



(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)



1-0035373

(51)¹⁹ C12N 9/12; C12P 13/02; C12N 15/77

(13) B

(21) 1-2019-07186

(22) 29/06/2018

(86) PCT/KR2018/007407 29/06/2018

(87) WO/2019/004778 03/01/2019

(30) 10-2017-0083437 30/06/2017 KR

(45) 25/04/2023 421

(43) 25/06/2020 387ASC

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

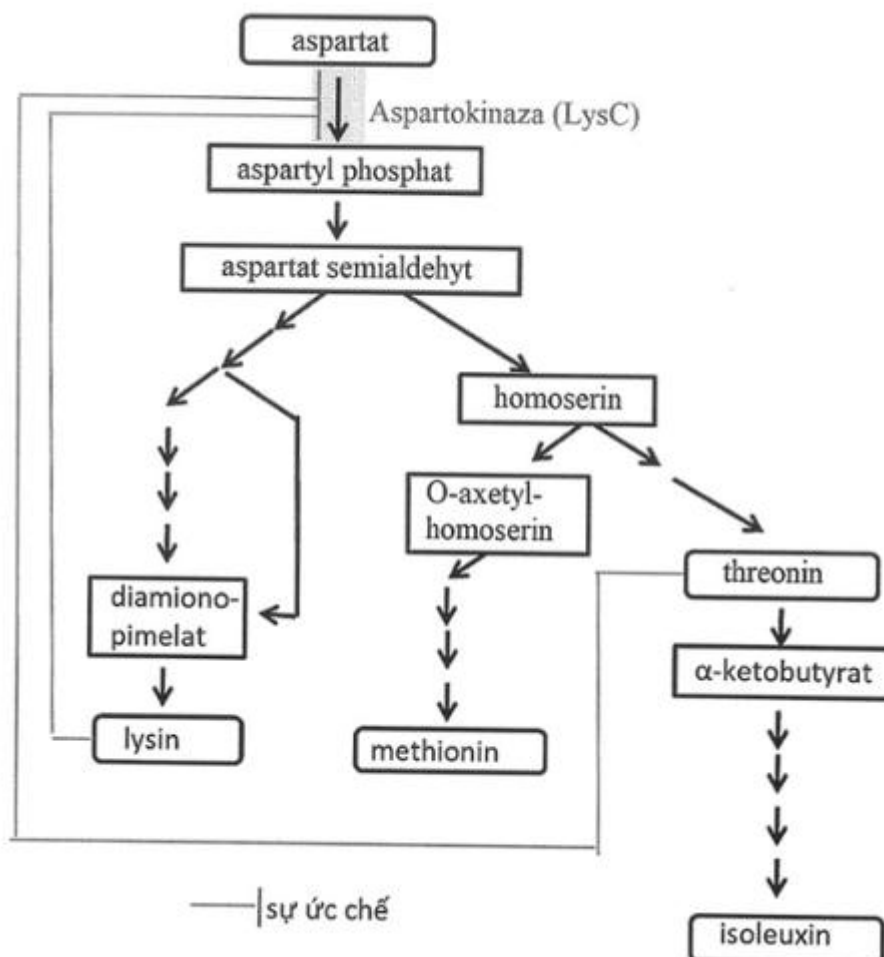
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) KIM, Hyung Joon (KR); KIM, Hyo Jin (KR); BAE, Hyun Won (KR); KIM, Hyun Ah (KR); SEO, Chang Il (KR); LEE, Ji Sun (KR); CHANG, Jin Sook (KR).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) BIẾN THỂ ASPARTOKINAZA, POLYNUCLEOTIT, VI SINH VẬT CHỨA BIẾN THỂ VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN SINH L-AXIT AMIN

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể aspartokinaza, polynucleotit mã hóa biến thể, vi sinh vật chứa biến thể, và các phương pháp sản sinh L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất homoserin của chúng bằng cách sử dụng vi sinh vật.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể aspartokinaza, polynucleotit, vi sinh vật chứa biến thể, và các phương pháp sản sinh L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng bằng cách sử dụng vi sinh vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, cụ thể là chi *Corynebacterium glutamicum* là vi khuẩn gram-dương được sử dụng rộng rãi để sản xuất L-axit amin và các chất hữu ích khác. Để sản xuất các L-axit amin và các chất hữu ích khác, các nghiên cứu khác nhau đã được thực hiện để phát triển các vi sinh vật và công nghệ sản xuất hiệu quả cao cho quá trình lên men. Ví dụ, các phương pháp để tiếp cận cụ thể các chất đích bằng cách tăng biểu hiện của gen mã hóa cho các enzym liên quan đến sinh tổng hợp L-lysin hoặc bằng cách loại bỏ các gen không cần thiết đối với sinh tổng hợp đã được sử dụng chủ yếu (Patent Hàn Quốc số 10-0838038).

Trong khi đó, trong số các L-axit amin, L-lysin, L-threonin, L-methionin, L-isoleuxin, và L-glyxin là các axit amin dẫn xuất aspartat (Asp), và các axit amin này thường sử dụng aspartyl phosphat (App) được sản xuất từ Asp bởi aspartokinaza (LysC, E.C. 2.7.2.4) (tham chiếu trên Fig.1). Do đó, để sản xuất các axit amin bằng phương pháp lên men vi sinh vật, cần thiết để duy trì các hoạt động của các enzym được sử dụng trong con đường sinh tổng hợp ở mức độ nhất định hoặc cao hơn, và do đó nghiên cứu chuyên sâu đã được thực hiện trong vấn đề này.

Cụ thể, hoạt động của LysC, hoạt động như enzym đầu tiên trong con đường sinh tổng hợp các axit amin dẫn xuất aspartat được biết đến để điều chỉnh bởi sự ức chế ngược của L-lysin và L-threonin (J Mol Biol. 27 tháng 4 năm 2007; 368(2):521-36. Epub 20 tháng 2 năm 2007). Trong vấn đề này, mặc dù các đơn liên quan đến sự ức chế ngược đã được nộp (Patent Hoa Kỳ số US 8062869 B và Patent Nhật Bản số JP 3473042 B), nghiên cứu tiếp theo vẫn được đòi hỏi để tăng năng suất của các dẫn xuất sản phẩm của aspartat.

Xuất phát từ các vấn đề nêu trên, các tác giả sáng chế đã hoàn thành sáng chế này

bằng cách xác nhận rằng sản xuất của các L-axit được dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng được cải thiện khi sử dụng hoạt tính của enzym, trong đó biến thể aspartokinaza mới được cải tiến.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất biến thể aspartokinaza, trong đó axit amin ở vị trí 337 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng L-lysine hoặc L-methionine.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotide mã hóa biến thể.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng, trong đó bao gồm biến thể aspartokinaza hoặc có hoạt động của chúng được tăng cường.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản sinh L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng, bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường; và thu hồi L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản sinh methionine bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường; sản sinh acetylhomoserine hoặc succinylhomoserine từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy; và biến đổi acetylhomoserine hoặc succinylhomoserine thành methionine.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện con đường sinh tổng hợp của axit amin dẫn xuất aspartat và dẫn xuất axit amin của chúng của *Corynebacterium glutamicum*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Trong đó, mỗi phần giải thích và các phương án ví dụ thực hiện được bộc lộ ở đây có thể được áp dụng cho các phần giải thích và các phương án ví dụ khác. Tức là, tất cả sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được thể hiện ở đây thuộc về phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế sẽ không nên hiểu bị giới hạn bởi phần mô tả được bộc lộ cụ thể dưới đây.

Ngoài ra, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ có thể nhận ra hoặc xác nhận, dựa trên thử nghiệm thông thường, nhiều phương án tương tự với các phương án cụ thể được mô tả trong sáng chế này, và các phương án tương tự như vậy được dự định đưa vào sáng chế.

Để đạt được các mục đích nêu trên, khía cạnh của sáng chế đề xuất biến thể aspartokinaza, trong đó axit amin ở vị trí 337 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “aspartokinaza” đề cập đến enzym xúc tác quá trình phosphoryl hóa của axit amin, aspartat, và hoạt động trong bước đầu tiên của quá trình sinh tổng hợp ba amin axit thiết yếu, L-methionin, L-lysin, và L-threonin được biết đến như là họ aspartat.

Theo sáng chế, thuật ngữ “aspartokinaza” có thể thay thế cho nhau được sử dụng với “LysC” hoặc “protein LysC”. Protein LysC có thể được thu từ Ngân hàng gen của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (National Center for Biotechnology Information-NCBI) là cơ sở dữ liệu được biết đến. Protein Lys có thể là LysC có nguồn gốc từ chi *Corynebacterium*, và cụ thể, có thể là polypeptit có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* nhưng sáng chế không được giới hạn ở đây. Ngoài ra, LysC theo sáng chế có thể là polypeptit chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có trình tự tương đồng của 80%, 90%, 95%, hoặc lớn hơn 97%. Hơn nữa, rõ ràng là polypeptit nào có trình tự axit amin bị mất, biến đổi, thay thế hoặc bổ sung vào một phần của trình tự cũng thuộc phạm vi của sáng chế, miễn là trình tự axit amin có tương đồng như trên và thể hiện hiệu quả tương ứng với chuỗi polypeptit.

Theo sáng chế, các phương pháp khác nhau được biết trong kỹ thuật có thể được sử dụng cho phương pháp để thu được aspartokinaza (LysC). Các ví dụ của các phương pháp bao gồm tối ưu hóa các đơn vị mã hóa để thu được các enzym có hiệu quả cao trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, thường được sử dụng để biểu hiện các enzym, và các phương pháp để sàng lọc các nguồn enzym hữu ích bằng cách sử dụng các phương pháp sinh hóa dựa trên khối thông tin bộ gen của vi sinh vật, nhưng các phương pháp của sáng chế không được giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể aspartokinaza” có thể đề cập cụ thể

đến polypeptit trong đó dư lượng axit amin ở vị trí 377 được thay thế bằng axit amin khác từ đầu N của LysC chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có nguồn gốc từ *Corynebacterium sp.* “Axit amin khác” không được giới hạn miễn là nó là axit amin khác với L-leuxin là axit amin ở vị trí 377. Cụ thể, ví dụ, dư lượng axit amin ở vị trí 377 có thể được thay thế bằng lysin hoặc methionin. L-Lysin là ví dụ của axit amin cơ bản, và axit amin cơ bản có thể là một trong số các axit amin của L-lysin, L-arginin, và L-histidin. L-Methionin là ví dụ của axit amin không phân cực, và axit amin không phân cực có thể là một trong số các axit amin của L-methionin, L-phenylalanin, L-alanin, L-xystein, L-glyxin, L-isoleuxin, L-leuxin, L-prolin, L-tryptophan, và L-valin. Tuy nhiên, sáng chế không giới hạn ở các axit amin này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể aspartokinaza” có thể được sử dụng thay thế với “aspartokinaza được biến đổi” hoặc “LysC được biến đổi”.

Các biến thể aspartokinaza được đặc trưng bởi hoạt tính aspartokinaza được tăng cường so với polypeptit có hoạt tính của aspartokinaza có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Ngoài ra, ngay cả khi nó được mô tả là “protein chứa trình tự axit amin của số trình tự cụ thể”, protein như vậy không loại trừ việc bổ sung các trình tự không có nghĩa trước hoặc sau trình tự axit amin của số trình tự tương ứng, đột biến xảy ra tự nhiên, hoặc đột biến cùng nghĩa của chúng, nếu protein có tác dụng giống hệt hoặc tương đương với tác dụng của peptit chứa trình tự axit amin của số thứ tự tương ứng. Ngoài ra, rõ ràng rằng protein chứa trình tự bổ sung hoặc đột biến như vậy cũng thuộc trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ “tương đồng” đề cập đến tỷ lệ phần trăm đồng nhất giữa hai loại polynucleotit hoặc polypeptit. Tương đồng đề cập đến mức độ phù hợp với trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit, và có thể được biểu thị dưới dạng phần trăm. Trong sáng chế, trình tự tương đồng có hoạt động là giống hệt hoặc tương tự với trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit đã đưa ra được biểu thị như là “% tương đồng”. Tương đồng giữa các trình tự từ một nhóm chức đến các phần khác có thể được xác định bằng các kỹ thuật được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, tương đồng có thể được xác định bằng các sử dụng phần mềm tiêu chuẩn, như là BLAST 2.0, để tính toán các tham số như điểm số, đồng nhất, và tương tự, hoặc bằng cách so sánh trình tự thông qua các thí nghiệm lai Nam, và điều kiện lai thích hợp để xác định có thể được xác định bằng

phương pháp được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, J. Sambrook *et al.*, Kỹ thuật nhân dòng phân tử, Hướng dẫn sử dụng trong phòng thí nghiệm, tái bản lần thứ 2, Phòng thí nghiệm Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel *et al.*, Quy trình hiện tại trong sinh học phân tử, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể aspartokinaza.

Biến thể aspartokinaza được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit” đề cập đến polyme nucleotit chứa các đơn phân nucleotit liên kết cộng hóa trị trong chuỗi, và các mẫu của chúng là các mạch ADN hoặc ARN có chiều dài định trước hoặc dài hơn. Đặc biệt, polynucleotit đề cập đến đoạn polynucleotit mã hóa polypeptit được biến đổi.

Polynucleotit mã hóa biến thể aspartokinaza có thể là polynucleotit mã hóa polypeptit trong đó dư lượng axit amin ở vị trí 377 được thay thế bằng axit amin khác trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Cụ thể, như ví dụ đại diện, polynucleotit mã hóa biến thể aspartokinaza có thể là polynucleotit mã hóa polypeptit trong đó dư lượng axit amin ở vị trí 377 được thay thế bằng axit amin khác của L-lysin hoặc L-methionin trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Cụ thể hơn, polynucleotit có thể là polynucleotit mã hóa protein lysC chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 5. Ví dụ, polynucleotit có thể là polynucleotit chứa trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 6. Các biến đổi khác nhau có thể được thực hiện trong vùng mã hóa với điều kiện là chúng không thay đổi trình tự axit amin của protein được biểu hiện từ vùng mã hóa, do sự thoái hóa của đơn vị mã hóa hoặc trong việc xem xét các đơn vị mã hóa được ưu tiên bởi sinh vật trong đó protein được biểu hiện.

Do đó, rõ ràng rằng do sự thoái hóa của đơn vị mã hóa, polypeptit chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 5 hoặc polynucleotit có khả năng được dịch mã sang polynucleotit có tương đồng cũng có thể nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, đầu dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự mã hóa cho protein có hoạt động của protein chứa trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 bằng cách lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự bổ sung cho toàn bộ hoặc một phần của trình tự polynucleotit, có thể bao gồm nhưng không giới hạn.

“Các điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện cho phép lai đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện như vậy được bộc lộ cụ thể trong giáo trình (ví dụ, J. Sambrook *et al.*). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt gồm điều kiện trong đó các gen có tương đồng cao (ví dụ, lớn hơn 80%, lớn hơn 90%, cụ thể là lớn hơn 95%, lớn hơn 97%, và cụ thể hơn là lớn hơn 99%) có thể lai giữa chúng, trong khi các gen có tương đồng thấp hơn thì không thể lai với nhau; hoặc các điều kiện để lai Nam thông thường (tức là, các điều kiện cho rửa một lần, và cụ thể là rửa hai hoặc ba lần dưới nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng ở 60°C, 1×SSC (saline-sodium citrate: Salin natri xitrat) và 0,1% SDS (sodium dodecyl sulfate: natri đodecyl sulfat); cụ thể hơn là 60°C, 0,1×SSC, và 0,1% SDS; và cụ thể hơn nữa là 68°C, 0,1×SSC, và 0,1% SDS).

Phép lai đòi hỏi hai axit nucleic có các trình tự bổ sung, mặc dù sự không phù hợp giữa các bazơ có thể phụ thuộc vào mức độ nghiêm ngặt của phép lai. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để thể hiện mối quan hệ giữa các bazơ nucleotit lai lẫn nhau. Ví dụ, liên quan đến ADN, adenosin bổ sung cho thymin và xytosin được bổ sung cho guanin. Theo đó, sáng chế có thể bao gồm các trình tự axit nucleic tương tự về cơ bản cũng như các đoạn axit nucleic được tách chiết bổ sung cho toàn bộ trình tự.

Cụ thể, polynucleotit tương đồng có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai bao gồm bước lai ở giá trị T_m là 55°C và sử dụng các điều kiện được mô tả ở trên. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là 60°C, 63°C hoặc 65°C nhưng không bị giới hạn ở các nhiệt độ này. Người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể điều chỉnh phù hợp giá trị T_m theo mục đích đã định.

Tính nghiêm ngặt của việc lai các polynucleotit phụ thuộc vào độ dài và mức độ bổ sung của các polynucleotit, và các biến số được biết đến trong kỹ thuật (Sambrook *et al.*, supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8).

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa biến thể aspartokinaza và vi sinh vật được biến nạp với vector chứa polynucleotit mã hóa biến thể aspartokinaza. Cụ thể, sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng chứa biến thể aspartokinaza.

Các vi sinh vật chứa biến thể aspartokinaza của sáng chế được đặc trưng bởi hoạt tính của aspartokinaza được tăng cường so với vi sinh vật không được biến đổi hoặc vi sinh vật kiểu dại.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tăng cường của hoạt động” có nghĩa là hoạt động của protein được đưa vào, hoặc hoạt động được tăng cường so với hoạt động nội sinh hoặc hoạt động trước khi biến đổi của vi sinh vật. “Sự đưa vào” của hoạt động nghĩa là hoạt động của protein cụ thể mà vi sinh vật ban đầu không được biểu hiện tự nhiên hoặc nhân tạo. “Hoạt động nội sinh” đề cập đến hoạt động của protein cụ thể vốn xuất hiện trong chủng bố mẹ trước biến nạp, khi các đặc điểm của vi sinh vật bị thay đổi bằng sự biến đổi di truyền bởi các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” đề cập đến cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit mã hóa protein đích được liên kết hoạt động với trình tự điều tiết thích hợp để biểu hiện protein trong vật chủ thích hợp. Trình tự điều tiết có thể bao gồm vùng gen khởi động có thể bắt đầu phiên mã, bất kỳ trình tự vận hành nào để kiểm soát phiên mã, trình tự để mã hóa vị trí gắn kết ribosom mRNA thích hợp, và trình tự để kiểm soát kết thúc của phiên mã và dịch mã. Vector có thể được truyền vào vật chủ thích hợp, và sau đó có thể được sao chép hoặc thực hiện chức năng độc lập với bộ gen của vật chủ, và có thể được tích hợp vào trong bộ gen của vật chủ.

Vector được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn đặc biệt nào miễn là vector có thể được biểu hiện trong vật chủ, và bất kỳ vector nào được biết trong kỹ thuật có thể được sử dụng. Ví dụ về các vector thường được sử dụng là plasmit, cosmid, vi rút, và thực khuẩn thể ở trạng thái tự nhiên hoặc trạng thái tái tổ hợp. Ví dụ, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, và Charon21A có thể được sử dụng như là vector phage hoặc vector cosmid; và hệ thống pBR, hệ thống pUC, hệ thống pBluescriptII, hệ thống pGEM, hệ thống pTZ, hệ thống pCL, và hệ thống pET có thể được sử dụng như là vector plasmit. Cụ thể là các vector pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, và pCC1BAC có thể được sử dụng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Vector có thể được sử dụng trong sáng chế không có giới hạn cụ thể nào, và vector biểu hiện đã biết có thể được sử dụng. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa protein đích có thể được chèn vào trong nhiễm sắc thể thông qua vector để chèn nhiễm sắc thể nội bào. Sự chèn của polynucleotit vào trong nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào được biết đến trong kỹ thuật như là tái tổ hợp tương đồng nhưng sáng chế không giới hạn cụ thể ở đó. Vector có thể còn bao gồm dấu hiệu chọn lọc được sử dụng để chọn các tế bào được biến nạp với vector vào trong nhiễm sắc thể của vật chủ.

Dấu hiệu chọn lọc được sử dụng để chọn các tế bào được biến nạp cùng với vector, nghĩa là để xác nhận có hay không phân tử axit nucleic được chèn vào. Do đó, dấu hiệu chọn lọc có thể cung cấp cho tế bào khả năng để thể hiện kháng thuốc, kháng độc tế bào, tự dưỡng, hoặc biểu hiện kiểu hình có thể lựa chọn như là biểu hiện protein bề mặt. Với sự có mặt của tác nhân chọn lọc, các tế bào được biến nạp có thể được lựa chọn bởi vì chỉ các tế bào biểu hiện kết xuất dấu hiệu chọn lọc tồn tại hoặc thể hiện kiểu hình khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến quá trình đưa vector vào bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào trong tế bào chủ theo cách mà protein được mã hóa bởi polynucleotit được biểu hiện trong tế bào chủ. Miễn là polynucleotit được biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ, nó cũng có thể được tích hợp vào hoặc đặt vào trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ hoặc nằm bên ngoài nhiễm sắc thể. Ngoài ra, polynucleotit chứa ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào trong bất kỳ hình thức nào miễn là chúng có thể được đưa vào trong tế bào vật chủ và được biểu hiện trong đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào chủ dưới dạng catxet biểu hiện là một cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết cho sự tự biểu hiện của nó. Catxet biểu hiện có thể chứa vùng gen khởi động được liên kết hoạt động với polynucleotit, các tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom, hoặc các tín hiệu kết thúc dịch mã. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào chủ và được liên kết hoạt động với các trình tự được yêu cầu để biểu hiện trong tế bào chủ, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây. Phương pháp biến nạp bao gồm bất kỳ phương pháp nào để đưa axit nucleic vào trong tế bào, và có thể được thực hiện bằng cách lựa chọn kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp được biết đến trong kỹ thuật, phụ thuộc vào tế bào chủ. Các ví dụ của phương pháp bao gồm phương pháp xung điện, canxi phosphat (CaPO_4) kết tủa, canxi clorua (CaCl_2) kết tủa, vi tiêm, kỹ thuật polyetylen glycol (PEG), kỹ thuật DEAE-dextran, kỹ thuật cation liposome, kỹ thuật lithi axetat-DMSO, v.v, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Ngoài ra, thuật ngữ “liên kết hoạt động” có nghĩa là trình tự polynucleotit thực hiện chức năng liên kết với trình tự gen khởi động và làm trung gian phiên mã của polynucleotit mã hóa protein đích của sáng chế. Liên kết hoạt động có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết đến trong kỹ thuật, và - sự liên kết và phân cắt vị trí đặc hiệu ADN có thể được điều chế bằng cách sử dụng các enzym lyaza

và ligaza đã biết, nhưng sáng chế không được giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng” đề cập đến vi sinh vật sản sinh tự nhiên L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng, hoặc đề cập đến vi sinh vật trong đó năng suất của L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng được cung cấp cho chúng bỏ mẹ thiếu khả năng sản xuất L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng” đề cập đến nguyên liệu có khả năng sinh tổng hợp bằng cách sử dụng axit aspartic (aspartat) như là tiền chất, và có thể được dùng tích hợp với thuật ngữ “sản phẩm là dẫn xuất của aspartat”. “Dẫn xuất axit amin” đề cập đến nguyên liệu có thể được sản xuất từ L-axit amin và nguyên liệu bao gồm tiền chất của L-axit amin. Ngoài ra, dẫn xuất axit amin không được giới hạn miễn là nguyên liệu có thể được sản xuất bằng cách sinh tổng hợp sử dụng aspartat như là tiền chất. Cụ thể, các nguyên liệu được tổng hợp bằng cách thường sử dụng axetyl phosphat được bao gồm nhưng không giới hạn ở đó. Ví dụ, dẫn xuất axit amin có thể là L-lysin, L-threonin, L-methionin, L-glyxin, homoserin, *O*-axetylhomoserin, *O*-suxinylhomoserin, *O*-phosphohomoserin, L-isoleuxin, và cadaverin, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Cadaverin có thể được sinh tổng hợp trực tiếp bằng cách sử dụng aspartat như là tiền chất, hoặc có thể được sử dụng từ lysin bởi lysin decarboxylaza. L-methionin có thể được sinh tổng hợp trực tiếp bằng cách sử dụng aspartat như là tiền chất, hoặc có thể được sản xuất bằng cách biến đổi từ *O*-axetylhomoserin hoặc *O*-suxinylhomoserin.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “aspartat (axit aspartic)” được viết tắt là Asp hoặc D, và đề cập đến axit aspartic, là α -axit amin được sử dụng trong sinh tổng hợp các protein. Giống như tất cả các axit amin khác, aspartat chứa nhóm amino và nhóm axit carboxylic. Nói chung, aspartat được sản xuất như là aspartyl phosphat bởi aspartokinaza (LysC), và sau đó được chuyển thành L-lysin, L-methionin, L-homoserin, L-threonin, L-isoleuxin, v.v. trong cơ thể.

Để tăng cường sinh tổng hợp sản phẩm là dẫn xuất của aspartat, biến thể aspartokinaza của sáng chế có thể được sử dụng. Ví dụ, để tăng cường sinh tổng hợp của L-lysin, L-threonin, L-methionin, L-glyxin, homoserin, *O*-axetylhomoserin, *O*-

suxinylhomoserin, *O*-phosphohomoserin, L-isoleuxin, và cadaverin, biến thể aspartokinaza của sáng chế có thể được đưa vào hoặc hoạt động của chúng có thể được tăng cường. Ngoài ra, năng suất của sản phẩm là dẫn xuất của aspartat có thể còn được tăng cường bằng cách đưa vào hoặc tăng cường hoạt động của protein cụ thể hoặc bằng cách làm bất hoạt hoạt động của protein cụ thể.

Phương pháp đưa vào, tăng cường, và bất hoạt hoạt động của protein cụ thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp phù hợp được biết đến trong kỹ thuật tùy thuộc vào các đặc điểm của các vi sinh vật.

Vi sinh vật sản sinh sản phẩm là dẫn xuất của aspartat, L-axit amin, hoặc dẫn xuất axit amin của chúng có thể là bất kỳ vi sinh vật nào có khả năng sản sinh “axit amin” là dẫn xuất của aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng bằng cách đưa vào biến thể aspartat của sáng chế. Ví dụ cụ thể có thể bao gồm *Escherichia sp.*, *Serratia sp.*, *Erwinia sp.*, *Enterobacteria sp.*, *Salmonella sp.*, *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Brevibacterium sp.*, hoặc *Corynebacterium sp.*, và cụ thể hơn, vi sinh vật có thể là *Corynebacterium glutamicum*, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp sản sinh L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng, bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật được mô tả ở trên; và thu hồi L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

Phương pháp sản sinh L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật dưới các điều kiện nuôi cấy phù hợp và các điều kiện hoạt động enzym được biết đến trong kỹ thuật. Cụ thể, mặc dù không được giới hạn cụ thể, các bước nuôi cấy vi sinh vật có thể được thực hiện bằng nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, và nuôi cấy theo mẻ bổ sung đã được biết đến trong kỹ thuật. Ở đây, các điều kiện nuôi cấy không được giới hạn cụ thể, nhưng độ pH thích hợp (ví dụ, độ pH 5 đến 9, cụ thể là, độ pH 6 đến 8, và cụ thể hơn là độ pH 6,8) có thể được duy trì bằng cách sử dụng hóa chất cơ bản (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac) hoặc hóa chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sulfuric). Ngoài ra, điều kiện hiếu khí có thể được duy trì bằng cách bổ sung oxy hoặc hỗn hợp khí chứa oxy để nuôi cấy tế bào. Nhiệt độ nuôi cấy thể được duy trì ở 20°C đến 45°C, và cụ thể ở 25°C đến 40°C, và nuôi cấy có thể được thực

hiện trong khoảng 10 giờ đến 160 giờ, nhưng sáng chế không được giới hạn ở đây. Axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng được sản xuất nhờ nuôi cấy có thể được tiết vào trong môi trường hoặc duy trì trong các tế bào.

Ngoài ra, môi trường được sử dụng cho nuôi cấy có thể chứa đường và hydrat cacbon (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, mật, tinh bột và xenluloza), dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu đậu phộng và dầu dừa), axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic và axit linoleic); rượu (ví dụ, glyxerol và etanol), và axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic) riêng lẻ hoặc kết hợp như là nguồn cacbon; các hợp chất hữu cơ chứa nitrogen (ví dụ, pepton, dịch chiết nấm men, nước thịt, dịch chiết mạch nha, dịch ngô, bột đậu nành, và ure) hoặc hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat và amoni nitrat)) riêng lẻ hoặc kết hợp như là nguồn nitơ; và kali dihydrogen phosphat, di kali phosphat, hoặc muối chứa natri tương ứng riêng lẻ hoặc kết hợp như là nguồn phospho, nhưng sáng chế không được giới hạn ở đây. Ngoài ra, môi trường có thể chứa các vật liệu thúc đẩy sự tăng trưởng thiết yếu như là các muối kim loại khác (ví dụ, magie sulfat hoặc sắt sulfat), các axit amin, và các vitamin.

Phương pháp để thu hồi axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng được sản xuất trong phương pháp nuôi cấy của sáng chế có thể được thực hiện để thu axit amin đích từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp phù hợp đã được biết đến trong kỹ thuật theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, và sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) có thể được sử dụng, và axit amin đích là dẫn xuất của aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng có thể được thu hồi từ môi trường hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng phương pháp phù hợp đã được biết trong kỹ thuật.

Ngoài ra, phương pháp thu hồi có thể còn bao gồm bước tinh sạch, và có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp phù hợp đã được biết trong kỹ thuật.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp sản sinh L-methionin, bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật của sáng chế; sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc *O*-suxinylhomoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy; và chuyển *O*-axetylhomoserin hoặc *O*-suxinylhomoserin thành L-methionin.

Cụ thể, “bước chuyển thành L-methionin” có thể bao gồm các bước phản ứng *O*-

axetylhomoserin hoặc *O*-suxinylhomoserin với *O*-axetylhomoserin sulfhydrylaza hoặc *O*-suxinylhomoserin sulfhydrylaza với sự hiện diện của sulfit. “*O*-axetylhomoserin hoặc *O*-suxinylhomoserin” có thể là dịch lên men chứa *O*-axetylhomoserin hoặc *O*-suxinylhomoserin được sản xuất bởi vi sinh vật của sáng chế, hoặc có thể ở dạng tinh khiết. Ngoài ra, “sulfit” có thể là, ví dụ, methylmercaptan, và methylmercaptan có thể đề cập đến dạng natri methyl mercaptan ($\text{CH}_3\text{S-Na}$) cũng như là methylmercaptan (CH_3SH) ở trạng thái khí hoặc hóa lỏng và methylmercaptan chứa dimetylsulfit (DMS) ở dạng được mô tả trong Công bố đơn Quốc tế số WO2010/098629; và methylmercaptan cũng có thể đề cập đến dẫn xuất methylmercaptan ở dạng có khả năng cung cấp nguyên tử lưu huỳnh. Ngoài ra, “*O*-axetylhomoserin sulfhydrylaza hoặc *O*-suxinylhomoserin sulfhydrylaza” có thể là dịch lên men vi sinh vật sản sinh giống nhau, hoặc là dạng được tinh sạch.

Phương pháp sản sinh L-methionin có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật dưới các điều kiện nuôi cấy phù hợp và các điều kiện hoạt động enzym đã được biết đến trong kỹ thuật. Phương pháp nuôi cấy và môi trường cụ thể được mô tả ở trên.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Vi sinh vật chứa biến thể aspartokinaza theo sáng chế có thể thu được L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc sản phẩm là dẫn xuất của aspartat với năng suất cao mà không ức chế sự phát triển của các tế bào chủ so với vi sinh vật chứa polypeptit LysC-kiểu đại.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây cùng với các phương án ví dụ thực hiện. Tuy nhiên, các phương án ví dụ được mô tả ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không nên được hiểu là giới hạn phạm vi sáng chế.

Ví dụ 1: Điều chế chủng được đưa biến thể *lysC* vào

Sự biến đổi, hoạt động của chủng có thể được tăng cường so với kiểu đại, được lựa chọn thông qua mô hình cấu trúc của protein aspartokinaza, và chủng được đưa vào với biến thể được điều chế như mô tả dưới đây.

Trong gen *lysC* (SEQ ID NO: 2) mã hóa aspartokinaza (SEQ ID NO: 1) có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (sau đây gọi tắt là WT), axit amin ở

vị trí 377 được chọn như là vị trí biến đổi, và L-lysin là axit amin cơ bản, và L-methionin là axit amin không phân cực được chọn là ví dụ đại diện cho các axit amin khác để thay thế.

Để điều chế vector được đưa vào với sự biến đổi, hiệu chỉnh trên vị trí biến đổi, cặp mồi (SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 10) để khuếch đại vùng phía trước 5' và cặp mồi (SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12) để khuếch đại vùng phía sau 3' được thiết kế (Bảng 1). Trong các mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 12, vị trí enzyme giới hạn XbaI (được gạch chân) được chèn vào ở mỗi đầu. Ngoài ra, trong cặp mồi của các đoạn mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 hoặc cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11, sự biến đổi thay thế nucleotit (được gạch chân) đặt ở vị trí được thiết kế lại ghép với nhau.

Bảng 1

SEQ ID NO:	Mồi	Trình tự (5'-3')
7	Mồi 1	TCCT <u>CTAGAG</u> CTGCGCAGTGTGAATACG
8	Mồi 2	TGGAAATC <u>TTT</u> TCGATGTTACGTTGACAT
9	Mồi 3	ACATCGAAA <u>AG</u> ATTTCCACCTCTGAGATTC
10	Mồi 4	TGGAAATC <u>ATT</u> TCGATGTTACGTTGACAT
11	Mồi 5	ACATCGAA <u>ATG</u> ATTTCCACCTCTGAGATTC
12	Mồi 6	GAC <u>CTAGAG</u> TTACCTCAGAGACGATTA

PCR (Polymerase Chain Reaction: phản ứng chuỗi trùng hợp) được thực hiện với các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 12, hoặc SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12 bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của WT làm mạch khuôn. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, PCR được thực hiện với tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện sau: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây. Sau đó, phản ứng trùng hợp được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, hiệu chỉnh trên vị trí biến đổi của gen *lysC*, đoạn ADN (509 bp) của vùng phía trước 5' và đoạn ADN (520 bp) của vùng phía sau 3' tương ứng đã thu được.

PCR được thực hiện với cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 12 được thực hiện bằng cách sử dụng hai đoạn ADN đã được khuếch đại ở trên làm mạch khuôn. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, PCR được thực hiện với tổng cộng 30 chu kỳ trong các điều kiện như sau: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây. Sau đó, phản ứng trùng hợp được thực hiện ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN (1011 bp) bao gồm biến thể (SEQ ID NO: 4) của gen *lysC* mã hóa biến thể aspartokinaza (SEQ ID NO: 3), trong đó leuxin ở vị trí 377 được thay thế bằng lysin được khuếch đại. Ngoài ra, để xác nhận tầm quan trọng của axit amin ở vị trí 377, đoạn ADN (1011 bp) chứa biến thể (SEQ ID NO: 6) của gen *lysC* mã hóa biến thể aspartokinaza (SEQ ID NO: 5), trong đó leuxin ở vị trí 377 được thay thế bằng methionin đã thu được.

Vectơ pDZ (Patent Hàn Quốc số 0924065) không thể được nhân dòng trong *Corynebacterium glutamicum*, và đoạn ADN (1011 bp) được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI, và được nối với nhau bằng cách sử dụng ADN ligaza và sau đó được nhân dòng để thu được các plasmit. Các plasmit được đặt tên là pDZ-*lysC*(L377K) và pDZ-*lysC*(L377M).

Các vectơ pDZ-*lysC*(L377K) và pDZ-*lysC*(L377M), mỗi vectơ được đưa vào trong WT bằng cách sử dụng phương pháp xung điện (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1999) 52:541-545), và sau đó các chủng được biến nạp đã thu được trong môi trường LB chứa kanamycin (25 mg/L). WT::*lysC*(L377K) và WT::*lysC*(L377M), các chủng trong đó biến thể nucleotit được đưa vào bên trong gen *lysC* do các đoạn ADN được chèn vào nhiễm sắc thể thông qua quá trình tái tổ hợp thứ cấp (quá trình lai ghép), đã thu được, các chủng này được đặt tên tương ứng là *Corynebacterium glutamicum* CA01-2307 và CA01-2308. CA01-2307 và CA01-2308 được lưu giữ ở Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc, các chủng đã được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest vào 29 tháng 3 năm 2017, và các chủng được định danh là KCCM12000P và KCCM12001P.

Ví dụ 2: Xác nhận khả năng của chủng được đưa biến thể *lysC* vào để sản sinh axit amin là dẫn xuất của aspartat.

Để so sánh khả năng các chủng CA01-2307 và CA01-2308 được thu được từ Ví dụ 1 và chủng WT để sản sinh các axit amin dẫn xuất aspartat chính, các chủng được

nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp dưới đây, và các thành phần trong môi trường nuôi cấy đã được phân tích.

Mỗi chủng được cấy truyền vào trong bình tam giác (250 mL) chứa môi trường nuôi cấy giống (25 mL), và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 20 giờ trong khi lắc ở tốc độ 200 vòng/phút (rpm). Dung dịch nuôi cấy giống (1 mL) được cấy truyền vào trong bình tam giác (250 mL) chứa môi trường sản xuất (24 mL), và sau đó được nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ trong khi lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Các nồng độ của L-lysine và L-threonine là các axit amin đại diện dẫn xuất từ L-aspartat và aspartat, được phân tích bằng HPLC, và các nồng độ phân tích được thể hiện trên Bảng 2.

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

Glucose (20 g), pepton (10 g), dịch chiết nấm men (5 g), ure (1,5 g), KH_2PO_4 (4 g), K_2HPO_4 (8 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), biotin (100 μg), thiamin HCl (1.000 μg), canxi pantothenat (2.000 μg), nicotinamit (2.000 μg) (trong 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)

Glucose (100 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 g), protein đậu nành (2,5 g), bột ngô (5 g), ure (3 g), KH_2PO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), biotin (100 μg), thiamin clorua (1.000 μg), canxi pantothenat (2.000 μg), nicotinamit (3.000 μg), CaCO_3 (30 g) (trong 1 L nước cất).

Bảng 2. Các nồng độ của các axit amin là dẫn xuất aspartat được sản xuất từ CA01-2307 và CA01-2308

Chủng/nồng độ	L-Aspartat (mg/L)	L-Lysine (mg/L)	L-Threonine (mg/L)
WT	20,3	8,0	340,3
CA01-2307	29,7	3.647,7	402,7
CA01-2308	30,2	1.572,3	385,4

Như kết quả phân tích các nồng độ ở bảng trên của các axit amin là dẫn xuất aspartat, được xác nhận rằng khi biến thể *lysC* được đưa vào, nồng độ L-lysine được tăng lên đáng kể và nồng độ của L-aspartat và L-threonine cũng được tăng lên so với WT. Dựa trên kết quả trên, các chủng CA01-2307, CA01-2308, và WT được nuôi cấy theo cách tương tự như được mô tả ở trên để so sánh khả năng của chúng để sản sinh lysine cụ thể. Ngoài ra, nồng độ của L-lysine trong môi trường nuôi cấy được phân tích theo cách tương tự như mô tả ở trên (Bảng 3).

Bảng 3. Các nồng độ L-lysin được sản xuất từ các chủng WT, CA01-2307, và CA01-2308

Chủng/nồng độ	L-Lysin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
WT	0,008	0,007	0,008
CA01-2307	3,664	3,665	3,598
CA01-2308	1,523	1,475	1,666

Như kết quả phân tích nồng độ của L-lysin ở bảng trên, xác nhận rằng năng suất sản xuất L-lysin từ CA01-2307 chứa biến thể *lysC* (L377K) được tăng lên rất nhiều như trong đánh giá trước đó so với được sản xuất từ chủng WT. Ngoài ra, xác nhận rằng năng suất sản xuất L-lysin từ CA01-2308 chứa biến thể *lysC* (L377M) cũng được tăng lên so với L-lysin được sản xuất từ chủng WT. Dựa trên kết quả ở trên, xác nhận rằng năng suất của L-lysin trong các axit amin dẫn xuất aspartat được tăng lên rất nhiều do biến thể aspartokinaza (SEQ ID NO: 3), trong đó leuxin ở vị trí 377 được lựa chọn theo sáng chế được thay thế bằng lysin, và do biến thể aspartokinaza (SEQ ID NO: 5), trong đó leuxin ở vị trí 377 được thay thế bằng methionin.

Ví dụ 3: Điều chế chủng chứa L-threonin được tăng cường và xác nhận năng suất của L-threonin

Để xác nhận rõ thay đổi năng suất L-threonin bằng cách đưa vào biến thể *lysC* (L377K) có năng suất lysin cao hơn được xác nhận trong Ví dụ 2, biến thể được đưa vào trong gen mã hóa homoserin dehydrogenaza sản sinh homoserin là chất trung gian phổ biến trong con đường sinh tổng hợp L-threonin, L-isoleuxin, L-methionin, và các dẫn xuất homoserin. Cụ thể, chủng được điều chế bằng cách đưa biến thể *hom* (G378E) đã được biết đến trong kỹ thuật (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 612-620 (1996)) vào trong chủng CA01-2307 được điều chế trong Ví dụ 1. Ngoài ra, chủng trong đó biến thể *hom* (G378E) được đưa vào trong WT cũng được điều chế như là nhóm đối chứng. Để điều chế vector có *hom* (G378E) được đưa vào, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16 sử dụng bộ gen WT là ADN làm mạch khuôn. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, PCR được thực hiện tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện như sau: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây,

và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây. Sau đó, phản ứng trùng hợp được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút.

Kết quả là, hiệu chỉnh trên biến thể của gen *hom*, đoạn ADN (220 bp) của vùng phía trước 5' và đoạn ADN (220 bp) của vùng phía sau 3' đã thu được. Sau đó, hai đoạn ADN này được dùng làm mạch khuôn để thực hiện PCR bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 16. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, PCR được thực hiện với tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện như sau: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây. Sau đó, phản ứng trùng hợp được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN (440 bp) gồm biến thể gen *hom* được khuếch đại.

Bảng 4

SEQ ID NO:	Mồi	Trình tự (5'-3')
13	Mồi 7	TCCTCTAGACTGGTCGCCTGATGTTCTAC
14	Mồi 8	GCCAAAACCTCCACGCGATC
15	Mồi 9	ATCGCGTGGAGGTTTTGGCT
16	Mồi 10	GACTCTAGATTAGTCCCTTTCGAGGCGGA

Vectơ pDZ đã được sử dụng trong Ví dụ 1, và đoạn ADN (440 bp) được xử lý bằng enzym giới hạn *XbaI*, và chúng được nối với nhau bằng cách sử dụng ADN ligaza và sau đó được nhân dòng để thu được plasmit. Plasmit được đặt tên là pDZ-*hom* (G378E).

Vectơ pDZ-*hom* (G378E) được đưa vào trong các chủng WT và CA01-2307 bằng cách sử dụng phương pháp xung điện (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1999, 52:541-545)), và sau đó các chủng biến nạp được thu được bằng cách chọn lọc trên môi trường chứa kanamycin (25 mg/L). WT::*hom* (G378E) và CA01-2307::*hom* (G378E), thu được các chủng trong đó biến thể nucleotit được đưa vào trong gen *hom* bởi đoạn ADN được chèn vào nhiễm sắc thể thông qua quá trình tái tổ hợp thứ cấp. Để so sánh khả năng sản sinh threonin của WT::*hom* (G378E) và CA01-2307::*hom* (G378E), các chủng được nuôi cấy theo cách tương tự như trong Ví dụ 2, và nồng độ của threonin trong môi trường nuôi cấy được phân tích.

Bảng 5. Các nồng độ threonin được sản xuất từ các chủng, WT::*hom* (G378E) và CA01-2307::*hom* (G378E)

Chủng/Nồng độ	L-Threonin (g/L)		
	Mé 1	Mé 2	Mé 3
WT:: <i>hom</i> (G378E)	0,456	0,475	0,432
CA01-2307:: <i>hom</i> (G378E)	1,210	1,132	1,211

Như kết quả phân tích nồng độ của L-threonin, được xác nhận rằng năng suất của L-threonin được tăng lên đáng kể trong chủng chứa biến thể *lysC* (Bảng 5).

Ví dụ 4: Điều chế chủng chứa L-isoleuxin được tăng cường và so sánh năng suất của L-isoleuxin

Để xác nhận hiệu quả của việc đưa vào biến thể *lysC* (L377K) đến năng suất L-isoleuxin, vector để tăng cường biểu hiện của biến thể *ilvA* (V323A) của gen (*Appl. Enviro. Microbiol.*, Dec. 1996, p. 4345-4351) mã hóa L-threonin dehydrataza, được biết đến trong kỹ thuật, đã được điều chế.

Để điều chế vector được đưa vào với biến thể của gen *ilvA*, hiệu chỉnh trên vị trí biến thể, cặp môi (SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18) để khuếch đại vùng phía trước 5' và cặp môi (SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20) để khuếch đại vùng phía sau 3' được thiết kế. Trong cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 20, vị trí của enzym giới hạn BamHI (được gạch chân) được chèn vào mỗi đầu của môi. Ngoài ra, trong cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19, biến thể thay thế nucleotit (được gạch chân) đặt ở vị trí được thiết kế để lai ghép với nhau.

Bảng 6

SEQ ID NO:	Môi	Trình tự (5'-3')
17	Môi 11	ACGGATCCCAGACTCCAAAGCAAAAGCG
18	Môi 12	ACACCACGGCAGAACCCAGGTGCAAAGGACA
19	Môi 13	CTGGTTCTGCGGTGGTGTGCATCATCTCTG
20	Môi 14	ACGGATCCAACCAAACTTGCTCACACTC

PCR được thực hiện với cặp môi có mã nhận biết SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20 sử dụng nhiễm sắc thể của WT làm mạch khuôn. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, PCR được thực hiện với tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện như sau: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây. Sau đó,

phản ứng trùng hợp được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, tập trung vào vị trí biến đổi của gen *ilvA*, đoạn ADN (627 bp) của vùng phía trước 5' và đoạn ADN (608 bp) của vùng phía sau 3' đã thu được.

PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 20 bằng cách sử dụng hai đoạn ADN đã khuếch đại ở trên làm mạch khuôn. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, PCR được thực hiện với tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện như sau: 95°C biến tính trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây. Sau đó, phản ứng trùng hợp được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN (1217 bp) chứa biến thể gen *ilvA* mã hóa biến thể IlvA, trong đó valin ở vị trí 323 được thay thế bằng alanin được khuếch đại.

Vector pECCG117 (Patent Hàn Quốc số 10-0057684) và đoạn ADN (1011 bp) được xử lý bằng enzym giới hạn BamHI, và chúng được nối với nhau bằng cách sử dụng ADN ligaza và sau đó được nhân dòng để thu được plasmid. Plasmid được đặt tên là pECCG117-*ilvA* (V323A).

Vector pECCG117-*ilvA* (V323A) được đưa vào trong các chủng WT::*hom* (G378E) và CA01-2307::*hom* (G378E) đã được điều chế trong Ví dụ 3, bằng cách sử dụng phương pháp xung điện, và sau đó được ria trên môi trường lựa chọn chứa kanamycin (25 mg/L) để thu được các chủng đã biến nạp.

Các chủng được nuôi cấy theo cách tương tự như trong phương pháp nuôi cấy trong bình tam giác được thể hiện trong Ví dụ 2, và nồng độ L-isoleuxin trong môi trường nuôi cấy đã được phân tích (Bảng 7).

Bảng 7

Chủng	L-Isoleuxin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
WT:: <i>hom</i> (G378E)/pECCG117- <i>ilvA</i> (V323A)	0,102	0,072	0,062
CA01-2307:: <i>hom</i> (G378E)/pECCG117- <i>ilvA</i> (V323A)	0,876	0,900	0,918

Kết quả của phân tích nồng độ L-isoleuxin, được xác nhận rằng năng suất của L-isoleuxin đã tăng lên rất nhiều trong chủng chứa biến thể *lysC*.

Ví dụ 5: Điều chế chủng chứa *O*-axetylhomoserin được tăng cường và so sánh

năng suất của *O*-axetylhomoserin.

Để xác định hiệu quả việc đưa vào của biến thể *lysC* (L377K) đến sản xuất của *O*-axetylhomoserin, gen *metB* mã hóa cystathionin *gamma*-synthaza tham gia vào con đường thoái hóa *O*-axetylhomoserin, và gen *metY* mã hóa *O*-axetylhomoserin (thiol)-lyaza bị mất, và sau đó gen *metX* mã hóa homoserin *O*-acetyltransferaza là enzym sinh tổng hợp *O*-axetylhomoserin được biểu hiện quá mức, và do đó chủng sản sinh *O*-axetylhomoserin được điều chế. Trước tiên, để xóa gen *metB*, dựa trên thông tin trình tự nucleotit của gen, *metB* có nguồn gốc từ WT, cặp mồi (SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22) để khuếch đại vùng phía trước 5' của gen *metB* và cặp mồi (SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24) để khuếch đại vùng phía sau 3' được thiết kế.

Bảng 8

SEQ ID NO:	Mồi	Trình tự (5'-3')
21	Mồi 15	TCTAGATGCGCTGATTATCTCACC
22	Mồi 16	ACTGGTGGGTCATGGTTGCATATGAGATCAACTCCT GTAA
23	Mồi 17	TTACAGGAGTTGATCTCATATGCAACCATGACCCAC CAGT
24	Mồi 18	TCTAGACCTTGAAGTTCTTGACTG

PCR được thực hiện với cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24 sử dụng nhiễm sắc thể của WT làm mạch khuôn. Sau biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, PCR được thực hiện với tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện như sau: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây. Sau đó, phản ứng trùng hợp được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN (450 bp) của vùng phía trước 5' của gen *metB* và đoạn ADN (467 bp) của vùng phía sau 3' đã thu được.

PCR được thực hiện với cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 24 sử dụng hai đoạn ADN đã được khuếch đại ở trên làm mạch khuôn. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, PCR được thực hiện với tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện như sau: 95°C biến tính trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 3 phút. Sau đó, phản ứng trùng hợp được thực

hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, vùng trung tâm của gen *metB* bị mất, và do đó đoạn ADN (917 bp) chỉ chứa vùng phía trước và vùng phía sau được khuếch đại.

Vector pDZ và đoạn ADN (917 bp) được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI, và chúng được nối với nhau bằng cách sử dụng ADN ligaza và sau đó được nhân dòng để thu plasmit. Plasmit được đặt tên là pDZ- $\Delta metB$.

Vector pDZ- $\Delta metB$ được đưa vào mỗi chủng WT::*hom* (G378E) và CA01-2307::*hom* (G378E) đã được điều chế trong Ví dụ 3, bằng cách sử dụng phương pháp xung điện, sau đó các chủng biến nạp thu được trên môi trường chọn lọc chứa kanamycin (25 mg/L). WT::*hom* (G378E) $\Delta metB$ và CA01-2307::*hom* (G378E) $\Delta metB$, thu được các chủng trong đó gen *metB* bị mất do các đoạn ADN được chèn vào nhiễm sắc thể thông qua quá trình tái tổ hợp thứ cấp (quá trình lai ghép).

Để xóa gen *metY* tham gia vào con đường suy thoái khác của *O*-axetylhomoserin, dựa trên thông tin trình tự nucleotit của gen, *metY* có nguồn gốc từ WT, cặp môi (SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26) để khuếch đại vùng phía trước 5' của gen *metY* và cặp môi (SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28) để khuếch đại vùng phía sau 3' được thiết kế.

Bảng 9

SEQ ID NO:	Môi	Trình tự (5'-3')
25	Môi 19	TCTAGAAGTAGCGTTGCTGTACAC
26	Môi 20	ATCAATGGTCTCGATGCCCATATGGCATTGAGGT CCTTAAG
27	Môi 21	CTTAAGGACCTCCAAATGCCATATGGGCATCGAGA CCATTGAT
28	Môi 22	TCTAGATGGAACCGTTGCAACCAC

PCR được thực hiện với cặp môi có mã nhận biết SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28 sử dụng nhiễm sắc thể của WT làm mạch khuôn. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, PCR được thực hiện với tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện như sau: 95°C biến tính trong 30 giây, ủ để gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây. Sau đó, phản ứng trùng hợp được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN (512 bp) của vùng phía trước 5' của gen *metY* và đoạn ADN (520 bp) của vùng phía sau 3' đã thu được.

PCR được thực hiện với cặp mồi có mã nhận biết SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 28 sử dụng hai đoạn ADN đã được khuếch đại ở trên làm mạch khuôn. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, PCR được thực hiện với tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện như sau: 95°C biến tính trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 3 phút. Sau đó, phản ứng trùng hợp được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, vùng trung tâm của gen *metY* bị mất, và do đó đoạn ADN (1032 bp) chỉ chứa vùng phía trước và vùng phía sau được khuếch đại.

Vector pDZ và đoạn ADN (1032 bp) được xử lý bằng enzym giới hạn *XbaI*, và chúng được nối với nhau bằng cách sử dụng ADN ligaza và sau đó được nhân dòng để thu được plasmit. Plasmit được đặt tên là pDZ- $\Delta metY$.

Vector pDZ- $\Delta metY$ được đưa vào trong mỗi chủng WT::*hom* (G378E) $\Delta metB$ và CA01-2307::*hom* (G378E) $\Delta metB$ đã được điều chế ở trên bằng cách sử dụng phương pháp xung điện, và sau đó các chủng biến nạp được thu được trên môi trường chọn lọc chứa kanamycin (25 mg/L). WT::*hom* (G378E) $\Delta metB\Delta metY$ và CA01-2307::*hom* (G378E) $\Delta metB\Delta metY$, các chủng trong đó gen *metY* bị mất do các đoạn ADN được chèn vào trên nhiễm sắc thể thông qua quá trình tái tổ hợp thứ cấp (quá trình lai ghép) đã thu được.

Để tối đa hóa sản xuất *O*-axetylhomoserin, vector để tăng cường biểu hiện gen *metX* đã được điều chế. Để khuếch đại gen mã hóa homoserin *O*-axetyltransferaza (MetX), dựa trên các trình tự có nguồn gốc từ WT được báo cáo, vector được thiết kế bằng cách chèn vùng enzym BamHI giới hạn ở cả hai đầu của cặp mồi (SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30) để khuếch đại từ vùng gen khởi động (khoảng 300 bp vùng phía trước của đơn vị mã hóa khởi đầu) đến vùng xác định (khoảng 100 bp vùng phía sau của đơn vị mã hóa kết thúc).

Bảng 10

SEQ ID NO:	Mồi	Trình tự (5'-3')
29	Mồi 23	GGATCCCCTCGTTGTTACCCAGCAACC
30	Mồi 24	GGATCCCAAAGTCACAACCTACTTATGTTAG

PCR được thực hiện với cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26 sử dụng nhiễm sắc thể của WT làm mạch khuôn. Sau khi biến tính ở nhiệt độ

95°C trong 5 phút, PCR được thực hiện với tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện như sau: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây. Sau đó, phản ứng trùng hợp được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN (1546 bp) chứa gen *metX* đã thu được.

Vector pECCG117 (Patent Hàn Quốc có công bố số 10-0057684) và đoạn ADN của *metX* được xử lý bằng enzym giới hạn BamHI, và chúng được nối với nhau bằng cách sử dụng ADN ligaza và sau đó được nhân dòng để thu được plasmit. Plasmit được đặt tên là pECCG117-*metX*.

Vector pECCG117-*metX* được đưa vào trong các chủng WT::*hom* (G378E) Δ *metB* Δ *metY* và CA01-2307::*hom* (G378E) Δ *metB* Δ *metY* đã được điều chế ở trên bằng cách sử dụng phương pháp xung điện, sau đó được ria trên môi trường chọn lọc chứa kanamycin (25 mg/L) để thu được các chủng được biến nạp.

Để so sánh khả năng của các chủng được điều chế ở trên đối với việc sản sinh *O*-axetylhomoserin (sau đây gọi tắt là *O*-AH), các chủng được nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp dưới đây và nồng độ của *O*-axetylhomoserin trong môi trường nuôi cấy đã được phân tích.

Dùng que cấy bạch kim lấy một khuẩn lạc của chủng được cấy truyền vào trong bình tam giác (250 mL) chứa môi trường sản xuất *O*-AH (25 mL), và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 20 giờ trong khi lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Nồng độ của *O*-axetylhomoserin được phân tích bằng HPLC, và nồng độ được phân tích được thể hiện trong Bảng 11.

Môi trường sản xuất *O*-AH (độ pH 7,0)

Glucosa (100 g), (NH₄)₂SO₄ (40 g), protein đậu nành (2,5 g), bột ngô (5 g), ure (3 g), KH₂PO₄ (1 g), MgSO₄·7H₂O (0,5 g), biotin (100 µg), thiamin clorua (1.000 µg), canxi pantothenat (2.000 µg), nicotinamit (3.000 µg), CaCO₃ (30 g), L-methionin(0,3 g) (trong 1 L nước cất).

Bảng 11

Chủng	<i>O</i> -axetylhomoserin (g/L)		
	Mề 1	Mề 2	Mề 3

WT:: <i>hom</i> (G378E) Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> /pECCG117- <i>metX</i>	0,135	0,209	0,175
CA01-2307:: <i>hom</i> (G378E) Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> /pECCG117- <i>metX</i>	2,312	2,045	2,532

Như kết quả phân tích nồng độ của *O*-axetylhomoserin được thể hiện trong bảng trên, đã xác nhận rằng nồng độ của *O*-axetylhomoserin được sản xuất bởi biến thể *lysC* đã tăng lên.

Ví dụ 6: Điều chế chủng chứa *O*-suxinylhomoserin được tăng cường và so sánh năng suất của *O*-suxinylhomoserin.

Để xác định ảnh hưởng của việc đưa vào biến thể *lysC* (L377K) đến sản xuất của *O*-suxinylhomoserin, chủng sản sinh *O*-suxinylhomoserin đã được điều chế. Do *Corynebacterium glutamicum* kiểu dại không sản sinh tự nhiên *O*-suxinylhomoserin, chủng đã được biến đổi để có hoạt tính *O*-suxinyltransferaza (*MetX*) bằng cách thay thế axit amin ở vùng liên kết với cơ chất của *O*-axetyltransferaza đã được điều chế trong Ví dụ 5 để sản xuất *O*-suxinylhomoserin. Theo đó, dựa trên trình tự gen, *metX* có nguồn gốc từ WT, cặp môi (SEQ ID NO: 31 và SEQ ID NO: 32) đã thiết kế để điều chế vector để đưa vào biến thể *metX*.

Bảng 12

SEQ ID NO:	Môi	Trình tự (5'-3')
31	Môi 25	TCTAGAATGCCACCCCTCGCGCCTTC
32	Môi 26	TCTAGATTAGATGTAGAACTCGATG

PCR được thực hiện với cặp môi có mã nhận biết SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28 sử dụng nhiễm sắc thể của WT làm mạch khuôn. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, PCT được thực hiện với tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện như sau: biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn môi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây. Sau đó, phản ứng trùng hợp được thực hiện ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN (1146 bp) của vùng mã hóa của gen *metX* đã thu được.

Vector pDZ và đoạn ADN (1146 bp) được xử lý bằng enzym giới hạn *Xba*I, và chúng được nối với nhau bằng cách sử dụng ADN ligaza và sau đó được nhân dòng để thu được plasmid. Plasmid được đặt tên là pDZ-*metX*. Dựa trên vector pDZ-*metX* thu được, để tạo ra biến thể vector, trong đó axit amin ở vị trí 176 được thay thế bằng asparagin và

axit amin ở vị trí 313 được thay thế bằng arginin, cặp mỗi (SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 34), gây ra biến đổi lên axit amin ở vị trí 176, và cặp mỗi (SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36), gây ra biến đổi lên axit amin ở vị trí 313 đã được thiết kế.

Bảng 13

SEQ ID NO:	Mỗi	Trình tự (5'-3')
33	Mỗi 27	ACGCGCCAGCGCCTGGAACATCGGCATTCAATCCG
34	Mỗi 28	CGGATTGAATGCCGATGTTCCAGGCGCTGGCGCGT
35	Mỗi 29	TAGATACCGATATTCGGTACCCCTACCACCAG
36	Mỗi 30	CTGGTGGTAGGGGTACCGAATATCGGTATCTAC

Biến thể gen *metX* đã được điều chế bằng cách sử dụng kit gây đột biến trực tiếp (site-directed mutagenesis kit) (Stratagen, Mỹ) cùng với mỗi trong cặp mỗi ở trên. Plasmid biến nạp dựa trên plasmid pDZ-*metX* kiểu đại diện có được đặt tên là pDZ-*metX* (Q176N, L313R). Vector pDZ-*metX* (Q176N, L313R) đã được điều chế ở trên, được đưa vào trong các chủng WT::*hom* (G378E) Δ *metB* Δ *metY* và CA01-2307::*hom* (G378E) Δ *metB* Δ *metY* đã được điều chế trong Ví dụ 5 bằng cách sử dụng phương pháp xung điện, và sau đó các chủng biến nạp thu được trên môi trường chọn lọc chứa kanamycin (25mg/L). WT::*hom*(G378E)*metX*(Q176N, L313R) Δ *metB* Δ *metY* và CA01-2307::*hom*(G378E)*metX*(Q176N, L313R) Δ *metB* Δ *metY*, thu được các chủng trong đó gen *metX* được thay thế bằng *metX* (Q176N, L313R) bởi đoạn ADN được chèn vào nhiễm sắc thể qua quá trình tái tổ hợp thứ cấp (quá trình lai ghép).

Để tối đa hóa sản xuất của *O*-suxinylhomoserin, vector để tăng cường biểu hiện của biến thể gen *metX* (Q176N, L313R) đã được điều chế. Dựa trên pECCG117-*metX* được điều chế trong Ví dụ 5, vector biểu hiện quá mức biến thể *metX* đã được điều chế bằng cách sử dụng cặp mỗi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 33 đến SEQ ID NO: 36, trong đó biến thể axit amin ở vị trí 176 có hoạt tính *O*-suxinyltransferaza được thay thế bằng asparagin và axit amin ở vị trí 313 được thay thế bằng arginin. Cụ thể, vector được điều chế bằng cách sử dụng kit gây đột biến điểm trực tiếp (site-directed mutagenesis kit) (Stratagen, Mỹ) cùng với mỗi trong cặp mỗi ở trên, và vector được điều chế được đặt tên là pECCG117-*metX* (Q176N, L313R).

pECCG117-*metX*(Q176N, L313R) và vector trống pECCG117 được đưa vào trong

WT::*hom*(G378E)*metX* (Q176N, L313R) Δ *metB* Δ *metY* và CA01-2307::*hom*(G378E)*metX*(Q176N, L313R) Δ *metB* Δ *metY*, là các chủng đã được điều chế ở trên sản sinh *O*-suxinylhomoserin bằng cách sử dụng phương pháp xung điện, và được ria trên môi trường chọn lọc chứa kanamycin (25 mg/L) để thu được chủng biến nạp.

Để so sánh khả năng của chủng để sản sinh *O*-suxinylhomoserin, chủng được nuôi cấy bằng cách sử dụng các phương pháp dưới đây, và nồng độ của *O*-suxinylhomoserin trong môi trường nuôi cấy đã được phân tích.

Dùng que cấy bạch kim lấy một khuẩn lạc của chủng được cấy truyền vào trong bình tam giác (250 mL) chứa 25 mL của cùng thành phần môi trường sản xuất *O*-AH được sử dụng trong Ví dụ 5, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 20 giờ trong khi lắc ở tốc độ 200 vòng/phút. Nồng độ của *O*-suxinylhomoserin đã được phân tích bằng HPLC, và nồng độ được phân tích được thể hiện trong Bảng 14.

Bảng 14

Chủng	<i>O</i> -Suxinylhomoserin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
WT:: <i>hom</i> (G378E) <i>metX</i> (Q176N, L313R) Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> /pECCG117- <i>metX</i> (Q176N, L313R)	0,052	0,120	0,087
CA01-2307:: <i>hom</i> (G378E) Δ <i>metB</i> Δ <i>metY</i> /pECCG117- <i>metX</i> (Q176N, L313R)	1,529	1,632	1,874

Như kết quả phân tích nồng độ của *O*-suxinylhomoserin được thể hiện trong bảng trên, được xác nhận rằng việc sản xuất *O*-suxinylhomoserin được sản xuất bởi biến thể *lysC* đã tăng lên.

Những kết quả này cho thấy biến thể của sáng chế có thể tăng sản xuất axit amin dẫn xuất aspartat và/hoặc dẫn xuất của chúng.

Từ phần mô tả ở trên, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật liên quan đến sáng chế sẽ có thể hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện trong các hình thức cụ thể khác mà không thay đổi các khái niệm kỹ thuật hoặc các đặc điểm cần thiết của sáng chế. Các phương án ví dụ được bộc lộ ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngược lại, sáng chế nhằm mục đích không chỉ bao gồm các phương án ví dụ mà còn bao gồm các phương án khác nhau, biến đổi, tương đương và các phương án khác có thể được bao gồm trong nguyên lý và

phạm vi của sáng chế như được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể aspartokinaza có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có hoạt tính aspartokinaza, trong đó axit amin ở vị trí 337 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng L-lysin hoặc L-methionin.
2. Polynucleotit mã hóa biến thể theo điểm 1.
3. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng chứa biến thể aspartokinaza theo điểm 1, trong đó L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng được chọn từ nhóm gồm lysin, threonin, methionin, homoserin, *O*-axetylhomoserin, *O*-suxinylhomoserin, isoleuxin, và cadaverin.
4. Vi sinh vật theo điểm 3, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.
5. Phương pháp sản sinh L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng bao gồm:
 nuôi cấy vi sinh vật theo điểm 3 trong môi trường nuôi cấy; và
 thu hồi L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy, trong đó L-axit amin dẫn xuất aspartat hoặc dẫn xuất axit amin của chúng được chọn từ nhóm gồm lysin, threonin, methionin, homoserin, *O*-axetylhomoserin, *O*-suxinylhomoserin, isoleuxin, và cadaverin.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.
7. Phương pháp sản sinh L-methionin bao gồm:
 nuôi cấy vi sinh vật theo điểm 3 trong môi trường nuôi cấy;
 sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc *O*-suxinylhomoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy; và
 biến đổi *O*-axetylhomoserin hoặc *O*-suxinylhomoserin thành L-methionin.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> BIẾN THỂ ASPARTOKINAZA, POLYNUCLEOTIT, VI SINH VẬT CHỨA BIẾN THỂ
 VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN SINH L-AXIT AMIN
 <130> OPA18147
 <150> 10-2017-0083437
 <151> 2017-06-30
 <160> 36
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <400> 1
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
 20 25 30
 Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
 35 40 45
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
 50 55 60
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65 70 75 80
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
 85 90 95
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
 100 105 110
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 130 135 140
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205

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

<210> 2
 <211> 1266
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2
 gtggcccttg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60
 aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120
 tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180
 ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctgggtg agcgtatttc taacgctctc 240
 gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300
 ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg 360

```

gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtgttaat 420
aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtgggtggt ctgacaccac tgcagttgcg 480
ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat 540
accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatagca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600
atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttgggtgc tgcgcagtgt tgaatacgt 660
cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720
attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc 780
gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840
aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900
tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc 960
cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020
gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtgtt 1080
accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140
tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200
ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260
cgctaa 1266

```

```

<210> 3
<211> 421
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

```

```

<400> 3
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1          5          10          15

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
 20          25          30

Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
 35          40          45

Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
 50          55          60

Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65          70          75          80

Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
 85          90          95

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

Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly

```


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

<210> 4

<211> 1266
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 4
 gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60
 aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120
 tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180
 ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctggtg agcgtatttc taacgctctc 240
 gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcagggt 300
 ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg 360
 gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtgtaat 420
 aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtgggtggt ctgacaccac tgcagttgcg 480
 ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat 540
 accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatagca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600
 atgctggaac ttgctgctgt tggtccaag attttgggtg tgcgcagtgt tgaatacgtc 660
 cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720
 attgccgggt ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc 780
 gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840
 aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900
 tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcggtc cgacggccgc 960
 cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020
 gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccagggtgt 1080
 accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaaaa gatttccacc 1140
 tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgac tggatgctgc tgcacgtgca 1200
 ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcacccga 1260
 cgctaa 1266

<210> 5
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 5
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
 20 25 30

Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
 35 40 45
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
 50 55 60
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65 70 75 80
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
 85 90 95
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
 100 105 110
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 130 135 140
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 245 250 255
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Met Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380

Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415

Ala Gly Thr Gly Arg
 420

<210> 6
 <211> 1266
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6
 gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60
 aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120
 tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180
 ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctggtg agcgtatttc taacgctctc 240
 gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300
 ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg 360
 gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattggtg ctggtttcca ggggtgtaat 420
 aaagaaaccg gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtggtt ctgacaccac tgcagttgcg 480
 ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat 540
 accgctgacc cgcgcacgtg tcctaattgca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600
 atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttggtgc tgcgcagtgt tgaatacgtc 660
 cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720
 attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc 780
 gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840
 aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900
 tctttctgtg aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc 960
 cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaaa tgtgctttac 1020
 gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccagggtgtt 1080
 accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaaat gatttccacc 1140
 tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200

ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260
cgctaa 1266

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

<220>
<223> đoạn mỗi 1

<400> 7
tcctctagag ctgcgcagtg ttgaatacg 29

<210> 8
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 2

<400> 8
tggaatctt ttcgatgttc acgttgacat 30

<210> 9
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 3

<400> 9
acatcgaaaa gatttccacc tctgagattc 30

<210> 10
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 4

<400> 10
tggaatcat ttcgatgttc acgttgacat 30

<210> 11
<211> 30
<212> ADN

<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi 5	
<400>	11	
	acatcgaaat gatttccacc tctgagattc	30
<210>	12	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi 6	
<400>	12	
	gactctagag ttcacctcag agacgatta	29
<210>	13	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi 7	
<400>	13	
	tcctctagac tggtcgcctg atgttctac	29
<210>	14	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi 8	
<400>	14	
	gccaaaacct ccacgcgatc	20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi 9	
<400>	15	
	atcgcggtgga gggttttggt	20

<210> 16
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 10

<400> 16
 gactctagat tagtcccttt cgaggcgga 29

<210> 17
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 11

<400> 17
 acggatccca gactccaaag caaaagcg 28

<210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 12

<400> 18
 acaccacggc agaaccaggt gcaaaggaca 30

<210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 13

<400> 19
 ctggttctgc cgtgggtgtgc atcatctctg 30

<210> 20
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 14

<400> 20
acggatccaa ccaaacttgc tcacactc 28

<210> 21
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 15

<400> 21
tctagatgcg ctgattatct cacc 24

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

<220>
<223> đoạn mỗi 16

<400> 22
actggtgggt catggttgca tatgagatca actcctgtaa 40

<210> 23
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 17

<400> 23
ttacaggagt tgatctcata tgcaaccatg acccaccagt 40

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

<220>
<223> đoạn mỗi 18

<400> 24
tctagacctt gaagttcttg actg 24

<210> 25
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 19

<400> 25
 tctagaagta gcgttgctgt acac

24

<210> 26
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 20

<400> 26
 atcaatgggc tcgatgccca tatggcattt ggaggtcctt aag

43

<210> 27
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 21

<400> 27
 cttaaggacc tccaaatgcc atatgggcat cgagaccatt gat

43

<210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 22

<400> 28
 tctagatgga accgttgcaa ccac

24

<210> 29
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 23

<400> 29
 ggatcccctc gttgttcacc cagcaacc

28

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

<220>
 <223> đoạn mỗi 24

<400> 30
 ggatcccaaa gtcacaacta cttatggttag 30

<210> 31
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 25

<400> 31
 tctagaatgc ccaccctcgc gccttc 26

<210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 26

<400> 32
 tctagattag atgtagaact cgatg 25

<210> 33
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 27

<400> 33
 acgcgccagc gcctggaaca tcggcattca atccg 35

<210> 34
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 28

<400> 34
cggattgaat gccgatgttc caggcgctgg cgcgt

35

<210> 35
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 29

<400> 35
gtagataccg atattcggta cccctaccac cag

33

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

<220>
<223> đoạn mỗi 30

<400> 36
ctggtggtag ggtaccgaa tatcggtatc tac

33

Fig.1

