



(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)



1-0044312

(51)^{2020.01} C12N 15/77; C12P 13/08; C12N 9/10; (13) B
C12N 9/18; C07K 14/34; C12N 9/06

(21) 1-2021-05952

(22) 10/03/2020

(86) PCT/KR2020/003318 10/03/2020

(87) WO2020/218737 29/10/2020

(30) 10-2019- 0046935 22/04/2019 KR

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/03/2022 408A

(71) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) KWON, Su Yon (KR); BAEK, Mina (KR); SON, Seung-ju (KR); LEE, Kwang Woo (KR).

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

(54) VI SINH VẬT SẢN SINH L-THREONIN, CHẾ PHẨM ĐỀ SẢN XUẤT L-THREONIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-THREONIN

(21) 1-2021-05952

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật có khả năng tăng cường sản sinh L-threonin, chế phẩm để sản xuất L-threonin, và phương pháp sản xuất L-threonin sử dụng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật có khả năng tăng cường sản sinh L-threonin, chế phẩm để sản xuất L-threonin và phương pháp sản xuất threonin sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Threonin là axit amin thiết yếu, được sử dụng rộng rãi trong thức ăn chăn nuôi, phụ gia thực phẩm, và chất kích thích tăng trưởng động vật, và cũng được sử dụng trong các giải pháp bù nước cho mục đích y tế và vật liệu tổng hợp dùng trong dược phẩm. Liên quan đến phương pháp sản xuất threonin sử dụng vi sinh vật, các phương pháp để tăng cường các gen sinh tổng hợp threonin (ví dụ, *ppc*, *aspC*, và *thrABC*) và để ngăn chặn con đường thoái biến threonin được biết đến để tăng năng suất (Kwang-Ho Lee, et al., *Molecular System Biology* 2007). Các gen liên quan đến con đường thoái biến threonin bao gồm *tdh*, *tdcB*, *glyA*, *ilvA*, v.v., và trong số này, threonin deaminaza (*ilvA*) được biết đến là gen quan trọng nhất đối với sự thoái biến threonin. Việc xóa *ilvA* trong số các gen thoái biến giúp cải thiện đáng kể sản lượng threonin, nhưng có vấn đề là isoleuxin auxotroph có giá thành đắt; do đó, áp dụng làm giảm hoạt tính *ilvA* và đột biến nhạy cao đối với isoleuxin thường được biết đến (Akhverdian Valery Z. et al.).

Trong khi đó, đối với mối quan hệ giữa threonin và glyxin, tiền chất chính của serin hydroxymethyltransferaza, liên quan đến quá trình tổng hợp glyxin, là serin, và biết rằng hoạt tính enzym cao hơn 24 lần khi serin được sử dụng làm tiền chất so với khi threonin được sử dụng (Simic et al., *Appl Environ Microbiol.* 2002). Tuy nhiên, khả năng hấp thụ glyxin và khả năng sản sinh threonin vẫn chưa được biết đến.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đưa vào chất vận chuyển glyxin *cycA* có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes* để phát triển các vi sinh vật có thể tiếp cận được bằng cách đưa glyxin giải phóng ra khỏi tế bào, và kết quả là, họ đã phát triển chủng sản sinh L-threonin với năng suất cao.

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* để sản

sinh L-threonin có hoạt tính vận chuyển glyxin tăng cường.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm để sản xuất L-threonin chứa vi sinh vật theo sáng chế.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-threonin, phương pháp bao gồm nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Vi sinh vật để sản sinh L-threonin theo sáng chế có khả năng sản sinh threonin tối ưu và do đó có thể được áp dụng hiệu quả để sản xuất L-threonin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bên dưới. Trong khi đó, từng phần mô tả và phương án ví dụ được bộc lộ trong sáng chế cũng có thể được áp dụng cho từng phần mô tả và phương án khác. Có nghĩa là, tất cả sự kết hợp của các phần mô tả khác nhau được bộc lộ trong sáng chế đều thuộc phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phần mô tả chi tiết dưới đây có thể không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ngoài ra, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể nhận ra hoặc xác nhận, chỉ sử dụng thử nghiệm thông thường, nhiều điểm tương đương với các khía cạnh cụ thể của sáng chế được mô tả ở đây. Hơn nữa, những điểm tương đương này cũng được bao gồm trong sáng chế.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* để sản sinh L-threonin có hoạt tính vận chuyển glyxin tăng cường.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “chất vận chuyển glyxin” có thể bao gồm bất kỳ protein nào có khả năng đưa glyxin vào tế bào, và cụ thể là nó có thể là chất vận chuyển D-serin/D-alanin/glyxin. Chất vận chuyển glyxin có thể được sử dụng thay thế cho chất vận chuyển D-serin/D-alanin/glyxin hoặc protein để hấp thu glyxin.

“Chất vận chuyển D-serin/D-alanin/glyxin” là protein có thể tham gia vào quá trình vận chuyển toàn bộ serin, alanin, và glyxin, và thông tin về chúng có thể thu được bằng cách tìm kiếm trình tự chất vận chuyển D-serin/D-alanin/glyxin trong cơ sở dữ liệu đã biết như Ngân hàng gen của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI). Tốt hơn là, chất vận có thể là CycA hoặc AapA, và tốt hơn nữa là protein CycA, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở

đây.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “protein CycA” đề cập đến protein tham gia vào quá trình hấp thu serin, alanin, và glyxin. Protein CycA được mã hóa bởi gen *cycA*, và gen *cycA* được biết là tồn tại trong các vi sinh vật như *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium bovis*, *Salmonella enterica*, *Erwinia amylovora*, và *Corynebacterium ammoniagenes*.

Đối với mục đích của sáng chế, protein CycA theo sáng chế có thể bao gồm bất kỳ protein nào miễn là nó có thể tăng cường khả năng sản sinh threonin. Tốt hơn là, protein CycA có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, và tốt hơn nữa là có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. *Corynebacterium ammoniagenes* cùng loài với *Brevibacterium ammoniagenes*, và được phân loại trong cùng đơn vị phân loại với *Corynebacterium stationis* và *Brevibacterium stationis* (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60:874–879). Ngoài ra, *Brevibacterium ammoniagenes* đã được đổi tên thành *Corynebacterium stationis*.

Theo đó, như được sử dụng trong sáng chế, các thuật ngữ *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium stationis*, và *Brevibacterium stationis* có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Protein CycA theo sáng chế có thể bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 70% tương đồng hoặc đồng nhất với nó.

Cụ thể là, protein CycA có thể bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16. Ngoài ra, rõ ràng là bất kỳ trình tự axit amin nào, trong đó một phần của trình tự bị xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm vào cũng có thể thuộc phạm vi của sáng chế miễn là trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất và thể hiện hiệu quả tương ứng với hiệu quả của protein bên trên.

Ngoài ra, đầu dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ, bất kỳ polypeptit nào được mã hóa bởi polynucleotit có thể lai với trình tự bổ sung với toàn bộ hoặc một phần của trình tự nucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa polypeptit, có thể bao gồm các polypeptit có hoạt tính hấp thu serin, alanin, và glyxin.

Tức là, như được sử dụng trong sáng chế, mặc dù nó được mô tả là “protein hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin được mô tả bằng mã nhận biết cụ thể”, “protein hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin được mô tả bằng mã nhận biết cụ thể”, hoặc “protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin được mô tả bằng mã nhận biết cụ thể”, rõ ràng là bất kỳ protein nào có trình tự axit amin trong đó một phần của trình tự bị xóa, sửa đổi, thay thế, thay thế bảo thủ, hoặc thêm vào có thể được sử dụng trong sáng chế ngay cả khi nó có hoạt tính tương tự hoặc tương ứng với polypeptit có trình tự axit amin có mã nhận biết tương ứng. Ví dụ, nó có thể xảy ra trường hợp đầu N và/hoặc đầu C của trình tự axit amin được thêm vào với trình tự không làm thay đổi chức năng của protein, đột biến xảy ra tự nhiên, đột biến thế vị của chúng, đột biến câm, hoặc thay thế bảo thủ.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “thay thế bảo thủ” đề cập đến sự thay thế axit amin bằng axit amin khác có cấu trúc và/hoặc tính chất hóa học tương tự. Sự thay thế axit amin như vậy thường có thể xảy ra dựa trên sự giống nhau về độ phân cực, điện tích, tính hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước và/hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc. Ví dụ, các axit amin tích điện dương (có tính bazơ) bao gồm arginin, lysin, và histidin; các axit amin tích điện âm (có tính axit) bao gồm axit glutamic và axit aspartic; các axit amin thơm bao gồm phenylalanin, tryptophan, và tyrosin; và các axit amin kỵ nước bao gồm alanin, valin, isoleuxin, leuxin, methionin, phenylalanin, tyrosin, và tryptophan.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “polynucleotit” có nghĩa là bao gồm chung các phân tử ADN hoặc ARN. Các nucleotit là các đơn vị cấu trúc cơ bản của các polynucleotit, không chỉ bao gồm các nucleotit tự nhiên mà còn bao gồm các biến đổi tương tự của chúng trong đó các vị trí đường hoặc bazơ bị biến đổi (xem Scheit, *Nucleotit Analogs*, John Wiley, New York (1980); Uhlman và Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543–584 (1990)).

Polynucleotit có thể là polynucleotit mã hóa protein CycA của sáng chế, hoặc có thể là polynucleotit mã hóa polypeptit có ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng hoặc đồng nhất với protein CycA của sáng chế. Cụ thể là, ví dụ, polynucleotit mã hóa protein bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 70% tương đồng hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 16 có thể là polynucleotit bao gồm trình

tự axit amin có SEQ ID NO: 17 hoặc có ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự polynucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 17.

Ngoài ra, rõ ràng là do sự thoái biến của đơn vị mã hóa (codon), các protein bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16 hoặc có ít nhất 70% đồng nhất với SEQ ID NO: 16, hoặc cũng có thể bao gồm các polynucleotit có thể được dịch mã thành các protein có sự tương đồng hoặc đồng nhất với nó. Ngoài ra, polynucleotit của sáng chế có thể bao gồm đầu dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ, bất kỳ trình tự polynucleotit nào có thể lai với trình tự bổ sung với toàn bộ hoặc một phần của trình tự polynucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa các protein bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16 hoặc có ít nhất 70% đồng nhất, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. “Các điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện cho phép phép lai cụ thể giữa các polynucleotit. Các điều kiện được mô tả cụ thể trong tài liệu tham khảo (xem J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện mà các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất cao hơn hoặc bằng 70%, cao hơn hoặc bằng 80%, tốt hơn là cao hơn hoặc bằng 85%, tốt hơn nữa là cao hơn hoặc bằng 90%, còn tốt hơn nữa là cao hơn hoặc bằng 95%, tốt hơn nữa là cao hơn hoặc bằng 97%, và tốt nhất là cao hơn hoặc bằng 99% được lai với nhau, và các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn các sự tương đồng hoặc đồng nhất bên trên không được lai với nhau, hoặc các điều kiện rửa của phép lai Southern, tức là, rửa một lần, tốt hơn là hai hoặc ba lần với nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, tốt hơn là 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, và tốt hơn nữa là 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS.

Phép lai yêu cầu hai axit nucleic chứa các trình tự bổ sung, mặc dù sự không phù hợp giữa các bazơ có thể xảy ra phụ thuộc độ nghiêm ngặt của phép lai. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ nucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin được bổ sung với thymine, và xytosin được bổ sung với guanin. Do đó, polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm các đoạn nucleotit đã phân lập bổ sung với toàn bộ trình tự cũng như các trình tự polynucleotit về cơ bản giống nhau.

Cụ thể là, các polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai bao gồm bước lai tại giá trị T_m là 55°C trong các điều kiện đã mô tả bên trên. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là 60°C , 63°C , hoặc 65°C , nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây, và có thể được điều chỉnh phù hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật dựa trên mục đích của phép lai.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” đề cập đến mức độ liên quan giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit, và có thể được biểu thị bằng phần trăm. Các thuật ngữ tương đồng và đồng nhất có thể thường được sử dụng thay thế cho nhau. Trình tự tương đồng hoặc đồng nhất của các trình tự polynucleotit hoặc polypeptit bảo tồn có thể được xác định bằng các thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn và có thể được sử dụng hàm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình đã sử dụng. Về cơ bản, trình tự tương đồng hoặc đồng nhất thông thường có thể được lai trong các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc trung bình với toàn bộ hoặc ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% toàn bộ chiều dài của các trình tự. Các polynucleotit bao gồm các đơn vị mã hóa thoái biến thay vì các đơn vị mã hóa trong các polynucleotit lai cũng được xem xét.

Sự tương đồng hoặc đồng nhất của các trình tự polypeptit hoặc polynucleotit có thể được xác định bằng, ví dụ, thuật toán BLAST theo tài liệu (xem Karlin và Altschul, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5873 (1993)), hoặc FASTA của Pearson (xem *Methods Enzymol.*, 183, 63, 1990). Dựa trên thuật toán BLAST, chương trình được gọi là BLASTN hoặc BLASTX đã được phát triển (xem <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ngoài ra, bất kỳ các trình tự axit amin hoặc polynucleotit nào có sự tương đồng, giống, hoặc đồng nhất với nhau hay không có thể được xác định bằng cách so sánh các trình tự trong thử nghiệm phép lai Southern trong các điều kiện nghiêm ngặt như đã xác định, và các điều kiện lai thích hợp được xác định bởi những người hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và có thể được xác định bằng phương pháp được những người có hiểu biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật biết đến rộng rãi (ví dụ, J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*).

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “tăng cường hoạt tính của protein”

có nghĩa là hoạt tính được tăng cường so với hoạt tính nội sinh của vi sinh vật hoặc hoạt tính trước khi biến nạp. Tăng cường hoạt tính có thể bao gồm cả việc đưa vào protein ngoại lai và tăng cường hoạt tính của protein nội sinh. Tức là, nó bao gồm đưa protein ngoại lai vào vi sinh vật có hoạt tính nội sinh của protein đặc hiệu, và đưa protein vào vi sinh vật không có hoạt tính nội sinh. “Đưa protein vào” có nghĩa là hoạt tính của protein đặc hiệu được đưa vào vi sinh vật để hoạt tính của protein được biến đổi để biểu hiện. Nó cũng có thể được biểu hiện như tăng cường hoạt tính của protein tương ứng.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “nội sinh” đề cập đến trạng thái ban đầu của chủng bố mẹ trước biến nạp, khi các đặc điểm của vi sinh vật bị thay đổi do đột biến gen gây ra bởi các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo.

Theo sáng chế, tăng cường hoạt tính có thể được thực hiện bằng các phương pháp sau đây:

- 1) phương pháp để tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein;
- 2) phương pháp sửa đổi trình tự điều hòa biểu hiện để tăng biểu hiện polynucleotit;
- 3) phương pháp sửa đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể để tăng cường hoạt tính protein;

4) phương pháp đưa vào polynucleotit ngoại lai biểu hiện hoạt tính protein hoặc polynucleotit đã biến đổi trong đó các đơn vị mã hóa của polynucleotit trên đã được tối ưu hóa; và

5) phương pháp biến đổi để tăng cường hoạt tính bằng cách kết hợp các phương pháp bên trên, nhưng phương pháp không bị giới hạn ở đây.

Việc tăng số lượng bản sao của polynucleotit trong phương pháp 1) bên trên có thể được thực hiện ở dạng trong đó polynucleotit được liên kết chức năng với vectơ, hoặc bằng cách chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ, nhưng sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở đây. Cụ thể là, nó có thể được thực hiện bằng liên kết chức năng polynucleotit mã hóa protein của sáng chế với vectơ có thể sao chép và hoạt động không phân biệt tế bào chủ, và đưa nó vào tế bào chủ. Ngoài ra, nó có thể được thực hiện bằng phương pháp để tăng số lượng bản sao của polynucleotit trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ bằng cách liên kết chức năng polynucleotit với vectơ có thể chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ, và đưa nó vào tế bào chủ.

Tiếp theo, sửa đổi trình tự điều hòa biểu hiện sao cho sự biểu hiện của polynucleotit được tăng lên trong phương pháp 2) có thể được thực hiện bằng cách tạo ra biến đổi trong trình tự thông qua xóa, chèn, hoặc thay thế không bảo thủ hoặc bảo thủ trình tự axit nucleic, hoặc sự kết hợp của chúng để tăng cường hơn nữa hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế với trình tự axit nucleic có hoạt tính mạnh hơn, nhưng sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở đây. Ngoài ra, trình tự điều hòa biểu hiện có thể bao gồm promotor, trình tự điều khiển, trình tự mã hóa vị trí bám ribosom, trình tự kiểm soát kết thúc phiên mã và dịch mã, v.v., nhưng sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở đây.

Promotor dị hợp mạnh có thể được liên kết với vùng ngược dòng của đơn vị biểu hiện của polynucleotit thay vì promotor ban đầu. Các ví dụ của promotor mạnh bao gồm promotor CJ7 (patent Hàn Quốc số 0620092 và công bố đơn quốc tế số WO 2006/065095), promotor lysCP1 (công bố đơn quốc tế số WO 2009/096689), promotor EF-Tu, promotor groEL, promotor aceA hoặc aceB, v.v., nhưng promotor mạnh không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, sửa đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể trong phương pháp 3) có thể được thực hiện bằng cách tạo ra biến đổi trong trình tự điều hòa biểu hiện thông qua xóa, chèn, hoặc thay thế không bảo thủ hoặc bảo thủ trình tự axit nucleic, hoặc sự kết hợp của chúng để tăng cường hơn nữa hoạt tính của trình tự polynucleotit, hoặc bằng cách thay thế trình tự polynucleotit với trình tự polynucleotit biến đổi để có hoạt tính mạnh hơn, nhưng sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở đây.

Ngoài ra, việc đưa trình tự polynucleotit ngoại lai trong phương pháp 4) có thể được thực hiện bằng cách đưa vào tế bào chủ polynucleotit ngoại lai mã hóa protein biểu hiện hoạt tính giống hệt hoặc tương tự với protein bên trên, hoặc biến đổi polynucleotit trong đó các đơn vị mã hóa của polynucleotit ngoại lai đã được tối ưu hóa. Polynucleotit ngoại lai có thể được sử dụng mà không giới hạn nguồn gốc hoặc trình tự của nó miễn là nó biểu hiện hoạt tính giống hệt hoặc tương tự với hoạt tính của protein. Ngoài ra, polynucleotit ngoại lai có thể được đưa vào tế bào chủ sau khi tối ưu hóa các đơn vị mã hóa của nó để đạt được phiên mã và dịch mã tối ưu trong tế bào chủ. Việc đưa vào có thể được thực hiện bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật bằng cách lựa chọn phương pháp biến nạp phù hợp đã biết trong lĩnh vực này, và protein có thể được tạo ra khi các polynucleotit đưa vào được biểu hiện trong tế bào chủ, nhờ đó làm tăng hoạt tính của nó.

Cuối cùng, phương pháp biến đổi để tăng cường hoạt tính bằng cách kết hợp các phương pháp 1) đến phương pháp 4) trong phương pháp 5) có thể được thực hiện bằng cách áp dụng kết hợp ít nhất một trong các phương pháp sau: tăng số lượng bản sao của polynucleotit mã hóa protein; sửa đổi trình tự điều hòa biểu hiện sao cho sự biểu hiện của polynucleotit được tăng lên; sửa đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể; và biến đổi polynucleotit ngoại lai biểu hiện hoạt tính protein hoặc polynucleotit biến đổi tối ưu đơn vị mã hóa của chúng.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vector” đề cập đến cấu trúc ADN chứa trình tự polynucleotit mã hóa protein đích, được liên kết chức năng với trình tự điều hòa thích hợp sao cho protein đích có thể được biểu hiện trong vật chủ thích hợp. Trình tự điều hòa bao gồm promoter có khả năng khởi đầu quá trình phiên mã, bất kỳ trình tự điều khiển nào để kiểm soát quá trình phiên mã, trình tự mã hóa vị trí bám mARN ribosom thích hợp, và trình tự kiểm soát kết thúc phiên mã và dịch mã. Sau khi được biến nạp vào tế bào chủ thích hợp, vector có thể được sao chép hoặc hoạt động không phân biệt bộ gen vật chủ, và có thể được tích hợp vào chính bộ gen của vật chủ. Ví dụ, polynucleotit mã hóa protein đích trong nhiễm sắc thể có thể được thay thế bằng polynucleotit đã biến đổi thông qua vector để chèn vào nhiễm sắc thể. Việc đưa polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ nào phương pháp được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vector được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có thể được sao chép trong tế bào chủ, và bất kỳ vector nào được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Các ví dụ của các vector thường được sử dụng có thể bao gồm các plasmit, cosmit, virus, và thực khuẩn tự nhiên hoặc tái tổ hợp. Ví dụ, như vector phage hoặc vector cosmit, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, v.v. có thể được sử dụng, và như vector plasmit gốc pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET, v.v. có thể được sử dụng. Cụ thể là, các vector pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, v.v. có thể được sử dụng.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến quá trình đưa vector bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit đích vào tế bào chủ, do đó cho phép sự

biểu hiện của polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit trong tế bào chủ. Miễn là polynucleotit được biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ, không quan trọng là nó được đưa vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và nằm ở đó hoặc nằm ngoài nhiễm sắc thể, và có thể bao gồm cả hai trường hợp. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa polypeptit đích. Polynucleotit có thể được đưa vào dưới bất kỳ hình thức nào miễn là nó có thể được đưa vào tế bào chủ và được biểu hiện trong tế bào chủ. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ dưới dạng catxet biểu hiện, là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết để chúng tự biểu hiện. Catxet biểu hiện có thể thường bao gồm promotor được liên kết chức năng với polynucleotit, vùng gen kết thúc, vị trí bám ribosom, và đơn vị mã hóa kết thúc. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện có khả năng tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ như nó vốn có và được liên kết chức năng với trình tự cần thiết cho sự biểu hiện của nó trong tế bào chủ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, như được sử dụng bên trên, thuật ngữ “liên kết chức năng” đề cập đến kết chức năng giữa trình tự gen bên trên và trình tự promotor khởi đầu và làm trung gian cho quá trình phiên mã của polynucleotit mã hóa protein đích của sáng chế.

Phương pháp biến nạp vector của sáng chế bao gồm bất kỳ phương pháp nào đưa axit nucleic vào tế bào, và có thể được thực hiện bằng cách lựa chọn kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy thuộc vào tế bào chủ. Ví dụ, biến nạp có thể được thực hiện thông qua điện biến nạp, kết tủa canxi phosphat (CaPO_4), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), vi tiêm, kỹ thuật polyetylen glycol (PEG), kỹ thuật DEAE-dextran, kỹ thuật liposom cation, kỹ thuật lithi axetat-DMSO, v.v., nhưng các phương pháp không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh L-threonin” bao gồm tất cả các vi sinh vật hoang dại, hoặc các vi sinh vật biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo, và nó có thể đề cập đến vi sinh vật có khả năng sản sinh L-threonin, hoặc vi sinh vật mà khả năng sản sinh L-threonin được truyền cho chúng bố mẹ không có khả năng sản sinh L-threonin. Ngoài ra, nó có thể là vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể bị suy yếu hoặc tăng cường do sự chèn gen ngoại lai, hoặc tăng cường hoặc bất hoạt hoạt tính của gen nội sinh, và nó có thể là vi sinh vật trong đó xảy ra đột biến gen hoặc hoạt tính được tăng cường để sản sinh L-threonin mong muốn.

Ví dụ, vi sinh vật để sản sinh L-threonin có thể là vi sinh vật có hoạt tính vận chuyển glyxin tăng cường. Ngoài ra, nó có thể là vi sinh vật trong đó giải mã cảm của enzym trên con đường sinh tổng hợp threonin bị ức chế, hoặc có thể là vi sinh vật sản sinh threonin bằng cách tăng cường hoặc ức chế enzym liên quan đến con đường sinh tổng hợp threonin. Ngoài ra, nó có thể là vi sinh vật sản sinh threonin bằng cách bất hoạt hoạt tính enzym hoặc protein không ảnh hưởng đến sinh tổng hợp threonin, do đó tạo điều kiện cho sự chuyển hóa con đường sinh tổng hợp threonin. Ngoài ra, nó có thể là vi sinh vật trong đó hoạt tính của chất trung gian, đồng yếu tố, hoặc protein hoặc enzym trên con đường tiêu thụ nguồn năng lượng trên con đường sinh tổng hợp threonin bị bất hoạt.

Cụ thể hơn là, nó có thể là vi sinh vật trong đó giải mã cảm trên con đường sinh tổng hợp threonin bị ức chế bằng cách biến đổi các polypeptit của lysC (aspartat kinaza) và hom (homoserin dehydrogenaza), biểu hiện protein liên quan đến việc tăng sản sinh threonin được tăng cường, hoặc enzym liên quan đến con đường thoái biến threonin bị bất hoạt.

Tuy nhiên, đây chỉ là ví dụ, và vi sinh vật không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, nó có thể là vi sinh vật tăng cường sự biểu hiện của các gen mã hóa các enzym của các con đường sinh tổng hợp L-threonin khác nhau đã biết hoặc bất hoạt các enzym trên các con đường thoái biến. Vi sinh vật để sản sinh L-threonin có thể được sản xuất bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “bất hoạt hoạt tính protein” có nghĩa là chủng hoang dại tự nhiên, chủng bố mẹ, hoặc protein tương ứng không có biểu hiện của enzym hoặc protein, hoặc không có hoạt tính hoặc bị giảm hoạt tính mặc dù được biểu hiện, so với chủng không biến đổi. Cụ thể là, sự giảm là một khái niệm toàn diện bao gồm trường hợp bản thân hoạt tính protein bị giảm so với hoạt tính protein ban đầu của vi sinh vật do đột biến gen mã hóa protein, sửa đổi trình tự điều hòa biểu hiện, hoặc xóa một phần hoặc toàn bộ gen, v.v.; trường hợp mức độ hoạt tính tổng thể của protein nội bào bị giảm so với chủng tự nhiên hoặc chủng trước khi biến đổi do sự ức chế biểu hiện của gen mã hóa protein hoặc sự ức chế dịch mã; và sự kết hợp của chúng. Theo sáng chế, bất hoạt có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã được biết đến rộng rãi trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ của các phương pháp có

thể bao gồm 1) phương pháp xóa một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa protein; 2) phương pháp sửa đổi trình tự điều hòa biểu hiện sao cho sự biểu hiện của gen bị giảm; 3) phương pháp sửa đổi trình tự gen mã hóa protein sao cho hoạt tính protein bị loại bỏ hoặc làm suy yếu; 4) phương pháp đưa antisense oligonucleotit (ví dụ, antisense ARN) liên kết bổ sung với bản sao của gen mã hóa protein; 5) phương pháp thêm trình tự bổ sung vào phía trước (upstream) trình tự Shine–Dalgarno với trình tự Shine–Dalgarno của gen mã hóa protein để tạo thành cấu trúc thứ cấp, do đó ức chế sự gắn vào ribosom; và 6) phương pháp phiên mã ngược (RTE) để thêm promotor đầu 3' của khung đọc mở (ORF) của trình tự polynucleotit của gen mã hóa protein để được phiên mã ngược; và sự kết hợp của chúng, nhưng sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở đây.

Đối với mục đích của sáng chế, vi sinh vật theo sáng chế có thể là bất kỳ vi sinh vật nào miễn là nó mang chất vận chuyển glyxin và có khả năng sản sinh L-threonin.

Theo sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật có khả năng sản sinh L-threonin” có thể được sử dụng thay thế cho “vi sinh vật sản sinh L-threonin”, “vi sinh vật có khả năng sản sinh L-threonin”, và “vi sinh vật để sản sinh L-threonin”.

Vi sinh vật sản sinh threonin theo sáng chế có thể là vi sinh vật trong đó hoạt tính protein phân cắt glyxin được tăng cường hơn nữa. “Vi sinh vật sản sinh threonin” và “tăng cường hoạt tính của protein” giống như mô tả bên trên.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “protein phân cắt glyxin” là protein liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến con đường phân cắt glyxin, và có thể được sử dụng để chỉ từng protein bao gồm hệ thống phân cắt glyxin (GCV) hoặc phức hợp của protein hoặc chính hệ thống phân cắt glyxin.

Cụ thể là, protein phân cắt glyxin có thể là bất kỳ một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm T-protein (GcvT), P-protein (GcvP), L-protein (GcvL), hoặc H-protein (GcvH) tạo thành hệ thống phân cắt glyxin, và LipB hoặc LipA, là các coenzym của hệ thống phân cắt glyxin, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây (John E. Cronan, Microbiology và Molecular Biology Reviews., ngày 13 tháng 4 năm 2016). Protein phân cắt glyxin có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, cụ thể là *Corynebacterium ammoniagenes*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. GcvP có thể bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 38, GcvT có thể bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 39, GcvH có thể bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 40, LipA

có thể bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 41, và LipB có thể bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 42 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 70% tương đồng với trình tự axit amin tương ứng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Cụ thể là, protein GcvP có thể bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 38, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 38. Phần mô tả sự tương đồng hoặc đồng nhất là tương tự đối với GcvT, GcvH, LipA, và LipB. Ngoài ra, rõ ràng là bất kỳ nào protein có trình tự axit amin trong đó một phần của trình tự axit amin bị xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm vào cũng có thể thuộc phạm vi của sáng chế miễn là axit amin có tương đồng hoặc đồng nhất và biểu hiện hiệu quả tương ứng với protein bên trên.

Ngoài ra, đầu dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ, bất kỳ nào polypeptit có hoạt tính thoái biến glyxin dưới dạng polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có thể lai với trình tự bổ sung với toàn bộ hoặc một phần của trình tự nucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa polypeptit, có thể được bao gồm mà không bị giới hạn ở đây.

Sự tương đồng hoặc đồng nhất như được mô tả bên trên.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* để sản sinh L-threonin” là vi sinh vật sản sinh L-threonin và có thể có nghĩa là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*. Vi sinh vật sản sinh L-threonin được mô tả giống như bên trên. Cụ thể là, theo sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh L-threonin có thể có nghĩa là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong đó hoạt tính chất vận chuyển glyxin theo sáng chế được tăng cường, hoặc đã được biến nạp với vector chứa gen mã hóa chất vận chuyển glyxin để cải thiện khả năng sản sinh L-threonin. Ngoài ra, nó có thể có nghĩa là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong đó hoạt tính protein phân cắt glyxin được tăng cường hơn nữa, hoặc đã được biến nạp với vector chứa gen mã hóa protein phân cắt glyxin để cải thiện khả năng sản sinh L-threonin. “Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có cải thiện khả năng sản sinh L-threonin” có thể có nghĩa là vi sinh vật trong đó khả năng sản sinh L-threonin được cải thiện so với chủng bố mẹ trước khi biến nạp hoặc vi sinh vật không biến đổi. “Vi sinh vật không biến đổi” có thể đề cập đến chủng tự nhiên của chính chi

Corynebacterium, vi sinh vật không chứa gen mã hóa chất vận chuyển glyxin, hoặc vi sinh vật không được biến nạp với vectơ chứa gen mã hóa chất vận chuyển glyxin.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*” có thể bao gồm toàn bộ các vi sinh vật của chi *Corynebacterium*. Tốt hơn là, nó có thể là *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium crudilactis*, *Corynebacterium deserti*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium stationis*, *Corynebacterium singulare*, *Corynebacterium halotolerans*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium pollutisoli*, *Corynebacterium imitans*, *Corynebacterium testudinoris*, hoặc *Corynebacterium flavescens*, và tốt hơn nữa là *Corynebacterium glutamicum*.

Khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm sản sinh L-threonin, chế phẩm chứa vi sinh vật sản sinh L-threonin theo sáng chế.

Chế phẩm sản sinh L-threonin có thể đề cập đến chế phẩm có khả năng sản sinh L-threonin bởi vi sinh vật sản sinh L-threonin theo sáng chế. Chế phẩm có thể chứa vi sinh vật sản sinh L-threonin, và có thể bao gồm thành phần bổ sung có khả năng sản sinh threonin sử dụng chủng mà không bị giới hạn ở đây. Thành phần bổ sung có khả năng sản sinh threonin có thể còn bao gồm, ví dụ, bất kỳ tá dược thích hợp nào thường được sử dụng trong chế phẩm để lên men, hoặc thành phần của môi trường. Các tá dược có thể là, ví dụ, các chất bảo quản, chất làm ướt, chất phân tán, chất tạo huyền phù, chất đệm, chất ổn định, hoặc chất đẳng trương, nhưng các chất không bị giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-threonin, phương pháp bao gồm nuôi cấy vi sinh vật.

Môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế có thể là bất kỳ nào môi trường được sử dụng để nuôi cấy các vi sinh vật thông thường mà không có bất kỳ giới hạn cụ thể nào. Cụ thể là, vi sinh vật theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong các điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí trong môi trường thông thường chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, hợp chất vô cơ, axit amin, và/hoặc vitamin, trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH, v.v.

Nguồn cacbon có thể bao gồm các carbohydrat, như glucoza, fructoza, sucroza, maltoza, v.v.; các rượu, như các rượu đường, glyxerol, v.v.; các axit béo, như axit palmitic, axit stearic, axit linoleic, v.v.; các axit hữu cơ, như axit pyruvic, axit lactic,

axit axetic, axit xitric, v.v.; các axit amin, như axit glutamic, methionin, lysin, v.v., nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, nguồn cacbon có thể bao gồm các chất dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên như dịch thủy phân tinh bột, rỉ đường, rỉ đường đen, cám gạo, bột sắn, mật mía, rượu ngô, v.v., và các carbohydrat như rỉ đường đã qua tiền xử lý khử trùng (tức là, rỉ đường chuyển thành đường khử) có thể được sử dụng. Ngoài ra, có thể sử dụng nhiều nguồn cacbon khác với lượng thích hợp mà không bị giới hạn. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp hai hoặc nhiều loại, nhưng không bị giới hạn ở đây.

Nguồn nitơ có thể bao gồm các nguồn nitơ vô cơ, như amoniac, amoni sulfat, amoni clorua, amoni axetat, amoni phosphat, amoni cacbonat, amoni nitrat, v.v.; các axit amin, như axit glutamic, methionin, glutamin, v.v.; và các nguồn nitơ hữu cơ như pepton, NZ-amin, nước thịt, chiết xuất nấm men, chiết xuất mạch nha, rượu ngô, dung dịch thủy phân casein, cá hoặc các sản phẩm phân giải của chúng, bánh đậu xanh đã hủy chất béo hoặc các sản phẩm phân giải của chúng, v.v.. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp hai hoặc nhiều loại, nhưng không bị giới hạn ở đây.

Nguồn phospho có thể bao gồm monokali phosphat, đikali phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng, v.v. Các ví dụ của hợp chất vô cơ có thể bao gồm natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sulfat, sắt sulfat, mangan sulfat, canxi cacbonat, v.v..

Ngoài ra, có thể bao gồm các axit amin, vitamin, và/hoặc các tiền chất thích hợp. Các môi trường hoặc tiền chất này có thể được bổ sung vào môi trường theo cách nuôi cấy theo mẻ hoặc liên tục, nhưng các nguồn phospho không bị giới hạn ở đây.

Theo sáng chế, độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh trong quá trình nuôi cấy của vi sinh vật bằng cách bổ sung hợp chất như amoni kali hydroxit, kali kali hydroxit, ammonia, axit phosphoric, axit sulfuric, v.v. vào môi trường nuôi cấy theo cách thích hợp. Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy, chất chống tạo bọt như axit béo polyglycol este có thể được bổ sung vào để ngăn quá trình tạo bọt. Ngoài ra, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào môi trường để duy trì trạng thái hiếu khí của môi trường; hoặc khí nitơ, hydro, hoặc cacbon đioxit có thể được bơm vào mà không cần bơm khí để duy trì trạng thái kỵ khí hoặc vi hiếu khí của môi trường.

Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy có thể nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C, và cụ thể hơn là từ 28°C đến 37°C, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Quá trình nuôi

cây có thể được tiếp tục cho đến khi thu được các vật liệu hữu ích với hàm lượng mong muốn, và cụ thể là trong 10 đến 100 giờ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Phương pháp sản xuất L-threonin có thể bao gồm bước thu hồi L-threonin từ ít nhất một vật liệu được chọn từ vi sinh vật, môi trường, môi trường nuôi cấy của chúng, phần nổi phía trên của môi trường nuôi cấy, dịch chiết của môi trường nuôi cấy, và dịch phân giải của vi sinh vật sau bước nuôi cấy.

Trong bước thu hồi, L-threonin là nguyên liệu đích có thể được thu hồi từ dung dịch nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo phương pháp nuôi cấy, ví dụ, theo phương pháp nuôi cấy theo mẻ, liên tục, hoặc nuôi cấy theo mẻ có cung cấp dinh dưỡng. Ví dụ, để thu hồi L-threonin có thể sử dụng các phương pháp như kết tủa, ly tâm, lọc, sắc ký và kết tinh. Ví dụ, phần nổi phía trên thu được bằng cách loại bỏ sinh khối bằng cách ly tâm môi trường nuôi cấy ở tốc độ thấp có thể được tách ra thông qua sắc ký trao đổi ion, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Bước thu hồi có thể bao gồm quá trình lọc.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có hoạt tính vận chuyển glyxin được tăng cường để sản sinh L-threonin.

“Chất vận chuyển glyxin”, “tăng cường hoạt tính”, hoặc “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*” được mô tả bên trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ và ví dụ thử nghiệm. Tuy nhiên, các ví dụ và ví dụ thử nghiệm này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ và ví dụ thử nghiệm này.

Ví dụ 1: Điều chế chủng sản sinh L-threonin bằng cách sử dụng vi sinh vật hoang dại thuộc chi *Corynebacterium*

Ví dụ 1-1: Điều chế chủng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh L-threonin

Các chủng sản sinh L-threonin được phát triển từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 hoang dại. Cụ thể là, để giải quyết sự ức chế giải mẫn cảm bởi aspartat

kinaza (lysC), đóng vai trò như enzym quan trọng được hoạt động đầu tiên trong con đường sinh tổng hợp threonin, chủng đã được điều chế trong đó leuxin, là axit amin ở vị trí 377 của lysC, được thay thế với lysin (SEQ ID NO: 1). Dựa trên chủng, chủng sản sinh threonin đã được điều chế bằng cách thay thế arginin, là axit amin ở vị trí 398 của hom, bằng glutamin để giải quyết sự ức chế giải mã cảm homoserin dehydrogenaza (hom) (SEQ ID NO: 6), điều này rất quan trọng trong con đường sinh tổng hợp threonin.

Ví dụ 1-1-1: Đưa vào đột biến lysC

Cụ thể là, để điều chế các chủng trong đó đột biến lysC (L377K) được đưa vào, PCR được thực hiện dựa trên nhiễm sắc thể của ATCC13032 làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5. ADN polymeraza có độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. Các điều kiện PCR như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 1 phút. Kết quả là thu được từng đoạn ADN (515 bp) ở vùng phía trước (upstream region) 5' và đoạn ADN (538 bp) ở vùng phía sau (downstream region) 3' xung quanh đột biến của gen lysC. PCR được thực hiện với hai đoạn ADN được khuếch đại làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 5. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 2 phút; và polyme hóa ở 72°C trong 5 phút. Kết quả là, đoạn ADN (1023 bp) bao gồm đột biến gen lysC, mã hóa biến thể aspartokinaza trong đó leuxin ở vị trí 377 được thay thế bằng lysin, đã được khuếch đại. Sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng như đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, sau khi xử lý bằng enzym giới hạn SmaI, tỷ lệ giữa nồng độ mol (M) của pDZ vector (patent Hàn Quốc số 10-0924065) được xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút với đoạn ADN chèn được khuếch đại bởi PCR bên trên được thiết đặt là 1:2, và vector được tách dòng bằng cách sử dụng bộ Kit Infusion Cloning (TaKaRa) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và do đó điều chế được vector pDZ-L377K để đưa đột biến lysC(L377K) vào nhiễm sắc thể.

Vector pDZ-L377K đã được điều chế được biến nạp vào ATCC13032 bằng điện biến nạp và thực hiện trao đổi chéo thứ cấp, và do đó thu được chủng trong đó từng biến đổi nucleotit được thay thế bằng các nucleotit đã được biến đổi. Chủng được đặt tên là

CJP1.

Ví dụ 1-1-2: Đưa vào đột biến hom

Để điều chế các chủng trong đó đột biến hom(R398Q) được đưa vào dựa trên chủng CJP1, PCR được thực hiện dựa trên nhiễm sắc thể của ATCC13032 làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10. ADN polymeraza có độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. Các điều kiện PCR như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 1 phút. Kết quả là, thu được từng đoạn ADN (668 bp) ở vùng phía trước 5' và đoạn ADN (659 bp) ở vùng phía sau 3' xung quanh đột biến của gen hom. PCR được thực hiện với hai đoạn ADN được khuếch đại làm mạch khuôn và cặp mồi SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 10. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 2 phút; và polyme hóa ở 72°C trong 5 phút. Kết quả là, đoạn ADN (1327 bp) bao gồm đột biến của gen hom, mã hóa biến thể homoserin dehydrogenaza trong đó arginin ở vị trí 398 được thay thế bằng glutamin, đã được khuếch đại. Sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng như đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, sau khi xử lý bằng enzym giới hạn SmaI, tỷ lệ giữa nồng độ mol (M) của pDZ vector được xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút so với đoạn ADN chèn được khuếch đại bởi PCR bên trên được thiết đặt là 1:2, và vector được tách dòng bằng cách sử dụng bộ Kit Infusion Cloning (TaKaRa) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và do đó đã điều chế được vector pDZ-R398Q để đưa đột biến hom (R398Q) vào nhiễm sắc thể.

Vector pDZ-R398Q đã được điều chế được biến nạp vào *Corynebacterium glutamicum* CJP1 bằng điện biến nạp và thực hiện trao đổi chéo thứ cấp, và do đó đã thu được chủng trong đó từng biến đổi nucleotit được thay thế bằng các nucleotit biến đổi. Chủng được đặt tên là CJP1-R398Q và được ký gửi ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM), Cơ quan đăng ký Quốc tế, theo Hiệp ước Budapest, và đăng ký số KCCM12120P (patent Hàn Quốc số 10-1947959).

Ví dụ 1-2: Điều chế Chủng sản sinh L-threonin được đưa vào gen vận chuyển D-

Alanin/D-Serin/glyxin

Thử nghiệm được thực hiện để chèn gen vận chuyển D-alanin/D-serin/glyxin vào vi sinh vật được điều chế trong ví dụ 1-1 trên nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum*.

Ví dụ 1-2-1: Điều chế chủng được đưa vào chất vận chuyển glyxin có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes* (CycA(Cam))

Để chèn gen *cycA* mã hóa chất vận chuyển glyxin protein, gen Ncgl2131 mã hóa transposon được sử dụng làm vị trí chèn (patent Hàn Quốc số 10-1126041; phương pháp được bộc lộ trên Journal of Biotechnology 104, 5-25 Jorn Kalinowski et al., 2003 đã được sử dụng) (SEQ ID NO: 11). Để điều chế vectơ để chèn transposon, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 13 hoặc SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15 dựa trên nhiễm sắc thể của ATCC13032 làm mạch khuôn. ADN polymeraza có độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. Các điều kiện PCR như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 2 phút; và polyme hóa ở 72°C trong 5 phút. Kết quả là, đã thu được từng đoạn ADN (2041 bp) ở vùng phía trước 5' và đoạn ADN (2040 bp) ở vùng phía sau 3' từ gen Ncgl2131. PCR được thực hiện với hai đoạn ADN được khuếch đại làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 15. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 4 phút; và polyme hóa ở 72°C trong 5 phút. Kết quả là, đoạn ADN (4066 bp) bao gồm các vị trí nhận biết của hai enzym giới hạn SpeI và XhoI, đã được khuếch đại xung quanh trung tâm. Sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vectơ. Trong khi đó, sau khi xử lý bằng enzym giới hạn SmaI, tỷ lệ giữa nồng độ mol (M) của vectơ pDZ được xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút so với đoạn ADN chèn được khuếch đại bởi PCR bên trên được thiết đặt là 1:2, và vectơ được tách dòng bằng cách sử dụng bộ Kit Infusion Cloning (TaKaRa) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và do đó đã điều chế được vectơ pDZ-N2131 để chèn vào vị trí gen Ncgl2131.

Vectơ pDZ-N2131 đã được điều chế được biến nạp vào chủng KCCM12120P thu được trong ví dụ 1-1 bên trên bằng điện biến nạp và thực hiện trao đổi chéo thứ cấp, và

do đó thu được chủng trong đó Ncgl2131 đã bị xóa trên nhiễm sắc thể. Chủng được đặt tên là KCCM12120P-N2131.

Trong khi đó, để thu được đoạn gen có hoạt tính vận chuyển D-alanin/D-serin/glyxin, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19 dựa trên nhiễm sắc thể của *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872 làm mạch khuôn. ADN polymeraza có độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. Các điều kiện PCR như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 90 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 5 phút. Kết quả là, thu được đoạn gen *cycA* (1595 bp), và sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector (SEQ ID NO: 17).

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng p117-cj7-gfp bao gồm promotor *cj7* có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* đã biết (patent Hàn Quốc số 10-0620092) làm mạch khuôn. Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “p117” đại diện cho pECCG117, là vector con thoi của vi khuẩn *E. coli*–*Corynebacterium* (Biotechnology Letters 13(10):721–726, 1991). ADN polymeraza có độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR, và PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22. Các điều kiện PCR như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 3 phút. Sản phẩm khuếch đại PCR được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) để thu được đoạn *cj7* (350 bp) (SEQ ID NO: 20).

PCR chồng lắp được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn *cj7* và đoạn *cycA* được điều chế bên trên làm mạch khuôn và sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 19. PCR được thực hiện như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 2 phút; và polyme hóa ở 72°C trong 5 phút. Kết quả là, thu được đoạn gen *cj7-cycA* (1945 bp), và sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, sau khi xử lý vector pDZ-N2131 đã được điều chế bằng enzym giới hạn *xhoI*, tiếp tục xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút,

tỷ lệ giữa nồng độ mol (M) của vector so với đoạn cj7-cycA thu được bên trên được thiết đặt là 1:2, và vector được tách dòng bằng cách sử dụng bộ Kit Infusion Cloning (TaKaRa) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và do đó đã điều chế được vector pDZ-N2131/cj7-cycA(Cam) để chèn gen cycA vào vị trí gen Ncgl2131.

Vector pDZ-N2131/cj7-cycA(Cam) đã được điều chế được biến nạp vào chủng KCCM12120P bằng cách sử dụng điện biến nạp và thực hiện trao đổi chéo thứ cấp, và do đó thu được chủng trong đó Ncgl2131 được thay thế bằng cj7-cycA(Cam) trên nhiễm sắc thể. Chủng được đặt tên là KCCM12120P/cycA(Cam).

Ví dụ 1-2-2: Điều chế chủng được đưa vào chất vận chuyển glyxin (CycA(Eco)) có nguồn gốc từ *E. coli*

Trong khi đó, để so sánh gen cycA có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes* và hoạt tính của chúng, gen cycA đã biết có nguồn gốc từ *E. coli* K-12 được đưa vào chủng KCCM12120P theo cách tương tự như bên trên (Microbiology, 141(Pt 1); 133–40, 1995). Cụ thể là, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26 dựa trên nhiễm sắc thể của *E. coli* K-12 W3110 làm mạch khuôn. ADN polymeraza có độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. Các điều kiện PCR như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 1 phút; và polyme hóa ở 72°C trong 5 phút. Kết quả là, đã thu được đoạn gen cycA (1544 bp), và sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector (SEQ ID NO: 23).

PCR chồng lắp được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn cj7 và đoạn cycA được điều chế bên trên làm mạch khuôn và sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 26. PCR được thực hiện như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 90 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 5 phút. Kết quả là, đã thu được đoạn gen cj7-cycA (1894 bp), và sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, sau khi xử lý vector pDZ-N2131 đã được điều chế bằng enzym giới hạn xhoI, tiếp tục xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút, tỷ lệ giữa nồng độ mol (M) của vector so với đoạn cj7-cycA thu được bên trên được thiết

đặt là 1:2, và vector được tách dòng bằng cách sử dụng bộ Kit Infusion Cloning (TaKaRa) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và do đó đã điều chế được vector pDZ-N2131/cj7-cycA(Eco) để chèn gen cycA vào vị trí gen Ncgl2131.

Vector pDZ-N2131/cj7-cycA(Eco) đã được điều chế được biến nạp vào chủng KCCM12120P bằng cách sử dụng điện biến nạp và thực hiện trao đổi chéo thứ cấp, và do đó thu được chủng trong đó Ncgl2131 thay thế bằng cj7-cycA(Eco). Chủng được đặt tên là KCCM12120P/cycA(Eco).

Ví dụ 1-3: Đánh giá khả năng sản sinh L-threonin của các chủng được đưa vào CycA

Thử nghiệm khả năng sản sinh L-threonin được thực hiện trên các chủng được điều chế trong ví dụ 1-2. Từng chủng thu được bên trên được cho vào vào bình tam giác 250 mL chứa 25 mL môi trường nuôi cấy và được nuôi cấy ở 30°C trong 20 giờ ở với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sau đó, 1 mL dung dịch nuôi cấy giống được cho vào bình tam giác 250 mL chứa 24 mL môi trường sản xuất L-threonin bên dưới, và được nuôi cấy ở 30°C trong 48 giờ với tốc độ lắc 200 vòng/phút.

Môi trường nuôi cấy (độ pH 7,0)

20 g glucoza, 10 g pepton, 5 g chiết xuất nấm men, 1,5 g ure, 4 g KH₂PO₄, 8 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄.7H₂O, 100 µg Biotin, 1000 µg Thiamin-HCl, 2000 µg axit canxi-pantothenic, 2000 µg nicotinamit (trên 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất L-threonin (độ pH 7,2)

30 g glucoza, 2 g KH₂PO₄, 3 g ure, 40 g (NH₄)₂SO₄, 2,5 g pepton, 5 g (10 mL) CSL (Sigma), MgSO₄.7H₂O 0,5 g, 400 mg leuxin, 20 g CaCO₃ (trên 1 L nước cất)

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, lượng sản sinh của các axit amin khác nhau được tạo ra được đo bằng HPLC. Các kết quả như được thể hiện trong Bảng 1 bên dưới.

Bảng 1

Các chủng	Axit amin (g/L)						
	Thr	Gly	Ser	Lys	Ile	Ala	Val
KCCM12120P	1,61	0,27	0,04	2,73	0,07	0,14	0,04
KCCM12120P-N2131	1,60	0,28	0,04	2,74	0,08	0,15	0,05
KCCM12120P/cycA(Cam)	1,81	0,22	0,03	2,61	0,07	0,00	0,03

KCCM12120P/cycA(Eco)	1,37	0,30	0,05	2,92	0,07	0,02	0,03
----------------------	------	------	------	------	------	------	------

Sự sản sinh L-threonin tăng lên, sự sản sinh của L-lysine giảm xuống, và ngược lại, khi sự sản sinh L-threonin tăng lên, L-isoleucine (Ile) và glycine (Gly) có thể là các sản phẩm phụ trong con đường L-sinh tổng hợp threonine, có thể tăng lên, và do đó, sự sản sinh của chúng đã được xác nhận. Ngoài ra, lượng sản sinh của serine (Ser), alanine (Ala), và valine (Val) cũng đã được xác nhận để kiểm tra chức năng của chúng như chất vận chuyển gen cycA.

Như thể hiện trong bảng 1 bên trên, chủng KCCM12120P/cycA (Cam) được đưa vào gen cycA có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes* thể hiện sự sản sinh L-threonine tăng lên 12,5% và sự sản sinh L-lysine giảm 4% so với chủng bố mẹ KCCM12120P. Ngoài ra, do ảnh hưởng của việc chèn gen cycA, nó đã được xác nhận rằng sự sản sinh glycine đã bị giảm 18,5% so với chủng bố mẹ, và sự sản sinh serine và valine đã bị giảm nhẹ so với chủng bố mẹ, và sự sản sinh alanine đã bị giảm đáng kể và do đó không được phát hiện trong môi trường nuôi cấy.

Trong khi đó, đã được xác nhận rằng chủng KCCM12120P/cycA(Eco) được đưa gen cycA vào có nguồn gốc từ *E. coli* cho thấy sự sản sinh L-threonine giảm 14,9% và sự sản sinh L-lysine và glycine tương ứng tăng lên 6,9% và 10% so với chủng bố mẹ. Do đó, sự ảnh hưởng của việc chèn các gen cycA có nguồn gốc từ *E. coli* và cycA có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes* được phát hiện là khác nhau đáng kể, nhưng điểm chung là, nồng độ của alanine trong môi trường nuôi cấy bị giảm xuống đáng kể. Ngoài ra, trong trường hợp đưa cycA có nguồn gốc từ *E. coli* hoặc cycA có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes* vào, không có sự thay đổi trong sản sinh isoleucine (Ile).

Dựa trên bên trên các kết quả, nó đã được xác nhận rằng việc đưa gen cycA có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes* vào có hiệu quả sản sinh L-threonine.

KCCM12120P/cycA(Cam) được đặt tên là CA09-0902 và được ký gửi ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc, Cơ quan đăng ký Quốc tế, theo Hiệp ước Budapest vào ngày 10 tháng 4 năm 2019, với đăng ký số KCCM12484P.

Ví dụ 1-4: Điều chế các chủng sản sinh L-threonine được đưa vào các gen liên quan đến hệ thống phân cắt glycine

Ví dụ 1-4-1: Điều chế vector để đưa vào protein phân cắt glyxin

Do trước đó đã xác nhận rằng hoạt tính của chất vận chuyển glyxin có ảnh hưởng đến việc tăng khả năng sản sinh threonin, thử nghiệm được thực hiện để xác nhận khả năng sản sinh threonin khi việc sử dụng glyxin được đưa vào tế bào được tăng hơn nữa. Cụ thể là, hệ thống phân cắt glyxin (sau đây gọi là, hệ thống GCV) được đưa vào. Trong chủng *Corynebacterium glutamicum*, chỉ có các gen mã hóa L-proteins, LipB, và LipA, trong số sáu protein tạo thành hệ thống GCV được biết đến, nhưng các gen mã hóa ba protein khác không được biết đến. Do đó, để đưa vào hệ thống GCV có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes*, các vector để đưa vào gcvP (SEQ ID NO: 27), gcvT (SEQ ID NO: 28), gcvH (SEQ ID NO: 29), lipA (SEQ ID NO: 30), và lipB (SEQ ID NO: 31) đã được điều chế. Thử nghiệm sau đây đã được thực hiện. Để thu được đoạn gen gcvPT trong số các gen liên quan đến hệ thống phân cắt glyxin (sau đây gọi là hệ thống GCV), PCR được thực hiện dựa trên nhiễm sắc thể của *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872 làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33. ADN polymeraza có độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. Các điều kiện PCR như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 5 phút; và polyme hóa ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đã thu được đoạn gen gcvPT (4936 bp) bao gồm promotor, và sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector (SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO:28).

Để thu được đoạn gen gcvH-lipBA, gen khác liên quan đến hệ thống GCV, PCR được thực hiện dựa trên nhiễm sắc thể của *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872 làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 35. ADN polymeraza có độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. Các điều kiện PCR như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 3 phút; và polyme hóa ở 72°C trong 5 phút. Kết quả là, thu được gcvH-lipBA đoạn gen (3321 bp) bao gồm promotor, và sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector (SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31).

PCR chồng lắp được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn gcvPT và đoạn gcvH-lipBA thu được bên trên làm mạch khuôn và sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 35. PCR được thực hiện như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 10 phút; và polyme hóa ở 72°C trong 12 phút. Kết quả là, thu được đoạn gen gcvPTH-lipBA (8257 bp), và sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, sau khi xử lý vector pDZ-N2131 được điều chế trong ví dụ 1-2 bên trên bằng các enzym giới hạn *speI* và *xhoI*, tỷ lệ giữa nồng độ mol (M) của vector so với đoạn gcvPTH-lipBA thu được bên trên được thiết đặt là 1:2, và vector được tách dòng bằng cách sử dụng bộ Kit Infusion Cloning (TaKaRa) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và do đó đã điều chế được vector pDZ-N2131/gcvPTH-lipBA để chèn gen hệ thống GCV vào vị trí gen *Ncgl2131*.

Ví dụ 1-4-2: Điều chế các chủng được đưa vào protein phân cắt glyxin

PCR được thực hiện dựa trên vector pDZ-N2131/cj7-cycA(Cam) thu được trong ví dụ 1-2 bên trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 36 và SEQ ID NO: 37. ADN polymeraza có độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. Các điều kiện PCR như sau: 28 chu kỳ biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 90 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 5 phút. Kết quả là, thu được đoạn gen cj7-cycA(Cam) (1944 bp), và sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng cách sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, sau khi xử lý vector pDZ-N2131/gcvPTH-lipBA được điều chế bên trên bằng enzym giới hạn *xhoI*, tiếp tục xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút, tỷ lệ giữa nồng độ mol (M) của vector so với đoạn cj7-cycA(Cam) thu được bên trên được thiết đặt là 1:2, và vector được tách dòng bằng cách sử dụng bộ Kit Infusion Cloning (TaKaRa) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và do đó đã điều chế được vector pDZ-N2131/gcv-lip-cycA(Cam) để chèn gen vận chuyển D-alanin/D-serin/glyxin và gen hệ thống GCV vào vị trí gen *Ncgl2131*.

Vector pDZ-N2131/gcv-lip-cycA(Cam) đã được điều chế được biến nạp vào chủng KCCM12120P bằng cách sử dụng điện biến nạp và thực hiện trao đổi chéo thứ cấp, và do đó thu được chủng trong đó *Ncgl2131* được thay thế bằng gcvPTH-lipBA-cycA(Cam). Chủng được đặt tên là KCCM12120P/gcv-lip-cycA(Cam).

Ví dụ 1-4-3: Đánh giá khả năng sản sinh Threonin của các chủng được đưa vào chất vận chuyển glyxin và protein phân cắt glyxin

Thử nghiệm khả năng sản sinh L-threonin được thực hiện trên các chủng được điều chế trong các ví dụ 1-2 và 1-4-2. Từng chủng thu được bên trên được cho vào bình tam giác 250 mL chứa 25 mL môi trường nuôi cấy bên trên và được nuôi cấy ở 30°C trong 20 giờ với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sau đó, 1 mL dung dịch nuôi cấy giống được cho vào bình tam giác 250 mL chứa 24 mL môi trường sản xuất L-threonin bên trên, và được nuôi cấy ở 30°C trong 48 giờ với tốc độ lắc 200 vòng/phút.

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, lượng sản sinh của các axit amin khác nhau được tạo ra được đo bằng HPLC. Các kết quả như được thể hiện trong bảng 2 bên dưới.

Bảng 2

Các chủng	Axit amin (g/L)						
	Thr	Gly	Ser	Lys	Ile	Ala	Val
KCCM12120P	1,61	0,27	0,04	2,73	0,07	0,14	0,04
KCCM12120P-N2131	1,60	0,28	0,04	2,74	0,08	0,15	0,05
KCCM12120P/cycA(Cam)	1,81	0,22	0,03	2,34	0,07	0,00	0,03
KCCM12120P/gcv-lip-ycA(Cam)	2,04	0,13	0,02	2,36	0,10	0,00	0,01

Như thể hiện trong bảng 2, chủng KCCM12120P/gcv-lip-ycA(Cam) được đưa vào gen vận chuyển D-alanin/D-serin/glyxin và gen hệ thống GCV cho thấy sự tăng sản sinh L-threonin 26,7% so với chủng bố mẹ KCCM12120P, cho thấy sự cải thiện sản sinh 12,7% so với chủng KCCM12120P/cycA(Cam) trong đó chỉ có gen cycA được đưa vào. Dựa trên kết quả, nó đã được xác nhận rằng sự sản sinh L-threonin của chủng được đưa vào cùng với gen hệ thống GCV đã tăng hơn nữa so với chủng trong đó chỉ có gen cycA được đưa vào.

Sự sản sinh L-lysine của chủng KCCM12120P/gcv-lip-ycA(Cam) bị giảm 13,6% so với KCCM12120P, và sự sản sinh L-lysine của chủng KCCM12120P/cycA(Cam) bị giảm 14,3% so với KCCM12120P. Ngoài ra, sự sản sinh L-isoleuxin tăng lên trong KCCM12120P/gcv-lip-ycA(Cam) so với KCCM12120P, nhưng khi xem xét các kết quả của các ví dụ 1 đến ví dụ 3, có thể thấy rằng sự sản sinh L-isoleuxin, sản phẩm phụ trong con đường sinh tổng hợp, cũng tăng lên do tăng sản sinh L-threonin.

Sự sản sinh glyxin chỉ bị giảm 18,5% khi gen cycA được đưa vào so với chủng

KCCM12120P, và bị giảm 51,9% khi các gen liên quan đến hệ thống GCV được đưa vào kết hợp cùng với chủng KCCM12120P. Sự sản sinh alanin bị giảm xuống đáng kể khi chỉ đưa vào gen *cycA*, và đã xác nhận rằng không có tác dụng phụ do đưa vào hệ thống GCV. Mặc dù sự sản sinh serin và valin thấp đáng kể, đã xác nhận cả hai chủng KCCM12120P/*cycA*(Cam) và chủng KCCM12120P/*gcv-lip-cycA*(Cam) đều cho thấy sự giảm sản sinh serin và valin so với chủng bố mẹ KCCM12120P.

KCCM12120P/*gcv-lip-cycA*(Cam) được đặt tên là CA09-0905 và được ký gửi ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc, Cơ quan đăng ký Quốc tế, theo Hiệp ước Budapest ngày 10 tháng 4 năm 2019, với đăng ký số KCCM12485P.

Dựa trên các kết quả bên trên, đã xác nhận rằng khi gen *cycA*, là gen vận chuyển D-alanin/D-serin/glyxin có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes*, được đưa vào dựa trên chủng sản sinh L-threonin thuộc chi *Corynebacterium*, sự sản sinh L-threonin được tăng lên. Ngoài ra, đã xác nhận rằng khi các gen liên quan đến hệ thống GCV được đưa vào cùng với gen *cycA*, sự sản sinh L-threonin tăng lên đáng kể.

Ví dụ 2: Xác nhận khả năng sản sinh L-threonin của chủng sản sinh L-threonin KCCM11222P được vào *cycA* và hệ thống phân cắt glyxin

Như trong ví dụ 1, thử nghiệm được thực hiện để xác nhận ảnh hưởng của việc đưa *cycA* và hệ thống GCV vào chủng sản sinh threonin hiện có.

Ví dụ 2-1: Đưa *cycA* vào chủng sản sinh L-threonin KCCM11222P

Từng vectơ biến nạp pDZ-N2131, pDZ-N2131/*cj7-cycA*(Cam) và vectơ pDZ-N2131/*cj7-cycA*(Eco) được sử dụng trong ví dụ 1 bên trên được biến nạp vào *Corynebacterium glutamicum* KCCM11222P (patent Hàn Quốc số 10-1335853), là chủng sản sinh L-threonin, và thực hiện trao đổi chéo thứ cấp, và do đó thu được từng chủng trong đó *Ncgl2131* đã bị xóa và thay thế bằng *cj7-cycA*(Cam) hoặc *cj7-cycA*(Eco) trên nhiễm sắc thể. Các chủng được đặt tên tương ứng là KCCM11222P-N2131, KCCM11222P/*cycA*(Cam), hoặc KCCM11222P/*cycA*(Eco).

Thử nghiệm khả năng sản sinh L-threonin được thực hiện trên các chủng đã được điều chế. Từng chủng thu được bên trên được cho vào vào bình tam giác 250 mL chứa 25 mL môi trường nuôi cấy và được nuôi cấy ở 30°C trong 20 giờ với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sau đó, 1 mL dung dịch nuôi cấy giống được cho vào bình tam giác

250 mL chứa 24 mL môi trường sản xuất L-threonin bên dưới, và được nuôi cấy ở 32°C trong 48 giờ với tốc độ lắc 200 vòng/phút.

Môi trường nuôi cấy (độ pH 7,0)

20 g glucoza, 10 g pepton, 5 g chiết xuất nấm men, 1,5 g ure, 4 g KH_2PO_4 , 8 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg biotin, 1000 μg thiamin-HCl, 2000 μg axit canxi-pantothenic, 2000 μg nicotinamit (trên 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất L-threonin (độ pH 7,0)

100 g glucoza, 2 g KH_2PO_4 , 3 g ure, 25 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 g pepton, 5 g (10 mL) CSL(Sigma), 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg biotin, 1000 μg thiamin-HCl, 2000 μg axit Canxi-Pantothenic, 3000 μg nicotinamit, 30 g CaCO_3 (trên 1 L nước cất)

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, lượng sản sinh của các axit amin khác nhau được tạo ra được đo bằng HPLC. Các kết quả như được thể hiện trong bảng 3 bên dưới.

Bảng 3

Các chủng	Axit amin (g/L)						
	Thr	Gly	Ser	Lys	Ile	Ala	Val
KCCM11222P	7,64	1,30	0,86	3,68	1,46	0,60	0,46
KCCM11222P-N2131	7,66	1,28	0,88	3,68	1,47	0,59	0,41
KCCM11222P/cycA(Cam)	8,80	1,02	0,85	3,13	1,42	0,01	0,42
KCCM11222P/cycA(Eco)	6,67	1,35	0,90	4,42	1,49	0,05	0,40

Như thể hiện trong bảng 3, KCCM11222P/cycA(Cam) cho thấy sự sản sinh L-threonin tăng lên 15,2% và sự sản sinh L-lysin giảm 14,9% so với chủng bố mẹ KCCM11222P. Sự sản sinh glyxin và alanin cho thấy giảm tương ứng 21,5% và 98,3%, so với KCCM11222P, xác nhận rằng các kết quả giống với đánh giá các kết quả dựa trên chủng KCCM12120P của ví dụ 1. Trong trường hợp isoleuxin, chủng KCCM11222P/cycA(Cam) cho thấy giảm 3% sự sản sinh isoleuxin so với KCCM11222P, trong khi chủng KCCM11222P/cycA(Eco) cho thấy tăng lên 4% sự sản sinh isoleuxin so với KCCM11222P, xác nhận rằng đưa vào protein CycA không ảnh hưởng đáng kể đến sự sản sinh isoleuxin. Cụ thể là, đã xác nhận chủng mà gen cycA có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes* được đưa vào cho thấy sự giảm sản sinh isoleuxin.

Trong khi đó, chủng KCCM11222P/cycA(Eco) mà gen cycA có nguồn gốc từ

E. coli được đưa vào cho thấy sự sản sinh L-threonin giảm 12,7% và sự sản sinh L-lysin tăng lên 20,1% so với chủng KCCM11222P. Do đó, được xác nhận rằng gen *cycA* có nguồn gốc từ *E. coli* không có hiệu quả làm tăng sản sinh L-threonin.

Dựa trên các kết quả, có thể thấy rằng đưa protein CycA có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes* vào chủng đột biến có khả năng sản sinh threonin có thể làm tăng khả năng sản sinh threonin.

Ví dụ 2-2: Đưa *cycA* và hệ thống GCV vào chủng sản sinh L-threonin KCCM11222P

Theo cách tương tự như trong ví dụ 1, vector pDZ-N2131/*gcv-lip-cycA*(Cam) được điều chế để xác nhận ảnh hưởng kết hợp của gen *cycA*(Cam) và gen hệ thống GCV được biến nạp vào chủng KCCM11222P và thực hiện trao đổi chéo thứ cấp, và do đó thu được chủng trong đó Ncgl2131 đã được thay thế bằng *gcvPTH-lipBA-cycA*(Cam). Chủng được đặt tên là KCCM11222P/*gcv-lip-cycA*(Cam).

Thử nghiệm khả năng sản sinh L-threonin được thực hiện trên các chủng đã được điều chế. Từng chủng thu được bên trên được cho vào vào bình tam giác 250 mL chứa 25 mL môi trường nuôi cấy bên trên và được nuôi cấy ở 30°C trong 20 giờ với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sau đó, 1 mL dung dịch nuôi cấy giống được cho vào vào bình tam giác 250 mL chứa 24 mL môi trường sản sinh L-threonin, và được nuôi cấy ở 32°C trong 48 giờ với tốc độ lắc 200 vòng/phút.

Sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, lượng sản sinh của các axit amin khác nhau được tạo ra được đo bằng HPLC. Các kết quả như được thể hiện trong bảng 4 bên dưới.

Bảng 4

Các chủng	Axit amin (g/L)						
	Thr	Gly	Ser	Lys	Ile	Ala	Val
KCCM11222P	7,63	1,32	0,87	3,70	1,45	0,60	0,45
KCCM11222P-N2131	7,64	1,29	0,88	3,68	1,45	0,58	0,40
KCCM11222P/ <i>cycA</i> (Cam)	8,81	1,04	0,85	3,11	1,42	0,01	0,41
KCCM11222P/ <i>gcv-lip-cycA</i> (Cam)	10,31	0,57	0,49	3,17	1,50	0,00	0,31

Như thể hiện trong bảng 4, chủng KCCM11222P/*gcv-lip-cycA*(Cam) cho thấy sự sản sinh L-threonin tăng lên 35,1% so với chủng bố mẹ KCCM11222P, sự sản sinh L-threonin tăng lên 17,0% so với chủng KCCM11222P/*cycA*(Cam) chỉ được đưa vào gen

cycA. Dựa trên các kết quả, như trong ví dụ 1, đã xác nhận rằng sự sản sinh L-threonin của chủng được đưa vào cùng với gen hệ thống GCV đã tăng hơn nữa so với chủng chỉ được đưa vào gen cycA ngay cả trong tái tổ hợp chủng sản sinh L-threonin KCCM11222P.

Sự sản sinh L-lysin của chủng KCCM11222P/gcv-lip-cycA(Cam) bị giảm 14,3% so với KCCM11222P, trong khi sự sản sinh L-lysin của chủng KCCM11222P/cycA(Cam) bị giảm 14,9% so với KCCM11222P. Sự sản sinh của chủng L-isoleuxin KCCM11222P/gcv-lip-cycA(Cam) đã tăng lên 3,4% so với KCCM11222P, và có thể được hiểu là hiệu quả thứ cấp theo sự tăng sản sinh L-threonin, xem xét các kết quả của Ví dụ 2-1.

Sự sản sinh glyxin bị giảm 21,1% khi chỉ có gen cycA được đưa vào, và bị giảm 56,8% khi được đưa vào cùng các gen hệ thống GCV so với chủng KCCM11222P. Sự sản sinh đã alanin bị giảm đáng kể khi đưa vào gen cycA, và bị giảm hơn nữa khi đưa vào hệ thống GCV, và không được phát hiện trong chủng KCCM11222P/gcv-lip-cycA(Cam). Sự sản sinh serin và valin bị giảm tương ứng 43,7% và 31,1% trong KCCM11222P/gcv-lip-cycA(Cam) so với chủng bố mẹ KCCM11222P.

Rõ ràng rằng sáng chế được mô tả bên trên có thể được thực hiện các thay đổi dưới các dạng cụ thể khác nhau bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật mà không vượt khỏi nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm của sáng chế. Do đó, các phương án được mô tả nêu trên nhằm minh họa cho sáng chế, và không nhằm giới hạn sáng chế. Phạm vi của sáng chế được xác định bằng phần yêu cầu bảo hộ dưới đây thay vì phần mô tả chi tiết. Tất cả thay đổi hoặc biến đổi tương đương của các phương án thực hiện đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật sản sinh L-threonin thuộc chi *Corynebacterium* có hoạt tính vận chuyển glyxin tăng cường,
trong đó chất vận chuyển glyxin là protein CycA có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes*.
2. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó protein bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% tương đồng.
3. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật có hoạt tính của protein phân cắt glyxin được tăng cường hơn nữa.
4. Vi sinh vật theo điểm 3, trong đó protein phân cắt glyxin là ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm GcvP, GcvT, GcvH, LipB, và LipA.
5. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó protein phân cắt glyxin có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes*.
6. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó GcvP bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 38, GcvT bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 39, GcvH bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 40, LipA bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 41, và LipB bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 42, hoặc trình tự axit amin có ít nhất 90% tương đồng với trình tự axit amin tương ứng.
7. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật sản sinh L-threonin thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.
8. Chế phẩm để sản xuất L-threonin, trong đó chế phẩm chứa vi sinh vật theo điểm bất kỳ từ 1 đến 7.
9. Phương pháp sản xuất L-threonin, trong đó phương pháp bao gồm:
nuôi cấy vi sinh vật theo điểm bất kỳ từ 1 đến 7; và
thu hồi L-threonin từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG TĂNG CƯỜNG SẢN SINH L-THREONIN, CHẾ PHẨM ĐỀ SẢN XUẤT L-THREONIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THREONIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

<130> OPA19301

<150> KR 10-2019-0046935

<151> 2019-04-22

<160> 42

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 421

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể C.gl lysC

<400> 1

Met 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> 2
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 2
 tcgagctcgg tacccgctgc gcagtggtga atac

34

<210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 3
tggaaatctt ttcatgttc acgttgacat 30

<210> 4
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 4
atgtcaacgt gaacatcgaa aagatttcca 30

<210> 5
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 5
ctctagagga tccccgttca cctcagagac gatt 34

<210> 6
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biểu thể C.gl Hom

<400> 6
Met Thr Ser Ala Ser Ala Pro Ser Phe Asn Pro Gly Lys Gly Pro Gly
1 5 10 15
Ser Ala Val Gly Ile Ala Leu Leu Gly Phe Gly Thr Val Gly Thr Glu
20 25 30
Val Met Arg Leu Met Thr Glu Tyr Gly Asp Glu Leu Ala His Arg Ile
35 40 45
Gly Gly Pro Leu Glu Val Arg Gly Ile Ala Val Ser Asp Ile Ser Lys
50 55 60
Pro Arg Glu Gly Val Ala Pro Glu Leu Leu Thr Glu Asp Ala Phe Ala
65 70 75 80
Leu Ile Glu Arg Glu Asp Val Asp Ile Val Val Glu Val Ile Gly Gly
85 90 95
Ile Glu Tyr Pro Arg Glu Val Val Leu Ala Ala Leu Lys Ala Gly Lys
100 105 110

Ser Val Val Thr Ala Asn Lys Ala Leu Val Ala Ala His Ser Ala Glu
 115 120 125
 Leu Ala Asp Ala Ala Glu Ala Ala Asn Val Asp Leu Tyr Phe Glu Ala
 130 135 140
 Ala Val Ala Gly Ala Ile Pro Val Val Gly Pro Leu Arg Arg Ser Leu
 145 150 155 160
 Ala Gly Asp Gln Ile Gln Ser Val Met Gly Ile Val Asn Gly Thr Thr
 165 170 175
 Asn Phe Ile Leu Asp Ala Met Asp Ser Thr Gly Ala Asp Tyr Ala Asp
 180 185 190
 Ser Leu Ala Glu Ala Thr Arg Leu Gly Tyr Ala Glu Ala Asp Pro Thr
 195 200 205
 Ala Asp Val Glu Gly His Asp Ala Ala Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala
 210 215 220
 Ser Ile Ala Phe His Thr Arg Val Thr Ala Asp Asp Val Tyr Cys Glu
 225 230 235 240
 Gly Ile Ser Asn Ile Ser Ala Ala Asp Ile Glu Ala Ala Gln Gln Ala
 245 250 255
 Gly His Thr Ile Lys Leu Leu Ala Ile Cys Glu Lys Phe Thr Asn Lys
 260 265 270
 Glu Gly Lys Ser Ala Ile Ser Ala Arg Val His Pro Thr Leu Leu Pro
 275 280 285
 Val Ser His Pro Leu Ala Ser Val Asn Lys Ser Phe Asn Ala Ile Phe
 290 295 300
 Val Glu Ala Glu Ala Ala Gly Arg Leu Met Phe Tyr Gly Asn Gly Ala
 305 310 315 320
 Gly Gly Ala Pro Thr Ala Ser Ala Val Leu Gly Asp Val Val Gly Ala
 325 330 335
 Ala Arg Asn Lys Val His Gly Gly Arg Ala Pro Gly Glu Ser Thr Tyr
 340 345 350
 Ala Asn Leu Pro Ile Ala Asp Phe Gly Glu Thr Thr Thr Arg Tyr His
 355 360 365
 Leu Asp Met Asp Val Glu Asp Arg Val Gly Val Leu Ala Glu Leu Ala
 370 375 380
 Ser Leu Phe Ser Glu Gln Gly Ile Ser Leu Arg Thr Ile Gln Gln Glu
 385 390 395 400
 Glu Arg Asp Asp Asp Ala Arg Leu Ile Val Val Thr His Ser Ala Leu
 405 410 415
 Glu Ser Asp Leu Ser Arg Thr Val Glu Leu Leu Lys Ala Lys Pro Val
 420 425 430
 Val Lys Ala Ile Asn Ser Val Ile Arg Leu Glu Arg Asp
 435 440 445

<210> 7
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 7
 tcgagctcgg taccaccacg gcgctgacta tgc 33

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 8
 cgcgctcttc ctgttgatt gtacgcagg 30

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 9
 ccctgcgtac aatccaacag gaagagcgcg 30

<210> 10
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 10
 ctctagagga tcccgataga cagatttgtc cacg 34

<210> 11
 <211> 1611
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 11
 atgcaccacg agcaaccga agggcgcaa gtgggcattc gtagaacaat cccagaggaa 60
 agccgtacgg ctttctcga catgatcaat caaggtatgt caggtcttgc tgcgtctaca 120
 gcggctcggg tcagtgaatt caccgggcga aagtgggcga aggcgcgcgg ggtgaaactg 180

acccgcgccc cgcgaggtgg caatgctttt gacaccgccc agaaacttga gattgcagcc 240
 agcatgctag agaaaggatg cctaccccca gaaatcggcg agtatgtcgg catgactcgg 300
 gccaatatat ccctatggcg caaacaaggc ccagacaagc ttcgccaacg cgcagccacc 360
 ttgcgcaccg gcaagcgagc agctgaattc atccacgccc cggatgatggg cccttattat 420
 gggccacgca cactccatca agtggtgcgt gaggactaca caacactggt tgacgagtta 480
 tctgcgttgg ggttgccagc acaggtgtgt ggggccttac ttcattcttgc tccaccacca 540
 tcattacgct tttottatat gtcgtgtgta gtgccgttat ttgctgatga aatcaaagtc 600
 gtaggacaag gcacacgatt atcgtttaga gagaaaatga tgatccaacg tttccatgac 660
 accgggggtca gtgcagcaga aatcggtcga cgccctgggtc ggtgtcggca aacaatttcc 720
 aggggaacttc gacgtggtca agatgatgat ggacgttatc gtgcacgcga ctccatgaa 780
 ggtgcgatca ggaaactagc gcgtccgaaa acaccgaaac ttgatgcaa tcgtaggctt 840
 cgggctgtgg tggtcgaggc gttgaataat aaattatctc cggagcagat ttctggtctt 900
 ttagccaccg agcatgctaa cgatagctct atgcagatta gtcatgaaac tatttaccag 960
 gcgttatatg ttcaaggtaa aggggcgttg cgtgatgaat tgaagggtga gaaatttctt 1020
 cgtaccggtc ggaagggacg taaaccgcag tcgaagttgc catcgagagg taagccgtgg 1080
 gtggaggggtg cgttgattag tcaacgcccga gcagaagttg ctgatcgtgc tgtgcctggg 1140
 cactgggagg gcgatttagt aattggtggt gaaaaccaag cgacagcgtt ggtgacgttg 1200
 gtggagcgca cgagccggtt gacgttgatt aagcggttgg gggttaatca tgaggcgtcg 1260
 actgtgacgg atgcgttggt ggagatgatg ggtgatttgc cgcaggcgtt gcgtcggagt 1320
 ttgacgtggg atcaggggtg ggagatggca gagcatgcgc gggttagcgt ggtgaccaag 1380
 tgtccggtgt ttttctgtga tccctattcg ccgtggcagc gtgggtcgaa tgagaatacg 1440
 aatggattgg tcagggattt tttcccgaa ggcactaatt ttgctaaagt aagtgcgaa 1500
 gaagttcagc gggcacagga tctgctgaat taccggccgc ggaaaatgca tggtttttaa 1560
 agcgcgacgc aggtatatga aaaaatcgta gttggtgcat ccaccgattg a 1611

<210> 12
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 12
 tcgagctcgg taccctctgg tggtagttcg tag

33

<210> 13
 <211> 33

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 13
ctcgagcata ctagtatccc cgcaaagatc ggc 33

<210> 14
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 14
actagtatgc tcgagtacac gatctggacc aac 33

<210> 15
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 15
ctctagagga tccctcaagc tgcctcgcaa cta 33

<210> 16
<211> 476
<212> PRT
<213> Corynebacterium ammoniagenes

<400> 16
Met Ala Ser Tyr Asp Pro Gly His Ser Gln Val Lys Asn Thr Gly Val
1 5 10 15
Glu Leu Asp Ser His Val Glu Ser Asp His Leu Gln Arg Gly Leu Ser
20 25 30
Asn Arg His Ile Gln Leu Ile Ala Ile Gly Gly Ala Ile Gly Thr Gly
35 40 45
Leu Phe Met Gly Ser Gly Lys Thr Ile Ser Leu Ala Gly Pro Ser Val
50 55 60
Ile Leu Val Tyr Gly Ile Ile Gly Phe Met Leu Phe Phe Val Met Arg
65 70 75 80
Ala Met Gly Glu Leu Leu Leu Ser Asn Leu Asn Tyr Lys Ser Leu Arg
85 90 95
Asp Ala Val Ser Asp Ile Leu Gly Pro Thr Ala Gly Phe Val Cys Gly
100 105 110

Trp Thr Tyr Trp Phe Cys Trp Ile Val Thr Gly Met Ala Asp Val Val
 115 120 125
 Ala Ile Thr Gly Tyr Thr Gln Tyr Trp Trp Pro Asp Ile Ala Leu Trp
 130 135 140
 Ile Pro Gly Ala Leu Thr Ile Leu Leu Leu Gly Leu Asn Leu Val
 145 150 155 160
 Ala Val Arg Leu Phe Gly Glu Leu Glu Phe Trp Phe Ala Ile Ile Lys
 165 170 175
 Leu Val Ala Ile Thr Ala Leu Ile Leu Val Gly Ala Val Met Val Ile
 180 185 190
 Ser Arg Phe Gln Ser Pro Asp Gly Asp Ile Ala Ala Val Ser Asn Leu
 195 200 205
 Ile Asp His Gly Gly Phe Phe Pro Asn Gly Ile Thr Gly Phe Leu Ala
 210 215 220
 Gly Phe Gln Ile Ala Ile Phe Ala Phe Val Gly Val Glu Leu Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Ala Ala Ala Glu Thr Lys Asp Pro Glu Lys Asn Leu Pro Arg Ala
 245 250 255
 Ile Asn Ser Ile Pro Ile Arg Ile Val Val Phe Tyr Ile Leu Ala Leu
 260 265 270
 Ala Val Ile Met Met Val Thr Pro Trp Asp Lys Val His Ser Asp Ser
 275 280 285
 Ser Pro Phe Val Gln Met Phe Ala Leu Ala Gly Leu Pro Ala Ala Ala
 290 295 300
 Gly Ile Ile Asn Phe Val Val Leu Thr Ser Ala Ala Ser Ser Ala Asn
 305 310 315 320
 Ser Gly Ile Phe Ser Thr Ser Arg Met Leu Phe Gly Leu Ala Arg Glu
 325 330 335
 Gly Gln Ala Pro Lys Arg Trp Gly Ile Leu Ser Arg Asn Gln Val Pro
 340 345 350
 Ala Arg Gly Leu Leu Phe Ser Val Ala Cys Leu Val Pro Ser Leu Ala
 355 360 365
 Ile Leu Tyr Ala Gly Ala Ser Val Ile Asp Ala Phe Thr Leu Ile Thr
 370 375 380
 Thr Val Ser Ser Val Leu Phe Met Val Val Trp Ser Leu Ile Leu Ala
 385 390 395 400
 Ala Tyr Leu Val Phe Arg Arg Lys Phe Pro Glu Arg His Ala Ala Ser
 405 410 415
 Lys Phe Lys Val Pro Gly Gly Ala Phe Met Cys Trp Val Val Leu Ala
 420 425 430
 Phe Phe Ala Phe Met Val Val Val Leu Thr Phe Glu Asn Asp Thr Arg
 435 440 445
 Ser Ala Leu Met Val Thr Pro Ile Trp Phe Val Ile Leu Leu Ala Gly

450

455

460

Trp Phe Ile Ser Gly Gly Val Lys Arg Ala Arg Lys
 465 470 475

<210> 17
 <211> 1431
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium ammoniagenes

<400> 17
 atggcatctt atgatcccg gcattcacag gttaaaaata caggagtaga actogactct 60
 cacgtggagt cagaccatct ccaacgcggt cttagcaacc gacatatcca gttgattgcc 120
 attggcgggtg ctatcggcac cggactatct atgggatcgg gcaaaacat ctcccttgct 180
 ggtccttccg taatcttgggt gtatggcatc atcggtttta tgctcttctt cgtcatgcgg 240
 gogatgggtg agcttttgct ctgaacctc aactacaagt cattgcgtga tgccgtctcg 300
 gacatcctcg ggcctaccgc tggtttcgta tgcggctgga cctactggtt ctgctggatt 360
 gtcacaggca tggctgatgt cgtggctatt accggtaca cccaatactg gtggccagat 420
 atcgcgctgt ggatacctgg agcattgacg attttattac tgctcgggtt aaatctcgtg 480
 gcagtcgcgc tctttgggtga gttggaattt tggttcgcaa tcatcaagct ggtggctatt 540
 actgcgctca tctcgtcgg cgcggtgatg gttatttcgc gttccaatc cccagacggc 600
 gacattgcgg ctgtttccaa cctgatcgac catggcggtt tcttcccgaa cggaatcacg 660
 ggcttctcgt cgggattcca gattgctatc ttgccttcg tcggcgtgga gcttgccggt 720
 accgcggctg cagaaaccaa agaccagaa aagaatcttc ctgcgcgat taactcgatt 780
 cctattcgta tcgtcgtgtt ctacatcctg gctcttcggt tcatcatgat ggttaccoca 840
 tgggacaagg tccacagtga ctccagccca tttgtgcaga tgtttgccct ggctggactg 900
 ccggcggcag caggcattat taacttcgtg gtgctgacat ctgctgcttc atccgcgaac 960
 agtggtatct tctccacatc acgcatgctg ttccggtctg ctgcggaagg ccaagcgccc 1020
 aagcgttggg gcatcttgct ccgtaaccaa gtcccagccc gggcctgct gttctcagta 1080
 gcgtgcctgg tcccagcct ggcaatcttg tacgccggcg ccagcgtcat tgacgccttt 1140
 acgttgatta ccaccgtgtc ttctgtgctg ttcatggtgg tatggagcct gatcctcggc 1200
 gcgtaccttg tcttcgccg caagttccca gaacgccatg cagcatccaa gttcaaggtc 1260
 ccaggcgggg cgtttatgtg ctgggttggt ctgcgtttct tcgcgtttat ggtcgttgta 1320
 ctgaccttg aaaatgacac tcggtccgct ttgatggtca cccaatctg gttcgtgac 1380
 ctcttggccg gctggttcat ctccggcgga gtcaagcgcg ctaggaagtg a 1431

<210> 18
 <211> 33
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 18

cgaaaggaaa cactcatggc atcttatgat ccc

33

<210> 19

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 19

gggttgggtt ttcccgatct cgagcgattg cgtggcctcc aac

43

<210> 20

<211> 318

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cj7

<400> 20

agaaacatcc cagcgctact aatagggagc gttgaccttc cttccacgga ccggtaatcg

60

gagtgcctaa aaccgcatgc ggcttaggct ccaagatagg ttctgcgcgg ccgggtaatg

120

catcttctttt agcaacaagt tgaggggtag gtgcaaataa gaacgacata gaaatcgtct

180

cctttctgtt tttaatcaac atacaccacc acctaaaaat tccccgacca gcaagttcac

240

agtattcggg cacaatatcg ttgccaaaat attgtttcgg aatatcatgg gatacgtacc

300

caacgaaagg aaacactc

318

<210> 21

<211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 21

gccgatcttt ggggggatac tagtatgctc gagagaaaca tcccagcgct a

51

<210> 22

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 22
 gagtggtttcc tttcggttg

18

<210> 23
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 23
 Met Val Asp Gln Val Lys Val Val Ala Asp Asp Gln Ala Pro Ala Glu
 1 5 10 15

Gln Ser Leu Arg Arg Asn Leu Thr Asn Arg His Ile Gln Leu Ile Ala
 20 25 30

Ile Gly Gly Ala Ile Gly Thr Gly Leu Phe Met Gly Ser Gly Lys Thr
 35 40 45

Ile Ser Leu Ala Gly Pro Ser Ile Ile Phe Val Tyr Met Ile Ile Gly
 50 55 60

Phe Met Leu Phe Phe Val Met Arg Ala Met Gly Glu Leu Leu Leu Ser
 65 70 75 80

Asn Leu Glu Tyr Lys Ser Phe Ser Asp Phe Ala Ser Asp Leu Leu Gly
 85 90 95

Pro Trp Ala Gly Tyr Phe Thr Gly Trp Thr Tyr Trp Phe Cys Trp Val
 100 105 110

Val Thr Gly Met Ala Asp Val Val Ala Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Phe
 115 120 125

Trp Phe Pro Asp Leu Ser Asp Trp Val Ala Ser Leu Ala Val Ile Val
 130 135 140

Leu Leu Leu Thr Leu Asn Leu Ala Thr Val Lys Met Phe Gly Glu Met
 145 150 155 160

Glu Phe Trp Phe Ala Met Ile Lys Ile Val Ala Ile Val Ser Leu Ile
 165 170 175

Val Val Gly Leu Val Met Val Ala Met His Phe Gln Ser Pro Thr Gly
 180 185 190

Val Glu Ala Ser Phe Ala His Leu Trp Asn Asp Gly Gly Trp Phe Pro
 195 200 205

Lys Gly Leu Ser Gly Phe Phe Ala Gly Phe Gln Ile Ala Val Phe Ala
 210 215 220

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

Pro Glu Lys Ser Leu Pro Arg Ala Ile Asn Ser Ile Pro Ile Arg Ile
 245 250 255

Ile Met Phe Tyr Val Phe Ala Leu Ile Val Ile Met Ser Val Thr Pro
 260 265 270

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

<210> 24
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 24
 atggttagatc aggtaaaagt cgttgccgat gatcaggctc cggctgaaca gtcgctacgg 60
 cgcaatctca caaaccgaca tattcagctt attgccattg gcggtgccat tggtagggg 120
 ttgtttatgg ggtctggcaa aacgattagc cttgccgggc cgtcgatcat tttcgtttat 180
 atgatcattg gttttatgct ctttttcgtg atgcgggcaa tgggggaatt gctgctttcg 240
 aatctggaat acaaatcttt tagtgacttc gttccgatt tactogggcc gtgggcagga 300
 tatttcaccg gctggactta ctggttctgc tgggttgtaa ccggtatggc agacgtggtg 360
 gcgatcacgg cttatgctca gttctgggtc cccgatctct ccgactgggt cgctcgctg 420
 gcggtgatag tgctgctgct gacgctcaat ctgccaccg tgaaaatgtt cggtgagatg 480
 gagttctggt ttgcgatgat caaaatcgtc gccattgtgt cgctgattgt cgtcggcctg 540

gtcacgtgtg cgatgcactt tcagtcaccg actggtgtg aagcgtcatt cgcgcatttg 600
 tggaatgacg gcggctgggt cccgaaaggt ttaagtggct tctttgccgg attccagata 660
 gcgggttttcg ctttcgtggg gattgagctg gtaggtacaa cagctgcgga aaccaagat 720
 ccagagaaat cactgccacg cgcgattaac tocattccga tccgtatcat tatgttctac 780
 gtcttcgcgc tgattgtgat tatgtccgtg acgccgtgga gttcggtagt cccggagaaa 840
 agcccgtttg ttgaactgtt cgtgttggtg gggctgcctg ctgccgcaag cgtgatcaac 900
 tttgtgggtg tgacctctgc ggcgctctcc gctaacagcg gcgtcttctc taccagccgt 960
 atgctgtttg gtctggcgca ggaaggtgtg gcaccgaaag cgttcgctaa actttctaag 1020
 cgcgcagtac ccgcgaaagg gctgacgttc tcgtgtatct gtctgctcgg cggcgtgggtg 1080
 atgttgatg tgaatcctag tgtgattggc gcgttcacga tgattacaac cgtttccgcg 1140
 attctgttta tgttcgtctg gacgattatc ctttgctcgt acctgtgtg tgcgaaacag 1200
 cgtcctcatc tacatgagaa gtcgatctac aagatgccgc tcggcaagct gatgtgctgg 1260
 gtatgtatgg cgttctttgt gttcgtggtc gtgttgctga cactggaaga tgacactcgc 1320
 caggcgctgc tggttacccc gctgtgggtt atcgcgctgg ggttgggctg gctgtttatt 1380
 ggtaagaagc gggctgctga actgcggaat taa 1413

<210> 25
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 25
 cgaaaggaaa cactcatggt agatcaggta aaag

34

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 26
 gggttggtt ttccgatct cgagctgatg gatcacatca gtc

43

<210> 27
 <211> 2859
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium ammoniagenes

<400> 27

atggatttca ttgcccgcc ccttgggcc gatgccacag aatctaagga catgctggcg	60
cgtgtgggtt atgacagcgt agaagcgctt gtcacctcag caatccccca gtccattagc	120
atcacggatg cgcttaatat gccgcaggca ttgagtgaga ccgacgcaca agccaagctt	180
cgcgcttacg ctgataaaaa tgcgtgctg aagtctttct acggccaggg ctactcagac	240
accatcaccc ctgctgttat tcgccgcggt ttggtagaag acgctgggtg gtacaccgct	300
tataccccat accagccaga aatttcccag ggtcgccttg agtcgctgct gaacttccag	360
accatggttc aagacctcac cggcttgctt attgcgaatg cttctttgct ggatgaggca	420
tcggcagttg ctgaggccgt gggtttgatg tctcgtgcgg tcaagaaggg ccgccgcgta	480
ctgctcgacg cccgtttgca cccacagggt ctcaccgtgg cggcggagcg tgcccagca	540
attgacctcg aagttgagat tgctgacttg agcaacggcg tggttggcga agacctcgtc	600
ggcgcagtag ttgcctacac cggtagcgag ggcgatattt ttgaccacg tgctgttatac	660
gaagaaatcc atggccgcgg cggacttggt tccgtcgcgg ctgacttggt gtccttgctg	720
cttctggaag gcccaggctc gttcggtgca gacattgtca ttggttcctc ccaacgcttt	780
ggtgtgccgc tcttctttgg tggcccacac gctgctttca tggcagtaac tgacaagcta	840
aagcgtcaga tgccaggccg tttggtcggc gtatcggctg attctgaggg ccgtcctgct	900
taccgcttgg cgctgcagac tcgtgaacag cacatccgcc gtgaacgcgc gacgtcaaat	960
atttgtaccg cgcaggcact totggccaac gtggctgcc tgtacgccgt ctaccacggt	1020
ccagaaggct tgaaggagat tgctaaccac gtgcactcct tggctgcttc ctttgccggt	1080
gcagttacta ctcagggctc gaagattact tcctcggagt tcttcgacac cgttaccggt	1140
gccggcggtt atgccgcata cattaagttc agcttgaaa aggccggata cctggtgcgc	1200
accattggcg aggataaggt ttctgtctcc ttcggtgagt ccgcaaccga aggcatggt	1260
actgtcttgg cggacgcctt tggtgccgct gcagtagata atgcagattt cccactgcct	1320
gaagcactca cccgcaccac cgagggtgct acccacgaaa tctttaactc cattcactcc	1380
gaaaccacga tgatgcgtta cctgcgcaag ctcggtgata aggatctggc tctagatcgc	1440
accatgattc ctttgggctc atgcaccatg aagctcaacc caaccgcagc catggaaccg	1500
atcacctggc cagaattcgc caatgttcac cttactccc ctgaatacgc aaccagggc	1560
tggcgtgagc tcattgaaga gttggaaggc tggttggctg agctgaccgg ctacgccaag	1620
gtttctatcc aaccaaagc tggttcccag ggcgagctag ctgggtcttt ggctatccgc	1680
cgctaccacg tcgcaaagtg tgacaccaac cgcgatatcg tggttgattcc tgcgtccgcg	1740
cacggcacca acgctgcctc cgcgaccctg gcaaatctgc gcgttggtgt ggttaagacc	1800
gccgaagacg gctccatcga tctggaagat ctgatgcga agatcgccaa gcatggtcag	1860
aacatggccg gaatcatgat cacctacca tcactcacg gcgtctttga cccagagggt	1920

cgtgaagtct ggcacaagat ccatgccgct ggcggccagg totacattga tggcgcaaac 1980
 atgaatgctt tgactgggtg ggctcagccg ggcaagttcg gtggcgatgt ctgcacttg 2040
 aacctgcaca agactttcac cattccgcac ggcggtggcg gccaggtgt tggaccaatt 2100
 ggtgtcgctg agcacctcat tccattcctg ccaacggatg ctgcagctga tgagctggat 2160
 cctgctaacc caaccccagt agaacagggc gttccaatta ctgcttcgca gtttggttcc 2220
 gctggtgttc tgccgattac ctgggcatac atcgcaatga ccggtggcga gggcttaacc 2280
 tccgctactg cacacgccat cttgggtgct aactaccttg cgcgcgaact ctccgattcc 2340
 ttcccaattc tgttcaccgg taatgaaggt cttggttgcg acgagtgcac tttgatctg 2400
 cgcgcgctaa ccgatgcctc aggcgttact gcagcagacg ttgccaagcg tttgatcgac 2460
 tttggcttcc acgctcctac cctcgcattc ccagtggctg gcaccttgat ggtggaacct 2520
 actgagtctg aggatattgc tgaactggat cgtttcattg aagcaatgcg caccatccgt 2580
 gcggagattc aggaaatcat cgatggcaag atcgcatatg aagattcggc catccgccac 2640
 gcaccttaca ccgcaccgtc agtctcaagc gatgattggg agtactcctt tagccgtgaa 2700
 aaggccgcat ggccagttcc ttactgcgt ttgaacaagt acttcccacc ggtacgccgc 2760
 ctggatgaag cttacggcga ccgcaacctg gtgtgctcct gccaccgcc agaggcattc 2820
 gacttcgatg ccgacaccga ttccaccgag gaggcttaa 2859

<210> 28
 <211> 1104
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<400> 28
 atgtcagaac tacgccagtc ccactgcac gcagagcacg aaaagctcgg cgcattccttt 60
 accgcttttg gcccttgga tatgocacta aagtacggca aggagctcga tgagcaccac 120
 gcagtgcgta atgcagtcgg catgtttgac ctctgcaca tgggtgagat ttgggtcaac 180
 ggcccagacg ccgctgcatt tttgtcctat gcgctgatct ccaacatgga gaccgtgaaa 240
 aatggcaagg cgaagtactc catgattggt gctgaagacg gcggcatcat cgatgacctc 300
 atttcctacc gtttctccga taccaagttc ttggtagtgc caaacgctgg caacactgat 360
 gtggtttggg aagcttttaa tcagcgcatt gaaggcttcg atgtagaact caacaatgag 420
 tccttgatg ttgcgatgat tgccctgcag ggccccaatg ctgccaaggc tctagttgaa 480
 caggttgctg aagagtccaa ggaagaagta gaaaacctc ottactatgc cgcaaccatg 540
 gccaaagtgc cagacgttga caccatcgtc gcgcgcaccg gctacaccgg cgaagacggc 600
 ttcgagctga tgatctacaa ccgcatgacg accaagctct ggcagctttt catcgaccaa 660
 gatggtgtta ctccatgcgg tttagcttca cgcgattcct tgcgcttgga agctggcatg 720
 cctttgtacg gcaatgagct ttcccgcat atcaccctg tcgaggcagg catgggtgtg 780

gcgtttaaga agaagaccgc tgacttcgtc ggcgccgagg tcctgcgtca acgcttggaa 840
 gaaggcccta agcaagttat caaggctttg acctcctctg agcgccgtgc agcgcgacc 900
 ggtgctgaaa tctatgccgg cgagcagttg gtaggcaccg taacttcggg tcagccatcg 960
 ccgacgctgg gacaccctat tgccctggca ctggtagata ctgcagcaaa cctcgaagaa 1020
 ggcgcagaag tagaagtga tattcgccgc aagcgttacc ccttcaccgt taccaagacg 1080
 cctttctata gccgcgagaa gtaa 1104

<210> 29
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<400> 29
 atggctaacc tacctgcaga atttacttac tccgaagacc acgagtggat taacgccgct 60
 caggacgcaa tcgttgcaa aactgttcgc atcgccatca cttctgttgc cgcagaccgt 120
 cttggtgagg ttgtcttcgc tgagcttcca gcagttggcg atagcgtcac tgcaggtgaa 180
 acctgtggtg aggttgaatc caccaagtcc gtttctgacc tgtacagccc tgtcaccggt 240
 accgtgaccg ctgtgaacga gacagtgcac gatgattatg aaatcatcaa caatgatcct 300
 ttcggtgaag gttggctggt tgaggtcgag gttgaagaac tcggcgaggt tatgaccgct 360
 gatgaatacg cggcagaaaa cggcatctaa 390

<210> 30
 <211> 1062
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<400> 30
 atgctccgca ttgaaaagaa gaatgcggag tcacccattg agcagaagcc gaggtggatc 60
 cgcaaccagg tccgactgg coctggttat gaggacatga aaaagcgtgt tgctggcgct 120
 ggccctgcaca ctgtctgcca ggaggcaggc tgtcctaata tocacgaatg ctgggagtc 180
 cgagaagcca ccttccttat cggcggtgac cgttgtaact gcggttgga cttctgcgat 240
 attgccactg gtaagccgca ggcattggac accgatgagc cgcgtcgcgt ttcggaaaa 300
 atccaagaga tgaatctgaa ctacgccacg atcactggtg ttaccctga tgaccttcca 360
 gatgagggcg catggctata tgctgaagtg gttcgtaaga tccacgagaa gaaccctcac 420
 acgggtgtag aaaacctcac cccggaactt tccggcaagc cagacctgct gcaggaagtc 480
 ttcgaggctc gccctgaggt tttcgtcac aacttgaaa ccgttcctcg tattttcaag 540
 cgtatccgcc cggcattccg ttatgagcgt tctctggatg ttttgagca ggcacacgac 600
 ttcggcctga tcaccaagtc gaacttgatc ttgggcatgg gtgaaactga ggaagagatt 660
 caggaagctc tacgcgatat gcgctctgtg ggcactgaca tcattaccat tacgcagtac 720

ctgcgtcctg gtctctgttt ccaccaatt gagcgttggg ttgcacctga ggagttcatt 780
 gcgcactccg agtaagccaa ggaattgggc ttaccgtta tgtctgggtcc tttgggtcgt 840
 tcttcttacc gcgcgggcaa gctctacacc caggcgatga aggcacgtgg ctgggagctg 900
 ccagaaaatc tcaagcacct ggaagaaact tctgatggcg caaccgctca ggaagcttcg 960
 tcgctgttga agaagtacgg cccttccgag gaaacgccag ttacttcccg catggcaaag 1020
 acgcctgtgg gtgcagataa atttactgct agcatccgct aa 1062

<210> 31
 <211> 822
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<400> 31
 atgactgctc cgcgtgacct gtttttcccc gctgatcggt ctattcgcg ttctactgcc 60
 ccggtagagg tgagacgttt aggtcgtatg gattatcaag aagcctggga ctatcaagca 120
 gaagtgcag cgcagcgcgc acgtgacgaa gttgcagaca cgttgctggt cgttgagcac 180
 cccgctgtgt atacggcggg caagcgcacg cagcccgaag atatgccac caacgggtctt 240
 ccggttatca atgttgatcg tggcggcccg attacctggc acggcgaggg ccagttgggtg 300
 gtctaccoga ttatcaagtt ggcagagcct gtcgatgtcg tcgattatgt ccgcogtctg 360
 gaagaagctg ttattcatac cgttcgggaa atgggggtaa caactgctgg gcgtatcgat 420
 ggtcgctcag gcgtgtgggt gccatcgact accgctgcga aagaccggc agcatcgac 480
 cgagaccgca agattgcggc cttaggcatc cgcattacgc gtgggggttac catgcatggt 540
 ctggcgctca attgcgacaa tatcttggac tactacgagc acattattgc ctgcgggtatt 600
 gatgatgccg atatcaccac cctggcgcta gagctgggccc gcgacgtcac cgtagatgat 660
 gcggttgagc ccttgctcat tgcgcttgac gatgccttgg ccggccgcat ggtcgtcgcc 720
 gaccacactt tcgcatctgc ccagacccc atcaaattag ctaatgagaa agcgcgccaa 780
 gcacgcgcgc agtcttcctt gactgatcat gcaggctctt aa 822

<210> 32
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 32
 gccgatcttt gcgggggatac tagtcaggat gcaattgcc tcc 43

<210> 33
 <211> 34

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 33
 atgcgccatt agcgtggttg caccggttg tactt

34

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 34
 tagcaaccgg tgcaaccacg ctaatggcgc attg

34

<210> 35
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 35
 gggttgggtt ttcccgatct cgagcagcaa gcccatgccc aag

43

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 36
 tgggcatggg cttgctgctc gagagaaaca tcccagcgt a

41

<210> 37
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 37
 gggttgggtt ttcccgatct cgagcgattg cgtggcctcc aac

43

<210> 38

```

<211>      952
<212>      PRT
<213>      Corynebacterium ammoniagenes

<400>      38
Met Asp Phe Ile Ala Arg His Leu Gly Pro Asp Ala Thr Glu Ser Lys
  1              5              10              15

Asp Met Leu Ala Arg Val Gly Tyr Asp Ser Val Glu Ala Leu Val Thr
      20              25              30

Ser Ala Ile Pro Gln Ser Ile Ser Ile Thr Asp Ala Leu Asn Met Pro
      35              40              45

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

Asp Lys Asn Val Val Leu Lys Ser Phe Tyr Gly Gln Gly Tyr Ser Asp
      65              70              75              80

Thr Ile Thr Pro Ala Val Ile Arg Arg Gly Leu Val Glu Asp Ala Gly
      85              90              95

Trp Tyr Thr Ala Tyr Thr Pro Tyr Gln Pro Glu Ile Ser Gln Gly Arg
      100             105             110

Leu Glu Ser Leu Leu Asn Phe Gln Thr Met Val Gln Asp Leu Thr Gly
      115             120             125

Leu Pro Ile Ala Asn Ala Ser Leu Leu Asp Glu Ala Ser Ala Val Ala
      130             135             140

Glu Ala Val Gly Leu Met Ser Arg Ala Val Lys Lys Gly Arg Arg Val
      145             150             155             160

Leu Leu Asp Ala Arg Leu His Pro Gln Val Leu Thr Val Ala Ala Glu
      165             170             175

Arg Ala Arg Ala Ile Asp Leu Glu Val Glu Ile Ala Asp Leu Ser Asn
      180             185             190

Gly Val Val Gly Glu Asp Leu Val Gly Ala Val Val Ala Tyr Thr Gly
      195             200             205

Thr Glu Gly Asp Ile Phe Asp Pro Arg Ala Val Ile Glu Glu Ile His
      210             215             220

Gly Arg Gly Gly Leu Val Ser Val Ala Ala Asp Leu Leu Ser Leu Leu
      225             230             235             240

Leu Leu Glu Gly Pro Gly Ser Phe Gly Ala Asp Ile Val Ile Gly Ser
      245             250             255

Ser Gln Arg Phe Gly Val Pro Leu Phe Phe Gly Gly Pro His Ala Ala
      260             265             270

Phe Met Ala Val Thr Asp Lys Leu Lys Arg Gln Met Pro Gly Arg Leu
      275             280             285

Val Gly Val Ser Val Asp Ser Glu Gly Arg Pro Ala Tyr Arg Leu Ala
      290             295             300

Leu Gln Thr Arg Glu Gln His Ile Arg Arg Glu Arg Ala Thr Ser Asn
      305             310             315             320

```

Ile Cys Thr Ala Gln Ala Leu Leu Ala Asn Val Ala Ala Met Tyr Ala
 325 330 335
 Val Tyr His Gly Pro Glu Gly Leu Lys Glu Ile Ala Asn His Val His
 340 345 350
 Ser Leu Ala Ala Ser Phe Ala Gly Ala Val Thr Thr Gln Gly Leu Lys
 355 360 365
 Ile Thr Ser Ser Glu Phe Phe Asp Thr Val Thr Val Ala Gly Val Asp
 370 375 380
 Ala Ala Ser Ile Lys Phe Ser Leu Glu Lys Ala Gly Tyr Leu Val Arg
 385 390 395 400
 Thr Ile Gly Glu Asp Lys Val Ser Val Ser Phe Gly Glu Ser Ala Thr
 405 410 415
 Gln Gly Asp Val Thr Val Leu Ala Asp Ala Phe Gly Ala Ala Ala Val
 420 425 430
 Asp Asn Ala Asp Phe Pro Leu Pro Glu Ala Leu Thr Arg Thr Thr Glu
 435 440 445
 Val Leu Thr His Glu Ile Phe Asn Ser Ile His Ser Glu Thr Gln Met
 450 455 460
 Met Arg Tyr Leu Arg Lys Leu Gly Asp Lys Asp Leu Ala Leu Asp Arg
 465 470 475 480
 Thr Met Ile Pro Leu Gly Ser Cys Thr Met Lys Leu Asn Pro Thr Ala
 485 490 495
 Ala Met Glu Pro Ile Thr Trp Pro Glu Phe Ala Asn Val His Pro Tyr
 500 505 510
 Ser Pro Glu Tyr Ala Thr Gln Gly Trp Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
 515 520 525
 Glu Gly Trp Leu Ala Glu Leu Thr Gly Tyr Ala Lys Val Ser Ile Gln
 530 535 540
 Pro Asn Ala Gly Ser Gln Gly Glu Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ile Arg
 545 550 555 560
 Arg Tyr His Val Ala Asn Gly Asp Thr Asn Arg Asp Ile Val Leu Ile
 565 570 575
 Pro Ala Ser Ala His Gly Thr Asn Ala Ala Ser Ala Thr Leu Ala Asn
 580 585 590
 Leu Arg Val Val Val Val Lys Thr Ala Glu Asp Gly Ser Ile Asp Leu
 595 600 605
 Glu Asp Leu Asp Ala Lys Ile Ala Lys His Gly Gln Asn Met Ala Gly
 610 615 620
 Ile Met Ile Thr Tyr Pro Ser Thr His Gly Val Phe Asp Pro Glu Val
 625 630 635 640
 Arg Glu Val Cys Asp Lys Ile His Ala Ala Gly Gly Gln Val Tyr Ile
 645 650 655

Asp Gly Ala Asn Met Asn Ala Leu Thr Gly Trp Ala Gln Pro Gly Lys
 660 665 670
 Phe Gly Gly Asp Val Ser His Leu Asn Leu His Lys Thr Phe Thr Ile
 675 680 685
 Pro His Gly Gly Gly Gly Pro Gly Val Gly Pro Ile Gly Val Ala Glu
 690 695 700
 His Leu Ile Pro Phe Leu Pro Thr Asp Ala Ala Ala Asp Glu Leu Asp
 705 710 715 720
 Pro Ala Asn Pro Thr Pro Val Glu Gln Gly Val Pro Ile Thr Ala Ser
 725 730 735
 Gln Phe Gly Ser Ala Gly Val Leu Pro Ile Thr Trp Ala Tyr Ile Ala
 740 745 750
 Met Thr Gly Gly Glu Gly Leu Thr Ser Ala Thr Ala His Ala Ile Leu
 755 760 765
 Gly Ala Asn Tyr Leu Ala Arg Glu Leu Ser Asp Ser Phe Pro Ile Leu
 770 775 780
 Phe Thr Gly Asn Glu Gly Leu Val Ala His Glu Cys Ile Leu Asp Leu
 785 790 795 800
 Arg Ala Leu Thr Asp Ala Ser Gly Val Thr Ala Ala Asp Val Ala Lys
 805 810 815
 Arg Leu Ile Asp Phe Gly Phe His Ala Pro Thr Leu Ala Phe Pro Val
 820 825 830
 Ala Gly Thr Leu Met Val Glu Pro Thr Glu Ser Glu Asp Ile Ala Glu
 835 840 845
 Leu Asp Arg Phe Ile Glu Ala Met Arg Thr Ile Arg Ala Glu Ile Gln
 850 855 860
 Glu Ile Ile Asp Gly Lys Ile Ala Tyr Glu Asp Ser Val Ile Arg His
 865 870 875 880
 Ala Pro Tyr Thr Ala Pro Ser Val Ser Ser Asp Asp Trp Glu Tyr Ser
 885 890 895
 Phe Ser Arg Glu Lys Ala Ala Trp Pro Val Pro Ser Leu Arg Leu Asn
 900 905 910
 Lys Tyr Phe Pro Pro Val Arg Arg Leu Asp Glu Ala Tyr Gly Asp Arg
 915 920 925
 Asn Leu Val Cys Ser Cys Pro Pro Pro Glu Ala Phe Asp Phe Asp Ala
 930 935 940
 Asp Thr Asp Ser Thr Glu Glu Ala
 945 950

<210> 39
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium ammoniagenes

<400> 39

Met Ser Glu Leu Arg Gln Ser Pro Leu His Ala Glu His Glu Lys Leu
 1 5 10 15
 Gly Ala Ser Phe Thr Ala Phe Gly Pro Trp Asn Met Pro Leu Lys Tyr
 20 25 30
 Gly Lys Glu Leu Asp Glu His His Ala Val Arg Asn Ala Val Gly Met
 35 40 45
 Phe Asp Leu Ser His Met Gly Glu Ile Trp Val Asn Gly Pro Asp Ala
 50 55 60
 Ala Ala Phe Leu Ser Tyr Ala Leu Ile Ser Asn Met Glu Thr Val Lys
 65 70 75 80
 Asn Gly Lys Ala Lys Tyr Ser Met Ile Val Ala Glu Asp Gly Gly Ile
 85 90 95
 Ile Asp Asp Leu Ile Ser Tyr Arg Phe Ser Asp Thr Lys Phe Leu Val
 100 105 110
 Val Pro Asn Ala Gly Asn Thr Asp Val Val Trp Glu Ala Phe Asn Gln
 115 120 125
 Arg Ile Glu Gly Phe Asp Val Glu Leu Asn Asn Glu Ser Leu Asp Val
 130 135 140
 Ala Met Ile Ala Leu Gln Gly Pro Asn Ala Ala Lys Val Leu Val Glu
 145 150 155 160
 Gln Val Ala Glu Glu Ser Lys Glu Glu Val Glu Asn Leu Pro Tyr Tyr
 165 170 175
 Ala Ala Thr Met Ala Lys Val Ala Asp Val Asp Thr Ile Val Ala Arg
 180 185 190
 Thr Gly Tyr Thr Gly Glu Asp Gly Phe Glu Leu Met Ile Tyr Asn Ala
 195 200 205
 Asp Ala Thr Lys Leu Trp Gln Leu Phe Ile Asp Gln Asp Gly Val Thr
 210 215 220
 Pro Cys Gly Leu Ala Ser Arg Asp Ser Leu Arg Leu Glu Ala Gly Met
 225 230 235 240
 Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Leu Ser Arg Asp Ile Thr Pro Val Glu Ala
 245 250 255
 Gly Met Gly Val Ala Phe Lys Lys Lys Thr Ala Asp Phe Val Gly Ala
 260 265 270
 Glu Val Leu Arg Gln Arg Leu Glu Glu Gly Pro Lys Gln Val Ile Lys
 275 280 285
 Ala Leu Thr Ser Ser Glu Arg Arg Ala Ala Arg Thr Gly Ala Glu Ile
 290 295 300
 Tyr Ala Gly Glu Gln Leu Val Gly Thr Val Thr Ser Gly Gln Pro Ser
 305 310 315 320
 Pro Thr Leu Gly His Pro Ile Ala Leu Ala Leu Val Asp Thr Ala Ala
 325 330 335
 Asn Leu Glu Glu Gly Ala Glu Val Glu Val Asp Ile Arg Gly Lys Arg

340 345 350
 Tyr Pro Phe Thr Val Thr Lys Thr Pro Phe Tyr Ser Arg Glu Lys
 355 360 365

 <210> 40
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium ammoniagenes

 <400> 40
 Met Ala Asn Leu Pro Ala Glu Phe Thr Tyr Ser Glu Asp His Glu Trp
 1 5 10 15

 Ile Asn Ala Ala Gln Asp Ala Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Ile Gly
 20 25 30

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

 Leu Pro Ala Val Gly Asp Ser Val Thr Ala Gly Glu Thr Cys Gly Glu
 50 55 60

 Val Glu Ser Thr Lys Ser Val Ser Asp Leu Tyr Ser Pro Val Thr Gly
 65 70 75 80

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

 Asn Asn Asp Pro Phe Gly Glu Gly Trp Leu Phe Glu Val Glu Val Glu
 100 105 110

 Glu Leu Gly Glu Val Met Thr Ala Asp Glu Tyr Ala Ala Glu Asn Gly
 115 120 125

 Ile

<210> 41
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium ammoniagenes

 <400> 41
 Met Leu Arg Ile Glu Lys Lys Asn Ala Glu Ser Pro Ile Glu Gln Lys
 1 5 10 15

 Pro Arg Trp Ile Arg Asn Gln Val Arg Thr Gly Pro Gly Tyr Glu Asp
 20 25 30

 Met Lys Lys Arg Val Ala Gly Ala Gly Leu His Thr Val Cys Gln Glu
 35 40 45

 Ala Gly Cys Pro Asn Ile His Glu Cys Trp Glu Ser Arg Glu Ala Thr
 50 55 60

 Phe Leu Ile Gly Gly Asp Arg Cys Thr Arg Arg Cys Asp Phe Cys Asp
 65 70 75 80

 Ile Ala Thr Gly Lys Pro Gln Ala Leu Asp Thr Asp Glu Pro Arg Arg

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

<210> 42
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium ammoniagenes

<400> 42
 Met Thr Ala Pro Arg Asp Pro Phe Phe Pro Ala Asp Arg Ser Ile Arg
 1 5 10 15

Ala Ser Thr Ala Pro Val Glu Val Arg Arg Leu Gly Arg Met Asp Tyr

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