngữ "vùng khởi động mạnh hơn" đề cập đến vùng khởi động mà tạo ra sự phiên mã được nâng cao của gen so với tự vùng khởi động kiểu đại diện có của gen. Ví dụ về vùng khởi động mạnh hơn bao gồm, ví dụ, đã biết vùng khởi động biểu hiện cao như vùng khởi động T7, vùng khởi động *trp*, vùng khởi động *lac*, vùng khởi động *thr*, vùng khởi động *tac*, vùng khởi động *trc*, vùng khởi động *tet*, vùng khởi động *araBAD*, vùng khởi động *rpoH*, vùng khởi động *msrA*, vùng khởi động *Pml* (được tạo ra từ chi *Bifidobacterium*), vùng khởi động PR, và vùng khởi động PL. Ví dụ về vùng khởi động mạnh hơn có thể được sử dụng trong vi khuẩn coryneform bao gồm, ví dụ, vùng khởi động P54-6 được biến đổi nhân tạo (Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679 (2000)), vùng khởi động *pta*, *aceA*, *aceB*, *adh*, và *amyE* có thể được cảm ứng trong vi khuẩn coryneform với axit axetic, etanol, axit pyruvic, hoặc axit tương tự khác, vùng khởi động *cspB*, *SOD*, và *tuf* (EF-Tu), mà là vùng khởi động hiệu quả có khả năng tạo ra mức biểu hiện cao trong vi khuẩn coryneform (Journal of Biotechnology, 104

(2003) 311-323; Appl. Environ. Microbiol., 2005 Dec; 71 (12):8587-96), cũng như vùng khởi động *lac*, vùng khởi động *tac*, và vùng khởi động *trc*. Ngoài ra, đối với vùng khởi động mạnh hơn, loại hoạt tính cao của vùng khởi động hiện có có thể còn thu được bằng cách sử dụng các gen thông báo. Ví dụ, bằng cách tạo ra các vùng 35 và 10 trong vùng khởi động vùng gần hơn với trình tự liên ứng, hoạt tính của vùng khởi động có thể được làm tăng (WO00/18935). Ví dụ về loại hoạt tính cao của vùng khởi động bao gồm các vùng khởi động giống *tac* khác nhau (Katashkina JI et al., Công bố đơn Nga số 2006134574) và vùng khởi động *pnlp8* (WO2010/027045). Phương pháp để đánh giá hoạt độ của vùng khởi động và ví dụ về vùng khởi động mạnh được mô tả trong tài liệu của Goldstein và cộng sự (Prokaryotic Promoters in Biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128 (1995)), và phương pháp tương tự khác.

Hiệu quả dịch mã của gen có thể được nâng cao bằng cách, ví dụ, thay trình tự Shin-Dalgarno (SD) (còn được gọi là vị trí gắn kết ribosom (RBS)) đối với gen trên nhiễm sắc thể với trình tự SD mạnh hơn. "Trình tự SD mạnh hơn" nghĩa là SD trình tự mà tạo ra sự dịch mã được nâng cao của mARN so với trình tự SD kiểu đại tự nhiên hiện có của gen. Ví dụ về trình tự SD mạnh hơn bao gồm, ví dụ, RBS của gen *10* được tạo ra từ thực thể khuẩn T7 (Olins P.O. Et al, Gen, 1988, 73, 227-235). Ngoài ra, sự chèn, hoặc sự loại bỏ một số nucleotit được xác định là trong vùng đệm giữa RBS và codon (mã bộ ba) ban đầu, cụ thể là trong trình tự ngay sau mã bộ ba ban đầu (5'-UTR), ảnh hưởng đến một cách đáng kể độ ổn định và hiệu quả dịch mã của mARN, và do đó, hiệu quả dịch mã của gen có thể còn được nâng cao bằng cách biến đổi chúng.

Hiệu quả dịch mã của gen có thể còn được nâng cao bằng cách, ví dụ, biến đổi mã bộ ba. Ví dụ, hiệu quả dịch mã của gen có thể được nâng cao bằng thay mã bộ ba hiếm có trong gen với mã bộ ba đồng nghĩa được sử dụng thường xuyên hơn. Cụ thể là, gen được bổ sung có thể được biến đổi, ví dụ, để bao gồm mã bộ ba tối ưu theo tần số của mã bộ ba được quan sát trong vật chủ được sử dụng. Mã bộ ba có thể được thể bằng cách, ví dụ, phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí. Ngoài ra, mảnh gen trong đó mã bộ ba đích được thể có thể được tổng hợp một cách hoàn toàn. Tần số của mã bộ ba trong các sinh vật được bộc lộ trong Cơ sở dữ liệu sử dụng mã bộ ba ("Codon Usage Database") (<http://www.kazusa.or.jp/codon>; Nakamura, Y. Et al, Nucl. Acit Res., 28, 292 (2000)).

Ngoài ra, sự biểu hiện gen có thể còn được làm tăng bằng cách khuếch đại chất điều hòa mà làm tăng sự biểu hiện gen, hoặc loại bỏ hoặc làm giảm lượng chất điều hòa mà làm giảm sự biểu hiện gen.

Phương pháp làm tăng sự biểu hiện gen như được mô tả trên đây có thể được sử dụng một cách riêng rẽ hoặc tùy ý ở dạng kết hợp.

Ngoài ra, sự biến đổi mà làm tăng hoạt tính của protein có thể còn thu được bằng cách, ví dụ, làm tăng hoạt tính đặc hiệu của enzym. Đối với việc làm tăng hoạt tính đặc hiệu còn bao gồm khử nhạy để sự ức chế ngược. Cụ thể là, khi protein bị ức chế ngược bởi chất chuyển hóa, hoạt tính của protein có thể được làm tăng bằng cách tạo ra vi khuẩn chứa gen mã hóa protein đột biến mà đã được khử nhạy đối với sự ức chế ngược. Theo sáng chế, thuật ngữ "khử nhạy đối với sự ức chế ngược" bao gồm việc loại bỏ một cách hoàn toàn sự ức chế ngược, và việc làm giảm của sự ức chế ngược, trừ khi được chỉ ra theo cách cụ thể khác. Ngoài ra, trạng thái "được khử nhạy đối với sự ức chế ngược", cụ thể là trạng thái mà sự ức chế ngược bị loại bỏ hoặc bị làm giảm, có thể còn được gọi là "dung nạp đối với sự ức chế ngược". Protein thể hiện hoạt tính đặc hiệu được làm tăng có thể thu được bằng cách, ví dụ, nghiên cứu các sinh vật. Ngoài ra, loại hoạt tính cao của protein hiện có có thể còn thu được bằng cách bổ sung đột biến vào trong protein hiện có. Đột biến được bổ sung có thể là, ví dụ, sự thế, sự loại bỏ, sự chèn, hoặc sự bổ sung một hoặc một số gốc axit amin ở một hoặc một số vị trí của protein. Đột biến có thể được bổ sung bằng, ví dụ, phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí như được mô tả trên đây. Đột biến có thể còn được bổ sung bằng, ví dụ, quá trình xử lý gây đột biến. Ví dụ về quá trình xử lý gây đột biến bao gồm sự chiếu xạ tia X, sự chiếu xạ tia cực tím, và quá trình xử lý với chất gây đột biến như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), etyl metansulfonat (EMS), và metyl metansulfonat (MMS). Ngoài ra, đột biến ngẫu nhiên có thể được gây ra bằng cách xử lý trực tiếp ADN in vitro với hydroxylamin. Việc làm tăng hoạt tính đặc hiệu có thể được sử dụng một cách riêng rẽ, hoặc có thể được sử dụng ở dạng kết hợp tùy ý với các phương pháp này để làm tăng sự biểu hiện gen như được mô tả trên đây.

Phương pháp để biến nạp không bị giới hạn một cách cụ thể, và nói chung các phương pháp đã biết có thể được sử dụng. Các phương pháp có thể được sử dụng, ví dụ, phương pháp xử lý tế bào nhận với canxi clorua để làm tăng độ thấm của chúng đối với ADN, mà đã được thông báo đối với chủng *Escherichia coli* K-12 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 1970, 53, 159-162), và phương pháp điều chế tế bào khả nạp từ tế bào mà trong pha sinh trưởng, sau đó biến nạp với ADN, mà đã được thông báo đối với *Bacillus subtilis* (Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1977, 1:153-167). Ngoài ra, các phương pháp khác có thể còn được sử dụng bao gồm phương pháp tạo ra tế bào nhận ADN trong tế bào trần hoặc thể cầu chất, mà có thể hấp thụ một cách dễ dàng ADN tái tổ hợp, sau đó cách bổ sung ADN tái tổ hợp vào trong tế bào nhận ADN, mà đã biết là có thể sử dụng cho *Bacillus subtilis*, xạ khuẩn,

và men (Chang, S. and Choen, S.N., 1979, Mol. Gen. Genet., 168:111-115; Bibb, m.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., 1978, Nature, 274:398-400; Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929-1933). Ngoài ra, phương pháp xung điện tử được thông báo đối với vi khuẩn coryneform (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 2-207791) có thể còn được sử dụng.

Sự tăng về hoạt tính của protein có thể được xác định bằng cách xác định hoạt tính của protein.

Sự tăng về hoạt tính của protein có thể còn được xác định bằng cách xác định mức tăng về sự biểu hiện gen mã hóa protein. Mức tăng về sự biểu hiện gen có thể được xác định bằng cách xác định mức tăng về lượng phiên mã của gen, hoặc bằng cách xác định mức tăng về lượng của protein được biểu hiện từ gen.

Mức tăng của lượng phiên mã của gen có thể được xác định bằng cách so sánh lượng của mARN được phiên mã từ gen với lượng của chủng không được biến đổi như chủng kiểu dại hoặc chủng gốc. Ví dụ về phương pháp để đánh giá lượng của mARN bao gồm quá trình lai Northern, RT-PCR, gen chip, trình tự RNA và các ứng dụng khác (Sambrook, J., et al., Molecular Cloning Laboratory Manual/Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001). Lượng của mARN có thể làm tăng đến, ví dụ, 1,5 lần hoặc nhiều hơn, 2 lần hoặc nhiều hơn, hoặc 3 lần hoặc nhiều hơn so với chủng không được biến đổi.

Mức tăng với lượng của protein có thể được xác định bằng phương pháp Western Blot bằng cách sử dụng kháng thể (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001). Lượng của protein (như số lượng phân tử của protein trên mỗi tế bào) có thể làm tăng đến, ví dụ, 1,5 lần hoặc nhiều hơn, 2 lần hoặc nhiều hơn, hoặc 3 lần hoặc nhiều hơn so với chủng không được biến đổi.

Phương pháp làm tăng hoạt tính của protein trên đây có thể được sử dụng để làm tăng hoạt tính của protein tùy ý như enzym sinh tổng hợp L-axit amin, và làm tăng sự biểu hiện của gen tùy ý như gen mã hóa các protein tùy ý này, cùng với việc làm tăng hoạt tính chất mang hấp thụ fructoza không PTS và hoạt tính fructokinaza.

<1-4> Phương pháp để làm giảm hoạt tính của protein

Sau đây, phương pháp để làm giảm hoạt tính của protein sẽ được mô tả chi tiết hơn.

Thuật ngữ “hoạt tính của protein được làm giảm” nghĩa là hoạt tính của protein được làm giảm so với chủng không được biến đổi. Cụ thể hơn, thuật ngữ “hoạt tính của protein được làm giảm” nghĩa là hoạt tính của protein trên mỗi tế bào được

làm giảm so với hoạt tính của chủng không được biến đổi. Thuật ngữ "chủng không được biến đổi" được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến chủng đối chứng mà không được biến đổi sao cho hoạt tính của protein đích được làm giảm. Ví dụ về chủng không được biến đổi bao gồm chủng kiểu dại và chủng gốc. Ví dụ cụ thể về chủng không được biến đổi bao gồm chủng loại tương ứng của loài vi khuẩn. Ví dụ cụ thể về chủng không được biến đổi còn bao gồm chủng được minh họa trên đây trong phần mô tả liên quan đến vi khuẩn. Cụ thể là, theo một phương án, hoạt tính của protein có thể được làm giảm so với chủng loại, cụ thể là chủng loại của loài bao gồm vi khuẩn theo sáng chế. Theo một phương án khác, hoạt tính của protein có thể còn được làm giảm so với chủng *C. Glutamicum* ATCC 13032. Theo một phương án khác, hoạt tính của protein có thể còn được làm giảm so với chủng *C. Glutamicum* 2256 (ATCC 13869). Theo một phương án khác, hoạt tính của protein có thể còn được làm giảm so với chủng *E. Coli* K-12 MG1655. Trạng thái mà "hoạt tính của protein được làm giảm" còn bao gồm trạng thái mà hoạt tính của protein bị biến mất một cách hoàn toàn. Cụ thể hơn nữa, thuật ngữ "hoạt tính của protein được làm giảm" có thể có nghĩa là số lượng phân tử của protein trên mỗi tế bào được làm giảm, và/hoặc chức năng của mỗi phân tử protein được làm giảm so với chức năng của chủng không được biến đổi. Cụ thể hơn, thuật ngữ "hoạt tính" trong thuật ngữ "hoạt tính của protein được làm giảm" không chỉ giới hạn ở hoạt tính xúc tác của protein, mà còn có thể có nghĩa là lượng phiên mã của gen (cụ thể là lượng của mRNA) mã hóa protein hoặc lượng dịch mã của gen (cụ thể là lượng của protein). Trạng thái mà "số lượng phân tử của protein trên mỗi tế bào được làm giảm" còn bao gồm trạng thái mà không có protein. Trạng thái mà "chức năng của mỗi phân tử protein được làm giảm" còn bao gồm trạng thái mà có chức năng của mỗi phân tử protein bị biến mất một cách hoàn toàn. Mức giảm về hoạt tính của protein không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là hoạt tính được làm giảm so với hoạt tính của chủng không được biến đổi. Hoạt tính của protein có thể được làm giảm đến, ví dụ, 50% hoặc ít hơn, 20% hoặc ít hơn, 10% hoặc ít hơn, 5% hoặc ít hơn, hoặc 0% hoạt tính của chủng không được biến đổi.

Sự biến đổi để làm giảm hoạt tính của protein có thể thu được bằng cách, ví dụ, giảm sự biểu hiện gen mã hóa protein. Thuật ngữ "sự biểu hiện gen được làm giảm" nghĩa là sự biểu hiện gen được làm giảm so với chủng không được biến đổi như chủng kiểu dại và chủng gốc. Cụ thể hơn, thuật ngữ "sự biểu hiện gen được làm giảm" nghĩa là sự biểu hiện gen trên mỗi tế bào được làm giảm so với sự biểu hiện của chủng không được biến đổi. Cụ thể hơn nữa, thuật ngữ "sự biểu hiện gen được làm giảm" có thể có nghĩa là lượng phiên mã của gen (cụ thể là lượng của mRNA) được làm giảm, và/hoặc lượng dịch mã của gen (cụ thể là lượng của protein được biểu hiện từ gen)

được làm giảm. Trạng thái mà "sự biểu hiện gen được làm giảm" còn bao gồm trạng thái mà gen không được biểu hiện. Trạng thái mà "sự biểu hiện gen được làm giảm" còn được gọi là "sự biểu hiện gen bị làm giảm". Sự biểu hiện gen có thể được làm giảm đến, ví dụ, 50% hoặc ít hơn, 20% hoặc ít hơn, 10% hoặc ít hơn, 5% hoặc ít hơn, hoặc 0% hoạt tính của chúng không được biến đổi.

Mức giảm về sự biểu hiện gen có thể là do, ví dụ, sự giảm về hiệu quả phiên mã, sự giảm về hiệu quả dịch mã, hoặc dạng kết hợp của chúng. Sự biểu hiện gen có thể được làm giảm bằng cách biến đổi trình tự kiểm soát sự biểu hiện gen như vùng khởi động, trình tự Shin-Dalgarno (SD) (còn được gọi là vị trí gắn kết với ribosom (RBS)), và vùng đệm giữa RBS và mã bộ ba bắt đầu của gen. Khi trình tự kiểm soát sự biểu hiện được biến đổi, tốt hơn là một hoặc nhiều nucleotit, tốt hơn nữa là hai hoặc nhiều hơn các nucleotit, đặc biệt tốt hơn là ba hoặc nhiều hơn các nucleotit, của trình tự kiểm soát sự biểu hiện được biến đổi. Ví dụ, hiệu quả phiên mã của gen có thể được làm giảm bằng cách, ví dụ, thay vùng khởi động của gen trên nhiễm sắc thể với vùng khởi động yếu hơn. Thuật ngữ "vùng khởi động yếu hơn" nghĩa là vùng khởi động mà tạo ra sự phiên mã bị làm giảm của gen so với vùng tự khởi động kiểu đại diện có của gen. Ví dụ về vùng khởi động yếu hơn bao gồm, ví dụ, vùng khởi động có thể được cảm ứng. Cụ thể là, vùng khởi động có thể được cảm ứng có thể có chức năng làm vùng khởi động yếu hơn dưới điều kiện không được cảm ứng, như với sự vắng mặt của chất cảm ứng tương ứng. Ngoài ra, một phần hoặc toàn bộ của trình tự kiểm soát sự biểu hiện có thể được loại bỏ. Sự biểu hiện gen có thể còn được làm giảm bằng cách, ví dụ, thao tác yếu tố chịu trách nhiệm cho việc biểu hiện sự kiểm soát. Ví dụ về yếu tố chịu trách nhiệm cho việc biểu hiện sự kiểm soát bao gồm phân tử thấp chịu trách nhiệm cho việc kiểm soát sự phiên mã hoặc sự dịch mã (chất cảm ứng, chất ức chế, v.v.), protein chịu trách nhiệm cho việc kiểm soát sự phiên mã hoặc sự dịch mã (yếu tố phiên mã v.v.), axit nucleic chịu trách nhiệm cho việc kiểm soát sự phiên mã hoặc sự dịch mã (siARN v.v.), và yếu tố tương tự khác. Ngoài ra, sự biểu hiện gen có thể còn được làm giảm bằng cách, ví dụ, bổ sung đột biến mà làm giảm sự biểu hiện gen vào trong vùng mã hóa của gen. Ví dụ, sự biểu hiện gen có thể được làm giảm bằng thay mã bộ ba trong vùng mã hóa của gen với mã bộ ba đồng nghĩa được sử dụng ít thường xuyên hơn trong vật chủ. Ngoài ra, ví dụ, sự biểu hiện gen có thể được làm giảm do phá vỡ gen như được mô tả sau đây.

Sự biến đổi để làm giảm hoạt tính của protein có thể còn thu được bằng cách, ví dụ, phá vỡ gen mã hóa protein. Thuật ngữ "gen bị phá vỡ" nghĩa là gen được biến đổi sao cho protein mà có thể thường có chức năng không được sản xuất. Trạng thái mà "protein mà thường có chức năng không được sản xuất" bao gồm trạng thái mà

protein không được sản xuất từ gen, và trạng thái mà protein trong đó chức năng (như hoạt tính hoặc đặc tính) trên mỗi phân tử được làm giảm hoặc bị loại bỏ được sản xuất từ gen.

Sự phá vỡ gen có thể thu được bằng cách, ví dụ, loại bỏ gen trên nhiễm sắc thể. Thuật ngữ "sự loại bỏ gen" đề cập đến sự loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng của vùng mã hóa của gen. Ngoài ra, toàn bộ của gen bao gồm trình tự trước và sau từ vùng mã hóa của gen trên nhiễm sắc thể có thể được loại bỏ. Vùng được loại bỏ có thể là vùng bất kỳ như vùng đầu cuối N (vùng mã hóa vùng đầu cuối N của protein), vùng bên trong, hoặc vùng đầu cuối C (vùng mã hóa vùng đầu cuối C của protein), miễn là hoạt tính của protein có thể được làm giảm. Sự loại bỏ vùng dài hơn có thể thường đảm bảo một cách chắc chắn hơn việc bất hoạt gen. Vùng được loại bỏ có thể là, ví dụ, vùng có chiều dài 10% hoặc nhiều hơn, 20% hoặc nhiều hơn, 30% hoặc nhiều hơn, 40% hoặc nhiều hơn, 50% hoặc nhiều hơn, 60% hoặc nhiều hơn, 70% hoặc nhiều hơn, 80% hoặc nhiều hơn, 90% hoặc nhiều hơn, hoặc 95% hoặc nhiều hơn tổng chiều dài vùng mã hóa của gen. Ngoài ra, tốt hơn nếu khung đọc của trình tự trước và sau từ vùng được loại bỏ là không giống nhau. Sự không đồng nhất của khung đọc có thể làm lệch khung sau vùng được loại bỏ.

Sự phá vỡ gen có thể còn thu được bằng cách, ví dụ, bổ sung đột biến đối với sự thể axit amin (đột biến sai nghĩa), bộ ba mã kết thúc (đột biến vô nghĩa), sự bổ sung hoặc sự loại bỏ một hoặc hai gốc nucleotit (đột biến lệch khung đọc), hoặc đột biến tương tự khác vào trong vùng mã hóa của gen trên nhiễm sắc thể (Journal of Biological Chemistry, 272:8611-8617 (1997); Proceedings of National Academy of Sciences, USA, 95 5511-5515 (1998); Journal of Biological Chemistry, 26 116, 20833-20839 (1991)).

Sự phá vỡ gen có thể còn thu được bằng cách, ví dụ, chèn trình tự nucleotit khác vào trong vùng mã hóa của gen trên nhiễm sắc thể. Vị trí của sự chèn có thể là trong vùng bất kỳ của gen, và sự chèn trình tự nucleotit dài hơn có thể thường đảm bảo một cách chắc chắn hơn việc bất hoạt gen. Tốt hơn nếu khung đọc của trình tự trước và sau từ vị trí chèn là không giống nhau. Sự không đồng nhất của khung đọc có thể làm lệch khung sau vùng cần được loại bỏ. Trình tự nucleotit khác không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là trình tự được chọn làm giảm hoặc loại bỏ hoạt tính của protein được mã hóa, và ví dụ về chúng bao gồm, ví dụ, gen chỉ thị như gen kháng kháng sinh, và gen hữu ích cho quá trình sản xuất chất đích.

Cụ thể hơn, sự phá vỡ gen có thể được thực hiện sao cho trình tự axit amin của protein được mã hóa được loại bỏ. Nói cách khác, sự biến đổi để làm giảm hoạt tính

của protein có thể thu được bằng cách, ví dụ, loại bỏ trình tự axit amin của protein, cụ thể hơn, biến đổi gen để mã hóa protein trong đó trình tự axit amin được loại bỏ. Thuật ngữ "sự loại bỏ trình tự axit amin của protein" đề cập đến sự loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng của trình tự axit amin của protein. Ngoài ra, thuật ngữ "sự loại bỏ trình tự axit amin của protein" nghĩa là trình tự axit amin ban đầu bị biến mất trong protein, và còn bao gồm các trường hợp trong đó trình tự axit amin ban đầu được thay đổi thành trình tự axit amin khác. Cụ thể là, ví dụ, vùng mà được thay đổi thành trình tự axit amin khác bằng sự lệch khung có thể được xem là vùng được loại bỏ. Khi trình tự axit amin của protein được loại bỏ, tổng chiều dài protein thường được làm ngắn lại, nhưng có thể còn có các trường hợp trong đó tổng chiều dài protein không được thay đổi hoặc được kéo dài. Ví dụ, bằng cách loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng của vùng mã hóa của gen, vùng được mã hóa bằng vùng được loại bỏ có thể được loại bỏ trong protein được mã hóa. Ngoài ra, ví dụ, bằng cách bổ sung bộ ba mã kết thúc vào trong vùng mã hóa của gen, vùng được mã hóa bằng vùng sau vị trí bổ sung có thể được loại bỏ trong protein được mã hóa. Ngoài ra, ví dụ, bằng sự lệch khung trong vùng mã hóa của gen, vùng được mã hóa bằng vùng lệch khung có thể được loại bỏ trong protein được mã hóa. Phần mô tả trên đây liên quan đến vị trí và chiều dài vùng được loại bỏ trong sự loại bỏ gen có thể được sử dụng với các thay đổi cần thiết đối với vị trí và chiều dài vùng được loại bỏ trong sự loại bỏ trình tự axit amin của protein.

Sự biến đổi của gen này trên nhiễm sắc thể như được mô tả trên đây có thể thu được bằng cách, ví dụ, tạo ra gen loại phá vỡ được biến đổi sao cho nó không thể sản xuất protein mà thường có chức năng, và biến nạp vật chủ với ADN tái tổ hợp bao gồm gen loại phá vỡ này để gây ra sự tái tổ hợp tương đồng giữa gen loại phá vỡ và gen kiểu dại trên nhiễm sắc thể và do đó thay thế gen loại phá vỡ đối bằng gen kiểu dại trên nhiễm sắc thể. Trong quá trình này, nếu gen chỉ thị được chọn theo đặc tính của vật chủ như hiện tượng dinh dưỡng thụ động có trong ADN tái tổ hợp, quá trình thực hiện trở nên dễ dàng hơn. Ví dụ về gen loại phá vỡ bao gồm gen trong đó một phần hoặc toàn bộ vùng của vùng mã hóa được loại bỏ, gen bao gồm đột biến sai nghĩa, gen bao gồm đột biến vô nghĩa, gen bao gồm đột biến lệch khung đọc, và gen được bổ sung với sự chèn trình tự như gen nhảy hoặc gen chỉ thị. Protein được mã hóa bằng cách gen loại phá vỡ có hình thể khác với hình thể của protein kiểu dại, thậm chí nếu nó được sản xuất, và do đó chức năng của chúng được làm giảm hoặc bị loại bỏ. Sự phá vỡ gen này trên cơ sở sự thể gen tận dụng sự tái tổ hợp tương đồng đã được tạo ra, và các phương pháp sử dụng ADN mạch thẳng như phương pháp còn được gọi là "Phương pháp tích hợp hướng Red" (Red driven integration) (Datsenko, K.A, and Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645 (2000)), và phương pháp tận

dùng sự tích hợp hướng Red ở dạng kết hợp với hệ cắt bỏ được tạo ra từ thực thể khuẩn λ (Cho, E.H., Gumport, R.I., Gardner, J.F., J. Bacteriol., 184:5200-5203 (2002)) (xem, WO2005/010175), phương pháp sử dụng plasmid có vị trí bắt đầu sao chép nhạy với nhiệt độ, phương pháp sử dụng plasmid có khả năng truyền tiếp hợp, phương pháp của tận dụng vector tự sát không có vị trí bắt đầu sao chép mà có chức năng trong vật chủ (Patent Mỹ số US 6,303,383, Công bố đơn Nhật (Kokai) số 05-007491), và phương pháp tương tự khác.

Sự biến đổi để làm giảm hoạt tính của protein có thể còn thu được bằng cách, ví dụ, quá trình xử lý gây đột biến. Ví dụ về quá trình xử lý gây đột biến bao gồm sự chiếu xạ của tia X hoặc tia cực tím và quá trình xử lý với chất gây đột biến như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), ethyl metansulfonat (EMS), và methyl metansulfonat (MMS).

Phương pháp để làm giảm hoạt tính của protein như được mô tả trên đây có thể được sử dụng một cách riêng rẽ hoặc ở dạng kết hợp tùy ý.

Khi protein chức năng ở dạng phức hợp bao gồm các tiểu đơn vị, một phần hoặc tất cả các tiểu đơn vị có thể được biến đổi, miễn là hoạt tính của protein được làm giảm. Cụ thể là, ví dụ, một phần hoặc tất cả các gen mã hóa tiểu đơn vị tương ứng có thể bị phá vỡ hoặc xử lý theo tương tự khác. Ngoài ra, khi có các isozym của protein, một phần hoặc tất cả các hoạt tính của các isozym có thể được làm giảm, miễn là hoạt tính của protein được làm giảm. Cụ thể là, ví dụ, một phần hoặc tất cả các gen mã hóa isozym tương ứng có thể bị phá vỡ hoặc xử lý theo tương tự khác.

Mức giảm về hoạt tính của protein có thể được xác định bằng xác định hoạt tính của protein.

Mức giảm về hoạt tính của protein có thể còn được xác định bằng cách xác định mức giảm về sự biểu hiện gen mã hóa protein. Mức giảm về sự biểu hiện gen có thể được xác định bằng cách xác định mức giảm về lượng phiên mã của gen hoặc sự giảm về lượng của protein được biểu hiện từ gen.

Mức giảm về lượng phiên mã của gen có thể được xác định bằng cách so sánh lượng của mARN được phiên mã từ gen với lượng của chủng không được biến đổi. Ví dụ về phương pháp để đánh giá lượng của mARN bao gồm quá trình lai Northern, RT-PCR, gen chip, trình tự RNA và phương pháp tương tự khác (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001). Lượng của mARN tốt hơn được làm giảm đến, ví dụ, 50% hoặc ít hơn, 20% hoặc ít hơn, 10% hoặc ít hơn, 5% hoặc ít hơn, hoặc 0% của lượng của chủng không được biến đổi.

Sự giảm về lượng của protein có thể được xác định bằng phương pháp Western Blot bằng cách sử dụng kháng thể (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA) 2001). Lượng của protein (như số lượng phân tử của protein trên mỗi tế bào) tốt hơn được làm giảm đến, ví dụ, 50% hoặc ít hơn, 20% hoặc ít hơn, 10% hoặc ít hơn, 5% hoặc ít hơn, hoặc 0% của lượng của chúng không được biến đổi.

Sự phá vỡ gen có thể được xác định bằng cách xác định trình tự nucleotit của một phần hoặc toàn bộ của gen, bản đồ enzym giới hạn, chiều dài hoàn chỉnh, hoặc tương tự của gen phụ thuộc vào phương pháp được sử dụng để phá vỡ.

Phương pháp để làm giảm hoạt tính của protein như được mô tả trên đây có thể được sử dụng để giảm về hoạt tính của protein tùy ý như enzym mà xúc tác cho phản ứng phân nhánh từ con đường tổng hợp của L-axit amin đích để tạo ra hợp chất khác với L-axit amin đích, và giảm về sự biểu hiện của gen tùy ý như gen mã hóa các vi khuẩn protein tùy ý.

<2> Phương pháp sản xuất L-axit amin theo sáng chế

Phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất L-axit amin bao gồm bước nuôi cấy vi khuẩn theo sáng chế trong môi trường chứa fructoza để tích lũy L-axit amin trong môi trường và/hoặc tế bào của vi khuẩn, và thu gom L-axit amin từ môi trường và/hoặc tế bào của vi khuẩn. Theo sáng chế, một loại của L-axit amin có thể được sản xuất, hoặc hai hoặc nhiều hơn các loại L-axit amin có thể được sản xuất.

Môi trường được sử dụng không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là nó bao gồm fructoza, vi khuẩn theo sáng chế có thể tăng sinh trong đó, và L-axit amin đích có thể được sản xuất. Đối với môi trường, ví dụ, môi trường thông dụng được sử dụng đối với môi trường nuôi cấy của vi khuẩn như vi khuẩn coryneform và vi khuẩn *Enterobacteriaceae* có thể được sử dụng. Đối với môi trường, ví dụ, môi trường bao gồm nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, và nguồn lưu huỳnh, cũng như các thành phần được chọn từ thành phần hữu cơ và thành phần vô cơ nếu khác cần có thể được sử dụng, cùng với fructoza. Loại và nồng độ của các thành phần môi trường có thể được xác định một cách thích hợp theo các điều kiện như loại của vi khuẩn được sử dụng.

Trong phương pháp theo sáng chế, fructoza có thể hoặc có thể không được sử dụng làm nguồn cacbon duy nhất. Cụ thể là, trong phương pháp theo sáng chế, fructoza và nguồn cacbon khác có thể được sử dụng ở dạng kết hợp. Ví dụ cụ thể về nguồn cacbon khác bao gồm, ví dụ, sacarit như glucoza, sucroza, lactoza, galactoza,

xyloza, arabinoza, mật mía, sản phẩm thủy phân của tinh bột, và sản phẩm thủy phân của sinh khối, axit hữu cơ như axit axetic, axit fumaric, axit xitric, và axit suxcinic, rượu như glyxerol, glyxerol thô, và etanol, và axit béo. Ví dụ cụ thể về nguồn cacbon khác bao gồm glucoza. Đối với nguồn cacbon khác, nguyên liệu được tạo ra từ thực vật có thể được ưu tiên sử dụng. Ví dụ về thực vật bao gồm, ví dụ, ngũ cốc, lúa, lúa mì, đậu tương, mía, củ cải đường, và bông. Ví dụ về nguyên liệu được tạo ra từ thực vật bao gồm, ví dụ, bộ phận như rễ, thân cây, cuống, nhánh, lá, hoa, và hạt, thân thực vật bao gồm chúng, và sản phẩm phân hủy từ bộ phận thực vật của chúng. Dạng của nguyên liệu được tạo ra từ thực vật ở thời điểm sử dụng của chúng không bị giới hạn một cách cụ thể, và chúng có thể được sử dụng ở dạng bất kỳ như sản phẩm chưa được xử lý, dịch ép, sản phẩm được nghiền, và sản phẩm tinh chế. Pentoza như xyloza, hexoza như glucoza, hoặc hỗn hợp của chúng có thể thu được từ, ví dụ, sinh khối thực vật, và được sử dụng. Cụ thể hơn, các sacarit này có thể thu được bằng cách cho sinh khối thực vật vào các quá trình xử lý làm quá trình xử lý bằng hơi nước, thủy phân với axit đặc, thủy phân với axit loãng, thủy phân với enzym như xenlulaza, và quá trình xử lý bằng kiềm. Vì hemixenluloza thường bị thủy phân một cách dễ dàng hơn so với xenluloza, hemixenluloza trong sinh khối thực vật có thể là bị thủy phân trước để giải phóng pentoza, và sau đó xenluloza có thể là bị thủy phân để tạo ra hexoza. Ngoài ra, xyloza có thể được tạo ra bằng quá trình chuyển hóa từ hexoza bằng cách, ví dụ, tạo ra con đường chuyển hóa hexoza như glucoza thành xyloza cho vi khuẩn theo sáng chế. Đối với nguồn cacbon khác, một loại nguồn cacbon duy nhất có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều hơn các loại nguồn cacbon có thể được sử dụng ở dạng kết hợp.

Ví dụ cụ thể về nguồn nitơ bao gồm, ví dụ, muối amoni như amoni sulfat, amoni clorua, và amoni phosphat, nguồn nitơ hữu cơ như pepton, phần chiết men, phần chiết thịt, và sản phẩm phân hủy protein đậu tương, amoniac, và ure. Khí amoniac hoặc dung dịch amoniac trong nước được sử dụng để điều chỉnh pH có thể còn được sử dụng làm nguồn nitơ. Đối với nguồn nitơ, một loại nguồn nitơ duy nhất có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều hơn các loại nguồn nitơ có thể được sử dụng ở dạng kết hợp.

Ví dụ cụ thể về nguồn phosphat bao gồm, ví dụ, muối của axit phosphoric như kali dihydrogenphosphat và dikali hydrogenphosphat, và polyme axit phosphoric như axit pyrophosphoric. Đối với nguồn phosphat, một loại nguồn phosphat duy nhất có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều hơn các loại nguồn phosphat có thể được sử dụng ở dạng kết hợp.

Ví dụ cụ thể về nguồn lưu huỳnh bao gồm, ví dụ, hợp chất lưu huỳnh vô cơ

như sulfat, thiosulfat, và sulfit, và axit amin chứa lưu huỳnh như xystein, xystin, và glutathion. Đối với nguồn lưu huỳnh, một loại nguồn lưu huỳnh duy nhất có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều hơn các loại nguồn lưu huỳnh có thể được sử dụng ở dạng kết hợp.

Ví dụ cụ thể về thành phần hữu cơ và thành phần vô cơ bao gồm, ví dụ, vô cơ muối như natri clorua và kali clorua; vi lượng kim loại như sắt, mangan, magie, và canxi; vitamin như vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, axit nicotinic, nicotinamit, và vitamin B12; axit amin; axit nucleic; và các thành phần hữu cơ bao gồm các thành phần như pepton, casamino axit, phần chiết men, và sản phẩm phân hủy protein đậu tương. Đối với thành phần hữu cơ và thành phần vô cơ, một loại thành phần duy nhất có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều hơn các loại các thành phần có thể được sử dụng ở dạng kết hợp.

Ngoài ra, khi đột biến dinh dưỡng thụ động mà cần axit amin hoặc vi khuẩn tương tự khác để phát triển được sử dụng, tốt hơn là cung cấp chất dinh dưỡng cần thiết cho môi trường.

Ngoài ra, tốt hơn là, ví dụ, giới hạn lượng của biotin trong môi trường, hoặc bổ sung chất hoạt động bề mặt hoặc penicillin vào môi trường.

Điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là vi khuẩn theo sáng chế có thể tăng sinh, và L-axit amin đích có thể được sản xuất. Quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện, ví dụ, dưới điều kiện thường được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn như vi khuẩn coryneform và vi khuẩn *Enterobacteriaceae*. Điều kiện nuôi cấy có thể được điều chỉnh một cách thích hợp theo các điều kiện như loại của vi khuẩn được sử dụng.

Môi trường nuôi cấy có thể được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường lỏng. Ở thời điểm nuôi cấy, vi khuẩn theo sáng chế được nuôi cấy trên môi trường rắn như môi trường aga có thể được cấy truyền một cách trực tiếp vào trong môi trường lỏng, hoặc vi khuẩn theo sáng chế được nuôi cấy trong môi trường lỏng làm môi trường nuôi cấy mầm có thể là được cấy truyền vào trong môi trường lỏng đối với môi trường nuôi cấy chính. Cụ thể là, quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện một cách riêng rẽ dưới dạng quá trình nuôi cấy mầm và quá trình nuôi cấy chính. Trong trường hợp này, điều kiện nuôi cấy của quá trình nuôi cấy mầm và quá trình nuôi cấy chính có thể giống hoặc không giống nhau. Lượng của vi khuẩn theo sáng chế có trong môi trường ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy không bị giới hạn một cách cụ thể. Quá trình nuôi cấy chính có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, cấy truyền môi trường canh dinh dưỡng mầm vào môi trường đối với quá trình nuôi cấy chính với lượng là 1 đến 50%(thể tích/thể tích).

Việc nuôi cấy có thể được thực hiện làm việc nuôi cấy mẻ, việc nuôi cấy mẻ bổ sung cơ chất, việc nuôi cấy liên tục, hoặc dạng kết hợp của chúng. Môi trường được sử dụng ở thời điểm bắt đầu của việc nuôi cấy còn được gọi là "môi trường bắt đầu". Môi trường được cấp vào hệ nuôi cấy (bể lên men) trong việc nuôi cấy mẻ bổ sung cơ chất hoặc việc nuôi cấy liên tục còn được gọi là "môi trường cấp". Ngoài ra, để cung cấp môi trường cấp cho hệ nuôi cấy trong việc nuôi cấy mẻ bổ sung cơ chất hoặc việc nuôi cấy liên tục còn được gọi là "cấp". Ngoài ra, khi việc nuôi cấy được thực hiện một cách riêng rẽ dưới dạng việc nuôi cấy mầm và việc nuôi cấy chính, ví dụ, cả hai việc nuôi cấy mầm và việc nuôi cấy chính có thể được thực hiện dưới dạng việc nuôi cấy mẻ. Ngoài ra, ví dụ, việc nuôi cấy mầm có thể được thực hiện dưới dạng việc nuôi cấy mẻ, và việc nuôi cấy chính có thể được thực hiện dưới dạng việc nuôi cấy mẻ bổ sung cơ chất hoặc việc nuôi cấy liên tục.

Theo sáng chế, mỗi thành phần môi trường có thể có trong môi trường bắt đầu, môi trường cấp, hoặc cả hai. Loại thành phần có trong môi trường bắt đầu có thể giống hoặc khác với loại thành phần có trong môi trường cấp. Nồng độ của mỗi thành phần có trong môi trường bắt đầu có thể giống hoặc khác với nồng độ của thành phần có trong môi trường cấp. Ngoài ra, hai hoặc nhiều hơn các loại môi trường cấp bao gồm các loại khác nhau và/hoặc nồng độ khác nhau của các thành phần có thể được sử dụng. Ví dụ, khi môi trường được cấp không liên tục theo nhiều lần, loại và/hoặc nồng độ của các thành phần có trong môi trường cấp có thể giống hoặc khác nhau đối với mỗi lần cấp.

Nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là vi khuẩn theo sáng chế có thể tăng sinh và sản xuất L-axit amin. Nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường có thể ở mức cao nhất có thể trong khoảng sao cho quá trình sản xuất L-axit amin không bị ức chế. Nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường có thể là, làm nồng độ ban đầu (nồng độ trong môi trường bắt đầu), ví dụ, 1 đến 30% (w/v), tốt hơn là 3 đến 10% (w/v). Ngoài ra, nguồn cacbon có thể còn được cấp vào môi trường nếu cần. Ví dụ, nguồn cacbon có thể còn được cấp vào môi trường tương ứng với sự tiêu thụ nguồn cacbon cùng với tiến trình của quá trình lên men.

Khi fructoza và nguồn cacbon khác được sử dụng ở dạng kết hợp, tỷ lệ của lượng của fructoza so với tổng lượng của nguồn cacbon không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là vi khuẩn theo sáng chế có thể tận dụng fructoza làm nguồn cacbon. Tỷ lệ của lượng của fructoza so với tổng lượng của nguồn cacbon có thể là, ví dụ, 5% khối lượng hoặc cao hơn, 10% khối lượng hoặc cao hơn, 20% khối lượng hoặc cao hơn, 30% khối lượng hoặc cao hơn, 40% khối lượng hoặc cao hơn, hoặc 50% khối lượng

hoặc cao hơn. Tỷ lệ của lượng của fructoza so với tổng lượng của nguồn cacbon có thể là trong khoảng được mô tả trên đây theo, ví dụ, lượng ban đầu (cụ thể là lượng trong môi trường bắt đầu), lượng được cấp (cụ thể là lượng trong môi trường cấp), hoặc tổng lượng sử dụng (cụ thể là tổng lượng của lượng ban đầu và lượng được cấp).

Nồng độ của fructoza trong môi trường không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là vi khuẩn theo sáng chế có thể tận dụng fructoza làm nguồn cacbon. Fructoza có thể có trong môi trường, ví dụ, ở nồng độ là 0,2% trọng lượng/thể tích hoặc cao hơn, 0,5% trọng lượng/thể tích hoặc cao hơn, hoặc 1,0% trọng lượng/thể tích hoặc cao hơn, hoặc ở nồng độ là 30% trọng lượng/thể tích hoặc thấp hơn, 20% trọng lượng/thể tích hoặc thấp hơn, 10% trọng lượng/thể tích hoặc thấp hơn, 5% trọng lượng/thể tích hoặc thấp hơn, hoặc 2% trọng lượng/thể tích hoặc thấp hơn, hoặc ở nồng độ trong khoảng được xác định cho dạng kết hợp của chúng. Fructoza có thể có trong môi trường bắt đầu, môi trường cấp, hoặc cả hai môi trường này ở nồng độ trong khoảng được minh họa trên đây.

Khi fructoza có trong môi trường cấp, fructoza có thể có trong môi trường cấp ở nồng độ sao cho, ví dụ, nồng độ fructoza trong môi trường sau khi cấp lên đến 0,01% trọng lượng/thể tích hoặc cao hơn, 0,02% trọng lượng/thể tích hoặc cao hơn, hoặc 0,05% trọng lượng/thể tích hoặc cao hơn, hoặc lên đến 5% trọng lượng/thể tích hoặc thấp hơn, 2% trọng lượng/thể tích hoặc thấp hơn, hoặc 1% trọng lượng/thể tích hoặc thấp hơn, hoặc lên đến trong khoảng được xác định cho dạng kết hợp của chúng.

Fructoza có thể có trong môi trường ở nồng độ trong khoảng được minh họa trên đây, khi fructoza được sử dụng làm nguồn cacbon duy nhất. Ngoài ra, fructoza có thể còn có trong môi trường ở nồng độ trong khoảng được minh họa trên đây, khi nguồn cacbon khác được sử dụng ở dạng kết hợp. Ngoài ra, fructoza có thể còn có trong môi trường ở nồng độ trong khoảng được xác định bằng cách biến đổi thích hợp khoảng được minh họa trên đây trên cơ sở, ví dụ, tỷ lệ của lượng của fructoza so với tổng lượng của nguồn cacbon, hoặc tỷ lệ tương tự khác, khi nguồn cacbon khác được sử dụng ở dạng kết hợp.

Fructoza có thể có hoặc có thể không có trong môi trường trong toàn bộ thời gian nuôi cấy. Ví dụ, fructoza có thể có hoặc có thể không có trong môi trường trong khoảng xác định, như khoảng được minh họa trên đây, trong toàn bộ thời gian nuôi cấy. Ví dụ, fructoza có thể được cho làm việc trong khoảng thời gian ngắn trong một phần thời gian nuôi cấy. Thuật ngữ "làm việc trong khoảng thời gian ngắn" nghĩa là lượng của fructoza nhỏ hơn lượng cần thiết, và nó có thể có nghĩa là, ví dụ, nồng độ trong môi trường là 0. Ví dụ, fructoza có thể có hoặc có thể không có trong môi trường từ

thời điểm bắt đầu nuôi cấy. Khi fructoza không có trong môi trường ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy, fructoza được cấp vào môi trường sau thời điểm bắt đầu nuôi cấy. Khoảng thời gian cấp của fructoza có thể được xác định một cách thích hợp theo các điều kiện như khoảng thời gian nuôi cấy. Ngoài ra, ví dụ, fructoza có thể được tiêu thụ trong quá trình nuôi cấy, và do đó nồng độ của nó trong môi trường có thể trở thành 0. Thuật ngữ "một phần thời gian nuôi cấy" có thể đề cập đến, ví dụ, 1% hoặc ít hơn, 5% hoặc ít hơn, 10% hoặc ít hơn, 20% hoặc ít hơn, 30% hoặc ít hơn, hoặc 50% hoặc ít hơn toàn bộ thời gian nuôi cấy. Khi quá trình nuôi cấy được thực hiện dưới dạng quá trình nuôi cấy mầm riêng rẽ và quá trình nuôi cấy chính, thuật ngữ "toàn bộ thời gian nuôi cấy" có thể có nghĩa là toàn bộ thời gian nuôi cấy chính. Tốt hơn nếu, trong khoảng thời gian khi fructoza làm việc trong khoảng thời gian ngắn, nguồn cacbon khác có mặt với lượng đủ hiệu quả. Thậm chí nếu fructoza làm việc trong khoảng thời gian ngắn trong một phần thời gian nuôi cấy như được mô tả trên đây, miễn là có khoảng thời gian nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường chứa fructoza, quá trình nuôi cấy này nằm trong phạm vi của thuật ngữ "nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường chứa fructoza".

Nồng độ của các thành phần như fructoza có thể được xác định bằng sắc ký khí (Hashimoto, K. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1996, 70:22-30) hoặc HPLC (Lin, J.T. et al., *J. Chromatogr. A.*, 1998, 808:43-49).

Môi trường nuôi cấy có thể được thực hiện, ví dụ, dưới điều kiện ưa khí. Thuật ngữ "điều kiện ưa khí" đề cập đến điều kiện trong đó nồng độ oxy hòa tan trong môi trường lỏng không thấp hơn 0,33 ppm, mà là giới hạn phát hiện đối với việc phát hiện của điện cực màng oxy, hoặc có thể tốt hơn là điều kiện trong đó nồng độ oxy hòa tan trong môi trường lỏng không thấp hơn 1,5 ppm. Nồng độ oxy có thể được điều chỉnh đến, ví dụ, 5 đến 50%, tốt hơn là khoảng 10%, của nồng độ oxy bão hòa. Cụ thể hơn, quá trình nuôi cấy dưới điều kiện ưa khí có thể được thực hiện bằng quá trình nuôi cấy thông khí, quá trình nuôi cấy lắc, quá trình nuôi cấy khuấy, hoặc dạng kết hợp của chúng. pH của môi trường có thể là, ví dụ, 3 đến 10, tốt hơn là 4,0 đến 9,5. Trong quá trình nuôi cấy, pH của môi trường có thể được điều chỉnh nếu cần. pH của môi trường có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng chất kiềm và axit như khí amoniac, dung dịch amoniac trong nước, natri cacbonat, natri bicacbonat, kali cacbonat, kali bicacbonat, magie cacbonat, natri hydroxit, canxi hydroxit, và magie hydroxit. Nhiệt độ nuôi cấy có thể là, ví dụ, 20 đến 45°C, tốt hơn là 25 đến 37°C. Khoảng thời gian nuôi cấy có thể là, ví dụ, 10 đến 120 giờ. Quá trình nuôi cấy có thể là liên tục, ví dụ, đến khi nguồn cacbon có trong môi trường được tiêu thụ, hoặc đến khi vi khuẩn theo sáng chế mất hoạt tính. Bằng cách nuôi cấy vi khuẩn theo sáng chế dưới điều kiện như được mô tả trên đây, L-axit amin được tích lũy trong môi trường và/hoặc tế bào của vi

khuẩn.

Ngoài ra, khi axit L-glutamic được sản xuất, quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường lỏng được điều chỉnh để thỏa mãn điều kiện trong đó axit L-glutamic kết tủa, đồng thời kết tủa axit L-glutamic trong môi trường này. Ví dụ về điều kiện trong đó axit L-glutamic kết tủa bao gồm, ví dụ, pH là 5,0 đến 4,0, tốt hơn nếu pH là 4,5 đến 4,0, tốt hơn nữa nếu pH là 4,3 đến 4,0, đặc biệt tốt hơn nếu pH khoảng 4,0 (EP1078989A).

Quá trình sản xuất L-axit amin có thể được xác định bằng phương pháp đã biết được sử dụng để phát hiện hoặc xác định hợp chất. Ví dụ về phương pháp này bao gồm, ví dụ, HPLC, LC/MS, GC/MS, và NMR. Các phương pháp này có thể được sử dụng một cách riêng rẽ, hoặc có thể được sử dụng kết hợp theo cách thích hợp.

L-axit amin tạo ra có thể được thu gom từ dịch lỏng lên men bằng phương pháp đã biết được sử dụng để phân tách và tinh chế hợp chất. Ví dụ về phương pháp này bao gồm, ví dụ, phương pháp sử dụng nhựa trao đổi ion (Nagai, H. et al., Separation Science and Technology, 39(16), 3691-3710), phương pháp kết tủa, tách bằng màng (Công bố đơn Nhật (Kokai) số 9-164323 và Công bố đơn Nhật (Kokai) số 9-173792), và phương pháp kết tinh (WO2008/078448 và WO2008/078646). Các phương pháp này có thể được sử dụng một cách riêng rẽ, hoặc có thể được sử dụng kết hợp theo cách thích hợp. Khi L-axit amin được tích lũy trong tế bào của vi khuẩn, ví dụ, tế bào có thể bị phá vỡ với sóng siêu âm hoặc phương pháp tương tự khác, dịch nổi bề mặt có thể thu được bằng cách loại bỏ tế bào từ huyền phù chứa tế bào bị phá vỡ bằng ly tâm, và L-axit amin có thể được thu gom từ dịch nổi bề mặt bằng phương pháp sử dụng nhựa trao đổi ion hoặc phương pháp tương tự khác. L-axit amin được thu gom có thể là hợp chất ở dạng tự do, muối của chúng, hoặc hỗn hợp của chúng. Ví dụ về muối bao gồm, ví dụ, sulfat, hydroclorua, cacbonat, muối amoni, muối natri, và muối kali. Khi axit L-glutamic được sản xuất, axit L-glutamic được thu gom cụ thể hơn có thể là, ví dụ, axit L-glutamic dạng tự do, natri L-glutamat (mononatri L-glutamat, MSG), amoni L-glutamat (monoamoni L-glutamat), hoặc hỗn hợp của chúng. Ví dụ, mononatri L-glutamat (MSG) có thể thu được bằng cách bổ sung axit vào dịch lỏng lên men để kết tinh amoni L-glutamat có trong đó, và sau đó bằng cách bổ sung lượng đẳng mol của natri hydroxit vào các tinh thể thu được. Ngoài ra, việc khử màu có thể được thực hiện bằng cách sử dụng cacbon hoạt hóa trước và/hoặc sau khi kết tinh (xem, Tetsuya KAWAKITA, "Industrial Crystallization for Monosodium L-Glutamate.", Bulletin of Society of Sea Water Science, Nhật Bản, Vol.56:5). Tinh thể mononatri L-glutamat có thể được sử dụng làm, ví dụ, gia vị umami. Tinh thể mononatri L-glutamat

có thể còn được sử dụng làm gia vị ở dạng kết hợp với axit nucleic như natri guanylat và natri inosinat, mà còn có vị umami.

Khi L-axit amin kết tủa trong môi trường, nó có thể được thu gom bằng ly tâm, lọc, hoặc phương pháp tương tự khác. L-axit amin kết tủa trong môi trường có thể còn được phân lập cùng với L-axit amin hòa tan trong môi trường, sau đó L-axit amin hòa tan trong môi trường được kết tinh.

L-axit amin được thu gom có thể bao gồm này các thành phần như tế bào vi khuẩn, các thành phần môi trường, hơi ẩm, và chất chuyển hóa dưới dạng sản phẩm phụ của vi khuẩn cùng với L-axit amin. L-axit amin được thu gom có thể còn được tinh chế ở mức độ tinh khiết mong muốn. Độ tinh khiết của L-axit amin được thu gom có thể là, ví dụ, 50% (trọng lượng/trọng lượng) hoặc cao hơn, tốt hơn là 85% (trọng lượng/trọng lượng) hoặc cao hơn, đặc biệt tốt hơn là 95% (trọng lượng/trọng lượng) hoặc cao hơn (JP1214636B, USP5,431,933, USP4,956,471, USP4,777,051, USP4,946,654, USP5,840,358, USP6,238,714, và US2005/0025878).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn nữa thông qua các ví dụ minh họa mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế

Ví dụ: Quá trình sản xuất axit glutamic bằng cách sử dụng chủng *Corynebacterium glutamicum* có sự biểu hiện của gen *fucP-frk* được nâng cao

Trong Ví dụ này, quá trình sản xuất axit glutamic được thực hiện bằng cách sử dụng chủng sản xuất axit glutamic của *C. Glutamicum* được bổ sung với gen chất mang hấp thụ fructoza không PTS (*fucP*) và gen fructokinaza (*frk*), và hiệu quả của sự biểu hiện của gen *fucP-frk* được nâng cao đối với quá trình sản xuất axit glutamic được đánh giá.

(1) Nguyên liệu

Nguyên liệu được sử dụng trong ví dụ này là như sau.

Bảng 1 <Đoạn môi được sử dụng>

Đoạn môi	SEQ ID NO	Trình tự nucleotit (5'→3')
1	1	CCAAGCTTGCATGCCATTTGCGCCTGCAACGTAGGTTG
2	2	AACAGGAATGTTTCCTTTCGAAAA
3	3	AGGAACATTCCTGTTATGACTTCAAATATCCAAACCAGCG
4	4	TATAATCCTCCTTTAAGCATGTGATTCTTCCTTTGTC

5	5	GAATCACATGCTTAAAGGAGGATTATAATGACTACCCCGATCGTTCTGAG
6	6	CCAAGCTTGCATGCCAGGAGGATTATAATGACTACCCCGATCGTTCTGAG
7	7	CCAAGCTTGCATGCCCCGGGGTGCTACGCG
8	8	CGGTACCCGGGGATCAGCACAGGACCGTTTGCCATTG

<Plasmit được sử dụng>

pVK9 (Km^R; US2006-0141588)

pVK9-xfp (Km^R; WO2006/016705)

pVK9-P_{msrA}-*fucP*-frk (Km^R; theo sáng chế)

pVS7 (Spc^R; WO2013/069634)

pVS7-xfp (Spc^R; theo sáng chế)

<Chủng được sử dụng>

C. Glutamicum 2256Δ*sucA*Δ*ldhA* *YggB*^{*} (WO2014/185430)

C. Glutamicum 2256Δ*sucA*Δ*ldhA* *YggB*^{*}/pVK9/pVS7 (theo sáng chế)

C. Glutamicum 2256Δ*sucA*Δ*ldhA* *YggB*^{*}/pVK9-P_{msrA}-*fucP*-frk/pVS7 (theo sáng chế)

C. Glutamicum 2256Δ*sucA*Δ*ldhA* *YggB*^{*}/pVK9/pVS7-xfp (theo sáng chế)

C. Glutamicum 2256Δ*sucA*Δ*ldhA* *YggB*^{*}/pVK9-P_{msrA}-*fucP*-frk/pVS7-xfp (theo sáng chế)

(2) Quá trình tạo cấu trúc plasmit và chủng

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của chủng *C. Glutamicum* 2256 (ATCC 13869) làm mẫu, và các đoạn mồi 1 và 2, để khuếch đại mảnh ADN bao gồm vùng trước của gen *msrA* của *C. Glutamicum* (bao gồm vùng khởi động vùng; 369 bp). PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 làm mẫu, và đoạn mồi 3 và 4, để khuếch đại mảnh ADN bao gồm gen *fucP* của *C. ammoniagenes* (Ngân hàng gen (GenBank): AMJ44784.1; 1335 bp). PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của *Bifidobacterium longum* JCM1217 làm mẫu, và đoạn mồi 5 và 6, để khuếch đại mảnh ADN bao gồm gen *frk* của *B. Longum* (GenBank: BAJ66931.1; 897 bp). Các mảnh ADN thu được và pVK9 (US2006-0141588) được tiêu hóa bằng *Bam*HI và *Pst*II được buộc với nhau bằng cách sử dụng kit tạo dòng Clontech In-fusion HD Cloning Kit (TaKaRa Inc.), để tạo cấu trúc pVK9-P_{msrA}-*fucP*-frk, mà là plasmit biểu hiện của gen *fucP*-*frk*.

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng pVK9-xfp (WO2006/016705) làm mẫu, và đoạn mồi 7 và 8, để khuếch đại mảnh ADN bao gồm gen phosphoketolaza (*xfp*) của *B. Longum* JCM1217. Mảnh ADN thu được và pVS7 (WO2013/069634) được tiêu hóa bằng *Bam*HI và *Pst*II được buộc với nhau bằng cách sử dụng kit tạo dòng Clontech In-fusion HD Cloning Kit (TaKaRa Inc.), để tạo cấu trúc pVS7-xfp, mà là plasmit biểu hiện của *xfp* gen.

Plasmit được tạo cấu trúc được bổ sung vào trong chủng *C. Glutamicum* 2256 Δ *sucA* Δ *ldhA* *YggB** (WO2014/185430), để tạo cấu trúc chủng có sự biểu hiện được nâng cao của gen *fucP-frk* và gen *xfp*. Chủng khác được sử dụng còn được tạo cấu trúc bằng cách bổ sung plasmit tương ứng. Chủng 2256 Δ *sucA* Δ *ldhA* *YggB** là chủng sản xuất axit glutamic được tạo ra từ chủng *C. Glutamicum* 2256 (ATCC 13869). Chủng 2256 Δ *sucA* Δ *ldhA* *YggB** bị thiếu hụt gen *ldhA* và *sucA*, và có đột biến IS (V419::IS) trong gen *YggBe*. Trình tự nucleotit của gen *YggB* đột biến này (V419::IS) và trình tự axit amin của protein *YggB* đột biến (V419::IS) được mã hóa bằng gen lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 11 và 12.

(3) Việc nuôi cấy sản xuất axit glutamic

Việc nuôi cấy sản xuất axit glutamic được thực hiện bằng cách sử dụng chủng được tạo cấu trúc. Thành phần của môi trường được sử dụng được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: Thành phần của môi trường

Môi trường CM2G		
Pepton	10	g/L
Phân chiết men	10	g/L
NaCl	5	g/L
Biotin	10	μ g/L
Glucoza	5	g/L

Môi trường của thành phần trên đây được điều chỉnh đến pH là 7,0 với KOH được điều chế, được làm vô trùng bằng nồi hấp (120°C, 20 phút), và được sử dụng cho quá trình nuôi cấy.

Môi trường 1		
Fructoza	80	g/L

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	30	g/L
KH_2PO_4	1	g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01	g/L
VB_1	200	$\mu\text{g/L}$
Biotin	60	$\mu\text{g/L}$
Mameno	0,48	g/L

Môi trường của thành phần trên đây được điều chỉnh đến pH là 8,0 với KOH được điều chế, và được làm vô trùng bằng nồi hấp (115°C , 15 phút). Môi trường được làm vô trùng được bổ sung bằng CaCO_3 ở nồng độ là 50 g/L, và được sử dụng cho quá trình nuôi cấy.

Môi trường 2		
Glucoza	40	g/L
Fructoza	40	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	30	g/L
KH_2PO_4	1	g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01	g/L
VB_1	200	$\mu\text{g/L}$
Biotin	60	$\mu\text{g/L}$
Mameno	0,48	g/L

Môi trường của thành phần trên đây được điều chỉnh đến pH là 8,0 với KOH được điều chế, và được làm vô trùng bằng nồi hấp (115°C , 15 phút). Môi trường được làm vô trùng được bổ sung bằng CaCO_3 ở nồng độ là 50 g/L, và được sử dụng cho quá trình nuôi cấy.

<Đánh giá việc nuôi cấy 1: Đánh giá với môi trường chứa fructoza làm nguồn cacbon>

Mỗi chủng được nuôi cấy trên đĩa CM2G được bổ sung bằng (các) kháng sinh tương ứng qua đêm ở $31,5^\circ\text{C}$. Tế bào ở lượng tương ứng với 1/6 của đĩa được cạo vét, được cấy truyền vào trong 20 mL môi trường 1 có trong bình Sakaguchi, và được nuôi

cấy ở 30°C kèm với lắc ở 120 rpm (vòng/phút). Môi trường canh dinh dưỡng được lấy mẫu ở 18 giờ sau thời điểm bắt đầu nuôi cấy, và nồng độ của axit glutamic được xác định bằng cách sử dụng thiết bị phân tích Biotech-Analyzer AS-310 (SAKURA SI).

Kết quả được thể hiện trong Fig.1, sự biểu hiện được nâng cao của gen *fucP-frk* được xác định là nâng cao sự tích lũy của axit glutamic. Ngoài ra, sự biểu hiện được nâng cao của gen *fucP-frk* ở dạng kết hợp với gen *xfp* còn được xác định là nâng cao sự tích lũy của axit glutamic. Do đó, có thể kết luận rằng gen *fucP-frk* là thành phần hiệu quả đối với quá trình sản xuất axit glutamic bằng cách sử dụng fructoza làm nguồn cacbon.

<Đánh giá việc nuôi cấy 2: Đánh giá với môi trường bao gồm glucoza và fructoza làm nguồn cacbon>

Mỗi chủng được nuôi cấy trên đĩa CM2G được bổ sung bằng (các)kháng sinh tương ứng qua đêm ở 31,5°C. Tế bào ở lượng tương ứng với 1/6 của đĩa được cạo vét, được cấy truyền vào trong 20 mL môi trường 2 có trong bình Sakaguchi, và được nuôi cấy ở 30°C kèm với lắc ở 120 rpm. Môi trường canh dinh dưỡng được lấy mẫu ở 18 giờ sau thời điểm bắt đầu nuôi cấy, và lượng của tế bào (giá trị OD ở 620 nm; được pha loãng 101 lần) và nồng độ của axit glutamic được xác định. Nồng độ của axit glutamic được xác định bằng cách sử dụng thiết bị phân tích Biotech-Analyzer AS-310 (SAKURA SI).

Kết quả được thể hiện trong Fig.2. sự biểu hiện được nâng cao của gen *fucP-frk* được xác định là nâng cao sự tích lũy của axit glutamic trên mỗi lượng của tế bào. Ngoài ra, sự biểu hiện được nâng cao của gen *fucP-frk* ở dạng kết hợp với gen *xfp* còn được xác định là nâng cao sự tích lũy của axit glutamic trên mỗi lượng của tế bào. Do đó, có thể kết luận rằng gen *fucP-frk* là thành phần hiệu quả đối với quá trình sản xuất axit glutamic bằng cách sử dụng glucoza và fructoza làm nguồn cacbon.

Danh mục trình tự

Trình tự SEQ ID NO:

1-8: Đoạn môi

9: Trình tự nucleotit của gen *YggB* của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

10: Trình tự axit amin của protein *YggB* của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

11: Trình tự nucleotit của gen *YggB* đột biến (V419::IS) của *Corynebacterium*

glutamicum 2256 (ATCC 13869)

12: Trình tự axit amin của protein được mã hóa bằng gen *YggB* đột biến (V419::IS) của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

13: Trình tự nucleotit của gen *xfp* của *Bifidobacterium longum* JCM1217

14: Trình tự axit amin của protein Xfp của *Bifidobacterium longum* JCM1217

15-25: Đoạn mồi

26: Trình tự nucleotit của gen *fucP* của *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872

27: Trình tự axit amin của protein *FucP* của *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872

28: Trình tự nucleotit của gen *fucP* của *Pantoea ananatis* AJ13355

29: Trình tự axit amin của protein *FucP* của *Pantoea ananatis* AJ13355

30: Trình tự nucleotit của gen *frk* của *Bifidobacterium longum* JCM1217

31: Trình tự axit amin của protein *frk* của *Bifidobacterium longum* JCM1217

32: Trình tự nucleotit của *frk (mak)* gen của *Pantoea ananatis* AJ13355

33: Trình tự axit amin của protein *frk* (Mak) của *Pantoea ananatis* AJ13355

34: Trình tự nucleotit của *frk (scrK)* gen của *Pantoea ananatis* AJ13355

35: Trình tự axit amin của protein *frk* (ScrK) của *Pantoea ananatis* AJ13355

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất L-axit amin, phương pháp này bao gồm các bước:

A) nuôi cấy vi khuẩn có khả năng sản xuất L-axit amin trong môi trường chứa fructoza sao cho L-axit amin được tạo ra và tích lũy trong môi trường và/hoặc vi khuẩn; và

B) thu gom L-axit amin từ môi trường và/hoặc vi khuẩn,

trong đó L-axit amin được chọn từ nhóm bao gồm axit L-glutamic, L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-xitrulin, và L-ornithin,

trong đó vi khuẩn đã được biến đổi sao cho hoạt tính của chất mang hấp thụ fructoza không hệ enzym phosphotransferaza (Phosphotransferase System - PTS) và hoạt tính của fructokinaza được làm tăng so với vi khuẩn không được biến đổi bằng cách lần lượt làm tăng sự biểu hiện gen mã hóa chất mang hấp thụ fructoza không PTS và gen mã hóa fructokinaza,

trong đó chất mang hấp thụ fructoza không PTS là protein được chọn từ nhóm bao gồm:

(1a) protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 27 hoặc 29;

(1b) protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 27 hoặc 29, mà còn bao gồm sự thế, sự loại bỏ, sự chèn, và/hoặc sự bổ sung 1 đến 10 gốc axit amin, và trong đó protein này có hoạt tính hấp thụ fructoza không PTS; và

(1c) protein chứa trình tự axit amin có độ tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin SEQ ID NO: 27 hoặc 29, và trong đó protein này có hoạt tính hấp thụ fructoza không PTS, và

trong đó fructokinaza là protein được chọn từ nhóm bao gồm:

(2a) protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 31, 33, hoặc 35;

(2b) protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 31, 33, hoặc 35, mà còn bao gồm sự thế, sự loại bỏ, sự chèn, và/hoặc sự bổ sung 1 đến 10 gốc axit amin, và trong đó protein này có hoạt tính fructokinaza; và

(2c) protein chứa trình tự axit amin có độ tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin SEQ ID NO: 31, 33, hoặc 35, và trong đó protein này có hoạt tính fructokinaza.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất mang hấp thụ fructoza không PTS là protein được mã hóa bằng gen *fucP*.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó fructokinaza là protein được mã hóa bằng gen *frk*.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước làm tăng sự biểu hiện bao gồm làm tăng số lượng bản sao của (các) gen và/hoặc thay thế vùng khởi động của (các) gen bằng vùng khởi động mạnh hơn.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn còn được biến đổi sao cho hoạt tính của phosphoketolaza được làm tăng so với vi khuẩn không được biến đổi bằng cách làm tăng sự biểu hiện của gen mã hóa phosphoketolaza.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó phosphoketolaza là D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và/hoặc fructoza-6-phosphat phosphoketolaza.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn coryneform hoặc vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae*.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn thuộc chi *Corynebacterium*.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó vi khuẩn là *Corynebacterium glutamicum*.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn thuộc chi *Pantoea* hoặc *Escherichia*.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó vi khuẩn là *Pantoea ananatis* hoặc *Escherichia coli*.
12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó L-axit amin là axit L-glutamic.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó axit L-glutamic là monoamoni L-glutamat hoặc mononatri L-glutamat.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn còn được biến đổi sao cho hoạt tính của α -ketoglutarat dehydrogenaza và/hoặc succinat dehydrogenaza được làm giảm so với vi khuẩn không được biến đổi bằng cách phá vỡ gen mã hóa α -ketoglutarat dehydrogenaza và/hoặc gen mã hóa succinat dehydrogenaza.
15. Phương pháp theo điểm 12,
 - trong đó vi khuẩn là vi khuẩn coryneform, và
 - trong đó vi khuẩn còn được biến đổi để chứa gen *YggB* đột biến.
16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó gen *YggB* đột biến có đột biến được chọn từ nhóm bao gồm:
 - (1) đột biến trong vùng mã hóa các gốc axit amin ở các vị trí 419 đến 533 của

protein *YggB* kiểu đại,

(2) đột biến trong vùng mã hóa vùng xuyên màng của protein *YggB* kiểu đại, và

(3) dạng kết hợp của chúng, và

trong đó protein *YggB* protein kiểu đại được chọn từ nhóm bao gồm:

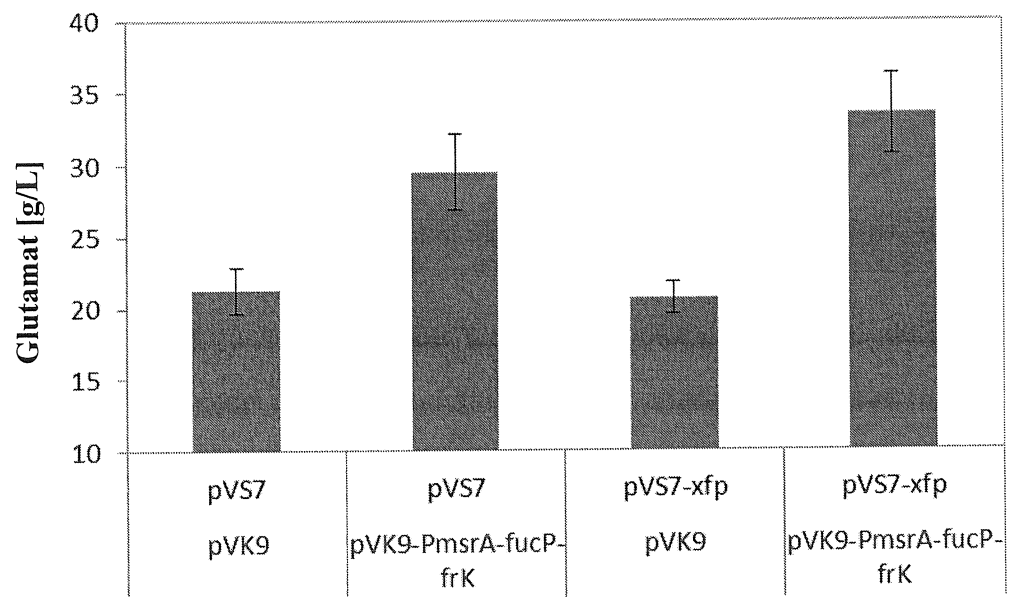
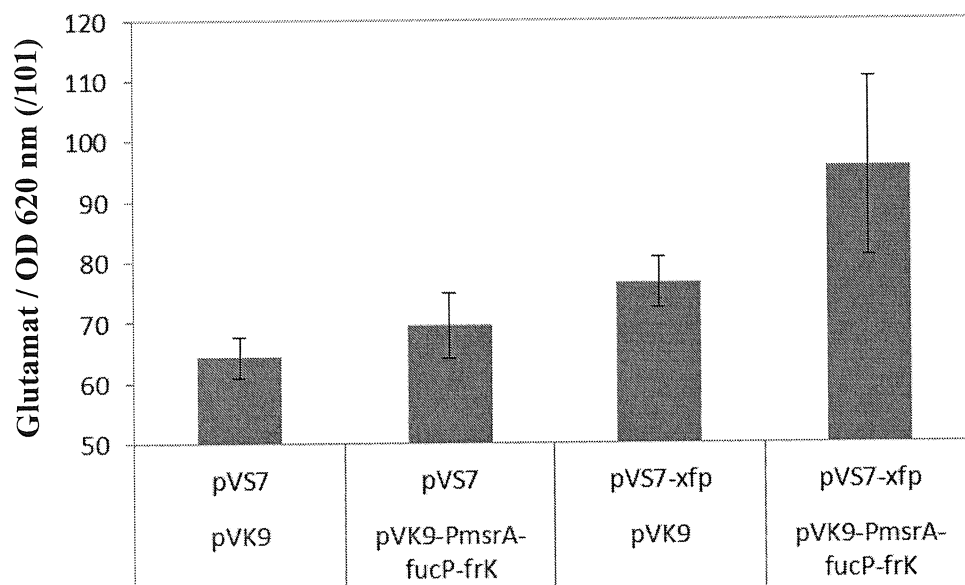
(a) protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 10;

(b) protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, mà còn bao gồm sự thế, sự loại bỏ, sự chèn, và/hoặc sự bổ sung 1 đến 10 gốc axit amin, và trong đó protein này, khi được biểu hiện quá mức trong vi khuẩn coryneform, tạo ra khả năng sản xuất axit L-glutamic được nâng cao của vi khuẩn coryneform; và

(c) protein chứa trình tự axit amin có độ tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, và trong đó protein này, khi được biểu hiện quá mức trong vi khuẩn coryneform, tạo ra khả năng sản xuất axit L-glutamic được nâng cao của vi khuẩn coryneform.

17. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường còn chứa nguồn cacbon khác với fructoza.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó nguồn cacbon là glucoza.

Fig.1**Fig.2**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Ajinomoto Co., Inc.
 <120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-AXIT AMIN
 <130> D842-17368
 <150> JP2017-073937
 <151> 2017-04-03
 <160> 35
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 1
 ccaagcttgc atgccatttg cgcctgcaac gtaggttg
 38
 <210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 2
 aacaggaatg ttcctttcga aaa
 23
 <210> 3
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 3

aggaacattc ctgttatgac ttcaaataac caaaccagcg
40

<210> 4
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 4
tataatcctc cttaagcat gtgattcttc ctttgtc
37

<210> 5
<211> 50
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 5
gaatcacatg cttaaaggag gattataatg actaccccga tcgttctgag
50

<210> 6
<211> 50
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 6
ccaagcttgc atgccaggag gattataatg actaccccga tcgttctgag
50

<210> 7
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 7

ccaagcttgc atgcccgggg tgctacgcg
29

<210> 8
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 8
cggtaccg ggcacagcac aggaccgttt gccattg
37

<210> 9
<211> 1602
<212> ADN
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 9
atgatttttag gcgtacccat tcaatatattg ctctattcat tgtggaattg gattgtcgat
60
accggttttg atgtagcaat tatcctggtc ttggcgtttt tgattccacg taccggccga
120
ctggccatgc gtattatcaa gcagcgagtg gagtctgcag ccgatgcgga caccactaag
180
aaccagctcg cgttcgctgg cgttggcggt tatatcgcgc aaattgtggc gtttttcatg
240
cttgccgtct ccgcgatgca ggcttttggt ttctctctcg cgggcgctgc gattccggca
300
accattgct cagctgccat tgggtcttggg gcgcagtcga ttgttgcgga cttcttggcc
360
ggatttttca tcctgacgga aaagcaattc ggcgtgggtg actgggtgcg ctttgagggc
420
aacggcatcg ttgttgaagg caccgtcatt gagatcacca tgcgcgcgac caaaattcgc
480
acgattgcac aagagaccgt gatcatcccg aactccacgg cgaaagtgtg catcaacaat
540
tctaataact ggtcgcgtgc ggttgtcggt attccgatcc ccatgttggg ttctgaaaac
600
atcacagatg tcatcgcgcg ctctgaagct gcgactcgtc gcgcacttgg ccaggagaaa
660
atcgcaccgg aaatcctcgg tgaactcgat gtgcacccag ccacggaagt cacaccgcca
720
acggtggtcg gcatgccgtg gatggtcacc atgcgtttcc tcgtgcaagt caccgcgggc
780
aatcaatggc tggtcgaacg cgccatccgc acagaaatca tcaacgaatt ctgggaagaa
840

tacggcagcg caaccactac atcgggaacc ctcatgtatt ccttacacgt tgagcatgaa
 900
 gagccaaaga cctcgcttat cgacgcctcc cccagggctc ttaaggaacc gaagccggag
 960
 gctgcggcga cggttgcatc gctagctgca tcgtctaacg acgatgcaga caatgcagac
 1020
 gcctcggcga tcaatgcagg caatccagag aaggaacttg attccgatgt gctggaacaa
 1080
 gaactctcca gcgaagaacc ggaagaaaca gcaaaaccag atcactctct ccgaggcttc
 1140
 ttccgcactg attactaccc aaatcggtgg cagaagatcc tgtcgtttgg cggacgtgtc
 1200
 cgcattgagca cttccctggt gttgggtgcg ctgctcttgc tgtcactatt taaggatcatg
 1260
 actgtggaac caagtgagaa ttggcaaaac tccagtggat ggctgtcacc aagcactgcc
 1320
 acctcaactg cggtgaccac ctccgaaact tccgcgccag caagcacgcc ttcgatgaca
 1380
 gtgcccacta cggtggagga gaccccaacg atggaatcta gcgtcgaaac gcagcaggaa
 1440
 acctcaaccc ctgcaaccgc aacgccccag cgagccgaca ccatcgaacc gaccgaggaa
 1500
 gccacgtcgc aggaggaaac gactgcatcg cagacgcagt ctccagcagt ggaagcacca
 1560
 accgcggtcc aagaaacagt tgcgccgacg tccacccctt ag
 1602

<210> 10
 <211> 533
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

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

Val Glu Gly Thr Val Ile Glu Ile Thr Met Arg Ala Thr Lys Ile Arg
 145 150 155 160
 Thr Ile Ala Gln Glu Thr Val Ile Ile Pro Asn Ser Thr Ala Lys Val
 165 170 175
 Cys Ile Asn Asn Ser Asn Asn Trp Ser Arg Ala Val Val Val Ile Pro
 180 185 190
 Ile Pro Met Leu Gly Ser Glu Asn Ile Thr Asp Val Ile Ala Arg Ser
 195 200 205
 Glu Ala Ala Thr Arg Arg Ala Leu Gly Gln Glu Lys Ile Ala Pro Glu
 210 215 220
 Ile Leu Gly Glu Leu Asp Val His Pro Ala Thr Glu Val Thr Pro Pro
 225 230 235 240
 Thr Val Val Gly Met Pro Trp Met Val Thr Met Arg Phe Leu Val Gln
 245 250 255
 Val Thr Ala Gly Asn Gln Trp Leu Val Glu Arg Ala Ile Arg Thr Glu
 260 265 270
 Ile Ile Asn Glu Phe Trp Glu Glu Tyr Gly Ser Ala Thr Thr Thr Ser
 275 280 285
 Gly Thr Leu Ile Asp Ser Leu His Val Glu His Glu Glu Pro Lys Thr
 290 295 300
 Ser Leu Ile Asp Ala Ser Pro Gln Ala Leu Lys Glu Pro Lys Pro Glu
 305 310 315 320
 Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Leu Ala Ala Ser Ser Asn Asp Asp Ala
 325 330 335
 Asp Asn Ala Asp Ala Ser Ala Ile Asn Ala Gly Asn Pro Glu Lys Glu
 340 345 350
 Leu Asp Ser Asp Val Leu Glu Gln Glu Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu
 355 360 365
 Glu Thr Ala Lys Pro Asp His Ser Leu Arg Gly Phe Phe Arg Thr Asp
 370 375 380
 Tyr Tyr Pro Asn Arg Trp Gln Lys Ile Leu Ser Phe Gly Gly Arg Val
 385 390 395 400
 Arg Met Ser Thr Ser Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 405 410 415
 Phe Lys Val Met Thr Val Glu Pro Ser Glu Asn Trp Gln Asn Ser Ser
 420 425 430
 Gly Trp Leu Ser Pro Ser Thr Ala Thr Ser Thr Ala Val Thr Thr Ser
 435 440 445
 Glu Thr Ser Ala Pro Ala Ser Thr Pro Ser Met Thr Val Pro Thr Thr
 450 455 460
 Val Glu Glu Thr Pro Thr Met Glu Ser Ser Val Glu Thr Gln Gln Glu
 465 470 475 480
 Thr Ser Thr Pro Ala Thr Ala Thr Pro Gln Arg Ala Asp Thr Ile Glu
 485 490 495
 Pro Thr Glu Glu Ala Thr Ser Gln Glu Glu Thr Thr Ala Ser Gln Thr
 500 505 510
 Gln Ser Pro Ala Val Glu Ala Pro Thr Ala Val Gln Glu Thr Val Ala
 515 520 525
 Pro Thr Ser Thr Pro
 530

<210> 11
 <211> 3063
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1269)

<400> 11
 atg att tta ggc gta ccc att caa tat ttg ctc tat tca ttg tgg aat
 48
 Met Ile Leu Gly Val Pro Ile Gln Tyr Leu Leu Tyr Ser Leu Trp Asn
 1 5 10 15
 tgg att gtc gat acc ggt ttt gat gta gca att atc ctg gtc ttg gcg
 96
 Trp Ile Val Asp Thr Gly Phe Asp Val Ala Ile Ile Leu Val Leu Ala
 20 25 30
 ttt ttg att cca cgt atc ggc cga ctg gcc atg cgt att atc aag cag
 144
 Phe Leu Ile Pro Arg Ile Gly Arg Leu Ala Met Arg Ile Ile Lys Gln
 35 40 45
 cga gtg gag tct gca gcc gat gcg gac acc act aag aac cag ctc gcg
 192
 Arg Val Glu Ser Ala Ala Asp Ala Asp Thr Thr Lys Asn Gln Leu Ala
 50 55 60
 ttc gct ggc gtt ggc gtt tat atc gcg caa att gtg gcg ttt ttc atg
 240
 Phe Ala Gly Val Gly Val Tyr Ile Ala Gln Ile Val Ala Phe Phe Met
 65 70 75 80
 ctt gcc gtc tcc gcg atg cag gct ttt ggt ttc tct ctc gcg ggc gct
 288
 Leu Ala Val Ser Ala Met Gln Ala Phe Gly Phe Ser Leu Ala Gly Ala
 85 90 95
 gcg att ccg gca acc att gcg tca gct gcc att ggt ctt ggt gcg cag
 336
 Ala Ile Pro Ala Thr Ile Ala Ser Ala Ala Ile Gly Leu Gly Ala Gln
 100 105 110
 tcg att gtt gcg gac ttc ttg gcc gga ttt ttc atc ctg acg gaa aag
 384
 Ser Ile Val Ala Asp Phe Leu Ala Gly Phe Phe Ile Leu Thr Glu Lys
 115 120 125
 caa ttc ggc gtg ggt gac tgg gtg cgc ttt gag ggc aac ggc atc gtt
 432
 Gln Phe Gly Val Gly Asp Trp Val Arg Phe Glu Gly Asn Gly Ile Val
 130 135 140
 gtt gaa ggc acc gtc att gag atc acc atg cgc gcg acc aaa att cgc
 480
 Val Glu Gly Thr Val Ile Glu Ile Thr Met Arg Ala Thr Lys Ile Arg
 145 150 155 160

```

acg att gca caa gag acc gtg atc atc ccg aac tcc acg gcg aaa gtg
528
Thr Ile Ala Gln Glu Thr Val Ile Ile Pro Asn Ser Thr Ala Lys Val
      165      170      175
tgc atc aac aat tct aat aac tgg tcg cgt gcg gtt gtc gtt att ccg
576
Cys Ile Asn Asn Ser Asn Asn Trp Ser Arg Ala Val Val Val Ile Pro
      180      185      190
atc ccc atg ttg ggt tct gaa aac atc aca gat gtc atc gcg cgc tct
624
Ile Pro Met Leu Gly Ser Glu Asn Ile Thr Asp Val Ile Ala Arg Ser
      195      200      205
gaa gct gcg act cgt cgc gca ctt ggc cag gag aaa atc gca ccg gaa
672
Glu Ala Ala Thr Arg Arg Ala Leu Gly Gln Glu Lys Ile Ala Pro Glu
      210      215      220
atc ctc ggt gaa ctc gat gtg cac cca gcc acg gaa gtc aca ccg cca
720
Ile Leu Gly Glu Leu Asp Val His Pro Ala Thr Glu Val Thr Pro Pro
      225      230      235      240
acg gtg gtc ggc atg ccg tgg atg gtc acc atg cgt ttc ctc gtg caa
768
Thr Val Val Gly Met Pro Trp Met Val Thr Met Arg Phe Leu Val Gln
      245      250      255
gtc acc gcc ggc aat caa tgg ctg gtc gaa cgc gcc atc cgc aca gaa
816
Val Thr Ala Gly Asn Gln Trp Leu Val Glu Arg Ala Ile Arg Thr Glu
      260      265      270
atc atc aac gaa ttc tgg gaa gaa tac ggc agc gca acc act aca tcg
864
Ile Ile Asn Glu Phe Trp Glu Glu Tyr Gly Ser Ala Thr Thr Thr Ser
      275      280      285
gga acc ctc att gat tcc tta cac gtt gag cat gaa gag cca aag acc
912
Gly Thr Leu Ile Asp Ser Leu His Val Glu His Glu Glu Pro Lys Thr
      290      295      300
tcg ctt atc gac gcc tcc ccc cag gct ctt aag gaa ccg aag ccg gag
960
Ser Leu Ile Asp Ala Ser Pro Gln Ala Leu Lys Glu Pro Lys Pro Glu
      305      310      315      320
gct gcg gcg acg gtt gca tcg cta gct gca tcg tct aac gac gat gca
1008
Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Leu Ala Ala Ser Ser Asn Asp Asp Ala
      325      330      335
gac aat gca gac gcc tcg gcg atc aat gca ggc aat cca gag aag gaa
1056
Asp Asn Ala Asp Ala Ser Ala Ile Asn Ala Gly Asn Pro Glu Lys Glu
      340      345      350
ctt gat tcc gat gtg ctg gaa caa gaa ctc tcc agc gaa gaa ccg gaa
1104
Leu Asp Ser Asp Val Leu Glu Gln Glu Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu
      355      360      365

```

gaa aca gca aaa cca gat cac tct ctc cga ggc ttc ttc cgc act gat
 1152
 Glu Thr Ala Lys Pro Asp His Ser Leu Arg Gly Phe Phe Arg Thr Asp
 370 375 380
 tac tac cca aat cgg tgg cag aag atc ctg tcg ttt ggc gga cgt gtc
 1200
 Tyr Tyr Pro Asn Arg Trp Gln Lys Ile Leu Ser Phe Gly Gly Arg Val
 385 390 395 400
 cgc atg agc act tcc ctg ttg ttg ggt gcg ctg ctc ttg ctg tca cta
 1248
 Arg Met Ser Thr Ser Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 405 410 415
 ttt aag ggg ctc ttc ctg ttt tagagtgc at tgatcttatg gaccaactgc
 1299
 Phe Lys Gly Leu Phe Leu Phe
 420
 cctgaatgga taaggcaccg cagaatgtag tgggtcaa at tacggaaacc tagagcaatc
 1359
 ccacgcaa at gctccaaccg tccgttgatc gcttcgaccg gaccgttgga gacaccaaca
 1419
 tcgaaatagc ccaacacatc accaagtcgt ttaaacaac tacgacccaa ctgcgcgagt
 1479
 tccttattcg gccccttcaa caccogaagc tgatcaataa tgggtccgcat tttcttcttc
 1539
 gcttcacgct tattacccat ctgataacaa tcaataatcg cctgatacgc aagccacgca
 1599
 agctttaaca ccccgtagtc tttgtcatal gccacaaact gctccaagct ttcttgctga
 1659
 cgaggactca accacttggt cgtgggtcaac aaggctcttc ggtttttata caacggatcc
 1719
 tggcttaaac cacgacgctg gtatttctcc cgctggaggc gttgccggca ggcggtgagc
 1779
 ttgtcaccag caagccgcac aacatggaat ggatccatca cgcgacgagc agaaggaatg
 1839
 agttctttac ttgctgtggc gtagccttgg aacccatcca tggacacgat ccgtatctga
 1899
 ttgcggaact gttcaccgcg ggaaccaagc caggaccgta aagcatcagc actacgacct
 1959
 gggacgacat ctaataaccg ggcaggacac cgtgagtc at accgatgcc ggtcatatcg
 2019
 acaatcacgg tgacaaaccc atcaccatgc ttagccctat tatgtgacca cttatgctca
 2079
 tccaccccaa tgacatacac tccatcaaga tggtaggat cgttatagac cagctcacgg
 2139
 cacatatcga gggctagttg gcagggtaaa tcccacccta gcccaagtgc tttcgcggtt
 2199
 gcgtgaacac tcatccggtc aatagcaagg cgttgcaaaa tccagcgggt gaccgggtg
 2259
 gtgacctttt taccgtgggtc agcgcagctt agttctgctt ggaaatactt ttgcttacat
 2319
 gtcgggttgg tgcagcggta gcgaggtaga cggataaaca gtttggtggg aaaccgcagc
 2379

atgggtaa at caatgagcat ccggtgggtg tgatgacgaa acaccccagg ttgggagcat
 2439
 tctgggcagg tggaggtata gtcgagtgcg tctgcttcga tcagggtgta atcacctgca
 2499
 tcggaagcgc cggatgatggg gagtcctagt tccgcagtgc ggcagatggg gtcagcgcgag
 2559
 atgttgccgg tagacttcat gggtagagcc ttttggttggg gtttggttag cttagatacc
 2619
 taaaccttaa ccctgacaaa aggctcggtt attttcgggt ctacaccgct agcccagggt
 2679
 ctgtgatgta ccccaaaacc ggaagggcca ttttaaggta tgactgtgga accaagtga
 2739
 aattggcaaa actccagtgg atggctgtca ccaagcactg ccacctcaac tgcggtgacc
 2799
 acctccgaaa cttccgcgcc agcaagcacg ctttcgatga cagtgccac tacgggtggag
 2859
 gagaccccaa cgatggaatc tagcgtcgaa acgcagcagg aaacctcaac ccctgcaacc
 2919
 gcaacgcccc agcgagccga caccatcgaa ccgaccgagg aagccacgtc gcaggaggaa
 2979
 acgactgcat cgcagacgca gtctccagca gtggaagcac caaccgcggg ccaagaaaca
 3039
 gttgcgccga cgtccacccc ttag
 3063

<210> 12
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 12
 Met Ile Leu Gly Val Pro Ile Gln Tyr Leu Leu Tyr Ser Leu Trp Asn
 1 5 10 15
 Trp Ile Val Asp Thr Gly Phe Asp Val Ala Ile Ile Leu Val Leu Ala
 20 25 30
 Phe Leu Ile Pro Arg Ile Gly Arg Leu Ala Met Arg Ile Ile Lys Gln
 35 40 45
 Arg Val Glu Ser Ala Ala Asp Ala Asp Thr Thr Lys Asn Gln Leu Ala
 50 55 60
 Phe Ala Gly Val Gly Val Tyr Ile Ala Gln Ile Val Ala Phe Phe Met
 65 70 75 80
 Leu Ala Val Ser Ala Met Gln Ala Phe Gly Phe Ser Leu Ala Gly Ala
 85 90 95
 Ala Ile Pro Ala Thr Ile Ala Ser Ala Ala Ile Gly Leu Gly Ala Gln
 100 105 110
 Ser Ile Val Ala Asp Phe Leu Ala Gly Phe Phe Ile Leu Thr Glu Lys
 115 120 125
 Gln Phe Gly Val Gly Asp Trp Val Arg Phe Glu Gly Asn Gly Ile Val
 130 135 140
 Val Glu Gly Thr Val Ile Glu Ile Thr Met Arg Ala Thr Lys Ile Arg
 145 150 155 160

```

Thr Ile Ala Gln Glu Thr Val Ile Ile Pro Asn Ser Thr Ala Lys Val
      165                      170                      175
Cys Ile Asn Asn Ser Asn Asn Trp Ser Arg Ala Val Val Val Ile Pro
      180                      185                      190
Ile Pro Met Leu Gly Ser Glu Asn Ile Thr Asp Val Ile Ala Arg Ser
      195                      200                      205
Glu Ala Ala Thr Arg Arg Ala Leu Gly Gln Glu Lys Ile Ala Pro Glu
      210                      215                      220
Ile Leu Gly Glu Leu Asp Val His Pro Ala Thr Glu Val Thr Pro Pro
225                      230                      235                      240
Thr Val Val Gly Met Pro Trp Met Val Thr Met Arg Phe Leu Val Gln
      245                      250                      255
Val Thr Ala Gly Asn Gln Trp Leu Val Glu Arg Ala Ile Arg Thr Glu
      260                      265                      270
Ile Ile Asn Glu Phe Trp Glu Glu Tyr Gly Ser Ala Thr Thr Thr Ser
      275                      280                      285
Gly Thr Leu Ile Asp Ser Leu His Val Glu His Glu Glu Pro Lys Thr
      290                      295                      300
Ser Leu Ile Asp Ala Ser Pro Gln Ala Leu Lys Glu Pro Lys Pro Glu
305                      310                      315                      320
Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Leu Ala Ala Ser Ser Asn Asp Asp Ala
      325                      330                      335
Asp Asn Ala Asp Ala Ser Ala Ile Asn Ala Gly Asn Pro Glu Lys Glu
      340                      345                      350
Leu Asp Ser Asp Val Leu Glu Gln Glu Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu
      355                      360                      365
Glu Thr Ala Lys Pro Asp His Ser Leu Arg Gly Phe Phe Arg Thr Asp
      370                      375                      380
Tyr Tyr Pro Asn Arg Trp Gln Lys Ile Leu Ser Phe Gly Gly Arg Val
385                      390                      395                      400
Arg Met Ser Thr Ser Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Ser Leu
      405                      410                      415
Phe Lys Gly Leu Phe Leu Phe
      420

```

```

<210> 13
<211> 2478
<212> ADN
<213> Bifidobacterium longum

```

```

<400> 13
atgacgagtc ctgttattgg cacccttggg aagaagctca acgctccggt ttccgaggaa
60
gccctcgaag gcgttgacaa gtactggcgc gttgccaaact acctttccat cggccagatt
120
tatctgcgtt ccaaccgct gatgaaggag cccttcaccc gcgaagatgt gaagcaccgt
180
ctggtggggc actggggcac tacccttggc ctgaacttcc tcatcggcca catcaaccgt
240
ttcattgctg accacggcca gaacaccgtg atcatcatgg gcccgggcca cggtggccccg
300

```


gccggtacct cccagtccta cctggacggc acctacaccg agaccttccc gaagatcacc
 360
 aaggacgaag ctggtctgca gaagttcttc cgtcagttct cttacctggg cggcattccg
 420
 tcccacttcg ctccggagac cccgggctcc atccacgagg gtggtgagct gggttacgct
 480
 ctgtcccacg cttacggcgc catcatggac aaccgagcc tgtttgtccc ggccatcgtc
 540
 ggcgacggcg aggctgagac cggcccgtg gctaccggct ggcagtccaa caagctcgtg
 600
 aaccgcgca ccgacgggat cgtgctgccg atcctgcacc tcaacggcta caagatcgcc
 660
 aaccgacca tcctgtcccg catctccgac gaagagctcc acgagttctt ccacggcatg
 720
 ggttacgagc cctacgagtt cgtcgtggc ttcgatgatg aggaccacat gtccatccac
 780
 cgtcgttcg ccgagctgtg ggagaccatc tgggacgaga tctgcgacat caaggccacc
 840
 gctcagaccg acaacgtgca ccgtccgttc taccgatgc tgatcttccg caccgccgaag
 900
 ggctggacct gccgaagta catcgacggc aagaagaccg agggctcctg gcgttccac
 960
 caggtgccgc tggttccgc ccgcgacacc gaggccact tcgaggttct caagaactgg
 1020
 ctcgagtcct acaagccgga agagctgttc gacgccaacg gtgctgtcaa ggacgacgtc
 1080
 cttgccttca tgccgaaggc cgagctgcgt atcggtgcca acccgaacgc caacggtggt
 1140
 gtgatccgca acgacctgaa gctgccgaac ctcgaggact acgaggtcaa ggaagtggct
 1200
 gagtacggcc acggctgggg ccagctcgag gccaccgta ccctgggtgc ctacactcgc
 1260
 gacatcatca agaacaacc gcgcgacttc cgcattctcg gaccggatga gaccgcttcc
 1320
 aaccgtctgc aggttctcta cgaagtcacc aacaagcagt gggatgccgg ctacatctcc
 1380
 gacgaggtcg acgagcacat gcacgtctcc ggccaggtcg ttgagcagct gtccgagcac
 1440
 cagatggaag gcttctctga ggcttacctg ctgaccggtc gtcacggcat ctggagctcc
 1500
 tacgagtcct tcgtccacgt gatcgactcc atgctgaacc agcacgcaa gtggcttgag
 1560
 gctaccgtcc gcgagattcc gtggcgcaag ccgattgcct ccatgaacct gctgggtctcc
 1620
 tcccacgttt ggcgtcagga ccacaacggc ttctcccacc aggatccggg tgtcacctcc
 1680
 gtctgtctga acaagtgtt ccacaacgac cacgtcatcg gcatctactt cgccaccgat
 1740
 gcgaacatgc tgctggccat ccgcgagaag tgctacaagt ccaccaacaa gatcaacgcc
 1800
 atcatcgtg gtaagcagcc tgctgccacc tggctgaccc tggacgagc tcgtgccgag
 1860

ctcgagaagg gtgccgccgc ttgggattgg gcttccaccg ccaagaacaa cgatgaggcc
 1920
 gaggtcgtgc ttgccgccgc cggcgatgtc ccgactcagg agatcatggc tgcttccgac
 1980
 aagctgaagg aactgggcat caagttcaag gttgtgaacg ttgccgacct gctctccctg
 2040
 cagtccgcca aggagaacga cgaggctctg accgacgagg agttcgccga catcttcacc
 2100
 gccgacaagc cgggtgctggt cgcgtaccac tcctacgctc acgacgtgcg tggcctgac
 2160
 tacgaccgtc cgaaccacga caacttcaac gtccacggct acgaggagga gggctccacc
 2220
 accaccccgt acgacatggt tcgtgtcaac cgcacgacc gctacgagct gaccgctgag
 2280
 gctctgcgca tgatcgacgc cgacaagtac gccgacaaga tcgacgagct cgagaagtgc
 2340
 cgtgatgagg ccttccagtt cgccgtcgac aacggctacg atcaccgga ctacaccgac
 2400
 tgggtgtact ccggcgtgaa caccgacaag aagggtgccg tcaccgctac cgccgctacc
 2460
 gctggcgaca acgagtga
 2478

<210> 14
 <211> 825
 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium longum

<400> 14
 Met Thr Ser Pro Val Ile Gly Thr Pro Trp Lys Lys Leu Asn Ala Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Glu Ala Leu Glu Gly Val Asp Lys Tyr Trp Arg Val Ala
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Ser Ile Gly Gln Ile Tyr Leu Arg Ser Asn Pro Leu Met
 35 40 45
 Lys Glu Pro Phe Thr Arg Glu Asp Val Lys His Arg Leu Val Gly His
 50 55 60
 Trp Gly Thr Thr Pro Gly Leu Asn Phe Leu Ile Gly His Ile Asn Arg
 65 70 75 80
 Phe Ile Ala Asp His Gly Gln Asn Thr Val Ile Ile Met Gly Pro Gly
 85 90 95
 His Gly Gly Pro Ala Gly Thr Ser Gln Ser Tyr Leu Asp Gly Thr Tyr
 100 105 110
 Thr Glu Thr Phe Pro Lys Ile Thr Lys Asp Glu Ala Gly Leu Gln Lys
 115 120 125
 Phe Phe Arg Gln Phe Ser Tyr Pro Gly Gly Ile Pro Ser His Phe Ala
 130 135 140
 Pro Glu Thr Pro Gly Ser Ile His Glu Gly Gly Glu Leu Gly Tyr Ala
 145 150 155 160
 Leu Ser His Ala Tyr Gly Ala Ile Met Asp Asn Pro Ser Leu Phe Val
 165 170 175

Pro Ala Ile Val Gly Asp Gly Glu Ala Glu Thr Gly Pro Leu Ala Thr
 180 185 190
 Gly Trp Gln Ser Asn Lys Leu Val Asn Pro Arg Thr Asp Gly Ile Val
 195 200 205
 Leu Pro Ile Leu His Leu Asn Gly Tyr Lys Ile Ala Asn Pro Thr Ile
 210 215 220
 Leu Ser Arg Ile Ser Asp Glu Glu Leu His Glu Phe Phe His Gly Met
 225 230 235 240
 Gly Tyr Glu Pro Tyr Glu Phe Val Ala Gly Phe Asp Asp Glu Asp His
 245 250 255
 Met Ser Ile His Arg Arg Phe Ala Glu Leu Trp Glu Thr Ile Trp Asp
 260 265 270
 Glu Ile Cys Asp Ile Lys Ala Thr Ala Gln Thr Asp Asn Val His Arg
 275 280 285
 Pro Phe Tyr Pro Met Leu Ile Phe Arg Thr Pro Lys Gly Trp Thr Cys
 290 295 300
 Pro Lys Tyr Ile Asp Gly Lys Lys Thr Glu Gly Ser Trp Arg Ser His
 305 310 315 320
 Gln Val Pro Leu Ala Ser Ala Arg Asp Thr Glu Ala His Phe Glu Val
 325 330 335
 Leu Lys Asn Trp Leu Glu Ser Tyr Lys Pro Glu Glu Leu Phe Asp Ala
 340 345 350
 Asn Gly Ala Val Lys Asp Asp Val Leu Ala Phe Met Pro Lys Gly Glu
 355 360 365
 Leu Arg Ile Gly Ala Asn Pro Asn Ala Asn Gly Gly Val Ile Arg Asn
 370 375 380
 Asp Leu Lys Leu Pro Asn Leu Glu Asp Tyr Glu Val Lys Glu Val Ala
 385 390 395 400
 Glu Tyr Gly His Gly Trp Gly Gln Leu Glu Ala Thr Arg Thr Leu Gly
 405 410 415
 Ala Tyr Thr Arg Asp Ile Ile Lys Asn Asn Pro Arg Asp Phe Arg Ile
 420 425 430
 Phe Gly Pro Asp Glu Thr Ala Ser Asn Arg Leu Gln Ala Ser Tyr Glu
 435 440 445
 Val Thr Asn Lys Gln Trp Asp Ala Gly Tyr Ile Ser Asp Glu Val Asp
 450 455 460
 Glu His Met His Val Ser Gly Gln Val Val Glu Gln Leu Ser Glu His
 465 470 475 480
 Gln Met Glu Gly Phe Leu Glu Ala Tyr Leu Leu Thr Gly Arg His Gly
 485 490 495
 Ile Trp Ser Ser Tyr Glu Ser Phe Val His Val Ile Asp Ser Met Leu
 500 505 510
 Asn Gln His Ala Lys Trp Leu Glu Ala Thr Val Arg Glu Ile Pro Trp
 515 520 525
 Arg Lys Pro Ile Ala Ser Met Asn Leu Leu Val Ser Ser His Val Trp
 530 535 540
 Arg Gln Asp His Asn Gly Phe Ser His Gln Asp Pro Gly Val Thr Ser
 545 550 555 560
 Val Leu Leu Asn Lys Cys Phe His Asn Asp His Val Ile Gly Ile Tyr
 565 570 575
 Phe Ala Thr Asp Ala Asn Met Leu Leu Ala Ile Ala Glu Lys Cys Tyr
 580 585 590

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

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

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 15
 cgacaacgag tgatctagaa aacagaattt gcctggc
 37

<210> 16
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 16
aacaggactc gtcatgtcga cctccttctt aaattgggtta ataaccagtg ac
52

<210> 17
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 17
gtcgacatga cgagtcctgt tattggcacc
30

<210> 18
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 18
attctgtttt ctagatcact cgttgctgcc agcggttagc
39

<210> 19
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 19
cgttgttgcc attgctgaag cctgcttttt tataactaact tg
42

<210> 20
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 20
gaagtcattgg cagtctcctt gtgtgaaatt g
31

<210> 21
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 21
gactgccatg acttcaaata tccaaaccag cg
32

<210> 22
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 22
atgacttggt tgagtttaag catgtgattc ttcctttgtc
40

<210> 23
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 23
gtagtcattgg cagtctcctt gtgtgaaatt gt
32

<210> 24
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 24

gactgccatg actaccccga tcgttctgag
30

<210> 25

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 25

atgacttggt tgagtttact tgccgatttc agccagata
39

<210> 26

<211> 1335

<212> ADN

<213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<400> 26

atgacttcaa atatccaaac cagcgaaaca tcttcagaac aaggtggcgg gaagtctaaa
60
gaagggttcg tttaccctgg acttctattg ccctttgcat tgatcgtaac ctgctttgca
120
gcggtggggaa tttctaccga cttgaccgcc cccatgggtca acgttttttag ttccgtattc
180
gatatgagcg cattccaatc tgcgctcgtg cagtctgcat actatggcgc atacttcctg
240
ctcgcgattc cagctgccat gctcaacacc cgcttcgggt tcaagggcgg tgctggtatc
300
ggcatgacgc tagcagccat cggcgcatth ctgttcttcc ctgcggcaga aattatgact
360
ttcggaaacct tcctgctcgc acttttcggt ctcgcaggtg gactttcaat tgttgaaact
420
tccgctaate cgttcgtaat gtccttaggg cctgagaaaa gcgctacgcg acgcttgaac
480
tttgcgcaag catttaaccc tattggttcc aacatcggtg ttctcatggc aacacttctg
540
gtggctccac acatcggaag tgcggttgaa cgtgcatccc ttccagaggc agaagccttg
600
gctcaaacct cctctgaact cgaaaaagtc atggttccat acatcatctt ggggtgtactg
660
tacgcgggtc tagcaatcgc tatcttcttt gtaagaatcc ccaagaataa gcgcatgcaa
720
gaaaccgact ccaatacggg tgccaaagggt gtattccttc gcttggtggaa caaccgaact
780

taccgattcg gtgtgattgc acaatttttc aacattgcag cacaaacctg tatctggaca
840
ttcattccgt tctacgtcca gcacacgctc ggagcctcac acgaaacggc cggatgggtg
900
cttcagctat cgcttatctt ctttctcgtc atgcgttttg tcatgggtctg gttgatggga
960
aagtacgacg gccgcaagct gttgatattt atgtgtgctt tgggagttgt tttcacactc
1020
atcgggtgtcc tgtcggagaa cgtgggtcgg gctgtggcca ttgctgcact ctctggctgc
1080
atttcgctac tcttccccac cattttacgga gtctctctaa gcggtgtcgg cgctgacacg
1140
aagtttgcct cttctggatt ggtcatggcc atcgtcggcg gcgcagttgc tcctatgatt
1200
cagggcgcga ttacggatgc gaccaaccct cagatcgggt tctcgttcgt aatcctctgc
1260
ttcgtaatca ttggcgcttt tggcctttat gccatcaaga accaagtgga gacaaaggaa
1320
gaatcacatg cttaa
1335

<210> 27
<211> 444
<212> PRT
<213> Corynebacterium ammoniagenes

<400> 27
Met Thr Ser Ile Ser Lys Pro Ser Pro Asn Glu Ala Ala Glu Glu Asp
1 5 10 15
Lys Lys Ser Lys Gly Ser Phe Val Tyr Pro Gly Leu Leu Leu Pro Phe
20 25 30
Gly Leu Ile Val Ala Cys Phe Ala Ala Trp Gly Ile Ser Thr Asp Leu
35 40 45
Thr Ala Pro Met Val Asn Val Phe Ser Ser Val Phe Asp Met Ser Ala
50 55 60
Phe Gln Ser Ala Leu Val Gln Phe Ala Tyr Tyr Gly Ala Tyr Phe Leu
65 70 75 80
Leu Ala Ile Pro Ala Ala Met Leu Asn Thr Arg Phe Gly Phe Lys Gly
85 90 95
Gly Val Val Ile Gly Met Ser Leu Ala Ala Ile Gly Ala Phe Leu Phe
100 105 110
Phe Pro Ala Ala Glu Ile Met Thr Tyr Gly Thr Phe Leu Leu Ala Leu
115 120 125
Phe Val Leu Ala Gly Gly Leu Ser Ile Val Glu Thr Ser Ala Asn Pro
130 135 140
Phe Val Met Ser Leu Gly Pro Glu Lys Asn Ala Thr Arg Arg Leu Asn
145 150 155 160
Phe Ala Gln Ala Phe Asn Pro Ile Gly Ser Asn Leu Gly Val Leu Met
165 170 175
Ala Thr Leu Leu Val Ala Pro His Ile Gly Asn Ala Ala Glu Arg Ala
180 185 190

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

<210> 28
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> Pantoea ananatis

<400> 28
 atgcaccaga acattgtttca gcaaaatgac ggttatctaa ataagactcc gctgtttccag
 60
 ttcattctgc tttcctgcct gttccccttg tggggctgtg cggcaagcct gaatgacatt
 120
 ctgattacgc agtttaaaag cgttttcgcc ctgagcgcatt ttgccagcgc cctgggtgcag
 180
 agcgcctttt acggcgggcta ttttctgatt gcgattcctg cctcgctggt gatccgtaaa
 240
 accagttaca agctggctat attagccggt ctggcggttg acatcctggg ctgcctgctg
 300
 ttttatcccg cctcgcatat ggcaacctac accatgtttc tggcggcgat ttttgccatt
 360

gccattgggt taagctttct ggagacggcg gcgaacacct acagctcaat gatcggacag
 420
 cgtcagcatg ccacgctgcg tcttaacatc agtcagacgt tttatccggt gggggcgctg
 480
 atgggcattg tgctgggaaa atatctggtg tttcaggatg gagaaagcct ggaaacgcaa
 540
 atggcaaaca tgacggcggc gcaggcgcat gctttccgcc tgtccatgct ggaacatacc
 600
 ctggaaccct ataaatatct ggtgatggtg ctggtggttg tcatgctgct gtttatgttc
 660
 acccgctatc cacgctgcaa gccgcaaagc aacgaaaaat cgctgccaac gctgggggaa
 720
 acctttcgct atctggctaa aaatcgccat tttaaacgcg gtattctggc gcagtttttg
 780
 tacgtcggta tgcagggtggc ggtgtggtcc tttaccatcc gtctggcgct tacgttgga
 840
 gctgccaatg agcgcgaggc atccagcttt atgatttaca gctttatctg tttctttatt
 900
 ggcaagtttg tcgccaacat tttaatgacg cgtttccggc cagagaaagt gcttatcgcc
 960
 ttttcactcc ttggcatcgc aacgctgggc tacgtgatgc tggtgcccaa tttcacagca
 1020
 gtctacgccg cgggtgttgt cagcgtgctg tttggcccgt gctgggcgac gatctatgcc
 1080
 gggacgctcg cgaccgttga cagtaaatac accgaagtcg cgggagcatt tattgtgatg
 1140
 tccattgtgg gtgcggcctt tgtgcccgcg ctgcagggtt ttgtttccga tcacctggga
 1200
 tcgatgcagc tggcattcgg cgtatcgctg ctgtgtttcg catgggttgg gttctatatt
 1260
 tggggcgagc tgcgccacaa aaagcagcct cgccttagcg gaaacctggc ggaggagggg
 1320
 cgatga
 1326

<210> 29
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Pantoea ananatis

<400> 29
 Met His Gln Asn Ile Val Gln Gln Asn Asp Gly Tyr Leu Asn Lys Thr
 1 5 10 15
 Pro Leu Phe Gln Phe Ile Leu Leu Ser Cys Leu Phe Pro Leu Trp Gly
 20 25 30
 Cys Ala Ala Ser Leu Asn Asp Ile Leu Ile Thr Gln Phe Lys Ser Val
 35 40 45
 Phe Ala Leu Ser Asp Phe Ala Ser Ala Leu Val Gln Ser Ala Phe Tyr
 50 55 60
 Gly Gly Tyr Phe Leu Ile Ala Ile Pro Ala Ser Leu Val Ile Arg Lys
 65 70 75 80

Thr Ser Tyr Lys Leu Ala Ile Leu Ala Gly Leu Ala Leu Tyr Ile Leu
 85 90 95
 Gly Cys Leu Leu Phe Tyr Pro Ala Ser His Met Ala Thr Tyr Thr Met
 100 105 110
 Phe Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ile Ala Ile Gly Leu Ser Phe Leu Glu
 115 120 125
 Thr Ala Ala Asn Thr Tyr Ser Ser Met Ile Gly Gln Arg Gln His Ala
 130 135 140
 Thr Leu Arg Leu Asn Ile Ser Gln Thr Phe Tyr Pro Val Gly Ala Leu
 145 150 155 160
 Met Gly Ile Val Leu Gly Lys Tyr Leu Val Phe Gln Asp Gly Glu Ser
 165 170 175
 Leu Glu Thr Gln Met Ala Asn Met Thr Ala Ala Gln Ala His Ala Phe
 180 185 190
 Arg Leu Ser Met Leu Glu His Thr Leu Glu Pro Tyr Lys Tyr Leu Val
 195 200 205
 Met Val Leu Val Val Val Met Leu Leu Phe Met Phe Thr Arg Tyr Pro
 210 215 220
 Arg Cys Lys Pro Gln Ser Asn Glu Lys Ser Leu Pro Thr Leu Gly Glu
 225 230 235 240
 Thr Phe Arg Tyr Leu Ala Lys Asn Arg His Phe Lys Arg Gly Ile Leu
 245 250 255
 Ala Gln Phe Leu Tyr Val Gly Met Gln Val Ala Val Trp Ser Phe Thr
 260 265 270
 Ile Arg Leu Ala Leu Thr Leu Gly Ala Ala Asn Glu Arg Glu Ala Ser
 275 280 285
 Ser Phe Met Ile Tyr Ser Phe Ile Cys Phe Phe Ile Gly Lys Phe Val
 290 295 300
 Ala Asn Ile Leu Met Thr Arg Phe Arg Pro Glu Lys Val Leu Ile Ala
 305 310 315 320
 Phe Ser Leu Leu Gly Ile Ala Thr Leu Gly Tyr Val Met Leu Val Pro
 325 330 335
 Asn Phe Thr Ala Val Tyr Ala Ala Val Phe Val Ser Val Leu Phe Gly
 340 345 350
 Pro Cys Trp Ala Thr Ile Tyr Ala Gly Thr Leu Ala Thr Val Asp Ser
 355 360 365
 Lys Tyr Thr Glu Val Ala Gly Ala Phe Ile Val Met Ser Ile Val Gly
 370 375 380
 Ala Ala Phe Val Pro Ala Leu Gln Gly Phe Val Ser Asp His Leu Gly
 385 390 395 400
 Ser Met Gln Leu Ala Phe Gly Val Ser Leu Leu Cys Phe Ala Trp Val
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Phe Trp Gly Glu Leu Arg His Lys Lys Gln Pro Arg Leu
 420 425 430
 Ser Gly Asn Leu Ala Glu Glu Gly Arg
 435 440

<210> 30

<211> 897

<212> ADN

<213> Bifidobacterium longum

<400> 30

atgactaccc cgatcggttct gagcctcggg gaactgctgt gggacatgct gccgagcggc
 60
 aagcgagccg gcggcgcccc cgtcaacttc gcctaccacg cgatgaagaa cggcaccgaa
 120
 ggctgggcca tcagcgcggt cggcgaggat gaactcggcg acgaactgat tgccaaggcc
 180
 gacgaggccg gcatcaacac cgttcttcag cgcaacgcct ggccgacctc caccgtcgaa
 240
 gtcgcaactga agaacgggtat cccggagtag accatcggtca agggcgtggc ttgggaccac
 300
 atcctgtaca cccgccagct catcgacgtg gtctccaagg ccgacgccgt ctgcttcggc
 360
 accctggccc tgcgctcccc cgaatcgcac gccaccatca cggagctgct caagcacacc
 420
 aagccgggcg cgatgaagtt cttcgacatc aacctgcgcg gcgaccacta ctccaaggaa
 480
 cttatcgagg aactcctcaa ggccggccacc gtcttcaaga tcaacgacga ggaactcctg
 540
 ctgctgcgcg acatgttcga cattcgcggc acctccggcg aagacgcctc ccgctggttc
 600
 ctcgaggaat tcgacctcga ctacgtgatt ctgaccgccg gctccgccta ctccaccatc
 660
 atctcccga agggcgaggt ctccacgctg gacactccgc acgtcgaggt gaacgacacc
 720
 gtgggtgcag gtgactcett ctccggcacc ttcaccgcac gcattcctgt gggtgacacg
 780
 ctgccgaag cccaccgcaa ggccgtcaac accgccgcct tcgtctgcac ccaggccggg
 840
 gcctggcccc agtaccggcg cgagatgccc gactatctgg ctgaaatcgg caagtaa
 897

<210> 31

<211> 298

<212> PRT

<213> Bifidobacterium longum

<400> 31

Met	Thr	Thr	Pro	Ile	Val	Leu	Ser	Leu	Gly	Glu	Leu	Leu	Trp	Asp	Met
1				5					10					15	
Leu	Pro	Ser	Gly	Lys	Arg	Ala	Gly	Gly	Ala	Pro	Val	Asn	Phe	Ala	Tyr
			20					25					30		
His	Ala	Met	Lys	Asn	Gly	Thr	Glu	Gly	Trp	Ala	Ile	Ser	Ala	Val	Gly
		35					40					45			
Glu	Asp	Glu	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	Ile	Ala	Lys	Ala	Asp	Glu	Ala	Gly
	50					55					60				
Ile	Asn	Thr	Val	Leu	Gln	Arg	Asn	Ala	Trp	Pro	Thr	Ser	Thr	Val	Glu
65					70				75						80
Val	Ala	Leu	Lys	Asn	Gly	Ile	Pro	Glu	Tyr	Thr	Ile	Val	Lys	Gly	Val
				85					90						95

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

<210> 32
 <211> 906
 <212> ADN
 <213> Pantoea ananatis

<400> 32
 gtgcgcatag gcattgattt gggcggcacc aaaacagaag tgattgcgct gtccggcgag
 60
 ggaaaagagc tgtttcgcca tcggatttcc acgccccgtg acgactaccg ggcgaccgtg
 120
 caggccatcg ttgatttagt ccgcctcgcc gaagaaaaaa ccggccaaac cgggacggta
 180
 ggcttaggta ttccgggcac gatttcgccc tatacgcagc gggtgaaaaa cgcgaactcc
 240
 acctggctaa acggtcagcc gctggataaa gatttggcgc aggcgctgaa tcgtgacatc
 300
 cgcatagcca atgacgcgaa ttgtctggcc gtgtccgaag cggtcgatgg cgcaggcgcg
 360
 gggcaggcac tgggtgtttg ggtaatcatc ggcaccgggt cgggcgcagg cgtagcgata
 420
 aacggcgcggt cacgcattgg cggcaacggc aatgcggggc aatgggggtca taatcctttg
 480
 ccgtggatgg atgaagacga gttgcgttac cgcgcggaag tcccctgtta ttgtggccag
 540

cagggctgca ttgaaacctt tgtttccggt accggctttg ctatcgacta tcagcgggta
 600
 agcgggtgtgg cgcgcaaagg cgctgagatt gtcaaactgc tggagcagca ggatcccgtg
 660
 gctgccctgg caatgagccg ctatgaaatc cgtctggcaa aatccctggc tcagggttgc
 720
 aacctgatcg atccccgacgt gattgtgctg ggcggcggca tgagcaacgt ggaccgcctg
 780
 taccagacgg tgcccacgct gatgaagaaa tgggtttttg gcggcgagtg tgaaacgccg
 840
 gtgctgaaag cgatgcacgg ggattcaagc ggtgtgcgcg gcgcggcctg gctgtggccg
 900
 gaataa
 906

<210> 33
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Pantoea ananatis

<400> 33
 Met Arg Ile Gly Ile Asp Leu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Val Ile Ala
 1 5 10 15
 Leu Ser Gly Glu Gly Lys Glu Leu Phe Arg His Arg Ile Ser Thr Pro
 20 25 30
 Arg Asp Asp Tyr Arg Ala Thr Val Gln Ala Ile Val Asp Leu Val Arg
 35 40 45
 Leu Ala Glu Glu Lys Thr Gly Gln Thr Gly Thr Val Gly Leu Gly Ile
 50 55 60
 Pro Gly Thr Ile Ser Pro Tyr Thr Gln Arg Val Lys Asn Ala Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Trp Leu Asn Gly Gln Pro Leu Asp Lys Asp Leu Ala Gln Ala Leu
 85 90 95
 Asn Arg Asp Ile Arg Ile Ala Asn Asp Ala Asn Cys Leu Ala Val Ser
 100 105 110
 Glu Ala Val Asp Gly Ala Gly Ala Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Val
 115 120 125
 Ile Ile Gly Thr Gly Ser Gly Ala Gly Val Ala Ile Asn Gly Ala Ser
 130 135 140
 Arg Ile Gly Gly Asn Gly Asn Ala Gly Glu Trp Gly His Asn Pro Leu
 145 150 155 160
 Pro Trp Met Asp Glu Asp Glu Leu Arg Tyr Arg Ala Glu Val Pro Cys
 165 170 175
 Tyr Cys Gly Gln Gln Gly Cys Ile Glu Thr Phe Val Ser Gly Thr Gly
 180 185 190
 Phe Ala Ile Asp Tyr Gln Arg Leu Ser Gly Val Ala Arg Lys Gly Ala
 195 200 205
 Glu Ile Val Lys Leu Leu Glu Gln Gln Asp Pro Val Ala Ala Leu Ala
 210 215 220
 Met Ser Arg Tyr Glu Ile Arg Leu Ala Lys Ser Leu Ala Gln Val Val
 225 230 235 240

Asn	Leu	Ile	Asp	Pro	Asp	Val	Ile	Val	Leu	Gly	Gly	Gly	Met	Ser	Asn
			245						250					255	
Val	Asp	Arg	Leu	Tyr	Gln	Thr	Val	Pro	Thr	Leu	Met	Lys	Lys	Trp	Val
		260						265					270		
Phe	Gly	Gly	Glu	Cys	Glu	Thr	Pro	Val	Leu	Lys	Ala	Met	His	Gly	Asp
		275					280					285			
Ser	Ser	Gly	Val	Arg	Gly	Ala	Ala	Trp	Leu	Trp	Pro	Glu			
	290					295					300				

<210> 34
 <211> 918
 <212> ADN
 <213> Pantoea ananatis

<400> 34
 atgtcagcac gagtctggtg tctgggtgat gccgtggtgg acctgcttcc ggacgggccc
 60
 gggcatttaa tacagtgtgc aggcggggcg cccgccaatg tggcgggtggg cattgcccg
 120
 ttacagggcc gcagcgggtt tattggccgg gttggggacg atccttttgg tcactttatg
 180
 cagcacacgc tggcgactga acaggttgat acccgctata tgacgctgga cagcgcccag
 240
 cgcacctcaa cgggtggtggt ggcgctggat caggaaggtg agcggacttt tacctttatg
 300
 gtgcgccccca gtgcagatct gtttctggaa caaggcgatc tccccagggt tgagcaaggt
 360
 gaatggcttc actgctgctc aattgccctg gcggcagaac cttcgcgctc caccaccttt
 420
 tctgccatgc agcagatcag cgatgccggt ggctttgtga gctttgatcc caatattcgt
 480
 cacgatctgt ggcacgacga tgcccaactg cgggactgtg tgaaccgggc gttacagctg
 540
 gccgatgtgg tcaagctgtc tgaggaagag ctggcttttc tgactccggg ggcgcaacac
 600
 gctgacagca tgcaggcgct ggcggaacgc tttgcgatta gcctgctgat ggtcaccag
 660
 ggcaaggcag gagtgaaagt ctggcatcag ggtaaacatt atcactatcc cacgctgcct
 720
 gtggtgagcg tggacaccac cggcgcaggg gatgcgtttg tcgccgggct gctatggggg
 780
 ctggcggaaa aggggatgcc cgctaatgag gccgagctgg cggcacgact cagcagcgca
 840
 cagcagtgtg gggcgctggc gacgacggca aaaggggcca tgaccgcgtt gccttatcgt
 900
 caccaaattg aaggatga
 918

<210> 35
 <211> 305

<212> PRT

<213> Pantoea ananatis

<400> 35

Met	Ser	Ala	Arg	Val	Trp	Cys	Leu	Gly	Asp	Ala	Val	Val	Asp	Leu	Leu
1				5					10					15	
Pro	Asp	Gly	Pro	Gly	His	Leu	Ile	Gln	Cys	Ala	Gly	Gly	Ala	Pro	Ala
			20					25					30		
Asn	Val	Ala	Val	Gly	Ile	Ala	Arg	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Gly	Phe	Ile
			35				40					45			
Gly	Arg	Val	Gly	Asp	Asp	Pro	Phe	Gly	His	Phe	Met	Gln	His	Thr	Leu
	50					55					60				
Ala	Thr	Glu	Gln	Val	Asp	Thr	Arg	Tyr	Met	Thr	Leu	Asp	Ser	Ala	Gln
65					70					75					80
Arg	Thr	Ser	Thr	Val	Val	Val	Ala	Leu	Asp	Gln	Glu	Gly	Glu	Arg	Thr
				85					90					95	
Phe	Thr	Phe	Met	Val	Arg	Pro	Ser	Ala	Asp	Leu	Phe	Leu	Glu	Gln	Gly
			100					105					110		
Asp	Leu	Pro	Arg	Phe	Glu	Gln	Gly	Glu	Trp	Leu	His	Cys	Cys	Ser	Ile
		115					120					125			
Ala	Leu	Ala	Ala	Glu	Pro	Ser	Arg	Ser	Thr	Thr	Phe	Ser	Ala	Met	Gln
	130					135					140				
Gln	Ile	Ser	Asp	Ala	Gly	Gly	Phe	Val	Ser	Phe	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg
145					150					155					160
His	Asp	Leu	Trp	His	Asp	Asp	Ala	Gln	Leu	Arg	Asp	Cys	Val	Asn	Arg
				165					170					175	
Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Asp	Val	Val	Lys	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala
			180					185					190		
Phe	Leu	Thr	Pro	Gly	Ala	Gln	His	Ala	Asp	Ser	Met	Gln	Ala	Leu	Ala
		195					200					205			
Glu	Arg	Phe	Ala	Ile	Ser	Leu	Leu	Met	Val	Thr	Gln	Gly	Lys	Ala	Gly
	210					215					220				
Val	Lys	Val	Trp	His	Gln	Gly	Lys	His	Tyr	His	Tyr	Pro	Thr	Leu	Pro
225					230					235					240
Val	Val	Ser	Val	Asp	Thr	Thr	Gly	Ala	Gly	Asp	Ala	Phe	Val	Ala	Gly
				245					250					255	
Leu	Leu	Trp	Gly	Leu	Ala	Glu	Lys	Gly	Met	Pro	Ala	Asn	Glu	Ala	Glu
			260					265					270		
Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Ser	Ser	Ala	Gln	Gln	Cys	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr
		275					280					285			
Thr	Ala	Lys	Gly	Ala	Met	Thr	Ala	Leu	Pro	Tyr	Arg	His	Gln	Ile	Glu
	290					295					300				
Gly															
305															