



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

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

(11)



1-0047965

(51)^{2021.01} C07K 14/245; C12P 13/06; C12P 13/12; (13) B
C12N 15/77

(21) 1-2022-03881

(22) 18/12/2020

(86) PCT/KR2020/018713 18/12/2020

(87) WO 2021/125896 24/06/2021

(30) 10-2019-0172055 20/12/2019 KR

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/10/2022 415A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) KIM, Seo Yun (KR); CHO, Seung Hyun (KR); LEE, Jae Min (KR); BAEK, Min Ji (KR).

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

(54) BIẾN THỂ CỦA PROTEIN MÀNG TRONG, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA BIÊN THỂ, VECTO, VI SINH VẬT, CÁC PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM ĐÍCH, METHIONIN VÀ GLUFOSINAT, VÀ CÁC CHẾ PHẨM SẢN XUẤT HOMOSERIN VÀ O-AXETYLHOMOSERIN

(21) 1-2022-03881

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể của YjeH là protein màng trong, polynucleotit mã hóa biến thể, vector chứa polynucleotit, vi sinh vật chứa biến thể này, và phương pháp sản xuất sản phẩm đích, methionin và glufosinat sử dụng biến thể này, và chế phẩm sản xuất homoserin và *O*-axetylhomoserin.

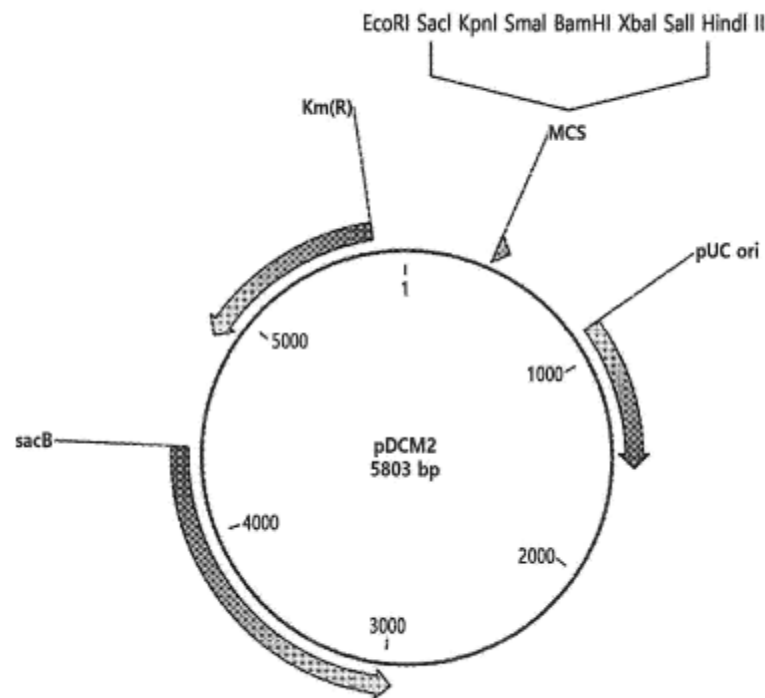


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể của YjeH là protein màng trong, polynucleotit mã hóa biến thể, vectơ chứa polynucleotit, vi sinh vật chứa biến thể, các phương pháp sản xuất sản phẩm đích, methionin và glufosinat bằng cách sử dụng biến thể này, và các chế phẩm sản xuất homoserin và *O*-axetylhomoserin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

O-Axetylhomoserin hoạt động như tiền chất của methionin, là một trong những axit amin thiết yếu trong cơ thể con người. Homoserin như tiền chất của cả methionin và threonin đã biết để được chuyển đổi thành threonin thông qua phosphohomoserin và chuyển đổi thành methionin thông qua axetylhomoserin.

Methionin không chỉ được sử dụng làm chất phụ gia cho thức ăn và thực phẩm mà còn là nguyên liệu thô cho các dung dịch tiêm truyền và thuốc được phẩm và được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học và sinh học. Quy trình hai bước để sản xuất L-methionin từ tiền chất L-methionin được sản xuất bằng cách lên men thông qua chuyển đổi bằng enzym đã được công bố (công bố đơn quốc tế số WO 2008/013432).

Trong quy trình hai bước, *O*-suxinylhomoserin và *O*-axetylhomoserin được sử dụng làm các tiền chất methionin, và quan trọng là sản xuất *O*-axetylhomoserin với sản lượng cao nhằm mục đích sản xuất hàng loạt kinh tế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Kết quả của những nỗ lực tích cực để hoàn thiện sáng chế bằng cách tăng sản xuất *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, các tác giả sáng chế đã tìm ra biến thể của protein màng trong có hoạt động sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin được tăng cường.

Sáng chế đề cập đến biến thể của YjeH là protein màng trong bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình

tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa biến thể.

Sáng chế đề cập đến vector chứa polynucleotit.

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm đích, trong đó phương pháp bao gồm nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy, trong đó vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất methionin, trong đó phương pháp này bao gồm: sản xuất *O*-axetylhomoserin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy; và chuyển đổi *O*-axetylhomoserin thành methionin bằng cách cho phản ứng *O*-axetylhomoserin với sulfua, trong đó vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất glufosinat, trong đó phương pháp này bao gồm: sản xuất *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy; và chuyển đổi *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin thành glufosinat, trong đó vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii)

thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm sản xuất homoserin bao gồm vi sinh vật hoặc dịch nuôi cấy vi sinh vật.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm sản xuất *O*-axetylhomoserin bao gồm vi sinh vật hoặc dịch nuôi cấy vi sinh vật.

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng biến thể của protein màng trong YjeH để sản xuất *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin.

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng vi sinh vật để sản xuất *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

O-Axetylhomoserin hoặc homoserin có thể được sản xuất với sản lượng cao bằng cách nuôi cấy vi sinh vật có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin được biến đổi sử dụng biến thể của YjeH là protein màng trong theo sáng chế so với các protein không biến đổi.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ minh họa plasmid pDCM2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án trong sáng chế có thể được áp dụng với các phần mô tả và phương án ở đây. Nói cách khác, tất cả sự kết hợp của các chi tiết khác nhau được mô tả trong sáng chế đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả dưới đây.

Để đạt được các mục đích nêu trên, một khía cạnh của sáng chế đề xuất biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự

tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Biến thể của protein màng trong YjeH có thể có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, tức là, hoạt tính sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “homoserin” là α -axit amin có nhóm hydroxyl ở mạch nhánh. Homoserin là chất trung gian của sinh tổng hợp threonin và methionin trong các vi sinh vật và thực vật, là đã biết được sản sinh từ axit aspartic-4-semialdehyd và có công thức hóa học $C_4H_9NO_3$. Homoserin có thể được chuyển đổi thành *O*-axetylhomoserin bằng homoserin axetyl transferaza với sự có mặt của axetyl-CoA.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “*O*-axetylhomoserin” đề cập đến dẫn xuất axetyl của L-homoserin, là vật liệu trung gian cụ thể trong con đường sinh tổng hợp của methionin trong các vi sinh vật. *O*-Axetylhomoserin đã biết được sản sinh bởi phản ứng giữa homoserin và axetyl-CoA được xúc tác bởi homoserin axetyltransferaza. Nó có công thức hóa học là $C_6H_{11}NO_4$. *O*-Axetylhomoserin còn có thể được gọi là *O*-axetyl-L-homoserin.

Cụ thể, trong biến thể của protein theo sáng chế, i) axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 có thể được thay thế bằng axit amin khác, ii) axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 có thể được thay thế bằng axit amin khác, hoặc iii) cả hai axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 và vị trí thứ 351 có thể được thay thế bằng các axit amin khác trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó. Sự thay thế các axit amin có thể là i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, hoặc ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, và cụ thể là, biến thể của protein có thể là biến thể của protein màng trong YjeH trong đó i) axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 được thay thế bằng asparagin, ii) axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 được thay thế bằng leuxin, hoặc iii) axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 được thay thế bằng asparagin và axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 được thay thế bằng leuxin, trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “protein màng trong” đề cập đến protein là một chi của họ axit amin Efflux (AAE) trong siêu họ Axit amin-Polyamin-

Organocation (APC) của các chất vận chuyển, làm trung gian sản xuất *O*-axetylhomoserin và/hoặc homoserin. Protein được dự đoán chứa 12 xoắn α xuyên màng, 10 trong số đó tạo ra nếp gấp lặp lại đảo ngược là đặc trưng của siêu họ APC. Protein màng trong có thể là, ví dụ, protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể được sử dụng thay thế với protein có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Theo sáng chế, protein màng trong có thể được sử dụng thay thế với *O*-axetylhomoserin- hoặc protein sản sinh homoserin, protein có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, protein có hoạt tính sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, protein YjeH, hoặc YjeH.

Theo sáng chế, mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể đề cập đến trình tự axit amin của YjeH là protein màng trong. Cụ thể, mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể là trình tự axit amin của protein màng trong được mã hóa bởi gen *yjeH* và có hoạt tính sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin. Trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể thu được từ cơ sở dữ liệu đã biết của Ngân hàng gen của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI). Ví dụ, trình tự axit amin có thể có nguồn gốc từ *Escherichia coli* (*E. coli*), tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó, và bất kỳ trình tự nào có hoạt tính đồng nhất với hoạt tính của trình tự axit amin có thể được bao gồm mà không giới hạn ở đó. Ngoài ra, mặc dù protein màng trong được xác định là protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 theo sáng chế, protein màng trong không loại trừ đột biến có thể xảy ra tự nhiên hoặc bằng cách bổ sung phía trước hoặc phía sau của trình tự vô nghĩa của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, hoặc đột biến câm của nó. Miễn là protein có hoạt tính tương đồng hoặc đồng nhất với hoạt tính của protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, rõ ràng rằng nó đều thuộc protein màng trong của sáng chế. Ví dụ, protein màng trong của sáng chế có thể là protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, hoặc 99,7% sự tương đồng hoặc đồng nhất. Hơn nữa, rõ ràng rằng bất kỳ protein có trình tự axit amin bao gồm việc xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm vào một phần trình tự axit amin thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế miễn là trình tự axit amin vẫn giữ được sự tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên và các hiệu

quả tương đương với hiệu quả của protein.

Tức là, mặc dù các thuật ngữ “protein hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO định trước”, và “protein hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO định trước” được sử dụng trong sáng chế, rõ ràng rằng bất kỳ protein có trình tự axit amin bao gồm việc xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm vào một phần axit amin đều có thể được sử dụng trong sáng chế, miễn là protein hoặc có hoạt tính đồng nhất hoặc tương đồng với hoạt tính của polypeptit bao gồm trình tự axit amin định trước. Ví dụ, rõ ràng rằng “protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1” hoặc “polypeptit bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1” thuộc “protein gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1” hoặc “polypeptit gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1” miễn là “protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1” hoặc “polypeptit bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1” có hoạt tính tương đồng hoặc đồng nhất với “protein gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1” hoặc “polypeptit gồm có trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1”.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể” đề cập đến protein thu được bằng cách thay thế bảo thủ và/hoặc sửa đổi ít nhất một axit amin khác với axit amin của trình tự được đề cập mà vẫn giữ được các chức năng hoặc đặc tính của chúng. Biến thể có thể có trình tự axit amin khác với trình tự đã xác định do thay thế, xóa, hoặc thêm một số axit amin. Các biến thể như vậy thường có thể được xác định bằng cách sửa đổi ít nhất một axit amin có trình tự axit amin nêu trên của protein và đánh giá các đặc tính của protein đã biến đổi. Tức là, khả năng của biến thể có thể được tăng cường, có thể không bị thay đổi, hoặc có thể bị giảm đi so với protein tự nhiên. Ngoài ra, một số biến thể có thể bao gồm các biến thể mà từ đó ít nhất một phần như trình tự dẫn đầu đầu N hoặc miền xuyên màng được loại bỏ. Các biến thể khác có thể bao gồm các biến thể trong đó một phần đã được loại bỏ khỏi đầu N- và/hoặc đầu C- của protein trưởng thành. Thuật ngữ “biến thể” còn có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ khác như biến đổi, protein biến đổi, polypeptit biến đổi, đột biến, mutein, và phân kỳ, và bất kỳ thuật ngữ nào dùng để chỉ sự biến đổi cũng có thể được sử dụng không giới hạn. Xem xét các mục đích của sáng chế, khả năng của biến thể có thể được tăng cường so với protein tự nhiên hoặc không biến đổi, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thay thế bảo thủ” đề cập đến sự thay thế một

axit amin bằng axit amin khác có cấu trúc và/hoặc các tính chất hóa học tương tự. Ví dụ, biến thể có thể bao gồm ít nhất một sự thay thế bảo thủ trong khi vẫn giữ được ít nhất một hoạt tính sinh học. Sự thay thế axit amin này 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 mang điện tích dương (có tính bazơ) như arginin, lysin, và histidin và các axit amin mang điện tích âm (có tính axit) như axit glutamic và axit aspartic; và các axit amin không tích điện có các mạch nhánh bao gồm các axit amin không phân cực như glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tryptophan, và prolin, và các axit amin phân cực hoặc ưa nước như serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, và glutamin. Trong số các axit amin không phân cực, các axit amin thơm bao gồm phenylalanin và tryptophan.

Các biến thể còn có thể bao gồm việc loại bỏ hoặc bổ sung các axit amin có ảnh hưởng tối thiểu đến các tính chất và cấu trúc bậc hai của polypeptit. Ví dụ, polypeptit có thể được liên hợp với trình tự tín hiệu (hoặc dẫn đầu) ở đầu N của protein cùng chuyển dịch theo hướng dịch mã hoặc sau dịch mã của protein. Polypeptit còn có thể được liên hợp với trình tự hoặc liên kết khác để xác định, tinh chế hoặc tổng hợp polypeptit.

Trong sáng chế, thuật ngữ “được thay thế bằng axit amin khác” không bị giới hạn cụ thể miễn là axit amin sau khi thay thế khác với axit amin trước khi thay thế.

Trong sáng chế, thuật ngữ “được thay thế bằng axit amin khác” không bị giới hạn cụ thể miễn là axit amin sau khi thay thế khác với axit amin trước khi thay thế. Cụ thể, axit amin có thể được thay thế bằng bất kỳ một trong số lysin, histidin, axit glutamic, axit aspartic, glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tryptophan, prolin, serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, và glutamin khác với trình tự axit amin trước đó.

Cụ thể, trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, phenylalanin là axit amin tương ứng với vị trí thứ 92, có thể được thay thế bằng asparagin, hoặc phenylalanin là axit amin tương ứng với vị trí thứ 351, có thể được thay thế bằng leuxin. Trong khi đó, theo sáng chế, rõ ràng rằng có thể sử dụng thuật ngữ “được thay thế bằng axit amin nhất định” có nghĩa là axit amin sau khi thay thế khác với axit amin trước khi thay thế trừ khi sử dụng thuật ngữ “được thay thế bằng axit amin khác”.

Ngoài ra, gốc axit amin được thay thế có thể bao gồm không chỉ axit amin tự nhiên, mà còn axit amin phi tự nhiên. Axit amin phi tự nhiên có thể là, ví dụ, D-axit amin, (homo)-axit amin, (*beta*-homo)-axit amin, *N*-metyl axit amin, α -metyl axit amin, và axit amin không phổ biến (ví dụ, xitrullin hoặc naphthylalanin), tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó. Trong khi đó, theo sáng chế, rõ ràng rằng thuật ngữ “được thay thế với axit amin nhất định” có nghĩa là axit amin sau khi thay thế khác với axit amin trước khi thay thế trừ khi thuật ngữ “được thay thế với axit amin khác” được sử dụng.

Biến thể có thể là biến thể trong đó ít nhất một trong các axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 và vị trí thứ 351 được thay thế bằng axit amin khác với axit amin trước khi thay thế trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, hoặc được thay thế bằng axit amin không tích điện có chuỗi cạnh khác với axit amin trước khi thay thế, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Cụ thể, biến thể có thể là biến thể của protein trong đó i) axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 được thay thế bằng axit amin khác, ii) axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 được thay thế bằng axit amin khác, hoặc iii) các axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 và vị trí thứ 351 được thay thế bằng các axit amin khác trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó. Sự thay thế các axit amin có thể là i) thay thế axit amin thứ 92 bằng asparagin, hoặc ii) thay thế axit amin thứ 351 bằng leuxin. Cụ thể, biến thể có thể là biến thể của protein màng trong YjeH trong đó i) axit amin thứ 92 được thay thế bằng asparagin, ii) axit amin thứ 351 được thay thế bằng leuxin, hoặc iii) axit amin thứ 92 được thay thế bằng asparagin và axit amin thứ 351 được thay thế bằng leuxin trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương ứng với” đề cập đến gốc axit amin ở vị trí đã nêu trong protein hoặc polypeptit hoặc gốc axit amin tương tự, đồng nhất, hoặc tương đồng với gốc được nêu trong protein hoặc polypeptit. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vùng tương ứng” thường đề cập đến vùng trong protein liên quan hoặc protein tham chiếu.

Trong sáng chế, một số cụ thể có thể được sử dụng cho vị trí của gốc amin của protein được sử dụng trong sáng chế. Ví dụ, vị trí tương ứng với gốc axit amin của protein theo sáng chế có thể được đánh số lại bằng cách sắp xếp trình tự axit amin của

protein được so sánh và trình tự axit amin của protein theo sáng chế.

Biến thể của protein màng trong YjeH được đề xuất trong sáng chế có thể đề cập đến biến thể có khả năng tăng cường để sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin so với protein không biến đổi bằng cách thay thế axit amin ở vị trí cụ thể trong protein màng trong nêu trên có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin.

Biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể bao gồm bất kỳ một trong các trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36, cụ thể về cơ bản bao gồm bất kỳ một trong các trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36, cụ thể hơn là bao gồm bất kỳ một trong các trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, biến thể có thể bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trình tự có các mã nhận biết SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36, hoặc trình tự axit amin trong đó ít nhất một axit amin trong số các axit amin thứ 92 và 351 được cố định trong các trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36 và có ít nhất 80% sự tương đồng với trình tự các axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó. Cụ thể, biến thể của sáng chế có thể bao gồm polypeptit có ít nhất 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% sự tương đồng hoặc đồng nhất với bất kỳ một trong các trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36. Ngoài ra, rõ ràng rằng bất kỳ protein có trình tự axit amin bao gồm việc xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm vào một phần của trình tự axit amin ở vị trí khác với vị trí thứ 92 và vị trí thứ 351 đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế miễn là protein vẫn giữ được sự tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên và các hiệu quả tương đương với hiệu quả của biến thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương đồng hoặc đồng nhất” đề cập đến mức độ kết hợp giữa hai trình tự axit amin hoặc trình tự bazơ và có thể được biểu hiện dưới dạng phần trăm. Các thuật ngữ tương đồng và đồng nhất thường có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Sự tương đồng hoặc đồng nhất trình tự của các polynucleotit hoặc polypeptit bảo

thủ có thể được xác định bằng thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn, và hàm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình có thể được sử dụng cùng nhau. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất thông thường có thể lai hóa với nhau ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80% hoặc 90% của toàn bộ trình tự hoặc toàn bộ chiều dài trong các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc trung bình. Trong các polynucleotit được lai hóa, các polynucleotit bao gồm codon thoái biến thay vì codon thông thường cũng được xem xét.

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa hai polypeptit hoặc trình tự polynucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng bất kỳ thuật toán đã biết như thuật toán “FASTA” bằng cách sử dụng các thông số mặc định được đưa ra bởi, ví dụ, Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444. Thay vào đó, có thể sử dụng thuật toán Needleman–Wunsch (1970, *J. Mol. Biol.* 48:443–453) được thực hiện trong chương trình Needleman của gói Bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu (The European Molecular Biology Open Software Suite: EMBOSS) (Rice et al., 2000, *Trends Genet.* 16:276–277) (phiên bản 5.0.0 hoặc mới hơn) để xác định sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J. et al., *Axit nucleics Research* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F., et al., *J MOLEC BIOL* 215:403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, và CARILLO et al. (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). Ví dụ, sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng BLAST, từ dữ liệu của Cơ sở dữ liệu Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia, hoặc ClustalW.

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa các polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định, ví dụ, bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng chương trình máy tính GAP như chương trình được đưa ra bởi Needleman et al., (1970), *J Mol Biol.* 48:443, ví dụ, như đã đưa ra bởi Smith và Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình máy tính GAP xác định sự tương tự như số lượng các ký hiệu được căn chỉnh (tức là, các nucleotit hoặc axit amin) giống nhau, được chia cho tổng số ký hiệu trong một đoạn ngắn hơn của hai chuỗi. Các tham số mặc định cho chương trình GAP có thể bao gồm: (1) ma trận so sánh nhị phân (chứa giá trị 1 cho đồng nhất và 0 cho không đồng nhất) ma trận so sánh trọng số của Gribskov et al. (1986), *Nucl. Acids Res.* 14:6745 như được mô tả bởi Schwartz và Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence*

và Structure, National Biomedical Research Foundation, các trang từ 353 đến 358 (1979) (hoặc ma trận thay thế EADNFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4)); (2) hàm phạt 3,0 cho mỗi khoảng trống dịch chuyển và hàm phạt bổ sung 0,10 cho mỗi ký hiệu trong mỗi khoảng trống dịch chuyển (hoặc hàm phạt mở khoảng trống dịch chuyển 10, và hàm phạt mở rộng khoảng trống dịch chuyển 0,5); và (3) không có hàm phạt cho các khoảng trống dịch chuyển cuối cùng.

Ngoài ra, sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất trình tự giữa hai polynucleotit hoặc polypeptit đã đưa ra có thể được xác định bằng cách so sánh các trình tự của chúng bằng cách lai Southern trong các điều kiện nghiêm ngặt đã xác định, và các điều kiện lai nghiêm ngặt đã xác định thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế và có thể được xác định bằng phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, tái bản lần hai, ấn phẩm Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể của protein màng trong” hoặc “biến thể của protein màng trong YjeH” có thể có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin và có thể được sử dụng thay thế với polypeptit biến đổi có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, polypeptit biến đổi sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, polypeptit biến đổi có hoạt tính sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, polypeptit biến đổi có hoạt tính sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, biến thể với hoạt tính xuất khẩu *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, biến thể sản sinh *O*-axetylhomoserin- hoặc homoserin-, protein sản sinh homoserin biến đổi, protein sản sinh *O*-axetylhomoserin biến đổi, đột biến YjeH, biến thể YjeH, YjeH biến thể, YjeH, hoặc tương tự.

Ngoài ra, protein có thể có nguồn gốc từ các chủng thuộc chi *Escherichia*, chi *Erwinia*, chi *Serratia*, chi *Providencia*, chi *Corynebacterium*, chi *Pseudomonas*, chi *Leptospira*, chi *Salmonella*, chi *Brevibacterium*, chi *Hypomononas*, chi *Chromobacterium*, và chi *Norcardia*, hoặc nấm hoặc nấm men, cụ thể có nguồn gốc từ các chủng thuộc chi *Escherichia*, chi *Corynebacterium*, và chi *Leptospira*, và nấm men, và cụ thể hơn là có nguồn gốc từ các chủng thuộc chi *Escherichia*, ví dụ, *Escherichia coli* (*E. coli*), tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Biến thể của protein màng trong YjeH có thể bao gồm đột biến ở vị trí thứ 92 và/hoặc vị trí thứ 351 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và bất kỳ biến thể bao gồm thêm hoặc xóa axit amin vào hoặc từ trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế miễn là axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 và/hoặc vị trí thứ 351 từ đầu N có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế. Biến thể của protein màng trong YjeH có thể bao gồm trình tự axit amin bao gồm thay thế axit amin thứ 92 và/hoặc axit amin thứ 351 bằng axit amin khác trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và có thể có hoạt tính tăng cường so với protein màng trong bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc không bao gồm sự đột biến. Biến thể của protein màng trong YjeH có thể có tối thiểu 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7%, hoặc tối đa 100% sự tương đồng hoặc đồng nhất có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Sự đột biến của axit amin thứ 92 hoặc 351 có thể thay thế axit amin thứ 92 bằng asparagin hoặc thay thế axit amin thứ 351 bằng leuxin.

Cụ thể, biến thể của protein màng trong YjeH có thể bao gồm i) thay thế axit amin thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin thứ 351 bằng leuxin, hoặc thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và có thể có hoạt tính tăng cường so với protein bao gồm trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc protein màng trong có nguồn gốc từ vi sinh vật kiểu dại trước khi biến đổi.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể của protein màng trong YjeH.

Protein màng trong YjeH và biến thể của nó đã được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit” đề cập đến sợi ADN hoặc ARN có độ dài tối thiểu nhất định hoặc nhiều hơn như polyme của các nucleotit trong đó các đơn phân nucleotit được liên kết với nhau dưới dạng chuỗi dài bằng các liên kết cộng hóa trị, cụ thể hơn là polynucleotit có thể là đoạn polynucleotit mã hóa biến thể.

Polynucleotit có thể bao gồm bất kỳ trình tự nucleotit mã hóa biến thể của protein màng trong YjeH theo sáng chế mà không giới hạn ở đó. Trong sáng chế, gen mã hóa trình tự axit amin của protein màng trong YjeH là gen *yjeH*, và gen có thể có nguồn gốc từ *Escherichia coli* (*E. coli*), tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Cụ thể, polynucleotit của sáng chế có thể bao gồm các biến đổi khác nhau được thực hiện trong vùng mã hóa được sản xuất không thay đổi trình tự axit amin của polypeptit được biểu hiện từ vùng mã hóa bởi sự thoái biến đơn vị mã hóa (codon) hoặc trong sự xem xét các codon được ưu tiên bởi sinh vật sống trong đó protein được biểu hiện. Cụ thể, bất kỳ trình tự polynucleotit mã hóa biến thể của protein màng trong YjeH trong đó axit amin thứ 92 hoặc 351 được thay thế bằng axit amin khác trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể được bao gồm mà không giới hạn ở đó. Ngoài ra, bất kỳ trình tự mã hóa protein màng trong, trong đó axit amin thứ 92 hoặc 351 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng axit amin khác bằng cách lai hóa với đầu dò được điều chế từ các trình tự gen đã biết, ví dụ, có thể bao gồm các trình tự bổ sung toàn bộ hoặc một phần cho trình tự nucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt mà không bị giới hạn ở đó. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện cho phép lai cụ thể giữa các polynucleotit. Các điều kiện này đã được mô tả cụ thể trong các tài liệu đã biết (ví dụ, J. Sambrook et al.). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện thực hiện lai hóa giữa các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất cao lai với nhau, ví dụ, tối thiểu 40%, tốt hơn là 90%, tốt hơn nữa là 95%, tốt hơn nữa là 97%, và tốt nhất là 99%, mà không thực hiện lai hóa giữa các gen có sự tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên, hoặc thực hiện rửa một lần, tốt hơn là hai đến ba lần ở điều kiện rửa thông thường của lai Southern ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, và 0,1% SDS, tốt hơn là 60°C, 0,1× SSC, 0,1% SDS, và tốt nhất là 68°C, 0,1× SSC, 0,1% SDS.

Sự lai hóa đòi hỏi hai polynucleotit chứa các trình tự bổ sung, mặc dù tùy thuộc vào mức độ nghiêm ngặt của phép lai, sự không khớp giữa các bazơ là có thể. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ của các nucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin được bổ sung với thymin, và xytosin được bổ sung với guanin. Do đó, sáng chế có thể bao gồm đoạn axit nucleic được tách chiết bổ sung với toàn bộ trình tự cũng như trình tự nucleotit giống nhau về cơ bản.

Cụ thể, các polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai nêu trên và sử dụng quá trình lai hóa ở giá trị T_m ở nhiệt độ 55°C. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là nhiệt độ 60°C, 63°C, hoặc 65°C, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây, và có thể được điều chỉnh thích hợp bởi những người

có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy thuộc vào mục đích sử dụng.

Mức độ phù hợp của sự nghiêm ngặt trong lai hóa các polynucleotit có thể tùy thuộc vào các chiều dài của các polynucleotit và mức độ bổ sung và các thông số của chúng đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (Sambrook et al., supra, 9.50–9.51, 11.7–11.8).

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vector chứa polynucleotit mã hóa biến thể của protein màng trong YjeH.

Protein màng trong YjeH, biến thể của nó, và polynucleotit đã mô tả ở trên.

Vector theo sáng chế có thể là cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa polypeptit đích và được liên kết chức năng với vùng điều hòa biểu hiện (trình tự điều hòa biểu hiện) thích hợp để có thể biểu hiện polypeptit đích trong tế bào vật chủ thích hợp. Trình tự điều hòa biểu hiện có thể bao gồm vùng gen khởi động có khả năng bắt đầu phiên mã, trình tự điều khiển bất kỳ để điều hòa phiên mã, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom mARN thích hợp, và trình tự để điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã. Khi tế bào vật chủ thích hợp được biến nạp với vector, vector có thể sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen vật chủ, hoặc có thể tích hợp vào bộ gen của chúng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biểu hiện” bao gồm bất kỳ quá trình liên quan đến sản xuất polypeptit chẳng hạn như phiên mã, sửa đổi sau phiên mã, dịch mã, sửa đổi sau dịch mã, và tạo chất tiết, v.v. tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector biểu hiện” đề cập đến phân tử axit nucleic mạch thẳng hoặc mạch vòng bao gồm trình tự mã hóa và trình tự điều hòa được liên kết chức năng để biểu hiện vector.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được liên kết chức năng” đề cập đến việc đặt trình tự điều hòa vào vị trí thích hợp để điều hòa biểu hiện trình tự mã hóa. Do đó, “được liên kết chức năng” bao gồm sự liên kết giữa vùng điều hòa của miền chức năng có hoạt tính mong muốn hoặc đã biết như vùng gen khởi động, codon kết thúc, trình tự tín hiệu, hoặc chất tăng cường và chất đích (gen hoặc polypeptit) để điều hòa biểu hiện, chất tiết, hoặc chức năng của chất đích phù hợp với hoạt tính mong muốn hoặc đã biết.

Vector được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và bất kỳ vector đã

biết có thể được sử dụng. Các ví dụ của các vector đã biết có thể bao gồm các plasmid, cosmit, virus, và các thể thực khuẩn tái tổ hợp hoặc tự nhiên. Ví dụ, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, và Charon21A có thể được sử dụng như vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmit, và có thể sử dụng các vector dựa trên pBR, dựa trên pUC, dựa trên pBluescriptII, dựa trên pGEM, dựa trên pTZ, dựa trên pCL, và dựa trên pET làm vector plasmid. Cụ thể, có thể sử dụng pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, và pCC1BAC. Cụ thể hơn, vector được sử dụng trong sáng chế có thể là pDCM2 (Fig.1, mã nhận biết SEQ ID NO: 37) được tạo cấu trúc để chèn và thay thế gen trong nhiễm sắc thể của *Corynebacterium*, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó, và bất kỳ vector biểu hiện đã biết có thể được sử dụng.

Ví dụ, polynucleotit mã hóa polypeptit đích có thể được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách sử dụng vector cho việc chèn nhiễm sắc thể vào các tế bào. Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bởi bất kỳ phương pháp nào đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó. Polynucleotit có thể còn bao gồm chỉ dấu chọn lọc để phát hiện việc chèn nhiễm sắc thể. Chỉ dấu chọn lọc được sử dụng để chọn các tế bào được biến nạp với vector, tức là, để xác nhận việc chèn các phân tử axit nucleic mong muốn, và các ví dụ của chỉ dấu chọn lọc có thể bao gồm các chỉ dấu có các kiểu hình có thể lựa chọn, chẳng hạn như khả năng chống chịu thuốc, nhu cầu dinh dưỡng, khả năng chống lại các tác nhân gây độc tế bào, hoặc biểu hiện của polypeptit trên bề mặt. Chỉ các tế bào biểu hiện chỉ dấu chọn lọc mới có thể tồn tại hoặc thể hiện các kiểu hình khác nhau trong môi trường được xử lý bằng chất chọn lọc, và do đó các tế bào đã biến nạp có thể được chọn lọc.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Mã nhận biết SEQ ID NO: 1, protein màng trong YjeH, biến thể của nó, polynucleotit mã hóa biến thể, và vector chứa polynucleotit đã được mô tả ở trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật chứa biến thể của protein màng trong YjeH” đề cập đến vi sinh vật với khả năng tăng cường để sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin được điều chế bằng cách đưa biến thể của protein màng trong YjeH và vi sinh vật có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin yếu. Cụ thể, vi sinh vật là vi sinh vật biểu hiện biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm ít nhất một sự biến đổi axit amin trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và sự biến đổi axit amin có thể bao gồm sự thay thế axit amin thứ 92 hoặc 351 từ đầu N bằng axit amin khác.

Xem xét các mục đích của sáng chế, sản sinh ngoại bào của *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin của vi sinh vật bao gồm ít nhất một biến thể của protein màng trong YjeH; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit tăng so với các vi sinh vật kiểu dại hoặc không biến đổi, và do đó vi sinh vật đặc trưng ở chỗ khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin được tăng cường. Trong khi các vi sinh vật kiểu dại hoặc không biến đổi không thể sản sinh hoặc có thể sản sinh lượng nhỏ *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin có thể được tăng cường theo sáng chế bằng cách tăng lượng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin bằng cách đưa vào biến thể của protein màng trong YjeH; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật không biến đổi” không bao gồm các chủng bao gồm sự đột biến có thể xảy ra tự nhiên trong các vi sinh vật và đề cập đến chủng kiểu dại hoặc vi sinh vật không bao gồm biến thể của protein màng trong YjeH. “Vi sinh vật không biến đổi” có thể được sử dụng thay thế với “chủng trước khi biến đổi”, “vi sinh vật trước khi biến đổi”, “chủng không đột biến”, “vi sinh vật không đột biến”, “chủng không biến đổi”, hoặc “vi sinh vật tham chiếu”.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ protein “được biểu hiện/được biểu hiện” có nghĩa là trạng thái trong đó protein đích được đưa vào hoặc biến đổi để được biểu hiện trong vi sinh vật. Trong trường hợp trong đó protein đích có mặt trong vi sinh vật, hoạt tính của protein có thể được tăng cường so với hoạt tính của protein nội sinh hoặc hoạt tính của protein trước khi biến đổi. Xem xét các mục đích của sáng chế, “protein đích” có thể là biến thể của protein màng trong YjeH nêu trên.

Cụ thể, thuật ngữ “đưa vào protein” đề cập đến cung cấp hoạt tính của protein cụ

thể cho vi sinh vật trong đó ban đầu không có sẵn protein hoặc tăng cường hoạt tính của protein so với hoạt tính nội sinh của protein hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi. Ví dụ, việc đưa vào protein có thể đề cập đến đưa polynucleotit mã hóa protein cụ thể vào nhiễm sắc thể hoặc đưa vector chứa polynucleotit mã hóa protein cụ thể vào vi sinh vật, nhờ đó biểu hiện hoạt tính của protein. Ngoài ra, “tăng cường hoạt tính” có thể có nghĩa là hoạt tính của protein cụ thể của vi sinh vật được tăng cường khi so với hoạt tính nội sinh hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi. Thuật ngữ “hoạt tính nội sinh” có thể đề cập đến hoạt tính của protein cụ thể có sẵn ban đầu bởi chủng bố mẹ hoặc trước khi biến đổi khi vi sinh vật được biến đổi bằng cách biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo.

Cụ thể, việc tăng cường hoạt tính của sáng chế có thể được đạt được bằng cách theo ít nhất một phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm: phương pháp tăng số lượng bản sao của gen mã hóa biến thể protein; phương pháp đưa đột biến vào trình tự điều hòa biểu hiện của gen mã hóa biến thể protein; phương pháp thay thế trình tự điều hòa biểu hiện của gen bằng trình tự mã hóa biến thể protein và có hoạt tính mạnh hơn; phương pháp thay thế gen mã hóa protein màng trong kiểu đại trên nhiễm sắc thể bằng gen mã hóa biến thể protein; phương pháp đưa thêm đột biến vào gen mã hóa biến thể protein để tăng cường hoạt tính của biến thể protein; và phương pháp đưa biến thể protein vào vi sinh vật, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Trong phần mô tả nêu trên, sự tăng lên số lượng bản sao của gen, mặc dù không bị giới hạn cụ thể ở đó, có thể được thực hiện ở trạng thái được liên kết chức năng với vector, hoặc bằng cách được chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ. Cụ thể, việc tăng số lượng bản sao có thể được thực hiện bằng cách đưa vector vào tế bào vật chủ trong đó vector liên kết chức năng với polynucleotit mã hóa protein biến thể theo sáng chế và có thể sao chép và hoạt động bất kể tế bào chủ. Thay vào đó, vector được đưa vào tế bào vật chủ trong đó vector liên kết chức năng với polynucleotit có khả năng chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ. Sự chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ bằng sự tái tổ hợp tương đồng.

Sự biến đổi của trình tự điều hòa biểu hiện để tăng mức biểu hiện của polynucleotit có thể được thực hiện bằng cách, nhưng không bị giới hạn ở, gây đột biến trên trình tự bằng cách xóa, chèn, thay thế bảo thủ, thay thế không bảo thủ, hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng để tăng cường thêm hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện hoặc bằng

cách thay thế trình tự với trình tự có hoạt tính mạnh hơn. Trình tự điều hòa biểu hiện có thể bao gồm nhưng không bị giới hạn ở vùng gen khởi động, trình tự hoạt động, trình tự mã hóa vị trí liên kết với ribosom, và trình tự điều chỉnh sự kết thúc phiên mã và dịch mã.

Vùng gen khởi động mạnh hơn vùng gen khởi động nội tại có thể được liên kết phía trước của bộ phận biểu hiện polynucleotit, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó. Các ví dụ của vùng gen khởi động mạnh hơn đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể bao gồm các vùng gen khởi động từ CJ1 đến CJ7 (patent Hoa Kỳ số US 7662943 B2), vùng gen khởi động lac, vùng gen khởi động trp, vùng gen khởi động trc, vùng gen khởi động tac, vùng gen khởi động Lambda phage PR, vùng gen khởi động PL, vùng gen khởi động tet, vùng gen khởi động gapA, vùng gen khởi động SPL7, vùng gen khởi động SPL13 (sm3) (patent Hoa Kỳ số US 10584338 B2), vùng gen khởi động O2 (patent Hoa Kỳ số US 10273491 B2), vùng gen khởi động tkt, và vùng gen khởi động yccA, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, sự biến đổi của trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách gây đột biến trong trình tự điều hòa biểu hiện bằng cách xóa, chèn, thay thế không bảo thủ, thay thế bảo thủ, hoặc kết hợp của chúng để tăng cường thêm hoạt tính của trình tự polynucleotit, hoặc bằng cách thay thế trình tự nucleotit bằng trình tự nucleotit đã biến đổi để có hoạt tính mạnh hơn, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Việc đưa vào protein và tăng cường hoạt tính có thể tăng lên hoạt tính hoặc nồng độ của protein từ hoạt tính hoặc nồng độ của chủng vi sinh vật kiểu dại hoặc không biến đổi, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Trong sáng chế, vi sinh vật chứa biến thể của protein màng trong YjeH có thể là vi sinh vật tái tổ hợp được điều chế bằng biến nạp sử dụng vector chứa polynucleotit mã hóa biến thể của protein màng trong YjeH, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến quá trình đưa vector chứa polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào vật chủ theo cách mà protein được mã hóa bởi polynucleotit được biểu hiện trong tế bào vật chủ. Polynucleotit được biến nạp có thể dưới dạng được chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ hoặc dưới dạng nằm bên ngoài nhiễm sắc thể miễn là protein được biểu hiện trong tế bào vật chủ. Ngoài

ra, polynucleotit bao gồm ADN và/hoặc ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ ở bất kỳ dạng nào miễn là polynucleotit được đưa vào tế bào vật chủ và protein được biểu hiện trong đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ dưới dạng catxet biểu hiện là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết để tự sao chép. Catxet biểu hiện thông thường có thể bao gồm vùng gen khởi động, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã được liên kết chức năng với polynucleotit. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ ở dạng ban đầu và được liên kết chức năng đến trình tự yêu cầu đối với biểu hiện trong tế bào vật chủ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Các loại vi sinh vật có hoạt tính sản sinh homoserin không bị giới hạn cụ thể miễn là vi sinh vật có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, và cụ thể vi sinh vật có thể là bất kỳ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, chi *Escherichia*, chi *Enterobacter*, chi *Erwinia*, chi *Serratia*, chi *Providencia*, và chi *Brevibacterium*, cụ thể hơn là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Cụ thể hơn, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium crudilactis*, *Corynebacterium deserti*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium stationis*, *Corynebacterium singulare*, *Corynebacterium halotolerans*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium pollutisoli*, *Cxorynebacterium imitans*, *Corynebacterium testudinoris*, hoặc *Corynebacterium flavescens*, và bất kỳ vi sinh vật nào thuộc chi *Corynebacterium* có thể được sử dụng mà không giới hạn ở đó.

Trong sáng chế, chủng bố mẹ của vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó gen làm suy yếu con đường sinh tổng hợp của *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin được bất hoạt thêm hoặc con đường sinh tổng hợp của *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin được tăng cường để tăng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Cụ thể, để bất hoạt gen làm suy yếu con đường sinh tổng hợp của *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, ví dụ, sự biểu hiện của gen *metB* (mã nhận biết SEQ ID NO: 17) mã hóa xystathionin *gamma*-synthaza tham gia vào con đường thoái biến của *O*-axetylhomoserin hoặc gen *metY* (mã nhận biết SEQ ID NO: 22) mã hóa *O*-

axetylhomoserin (thiol)-lyaza tham gia vào con đường thoái biến của *O*-axetylhomoserin có thể được làm suy yếu hoặc bất hoạt.

Để tăng cường con đường sinh tổng hợp của *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, ví dụ, đột biến gen có thể được đưa vào gen *lysC* (mã nhận biết SEQ ID NO: 27) mã hóa aspartokinaza, hoặc biểu hiện của gen *metX* (mã nhận biết SEQ ID NO: 32) mã hóa *O*-axetylhomoserin transferaza có thể được khuếch đại.

Tuy nhiên, phương án không bị giới hạn ở đó, khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin có thể được tăng cường bằng bất kỳ phương pháp đã biết để điều hòa biểu hiện gen.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tăng cường/tăng lên” có nghĩa là bao gồm sự tăng lên trong hoạt tính so với hoạt tính nội sinh.

Sự tăng cường hoặc tăng lên hoạt tính của gen có thể đạt được bằng cách ứng dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ về các phương pháp có thể bao gồm ít nhất một được chọn từ nhóm bao gồm: phương pháp tăng số lượng bản sao của gen; phương pháp đưa đột biến vào trình tự điều hòa biểu hiện của gen; phương pháp thay thế trình tự điều hòa biểu hiện của gen bằng trình tự có hoạt tính mạnh hơn; phương pháp đưa thêm đột biến vào gen để tăng cường hoạt tính của gen; và phương pháp đưa gen ngoại lai vào vi sinh vật; và bất kỳ sự kết hợp của chúng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “bất hoạt” của protein có nghĩa là hoạt tính của protein được làm suy yếu so với hoạt tính nội sinh, hoặc protein không có hoạt tính.

Sự bất hoạt của protein có thể đạt được bằng các phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ về các phương pháp có thể bao gồm: phương pháp xóa một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể bao gồm loại bỏ hoạt tính của protein; phương pháp thay thế gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể với gen đột biến để giảm hoạt tính của enzym; phương pháp đưa đột biến vào trình tự điều hòa biểu hiện của gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể; phương pháp thay thế trình tự điều hòa biểu hiện của gen mã hóa protein bằng trình tự có hoạt tính yếu hoặc không có hoạt tính (ví dụ, phương pháp thay thế vùng gen khởi động của gen bằng vùng gen khởi động yếu hơn vùng gen khởi động nội sinh); phương pháp xóa một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể; phương pháp đưa antisense oligonucleotit (ví dụ,

antisense ARN), ức chế dịch mã từ Marn vào protein thông qua liên kết bổ sung với bản phiên mã của gen trên nhiễm sắc thể; phương pháp làm cho việc gắn vào ribosom không thể thực hiện được bằng cách tạo ra cấu trúc thứ cấp bằng cách thêm trình tự bổ sung vào trình tự Shine–Dalgarno (SD) trên phía sau của trình tự SD của gen mã hóa protein; và phương pháp kỹ thuật phiên mã ngược (reverse transcription engineering: RTE) thêm vùng gen khởi động đối với phiên mã ngược đến đầu 3' của khung đọc mở (open reading frame: ORF) của trình tự tương ứng, và sự kết hợp của chúng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm đích bao gồm nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy, trong đó vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Mã nhận biết SEQ ID NO: 1, protein màng trong YjeH, biến thể của chúng, polynucleotit mã hóa biến thể, vector chứa polynucleotit, và vi sinh vật chứa biến thể đã được mô tả ở trên.

Sản phẩm đích có thể là *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nuôi cấy” đề cập đến việc phát triển vi sinh vật trong môi trường được điều chỉnh thích hợp. Quá trình nuôi cấy theo sáng chế có thể được thực hiện theo môi trường thích hợp và các điều kiện nuôi cấy đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Quá trình nuôi cấy có thể được dễ dàng điều chỉnh để sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo chúng đã chọn. Bước nuôi cấy vi sinh vật có thể được thực hiện theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ có cấp dinh dưỡng, v.v., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “môi trường nuôi cấy” đề cập đến nguyên liệu trong đó các chất dinh dưỡng cần thiết để nuôi cấy vi sinh vật được trộn làm các thành phần chính và cung cấp các chất dinh dưỡng và các yếu tố tăng trưởng cũng như nước cần thiết cho sự tồn tại và tăng trưởng. Cụ thể, mặc dù môi trường nuôi cấy và các điều

kiện nuôi cấy khác để nuôi cấy vi sinh vật của sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là môi trường nuôi cấy thường được sử dụng trong nuôi cấy các vi sinh vật, vi sinh vật của sáng chế có thể được nuôi cấy trong môi trường thông thường chứa các nguồn carbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, các hợp chất vô cơ, các axit amin, và/hoặc các vitamin trong các điều kiện hiếu khí trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH, và tương tự.

Theo sáng chế, có thể sử dụng các nguồn carbon, cacbohydrat chẳng hạn như glucoza, fructoza, sucroza, và maltoza; rượu đường như mannitol và sorbitol; các axit hữu cơ như axit pyruvic, axit lactic, và axit xitric; và các axit amin như axit glutamic, methionin và lysin. Ngoài ra, có thể sử dụng các chất dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên như dịch thủy phân tinh bột, mật đường, mật đường đen, cám gạo, sắn, bã mía, và dịch chiết ngô, và có thể sử dụng các loại hydrat carbon cụ thể như glucoza và mật đường đã xử lý trước vô trùng (tức là, mật đường được chuyển hóa thành đường giảm), và các lượng thích hợp của bất kỳ nguồn carbon nào khác cũng có thể được sử dụng mà không bị giới hạn ở đó. Các nguồn carbon này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp ít nhất hai nguồn carbon.

Như các nguồn nitơ, có thể sử dụng các nguồn nitơ vô cơ như amoniac, amoni sulfat, amoni clorua, amoni axetat, amoni phosphat, amoni carbonat, và amoni nitrat; và các nguồn nitơ hữu cơ như các axit amin, ví dụ, axit glutamic, methionin, và glutamin, pepton, NZ-amin, cao thịt, dịch chiết nấm men, cao mạch nha, dịch chiết ngô, thủy phân casein, cá hoặc các sản phẩm phân hủy của chúng, và bánh đậu tương đã khử chất béo hoặc các sản phẩm thoái biến của chúng. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp ít nhất hai nguồn nitơ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Như các nguồn phospho, có thể sử dụng monokali phosphat, đikali phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng với chúng. Như các hợp chất vô cơ, có thể sử dụng natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sulfat, sulfat sắt, sulfat mangan, canxi cacbonat, và tương tự. Ngoài ra, các axit amin, vitamin và/hoặc các tiền chất thích hợp cũng có thể được đưa vào. Môi trường nuôi cấy và các tiền chất này có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy theo mẻ hoặc nuôi cấy liên tục, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật, các hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, và axit phosphoric có thể được thêm

thích hợp vào môi trường nuôi cấy để điều chỉnh độ pH của môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, chất khử bọt như axit béo polyglycol este có thể được thêm vào trong quá trình nuôi cấy để ngăn chặn sự tạo thành bọt. Ngoài ra, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy để duy trì môi trường nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí, và các khí nitơ, hydro, hoặc khí carbon đioxit có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy để duy trì môi trường nuôi cấy trong các điều kiện kỵ khí và điều kiện vi hiếu khí mà không cần bơm bất kỳ khí nào khác vào đó, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy có thể được duy trì ở nhiệt độ 25°C đến 50°C, tốt hơn là 30°C đến 37°C, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó. Việc nuôi cấy có thể tiếp tục cho đến khi thu được lượng sản phẩm mong muốn, tốt hơn là từ 10 giờ đến 100 giờ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Sản phẩm đích được sản xuất bằng cách nuôi cấy có thể được sản sinh vào môi trường nuôi cấy hoặc giữ lại trong các tế bào.

Phương pháp có thể còn bao gồm bước thu hồi sản phẩm đích từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật.

Bước thu hồi sản phẩm đích đã sản xuất trong bước nuôi cấy có thể được thực hiện bằng cách thu gom sản phẩm đích từ việc nuôi cấy sử dụng phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo phương pháp nuôi cấy. Ví dụ, có thể sử dụng phương pháp ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi ion, kết tinh, và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography-HPLC), và axit amin đích có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp thích hợp trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó. Môi trường nuôi cấy còn có thể được gọi là canh thịt nuôi cấy.

Ngoài ra, bước thu hồi có thể còn bao gồm quá trình tinh chế có thể được thực hiện sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Do đó, sản phẩm đích đã thu hồi có thể dưới dạng tinh chế hoặc canh thịt lên men của vi sinh vật bao gồm sản phẩm đích (*Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering*, A. J. Nair., 2008).

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất methionin, phương pháp này bao gồm: sản xuất *O*-axetylhomoserin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy; và chuyển đổi *O*-axetylhomoserin thành methionin bằng cách phản

ứng *O*-axetylhomoserin với sulfua, trong đó vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Mã nhận biết SEQ ID NO: 1, protein màng trong YjeH, biến thể của chúng, polynucleotit mã hóa biến thể, vector chứa polynucleotit, vi sinh vật chứa biến thể, và *O*-axetylhomoserin đã được mô tả ở trên.

Trong sáng chế, *O*-axetylhomoserin như tiền chất methionin có thể được chuyển đổi thành methionin thông qua phản ứng với sulfua.

Phản ứng với sulfua đề cập đến quá trình tạo ra L-methionin từ *O*-suxinylhomoserin sử dụng bất kỳ phương pháp đã biết. Ví dụ, L-methionin có thể được sản xuất bằng cách phản ứng methyl mercaptan như sulfua với *O*-axetylhomoserin. Ngoài ra, chất xúc tác hoặc enzym có thể được thêm vào hoặc phản ứng có thể được thực hiện trong vi sinh vật bao gồm enzym để tăng tốc độ phản ứng và tăng sản lượng.

“Sulfua” có thể là, ví dụ, methyl mercaptan, và methyl mercaptan có thể là bất kỳ dẫn xuất methyl mercaptan có khả năng cung cấp các nguyên tử lưu huỳnh như đimetylsulfua (DMS) được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 2010/098629 cũng như natri methyl mercaptan ($\text{CH}_3\text{S}-\text{Na}$) trong pha lỏng và methyl mercaptan (CH_3SH) ở trạng thái khí hoặc lỏng.

Như enzym được sử dụng trong phản ứng chuyển đổi methionin, có thể sử dụng xystathionin- γ -synthaza, *O*-axetylhomoserin sulfhydrylaza, hoặc *O*-suxinylhomoserin sulfhydrylaza đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Quá trình của phản ứng chuyển đổi methionin của sáng chế có thể được thể hiện dưới dạng phương trình phản ứng sau:



Trong phản ứng này, gốc CH_3S của methyl mercaptan được thay thế bằng gốc axetat của *O*-axetylhomoserin để sản xuất L-methionin.

Phản ứng có thể được thực hiện ở nhiệt độ 20°C đến 45°C trong khi duy trì độ pH

của môi trường phản ứng trong phạm vi 6 đến 7, và pyridoxal 5'-phosphat có thể thêm vào như coenzym.

Sự chuyển đổi của tiền chất L-methionin vào L-methionin trong sự có mặt của methyl mercaptan là phản ứng enzym và được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 2008/013432. Công bố đơn quốc tế số WO 2008/013432 bộc lộ thông tin chi tiết về các đặc tính và điều chế các enzym chuyển đổi methionin có hoạt tính thích hợp để chuyển hóa tiền chất L-methionin thành L-methionin trong sự có mặt của methyl mercaptan. Enzym chuyển đổi methionin thích hợp này có thể được điều chế sử dụng biểu hiện gen theo các phương pháp công nghệ sinh học.

Trình tự của gen mã hóa enzym có hoạt tính chuyển đổi có thể thu được từ, nhưng không giới hạn ở, cơ sở dữ liệu của NCBI (Hoa Kỳ) và ngân hàng ADN (KEGG, Nhật Bản). Đối với sự chuyển đổi sinh học, gen có thể được nhân dòng từ trình tự gen thu được, và sau đó được đưa vào vector biểu hiện. Cụ thể, gen có thể được biểu hiện dưới dạng hoạt động từ vector pCL-CJI (CJ, Hàn Quốc) là vector biểu hiện đối với *E. coli* trong các chủng tái tổ hợp, và protein được biểu hiện có thể thu được từ dung dịch enzym trong đó các tế bào đã phá vỡ sử dụng sóng âm thanh (sonicated) được ly giải. Cả hai chủng biểu hiện enzym chuyển đổi methionin và enzym chuyển đổi methionin được biểu hiện có thể được sử dụng trực tiếp trong phản ứng chuyển đổi methionin.

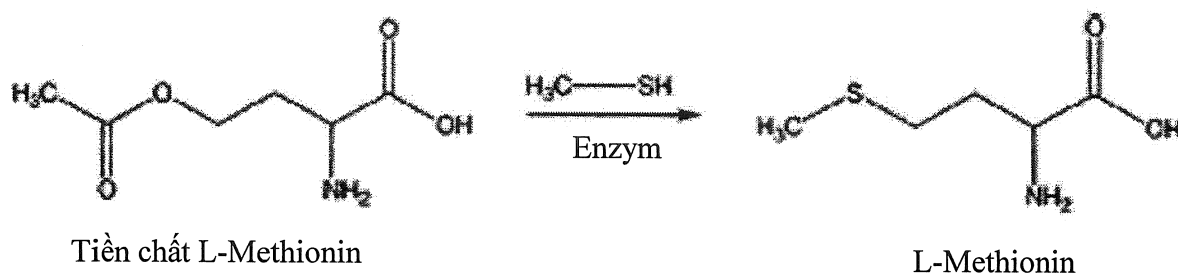
Enzym chuyển đổi methionin được biểu hiện từ gen hoặc chủng vi sinh vật biểu hiện enzym có thể được trộn trực tiếp, một phần hoặc toàn bộ với phần nổi lên men hoặc canh thịt lên men trong đó tiền chất L-methionin được tích lũy để bắt đầu phản ứng. Tức là, phản ứng có thể được bắt đầu bằng cách thêm enzym chuyển đổi methionin hoặc chủng vi sinh vật biểu hiện enzym vào dung dịch lên men trong đó *O*-axetylhomoserin được tích lũy và thêm methyl mercaptan vào đó.

Cụ thể, *O*-axetylhomoserin được tích lũy trong dung dịch lên men có thể được chuyển đổi thành L-methionin bằng xystathionin- γ -synthaza, *O*-axetylhomoserin sulfhydrylaza, hoặc *O*-suxinyl homoserin sulfhydrylaza.

Phản ứng chuyển đổi methionin có thể được xác nhận bằng cách sử dụng DTNB (5,5-dithiobis(2-nitro-benzoic axit), Sigma, Hoa Kỳ), và sản phẩm phản ứng có thể được phân tích bằng HPLC. Trong quá trình phản ứng methionin chuyển đổi, các sản phẩm phụ như axit axetic có thể được thu thêm thông qua phản ứng giữa methyl mercaptan và

O-axetylhomoserin mà không cần quá trình sản xuất riêng biệt.

Phản ứng enzym giữa tiền chất L-methionin và metyl mercaptan có thể được thể hiện bằng phương trình phản ứng sau:



Phương pháp sản xuất methionin có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật trong các điều kiện nuôi cấy tối ưu đã biết và các điều kiện kích hoạt enzym. Các phương pháp và môi trường nuôi cấy cụ thể như đã mô tả ở trên.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất glufosinat, trong đó phương pháp này bao gồm: sản xuất *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy; và chuyển đổi *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin thành glufosinat, trong đó vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc ii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Mã nhận biết SEQ ID NO: 1, protein màng trong YjeH, biến thể của nó, polynucleotit mã hóa biến thể, vector chứa polynucleotit, vi sinh vật chứa biến thể, và homoserin đã mô tả ở trên.

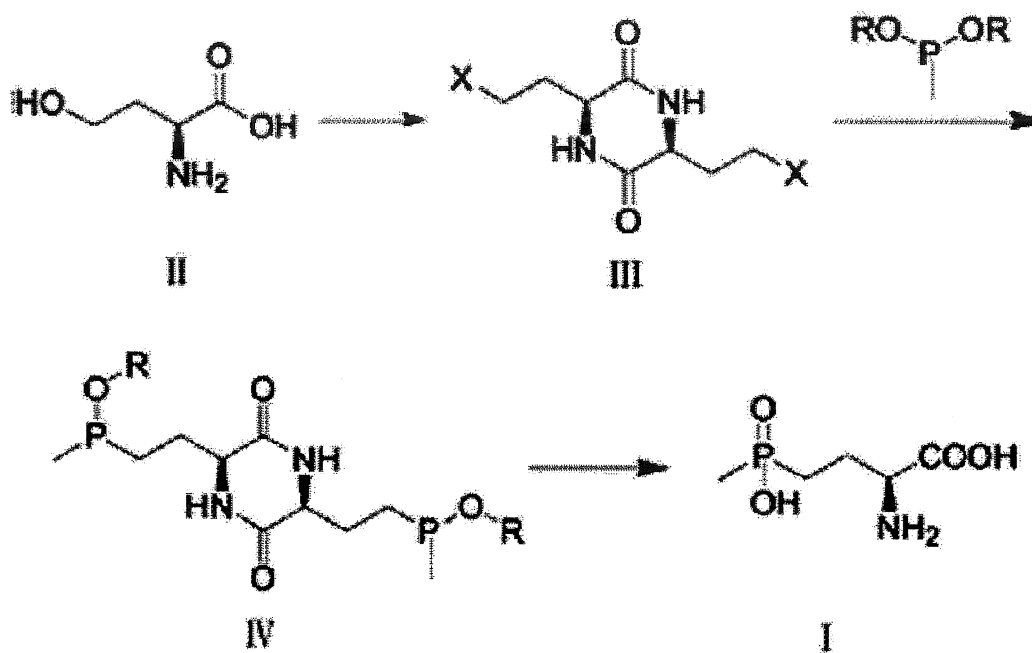
Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “glufosinat” đề cập đến một loạt các chất diệt cỏ tự nhiên được tạo ra bởi một số loài vi khuẩn đất *Streptomyces*, và còn được gọi là phosphinothrixin.

Trong sáng chế, *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin có thể được chuyển đổi thành glufosinat thông qua nhiều bước bao gồm halogen hoá.

Phản ứng chuyển đổi glufosinat đã được bộc lộ, ví dụ, trong công bố đơn patent

Trung Quốc số CN 108516991 A. Cụ thể, phản ứng glufosinat chuyển đổi có thể bao gồm: (1) bước thực hiện sự khử nước đồng sôi của homoserin (công thức II) sử dụng dung môi hữu cơ trong sự có mặt của chất xúc tác có tính axit; và bước thêm chất halogen hoá vào homoserin đã khử nước đồng sôi và thực hiện halogen hoá để thu được L-3,6-bis(2-haloetyl)-2,5-dion piperazin (công thức III); (2) bước thêm metylphosphinic axit dieste hoặc metyl phosphit dieste vào L-3,6-bis(2-haloetyl)-2,5-dion piperazin và thực hiện phản ứng Abbov sử dụng dung môi sôi cao trong sự có mặt của chất xúc tác để thu được hợp chất có công thức IV; và (3) bước thực hiện phản ứng thủy phân bằng cách hòa tan hợp chất có công thức IV trong axit và đun nóng dung dịch, loại bỏ dung môi sau khi kết thúc phản ứng, thêm rượu vào, và thực hiện phản ứng chuyển đổi bằng cách thêm alkylen oxit vào để thu được glufosinat (công thức I).

Phản ứng chuyển đổi glufosinat sử dụng homoserin làm tiền chất có thể được thể hiện bằng phương trình phản ứng sau:



Phương pháp sản xuất glufosinat có thể được thực hiện bằng cách sử dụng homoserin được điều chế bằng cách lên men sinh học như tiền chất theo sáng chế. Glufosinat có thể được sản xuất bằng cách điều chế L-3,6-bis(2-haloetyl)-2,5-dion piperazin bằng phản ứng với metylphosphonium bằng cách khử nước azeotropic và halogen hóa, thực hiện phản ứng Abbov, và sau đó thực hiện phản ứng thủy phân nêu trên.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm sản xuất homoserin bao gồm vi sinh vật hoặc nuôi cấy vi sinh vật, trong đó vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm sản xuất *O*-axetylhomoserin bao gồm vi sinh vật hoặc dịch nuôi cấy vi sinh vật, trong đó vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Mã nhận biết SEQ ID NO: 1, protein màng trong YjeH, biến thể của nó, polynucleotit mã hóa biến thể, vector chứa polynucleotit, vi sinh vật chứa biến thể, homoserin, và *O*-axetylhomoserin đã được mô tả ở trên.

Chế phẩm sản xuất *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin có thể đề cập đến chế phẩm được sử dụng để sản xuất *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin bằng biến thể của protein màng trong YjeH theo sáng chế. Chế phẩm có thể bao gồm biến thể của protein màng trong YjeH hoặc thành phần có khả năng làm hoạt động biến thể của protein màng trong YjeH mà không giới hạn ở đó. Biến thể của protein màng trong YjeH có thể ở dạng chèn vào vector có khả năng biểu hiện gen liên kết chức năng trong tế bào chủ.

Chế phẩm có thể còn bao gồm chất bảo quản đông lạnh (cryoprotectant) hoặc tá dược. Chất bảo quản đông lạnh hoặc tá dược có thể là chất tự nhiên hoặc chất không xuất hiện tự nhiên, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó. Ví dụ khác, chất bảo quản đông lạnh hoặc tá dược có thể là chất mà vi sinh vật không tự nhiên tiếp xúc với hoặc chất không tự nhiên có trong vi sinh vật, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng biến thể của protein màng trong YjeH để sản xuất *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng vi sinh vật để sản xuất *O*-

axetylhomoserin hoặc homoserin, trong đó vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1; polynucleotit mã hóa biến thể; và vector chứa polynucleotit.

Homoserin, *O*-axetylhomoserin, protein màng trong YjeH, biến thể của nó, polynucleotit mã hóa biến thể, vector chứa polynucleotit và vi sinh vật chứa biến thể đã được mô tả ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa trên các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ sau đây chỉ được mô tả để minh họa cho sáng chế, và phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ 1: Cấu trúc của plasmit

Plasmit (pDCM2, được thể hiện trên Fig.1, mã nhận biết SEQ ID NO: 37) được thiết kế để chèn và thay thế gen trong nhiễm sắc thể *Corynebacterium* và được tổng hợp bằng cách sử dụng dịch vụ tổng hợp gen của Bionics Co., Ltd. Plasmit được thiết kế để chứa enzym giới hạn hiệu quả để nhân dòng dựa trên bài báo liên quan đến hệ thống *sacB* thông thường đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (*Gene*, 145 (1994) 69–73). Plasmit pDCM2 được tổng hợp có các đặc tính sau đây.

- 1) Do nguồn gốc sao chép chỉ hoạt động trong *E. coli*, plasmit tự sao chép chỉ trong *E. coli* và không thể tự sao chép trong *Corynebacterium*.
- 2) Plasmit chứa gen kháng kanamycin như chỉ dấu chọn lựa.
- 3) Plasmit chứa gen Levan sucroza (*sacB*) như chỉ dấu chọn lựa tích cực thứ cấp.
- 4) Không có thông tin gen có nguồn gốc từ plasmit pDCM2 vẫn còn trong chủng được điều chế cuối cùng.

Ví dụ 2: Cấu trúc của các chủng được đưa vào với protein màng ngoại sinh biến thể (YjeH) và đánh giá khả năng sản sinh *O*-Axetylhomoserin và Homoserin

Ví dụ 2-1. Cấu trúc của các chủng được đưa vào với protein màng ngoại sinh (YjeH)

và biến thể YjeH

Để đánh giá hiệu quả của YjeH được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 như protein màng ngoại sinh và protein sản sinh *O*-axetylhomoserin, vector để chèn nhiễm sắc thể bao gồm gen *yjeH* (mã nhận biết SEQ ID NO: 2) mã hóa YjeH có nguồn gốc từ *E. coli* được điều chế.

Cụ thể, để tạo cấu trúc vector xóa transposaza, cặp mồi (các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5) để khuếch đại vùng phía trước 5' và cặp mồi (các mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7) để khuếch đại vùng phía sau 3' đối với gen mã hóa transposaza (mã nhận biết SEQ ID NO: 3, gen số NCgl2335) được thiết kế. Cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 được thiết kế để bắt chéo với nhau. Enzym giới hạn trình tự *Sma*I được bố trí trong vùng này. Các trình tự đoạn mồi được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

SEQ ID NO:	Tên trình tự	Trình tự
SEQ ID NO: 4	Tn_5 F	tgaattcgagctcggtacccCACCGACGCGCATCTGCCT
SEQ ID NO: 5	Tn_5 R	GGTGTGGTGACTTTCAGCAGTTCCCGGGGGGGG AGGAGGCATGTGGTGTG
SEQ ID NO: 6	Tn_3 F	CAACACCACATGCCTCCTCCCCCGGGAAC GCTGAAAGTCACCACACC
SEQ ID NO: 7	Tn_3 R	gtcgactctagaggatccccCTCCCAAACCATGAGGAAT GG

Phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (PCR: Polymerase Chain Reaction) được thực hiện sử dụng nhiễm sắc thể của (WT) ATCC13032 kiểu dại làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5 và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7. PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây được lặp lại, và sau đó thực hiện kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được các đoạn ADN 851 bp của vùng phía trước 5' và 847 bp của vùng phía sau 3' đối với vùng xóa gen NCgl2335.

PCR được thực hiện sử dụng hai đoạn ADN được khuếch đại làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 7. PCR được thực hiện

trong các điều kiện sau đây. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây được lặp lại, và sau đó thực hiện kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN 1648 bp bao gồm vùng có khả năng xóa gen mã hóa transposaza (mã nhận biết SEQ ID NO: 3, gen số NCgl2335) được khuếch đại.

Các sản phẩm PCR thu được được nhân bản gắn dòng sử dụng vector pDCM2 được xử lý với enzym giới hạn SmaI và bộ kit nhân dòng In-Fusion® HD (Clontech). *E. coli* DH5α được biến nạp với vector được nhân dòng, và *E. coli* được biến nạp được xét nghiệm kính phết trong môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Lựa chọn các khuẩn lạc được biến nạp với plasmit được chèn với gen đích bằng PCR, và plasmit thu được bằng phương pháp tách chiết plasmit. Cuối cùng, vector tái tổ hợp pDCM2-ΔNCgl2335 bao gồm catxet xóa NCgl2335 đã nhân dòng được tạo cấu trúc.

Để đánh giá hiệu quả của protein sản sinh *O*-axetylhomoserin, vector để chèn nhiễm sắc thể bao gồm gen (mã nhận biết SEQ ID NO: 2) mã hóa YjeH có nguồn gốc từ *E. coli* được điều chế. Đối với vấn đề này, vector biểu hiện gen *yjeH* được tạo cấu trúc sử dụng vùng gen khởi động CJ7 (mã nhận biết SEQ ID NO: 8, patent Hoa Kỳ số 7662943 B2). Cặp mồi (các mã nhận biết SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10) để khuếch đại vùng gen khởi động CJ7 và cặp mồi (các mã nhận biết SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12) để khuếch đại vùng *yjeH* của *E. coli* được thiết kế. Các trình tự đoạn mồi được thể hiện trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

SEQ ID NO:	Tên trình tự	Trình tự
SEQ ID NO: 9	CJ7_yjeH F	ACACCACATGCCTCCTCcccAGAAACATCCC AGCGCTAC
SEQ ID NO: 10	CJ7_yjeH R	AGTTCTTGTTTGAGTCCACTCATAGTGTTT CCTTTCGTTGGGT
SEQ ID NO: 11	yjeH F	ACCCAACGAAAGGAAACACTATGAGTGGA CTCAAACAAGAACTG
SEQ ID NO: 12	yjeH R	GACTTTCAGCAGTTcccgggTTATGTGGTTAT GCCATTTTCCGG

PCR được thực hiện sử dụng pECCG117-PCJ7-gfp (patent Hoa Kỳ số 7662943 B2) làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10 và

PCR được thực hiện sử dụng nhiễm sắc thể của *E. coli* kiểu dại làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết tương ứng SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12. PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây được lặp lại, và sau đó thực hiện kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được đoạn ADN 360 bp của vùng gen khởi động CJ7 và đoạn ADN 1297 bp của gen *yjeH* của *E. coli*.

PCR được thực hiện sử dụng hai đoạn ADN được khuếch đại làm mạch khuôn cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 12. PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây được lặp lại, và sau đó thực hiện kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN 1614 bp bao gồm vùng trong đó vùng gen khởi động CJ7 và gen *yjeH* đã chèn được khuếch đại.

Đoạn ADN xóa gen thu được bằng PCR được nhân dòng với vector pDCM2- Δ NCgl2335 được xử lý với enzym giới hạn SmaI sử dụng bộ kit nhân dòng In-Fusion® HD (Clontech). Cuối cùng, vector tái tổ hợp pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-*yjeH* (eco, WT) được tạo cấu trúc.

Cụ thể, phenylalanin (Phe) là axit amin thứ 92 của trình tự axit amin của YjeH được thay thế bằng asparagin (Asn) (F92N) sử dụng pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-*yjeH* (eco, WT) làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14. Plasmid đã tạo cấu trúc bao gồm gen mã hóa biến thể YjeH (F92N) được gọi là pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-*yjeH* (eco, F92N).

Ngoài ra, phenylalanin (Phe) là axit amin thứ 351 của trình tự axit amin của YjeH được thay thế bằng leuxin (F351L) sử dụng plasmid pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-*yjeH* (eco, WT) làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16. Plasmid đã tạo cấu trúc bao gồm gen mã hóa biến thể YjeH (F351L) được gọi là pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-*yjeH* (eco, F351L). Các trình tự đoạn mồi được thể hiện trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

SEQ ID NO:	Tên trình tự	Trình tự
SEQ ID NO: 13	F92N F	CGGCTGGCTGAATTTATCGGTCA
SEQ ID NO: 14	F92N R	TGACCGATAAATTCAGCCAGCCG
SEQ ID NO: 15	F351L F	CAATGGCATCCTTATTATGATTT
SEQ ID NO: 16	F351L R	AAATCATAATAAGGATGCCATTG

Chủng ATCC13032 được biến nạp với mỗi pDCM2- Δ NCgl2335, pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT), pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N), và pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L) đã tạo cấu trúc sử dụng phương pháp xung điện và thực hiện quá trình bắt chéo thứ cấp để thu được ATCC13032 Δ NCgl2335, ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT), ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N), và ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L) trong đó gen NCgl2335 được xóa khỏi nhiễm sắc thể. Việc chèn gen NCgl2335 bất hoạt và mới được đưa vào gen *E. coli yjeH* được xác định bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 7 và so sánh các kết quả với kết quả của ATCC13032 trong đó gen NCgl2335 không bị bất hoạt.

Ví dụ 2-2. Đánh giá khả năng sản sinh *O*-Axetylhomoserin

Để so sánh hoạt tính sản sinh *O*-axetylhomoserin (*O*-AH) của ATCC13032 Δ NCgl2335, ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT), ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N), và ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L) được tạo cấu trúc trong ví dụ 2-1 với hoạt tính sản sinh của chủng kiểu đại ATCC13032, *O*-axetylhomoserin có trong môi trường nuôi cấy được phân tích theo phương pháp sau đây.

Vòng lặp cấy của từng chủng được cấy chuyển vào trong bình tam giác 250 ml chứa 25 ml môi trường dưới đây và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 33°C trong 20 giờ ở tốc độ 200 vòng/phút. Các nồng độ của *O*-axetylhomoserin được phân tích sử dụng HPLC, và các nồng độ phân tích được thể hiện trong bảng 4.

Môi trường sản xuất *O*-Axetylhomoserin (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) dịch chiết ngô (CSL, Sigma), 0,5 g MgSO₄·7H₂O, và 20 g CaCO₃ (trong 1 L nước cất)

Bảng 4

Tên chủng	<i>O</i> -Axetylhomoserin (g/L)
-----------	---------------------------------

ATCC13032	0,3
ATCC13032 Δ NCgl2335	0,3
ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT)	0,7
ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N)	1,2
ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L)	1,0

Kết quả là, xác nhận rằng *O*-axetyl-L-homoserin được tích lũy với nồng độ 0,3 g/L khi ATCC13032 làm đối chứng được nuôi cấy, và sự sản sinh *O*-axetyl-L-homoserin không bị ảnh hưởng bằng việc xóa gen NCgl2335 (transposaza), như được thể hiện ở bảng 4. Cụ thể, xác nhận rằng *O*-axetyl-L-homoserin được tích lũy với nồng độ 0,7 g/L khi gen kiểu dại *yjeH* được biểu hiện, và *O*-axetyl-L-homoserin được tích lũy với các nồng độ 1,2 g/L và 1,0 g/L khi biến thể các gen *yjeH* được biểu hiện.

Do đó, dựa trên các kết quả được thể hiện ở trên, xác nhận rằng các gen kiểu dại và biến thể *yjeH* của sáng chế tăng đáng kể sự sản sinh axit amin được quan tâm bằng cách xuất khẩu *O*-axetylhomoserin từ ATCC13032.

Các chủng ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N) và ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L) được gọi tương ứng là *Corynebacterium glutamicum* CM04-0651 và *Corynebacterium glutamicum* CM04-0652, và được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc theo Hiệp ước Budapest vào ngày 04 tháng 12 năm 2019, với các số lưu chủng KCCM12633P và KCCM12634P, tương ứng.

Ví dụ 2-3. Đánh giá khả năng sản sinh homoserin

Để so sánh hoạt tính sản sinh homoserin của ATCC13032 Δ NCgl2335, ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT), ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N), và ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L) được tạo cấu trúc trong ví dụ 2-1 với hoạt tính sản sinh của chủng kiểu dại ATCC13032, homoserin có trong môi trường nuôi cấy được phân tích theo phương pháp sau đây.

Vòng lặp cấy của từng chủng được cấy chuyển vào trong bình tam giác 250 ml chứa 25 ml môi trường dưới đây và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 33°C trong 20 giờ ở tốc độ 200 vòng/phút. Các nồng độ của homoserin được phân tích sử dụng HPLC, và các nồng độ phân tích được thể hiện trong bảng 5.

Môi trường sản xuất homoserin (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) dịch

chiết ngô (CSL, Sigma), 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, và 20 g CaCO_3 (trong 1 L nước cất)

Bảng 5

Tên chủng	Homoserin (g/L)
ATCC13032	0,0
ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335}$	0,0
ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335}::\text{PCJ7-yjeH}$ (eco, WT)	0,0
ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335}::\text{PCJ7-yjeH}$ (eco, F92N)	0,2
ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335}::\text{PCJ7-yjeH}$ (eco, F351L)	0,2

Kết quả là, xác nhận rằng homoserin không được tích lũy với nồng độ 0,0 g/L khi ATCC13032 làm đối chứng được nuôi cấy, và sự sản sinh homoserin không bị ảnh hưởng bằng việc xóa gen NCgl2335 (transposaza) như được thể hiện ở bảng 5. Cụ thể, cũng xác nhận rằng homoserin không được tích lũy với nồng độ 0,0 g/L khi gen kiểu dại *yjeH* được biểu hiện, và homoserin được tích lũy với các nồng độ 0,2 g/L và 0,2 g/L khi các gen *yjeH* biến thể được biểu hiện.

Do đó, dựa trên các kết quả được thể hiện ở trên, xác nhận rằng gen *yjeH* biến thể của sáng chế làm tăng sản sinh axit amin được quan tâm bằng cách sản sinh homoserin từ ATCC13032.

Ví dụ 3: Cấu trúc của chủng với khả năng tăng cường sản sinh *O*-Axetylhomoserin và khả năng đánh giá sản sinh *O*-Axetylhomoserin và Homoserin

Ví dụ 3-1. Sự bất hoạt của xystathionin *Gamma* (γ)-synthaza (MetB)

Thông qua PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn, thu được gen *metB* mã hóa xystathionin γ -synthaza tham gia vào con đường thoái biến của *O*-axetylhomoserin. Thông tin trên trình tự nucleotit của gen *metB* (NCBI số NCgl2360 , mã nhận biết SEQ ID NO: 17) thu được từ Ngân hàng gen của Viện Y tế Quốc gia (Hoa Kỳ), và cặp môi (các mã nhận biết SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19) bao gồm đầu N của gen *metB* và chất liên kết và cặp môi (các mã nhận biết SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 21) bao gồm đầu C và chất liên kết được tổng hợp dựa trên đó. Các trình tự đoạn môi được thể hiện trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

SEQ ID NO	Tên trình tự	Trình tự
-----------	--------------	----------

SEQ ID NO: 18	metB_N_del F	TCTAGACGCCCCGCATACTGGCTTC
SEQ ID NO: 19	metB_N_del R	CCCATCCACTAAACTTAAACAGATGTGATCGCCCCGGC
SEQ ID NO: 20	metB_C_del F	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGGAAGAAC CACCCAGGCC
SEQ ID NO: 21	metB_C_del R	GTCGACCAATCGTCCAGAGGGCG

PCR được thực hiện sử dụng ADN nhiễm sắc thể của ATCC13032 làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19 và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 21. ADN polymeraza có độ tin cậy cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza, và PCR được thực hiện bằng cách lặp lại 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 96°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút. Kết quả tương ứng là, thu được gen 558 bp được khuếch đại chứa đầu N của gen *metB* và chất liên kết và gen 527 bp được khuếch đại chứa đầu C của gen *metB* và chất liên kết.

PCR được thực hiện sử dụng hai gen được khuếch đại thu được như mô tả ở trên làm mạch khuôn bằng cách lặp lại 10 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 96°C trong 60 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 50°C trong 60 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút, và sau đó thêm cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 21 vào đó, tiếp theo kéo dài 20 lần. Kết quả là, thu được catxet bất hoạt 1064 bp bao gồm đầu N-chất liên kết-đầu C của gen *metB*. Các sản phẩm PCR thu được được xử lý với các enzym giới hạn XbaI và SalI và được gắn với pDCM2 vector được xử lý với các enzym giới hạn XbaI và SalI để nhân dòng để cuối cùng tạo cấu trúc vector tái tổ hợp pDCM2- Δ metB được nhân dòng với catxet bất hoạt metB.

ATCC13032 được biến nạp với vector tạo cấu trúc pDCM2- Δ metB sử dụng phương pháp xung điện và thực hiện quá trình bất chéo thứ cấp để thu được ATCC13032 Δ metB trong đó gen *metB* được bất hoạt trong nhiễm sắc thể. Gen *metB* bất hoạt cuối cùng được xác nhận bằng cách so sánh với ATCC13032 trong đó gen *metB* không được bất hoạt sau khi thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 21.

Ví dụ 3-2. Sự bất hoạt *O*-Acetylhomoserin (thiol)-lyaza (MetY)

Thông qua PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn, thu được gen *metY* mã hóa *O*-acetylhomoserin (thiol)-

lyaza tham gia vào con đường thoái biến của *O*-axetylhomoserin. Thông tin trên trình tự nucleotit của gen *metY* (NCBI số Ncgl0625, mã nhận biết SEQ ID NO: 22) thu được từ Ngân hàng gen của Viện Y tế Quốc gia (Hoa Kỳ), và cặp mồi (các mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24) bao gồm đầu N của gen *metY* và chất liên kết và cặp mồi (các mã nhận biết SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26) bao gồm đầu C và chất liên kết được tổng hợp dựa trên đó. Các trình tự đoạn mồi được thể hiện trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

SEQ ID NO	Tên trình tự	Trình tự
SEQ ID NO: 23	metY_N_del F	TCTAGACCATCCTGCACCATTTAG
SEQ ID NO: 24	metY_N_del R	CCCATCCACTAAACTTAAACACGCTC CTGCCAGGTTC
SEQ ID NO: 25	metY_C_del F	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCTTGGT ACGCAACCAAGG
SEQ ID NO: 26	metY_C_del R	GTCGACGATTGCTCCGGCTTCGG

PCR được thực hiện sử dụng ADN nhiễm sắc thể của ATCC13032 làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24 và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26. ADN polymeraza có độ tin cậy cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza, và PCR được thực hiện bằng cách lặp lại 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 96°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút. Kết quả là, thu được tương ứng gen 548 bp khuếch đại chứa đầu N của gen *metY* và chất liên kết và gen 550 bp khuếch đại chứa đầu C của gen *metY* và chất liên kết. PCR được thực hiện sử dụng hai gen khuếch đại thu được như đã mô tả ở trên làm mạch khuôn bằng cách lặp lại 10 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 96°C trong 60 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 50°C trong 60 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút, và sau đó thêm cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 26 vào đó, tiếp theo kéo dài 20 lần. Kết quả là, thu được catxet bất hoạt 1077 bp bao gồm đầu N–chất liên kết–đầu C của gen *metY*. Các sản phẩm PCR thu được được xử lý với các enzym giới hạn XbaI và SalI và được gắn với vector pDCM2 được xử lý với các enzym giới hạn XbaI và SalI để nhân dòng để cuối cùng tạo cấu trúc vector tái tổ hợp pDCM2- Δ metY được nhân dòng với catxet bất hoạt *metY*.

Chủng ATCC13032 Δ metB được biến nạp với vector pDCM2- Δ metY đã tạo cấu

trúc sử dụng phương pháp xung điện và thực hiện quá trình bắt chéo thứ cấp để thu được ATCC13032 $\Delta metB \Delta metY$ trong đó gen *metY* được bất hoạt trong nhiễm sắc thể. Gen *metY* đã bất hoạt cuối cùng được xác nhận bằng cách so sánh với ATCC13032 trong đó gen *metY* không được bất hoạt sau khi thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 26.

Ví dụ 3-3. Sự đưa vào biến thể Aspartokinaza (LysC)

Để tối đa hóa việc sản sinh *O*-axetylhomoserin, gen *lysC* có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (mã nhận biết SEQ ID NO: 27) mã hóa aspartokinaza được đưa vào với đột biến (L377K) để tăng cường biểu hiện của gen *lysC* và giảm bớt sự ức chế phản hồi bằng L-lysin và L-threonin (patent Hoa Kỳ số 10662450 B2). Để điều chế vector bao gồm biến thể của gen *lysC*, cặp mồi (các mã nhận biết SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29) để khuếch đại vùng phía trước 5' và cặp mồi (các mã nhận biết SEQ ID NO: 30 và SEQ ID NO: 31) để khuếch đại vùng phía sau 3' đối với vị trí đột biến được thiết kế. Các vùng enzym giới hạn XbaI và SalI được chèn vào cả hai đầu của cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 31, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30 được thiết kế để bắt chéo với nhau, và sự thay thế nucleotit được bố trí trong vùng này. Các trình tự của cặp mồi như được thể hiện ở bảng 8 dưới đây.

Bảng 8

SEQ ID NO	Tên trình tự	Trình tự
SEQ ID NO: 28	lysC_L377K_5 F	TCCTCTAGAGCTGCGCAGTGTGAATACG
SEQ ID NO: 29	lysC_L377K_5 R	AGGTGGAAATCTTTTCGATGTTC
SEQ ID NO: 30	lysC_L377K_3 F	GAACATCGAAAAGATTCCACCT
SEQ ID NO: 31	lysC_L377K_3 R	GACTCTAGAGTTCACCTCAGAGACGATTA

PCR được thực hiện sử dụng nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29 và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 30 và SEQ ID NO: 31. PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây được lặp lại, và sau đó thực hiện kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được đoạn ADN 512 bp của vùng phía trước 5' và đoạn ADN 522 bp của vùng phía sau 3' đối với đột biến của gen *lysC*.

PCR được thực hiện sử dụng hai đoạn ADN khuếch đại làm mạch khuôn và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 31. PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây được lặp lại, và sau đó thực hiện kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN 1011 bp bao gồm biến thể của gen *lysC* (L377K) mã hóa biến thể aspartokinaza trong đó leuxin ở vị trí thứ 377 được thay thế bằng lysin được khuếch đại.

Đoạn *lysC* (L377K) thu được bằng PCR được xử lý với các enzym giới hạn XbaI và SalI ở cả hai đầu và được gắn với vector pDCM2 được xử lý với các enzym giới hạn XbaI và SalI, tiếp theo bằng cách nhân dòng để cuối cùng thu được vector tái tổ hợp pDCM2-*lysC* (L377K) được nhân dòng với catxet thay thế *lysC* (L377K).

Chủng ATCC13032 Δ metB Δ metY được biến nạp với pDCM2-*lysC* (L377K) vector đã điều chế bằng phương pháp xung điện và thực hiện quá trình bắt chéo thứ cấp để thu được *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 Δ metB Δ metY *lysC* (L377K) được đưa vào với biến thể của gen *lysC* trên nhiễm sắc thể. Biến thể của gen cuối cùng được xác định bằng PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 31 và sau đó so sánh trình tự với trình tự của gen kiểu dại *lysC* bằng cách giải trình tự.

Ví dụ 3-4. Cấu trúc của plasmit được đưa vào với *O*-Axetylhomoserin Transferaza (MetX)

Để khuếch đại gen mã hóa *O*-axetylhomoserin transferaza (MetX), thông tin trên trình tự nucleotit của gen *metX* (NCBI số NCgl0624, mã nhận biết SEQ ID NO: 32) thu được từ Ngân hàng gen của Viện Y tế Quốc gia (Hoa Kỳ), vị trí của enzym giới hạn BamHI được chèn vào cả hai đầu của mỗi đoạn mồi của cặp mồi (các mã nhận biết SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 34) để khuếch đại từ vùng gen khởi động (được bố trí khoảng vùng phía trước 300 bp từ codon bắt đầu) đến vùng kết thúc (được bố trí khoảng vùng phía sau 100 bp từ codon bắt đầu) dựa trên đó. PCR được thực hiện trong các điều kiện sau đây. Sau khi biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây được lặp lại, và sau đó thực hiện kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7

phút. Kết quả là, thu được đoạn ADN 1546 bp của vùng mã hóa của gen *metX*. Vector pECCG117 (KR 10-0057684 B1) và đoạn ADN *metX* được xử lý với enzyme giới hạn BamHI, được gắn sử dụng ligaza ADN, và được nhân dòng để thu được plasmid được gọi là pECCG117-*metX* WT. Các trình tự của cặp mồi như được thể hiện ở bảng 9 dưới đây.

Bảng 9

SEQ ID NO	Tên trình tự	Trình tự
SEQ ID NO: 33	metX F	GGATCCCCTCGTTGTTTCACCCAGCAACC
SEQ ID NO: 34	metX R	GGATCCCAAAGTCACAACACTTATGTTAG

Ví dụ 3-5. Cấu trúc của chủng sản sinh *O*-Axetylhomoserin và sự đánh giá khả năng sản sinh *O*-Axetylhomoserin

Sau khi vector pECCG117-*metX* WT đã điều chế ở ví dụ 3-4 được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) sử dụng phương pháp xung điện, chủng được xét nghiệm kính phết trong môi trường chọn lọc chứa kanamycin (25 mg/L) và được nuôi cấy để thu được các chất biến đổi.

Để so sánh hoạt tính sản sinh *O*-axetylhomoserin của các chủng, các chủng được nuôi cấy bằng phương pháp sau đây, và *O*-axetylhomoserin có trong môi trường nuôi cấy được phân tích.

Vòng lặp cấy của từng chủng được cấy chuyển vào trong bình tam giác 250 ml chứa 25 ml môi trường dưới đây và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 37°C trong 20 giờ ở tốc độ 200 vòng/phút. Các nồng độ của *O*-axetylhomoserin được phân tích sử dụng HPLC, và các nồng độ phân tích được thể hiện trong bảng 10.

Môi trường sản xuất *O*-Axetyl homoserin (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) dịch chiết ngô (CSL, Sigma), 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 400 mg methionin, và 20 g CaCO₃ (trong 1 L nước cất)

Bảng 10

Các chủng	<i>O</i> -AH (g/L)
ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K)	0,7
ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) /pECCG117- <i>metX</i> WT	1,3

Kết quả là, xác nhận rằng *O*-axetyl-L-homoserin được tích lũy với nồng độ 0,7 g/L khi ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) làm đối chứng được nuôi cấy và *O*-axetyl-L-homoserin được tích lũy với nồng độ 1,3 g/L khi chủng ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K)/pECCG117-metX WT được nuôi cấy như được thể hiện ở bảng 10.

Do đó, xác nhận rằng có sự tăng lên trong sản sinh *O*-axetyl-L-homoserin trong chủng ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K)/pECCG117-metX WT dựa trên các kết quả được thể hiện ở trên.

Ví dụ 3-6. Sự đánh giá khả năng sản sinh homoserin

Corynebacterium glutamicum ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) đã tạo cấu trúc trong ví dụ 3-3 được đưa vào với vector pECCG117-metX WT được tạo cấu trúc trong ví dụ 3-4 sử dụng phương pháp xung điện và được xét nghiệm kính phết trong môi trường chọn lọc chứa kanamycin (25 mg/L) và được nuôi cấy để thu được các chất biến đổi.

Để so sánh hoạt tính sản sinh homoserin của các chủng, các chủng được nuôi cấy bằng phương pháp sau đây, và homoserin có trong môi trường nuôi cấy được phân tích.

Vòng lặp cấy của từng chủng được cấy chuyển vào trong bình tam giác 250 ml chứa 25 ml môi trường dưới đây và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 37°C trong 20 giờ ở tốc độ 200 vòng/phút. Các nồng độ của homoserin được phân tích sử dụng HPLC, và các nồng độ phân tích được thể hiện trong bảng 11.

Môi trường sản xuất homoserin (độ pH 7,2)

30 g glucoza, 2 g KH_2PO_4 , 3 g ure, 40 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 g pepton, 5 g (10 mL) dịch chiết ngô (CSL, Sigma), 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400 mg methionin, và 20 g CaCO_3 (trong 1 L nước cất)

Bảng 11

Các chủng	Sự sản sinh homoserin (g/L)
ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K)	0,2
ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K)/pECCG117-metX WT	0,2

Kết quả là, xác nhận rằng homoserin được tích lũy với nồng độ 0,2 g/L khi

ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) làm đối chứng được nuôi cấy và homoserin được tích lũy với nồng độ 0,2 g/L khi chủng ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K)/pECCG117-metX WT được nuôi cấy như được thể hiện ở bảng 11.

Do đó, dựa trên các kết quả, xác nhận rằng chủng ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K)/pECCG117-metX WT có cùng mức sản sinh homoserin.

Ví dụ 4: Cấu trúc của chủng được đưa vào với biến thể protein màng ngoại sinh (YjeH) có khả năng tăng cường để sản sinh *O*-Axetylhomoserin và sự đánh giá khả năng sản sinh *O*-Axetylhomoserin

Ví dụ 4-1. Sự đưa vào biến thể protein màng ngoại sinh (YjeH)

Chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) đã tạo cấu trúc trong ví dụ 3-3 được biến nạp với các vector pDCM2- Δ NCgl2335, pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT), pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N), và pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L) đã tạo cấu trúc trước đó trong ví dụ 2-1 và thực hiện quá trình bắt chéo thứ cấp để thu được ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335, ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT), ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N), và ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L) trong đó gen NCgl2335 (transposaza) được xóa khỏi nhiễm sắc thể. Sự đưa vào gen NCgl2335 bất hoạt và gen *E. coli* yjeH mới được đưa vào được xác định bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 7 và các kết quả so sánh với các kết quả của ATCC13032 trong đó gen NCgl2335 không bị bất hoạt.

Ví dụ 4-2. Cấu trúc của chủng sản sinh *O*-Axetylhomoserin và sự đánh giá khả năng sản xuất *O*-Axetylhomoserin

Sau khi vector pECCG117-metX WT đã điều chế ở ví dụ 3-4 được đưa vào ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335, ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT), ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N), và ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L) đã điều chế ở ví dụ 4-1 sử dụng phương pháp xung điện, các chủng được xét nghiệm kính phết trong môi trường chọn lọc chứa kanamycin (25 mg/L) và được nuôi cấy để thu được các chất biến đổi.

Để so sánh hoạt tính sản sinh *O*-axetylhomoserin của các chủng, các chủng được nuôi cấy bằng phương pháp sau đây, và *O*-axetylhomoserin chứa trong môi trường nuôi cấy được phân tích.

Vòng lặp cấy của từng chủng được cấy chuyển vào trong bình tam giác 250 ml chứa 25 ml môi trường sản xuất *O*-axetyl homoserin (độ pH 7,2) của ví dụ 3-5 và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 33°C trong 20 giờ ở tốc độ 200 vòng/phút. Các nồng độ *O*-axetylhomoserin được phân tích sử dụng HPLC, và các nồng độ phân tích được thể hiện trong bảng 12.

Bảng 12

Các chủng		<i>O</i> -AH (g/L)
ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) /pECCG117-metX WT	-	1,3
	Δ NCgl2335	1,3
	Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT)	2,1
	Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N)	2,7
	Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L)	2,3

Kết quả là, xác nhận rằng *O*-axetyl-L-homoserin được tích lũy với nồng độ 1,3 g/L khi *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) làm đối chứng được nuôi cấy và sự sản sinh *O*-axetyl-L-homoserin không bị ảnh hưởng bằng việc xóa gen NCgl2335 (transposaza) như được thể hiện ở bảng 12. Cụ thể, xác nhận rằng *O*-axetyl-L-homoserin được tích lũy với nồng độ 2,1 g/L khi gen kiểu dại *yjeH* được biểu hiện và *O*-axetyl-L-homoserin được tích lũy với các nồng độ 2,7 g/L và 2,3 g/L khi biến thể của các gen *yjeH* được biểu hiện.

Do đó, dựa trên các kết quả được thể hiện ở trên, xác nhận rằng các gen kiểu dại và biến thể *yjeH* theo sáng chế tăng đáng kể sự sản sinh axit amin được quan tâm bằng cách sản sinh *O*-axetyl-L-homoserin từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032.

Ví dụ 4-3. Sự đánh giá khả năng sản sinh homoserin

Sau khi vector pECCG117-metX WT đã điều chế ở ví dụ 3-4 được đưa vào ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335, ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT), ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N), và ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L) đã điều chế trong ví dụ 4-1 sử dụng

phương pháp xung điện, các chủng được xét nghiệm kính phết trong môi trường chọn lọc chứa kanamycin (25 mg/L) và được nuôi cấy để thu được các chất biến đổi.

Để so sánh hoạt tính sản sinh homoserin của các chủng, các chủng được nuôi cấy bằng phương pháp sau đây, và homoserin chứa trong môi trường nuôi cấy được phân tích.

Vòng lặp cấy của từng chủng được cấy chuyển vào trong bình tam giác 250 ml chứa 25 ml môi trường dưới đây và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 33°C trong 20 giờ ở tốc độ 200 vòng/phút. Các nồng độ của homoserin được phân tích sử dụng HPLC, và các nồng độ phân tích được thể hiện trong bảng 13.

Môi trường sản xuất homoserin (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) dịch chiết ngô (CSL, Sigma), 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 400 mg methionin, và 20 g CaCO₃ (trong 1 L nước cất)

Bảng 13

Các chủng		Homoserin (g/L)
ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) /pECCG117-metX WT	-	0,2
	Δ NCgl2335	0,2
	Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT)	0,2
	Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N)	1,2
	Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L)	0,7

Kết quả là, xác nhận rằng homoserin được tích lũy với nồng độ 0,2 g/L khi *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) làm đối chứng được nuôi cấy, và sự sản xuất homoserin không bị ảnh hưởng bằng việc xóa gen NCgl2335 (transposaza) như được thể hiện ở bảng 13. Cụ thể, xác nhận rằng homoserin được tích lũy với nồng độ 0,2 g/L khi gen *yjeH* kiểu dại được biểu hiện, và homoserin được tích lũy với các nồng độ 1,2 g/L và 0,7 g/L khi biến thể của các gen *yjeH* được biểu hiện.

Do đó, dựa trên các kết quả được thể hiện ở trên, xác nhận rằng các gen kiểu dại và biến thể *yjeH* theo sáng chế tăng đáng kể sự sản sinh axit amin được quan tâm bằng cách sản sinh homoserin từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032.

Ví dụ 5: Sự sản sinh methionin (MET) sử dụng phản ứng chuyển đổi của O-

Axetylhomoserin được sản sinh bởi chủng

Sau khi vector pECCG117-metX WT đã điều chế ở ví dụ 3-4 được đưa vào ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335, ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT), ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N), và ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC (L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L) đã điều chế ở ví dụ 4-1 sử dụng phương pháp xung điện, các chủng được xét nghiệm kính phết trong môi trường chọn lọc chứa kanamycin (25 mg/L) và được nuôi cấy để thu được các chất biến đổi.

Ngoài ra, theo phương pháp đã bộc lộ ở tài liệu patent đã nộp trước đó (công bố đơn quốc tế số WO2008/013432), gen *metZ* mã hóa *O*-suxinylhomoserin sulfhydrylaza có nguồn gốc từ *Pseudomonas aeruginosa* và *Pseudomonas putida* được sử dụng cho việc chuyển đổi của *O*-axetylhomoserin thành methionin được nhân dòng. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của từng chủng làm mạch khuôn và cặp mồi để thu được gen *metZ* của *Pseudomonas aeruginosa* và *Pseudomonas putida* như sau: 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 2 phút để thu được các đoạn ADN. Các đoạn ADN thu được được phân cắt với NdeI/PacI và được nhân dòng vào vector pCL-CJ1 (CJ, Hàn Quốc) được phân cắt với các enzym giống nhau. Các tế bào *E. coli* W3110 được biến nạp với vector đã nhân dòng và được nuôi cấy trong môi trường tẩm LB chứa 50 μ g/L spectinomycin, và sau đó các khuẩn lạc được chọn. Các khuẩn lạc đã chọn được cấy chuyển trong 3 mL của môi trường LB chứa 50 μ g/L spectinomycin và được nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Các tế bào được nuôi cấy được thu hồi, rửa với 0,1 M chất đệm kali phosphat (độ pH 7,5), lơ lửng trong 200 μ L của chất đệm kali phosphat, và được ly giải bằng phương pháp phá vỡ tế bào sử dụng sóng âm thanh (sonication) 5 lần với khoảng thời gian 30 giây. Dịch ly giải tế bào được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút và phần nổi thu được để định lượng tổng mức protein bằng cách sử dụng giải pháp định lượng protein Bio-Rad (Bio-Rad, Hoa Kỳ). Sự biểu hiện protein được xác định bằng SDS-PAGE. Phần nổi thu được từ chiết xuất tế bào được sử dụng cho phản ứng chuyển đổi enzym.

Ngoài ra, gen *metZ* mã hóa *O*-suxinylhomoserin sulfhydrylaza có nguồn gốc từ *Hyphomonas neptunium* được nhân dòng. PCR được thực hiện sử dụng nhiễm sắc thể của *Hyphomonas neptunium* làm mạch khuôn và đoạn mồi theo cách tương tự như được

mô tả ở trên để thu được các đoạn ADN. Các đoạn ADN thu được được phân cắt với NdeI/AvrII và được nhân dòng vào vector pCL-CJ1 (CJ, Hàn Quốc) được phân cắt với các enzym giống nhau. Phần nổi thu được sử dụng vector đã nhân dòng được sử dụng theo cách tương tự như được mô tả ở trên và được sử dụng cho phản ứng chuyển đổi enzym.

Tùng chủng W3110 được biến nạp với vector biểu hiện *metZ* có nguồn gốc từ *Pseudomonas* và được biến nạp với vector biểu hiện *metZ* có nguồn gốc từ *Hyphomonas* được cấy chuyển trong môi trường tấm chứa LB spectinomycin làm thuốc kháng sinh, và được nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 30°C đến 40°C. Sau đó, khuẩn lạc riêng lẻ được cấy chuyển trong 40 ml môi trường LB chứa spectinomycin và được nuôi cấy trong 5 giờ ở nhiệt độ 30°C đến 40°C. Chủng biểu hiện *metZ* có nguồn gốc từ *Pseudomonas* và chủng biểu hiện *Hyphomonas* có nguồn gốc từ *metZ* đã nuôi cấy được nuôi cấy trong bình lên men 1 L ở tốc độ 600 vòng/phút đến 900 vòng/phút, ở nhiệt độ 30°C đến 40°C, trong 15 đến 30 giờ để thu được canh thịt lên men. Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong việc nuôi cấy như sau. Các tế bào của canh thịt lên men thu được ly giải bằng phương pháp phá vỡ tế bào sử dụng sóng âm thanh để điều chế các dung dịch enzym.

Môi trường 2XYT

10 g dịch chiết nấm men, 16 g tryptophan, 40 g glucoza, và 50 g spectinomycin (trong 1 L nước cất)

Phản ứng methionin chuyển đổi được thực hiện bằng cách thêm dung dịch enzym có nguồn gốc từ *Pseudomonas* và *O*-suxinylhomoserin sulfhydrylaza có nguồn gốc từ *Hyphomonas* vào môi trường nuôi cấy của chất biến nạp sản sinh *O*-axetylhomoserin. Sau khi thêm 0,1 L dung dịch enzym được thêm vào 2,0 L của môi trường nuôi cấy của *O*-axetylhomoserin trong đó các tế bào không bị loại bỏ, và 0,3 L dung dịch natri metyl mercaptan 15% được thêm vào để bắt đầu phản ứng. Sau khi 2 giờ, canh thịt lên men được thu hồi, các tế bào được loại bỏ khỏi đó, và các nồng độ của methionin được sản xuất được xác định bằng HPLC. Các nồng độ được phân tích như được thể hiện ở bảng 14.

Bảng 14

Các chủng		Met (g/L)
ATCC13032 Δ metB Δ metY	-	1,2

lysC (L377K) /pECCG117-metX WT	Δ NCgl2335	1,2
	Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, WT)	1,9
	Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F92N)	2,5
	Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH (eco, F351L)	2,1

Phần mô tả nêu trên của sáng chế chỉ nhằm mục đích minh họa, và những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật hiểu rằng có thể thực hiện các thay đổi và biến đổi khác nhau mà không làm thay đổi nguyên lý kỹ thuật và các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Do đó, rõ ràng rằng các phương án nêu trên là minh họa trong mọi khía cạnh và không giới hạn sáng chế. Do đó, phạm vi bảo hộ của sáng chế được xác định không phải bởi phần mô tả chi tiết, mà bởi các yêu cầu bảo hộ và các phần mô tả tương đương, và tất cả các biến thể trong phạm vi bảo hộ của yêu cầu bảo hộ và các biến thể tương đương đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> BIẾN THỂ CỦA PROTEIN MÀNG TRONG, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA BIẾN THỂ, VECTO, VI SINH VẬT, CÁC PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM ĐÍCH, METHIONIN VÀ GLUFOSINAT, VÀ CÁC CHẾ PHẨM SẢN XUẤT HOMOSERIN VÀ O-AXETYLHOMOSERIN
 <130> OPA20205
 <150> KR 10-2019-0172055
 <151> 2019-12-20
 <160> 37
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Chưa biết
 <220>
 <223> Escherichia coli YjeH
 <400> 1
 Met Ser Gly Leu Lys Gln Glu Leu Gly Leu Ala Gln Gly Ile Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Thr Ser Leu Leu Gly Thr Gly Val Phe Ala Val Pro Ala Leu
 20 25 30
 Ala Ala Leu Val Ala Gly Asn Asn Ser Leu Trp Ala Trp Pro Val Leu
 35 40 45
 Ile Ile Leu Val Phe Pro Ile Ala Ile Val Phe Ala Ile Leu Gly Arg
 50 55 60
 His Tyr Pro Ser Ala Gly Gly Val Ala His Phe Val Gly Met Ala Phe
 65 70 75 80
 Gly Ser Arg Leu Glu Arg Val Thr Gly Trp Leu Phe Leu Ser Val Ile
 85 90 95
 Pro Val Gly Leu Pro Ala Ala Leu Gln Ile Ala Ala Gly Phe Gly Gln
 100 105 110
 Ala Met Phe Gly Trp His Ser Trp Gln Leu Leu Leu Ala Glu Leu Gly
 115 120 125
 Thr Leu Ala Leu Val Trp Tyr Ile Gly Thr Arg Gly Ala Ser Ser Ser
 130 135 140
 Ala Asn Leu Gln Thr Val Ile Ala Gly Leu Ile Val Ala Leu Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Ile Trp Trp Ala Gly Asp Ile Lys Pro Ala Asn Ile Pro Phe Pro
 165 170 175
 Ala Pro Gly Asn Ile Glu Leu Thr Gly Leu Phe Ala Ala Leu Ser Val
 180 185 190

Met Phe Trp Cys Phe Val Gly Leu Glu Ala Phe Ala His Leu Ala Ser
 195 200 205

Glu Phe Lys Asn Pro Glu Arg Asp Phe Pro Arg Ala Leu Met Ile Gly
 210 215 220

Leu Leu Leu Ala Gly Leu Val Tyr Trp Gly Cys Thr Val Val Val Leu
 225 230 235 240

His Phe Asp Ala Tyr Gly Glu Lys Met Ala Ala Ala Ala Ser Leu Pro
 245 250 255

Lys Ile Val Val Gln Leu Phe Gly Val Gly Ala Leu Trp Ile Ala Cys
 260 265 270

Val Ile Gly Tyr Leu Ala Cys Phe Ala Ser Leu Asn Ile Tyr Ile Gln
 275 280 285

Ser Phe Ala Arg Leu Val Trp Ser Gln Ala Gln His Asn Pro Asp His
 290 295 300

Tyr Leu Ala Arg Leu Ser Ser Arg His Ile Pro Asn Asn Ala Leu Asn
 305 310 315 320

Ala Val Leu Gly Cys Cys Val Val Ser Thr Leu Val Ile His Ala Leu
 325 330 335

Glu Ile Asn Leu Asp Ala Leu Ile Ile Tyr Ala Asn Gly Ile Phe Ile
 340 345 350

Met Ile Tyr Leu Leu Cys Met Leu Ala Gly Cys Lys Leu Leu Gln Gly
 355 360 365

Arg Tyr Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Leu Leu Cys Val Leu Leu
 370 375 380

Leu Ala Met Val Gly Trp Lys Ser Leu Tyr Ala Leu Ile Met Leu Ala
 385 390 395 400

Gly Leu Trp Leu Leu Leu Pro Lys Arg Lys Thr Pro Glu Asn Gly Ile
 405 410 415

Thr Thr

<210> 2
 <211> 1257
 <212> ADN
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> Escherichia coli yjeH

<400> 2
 atgagtggac tcaaacaaga actggggctg gccagggca ttggcctgct atcgacgtca 60
 ttattaggca ctggcgtggt tgccgttcct gcgttagctg cgctggtagc gggcaataac 120
 agcctgtggg cgtggcccg tttgattatc ttagtggtcc cgattgcgat tgtgtttgcg 180
 attctgggtc gccactatcc cagcgcaggc ggcgtcgcgc acttcgtcgg tatggcgttt 240

gggttcgcggc ttgagcgagt caccggctgg ctgtttttat cggtcattcc cgtggggttg 300
 cctgccgcac tacaaattgc cgccgggttc ggccaggcga tgtttggttg gcatagctgg 360
 caactgttgt tggcagaact cggtagcttg gcgctggtgt ggtatatcgg tactcgcggt 420
 gccagttcca gtgctaattc acaaaccgtt attgccggac ttatcgtcgc gctgattgtc 480
 gctatctggt gggcgggcga tatcaaacct gcgaatatcc cctttccggc acctggtaat 540
 atcgaactta ccgggttatt tgctgcgtta tcagtgatgt tctggtgttt tgcgggtctg 600
 gaggcatttg cccatctcgc ctcggaattt aaaaatccag agcgtgattt tcctcgtgct 660
 ttgatgattg gtctgctgct ggcaggatta gtctactggg gctgtacggg agtcgtctta 720
 cacttcgacg cctatggtga aaaaatggcg gcggcagcat cgcttccaaa aattgtagtg 780
 cagttgttcg gtgtaggagc gttatggatt gcctgcgtga ttggctatct ggctgcttt 840
 gccagtctca acatttatat acagagcttc gccgcctgg tctggtcgca ggcgcaacat 900
 aatcctgacc actacctggc acgcctctct tctcgccata tcccgaataa tgccctcaat 960
 gcggtgctcg gctgctgtgt ggtgagcact ttggtgattc atgctttaga gatcaatctg 1020
 gacgctctta ttatttatgc caatggcatc tttattatga tttatctgtt atgcatgctg 1080
 gcaggctgta aattattgca aggacgttat cgactactgg cggtggttgg cgggctgtta 1140
 tgcggtctgt tactggcaat ggtcggctgg aaaagtctct atgcgctgat catgctggcg 1200
 gggttatggc tgttgctgcc aaaacgaaaa acgccgaaa atggcataac cacataa 1257

<210> 3
 <211> 267
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tn2335

<400> 3
 gtggcctaca ccttcgacca cgtcgtcgcc tggcgctggg gcaccaaaga agacgcctac 60
 aactacaccc acctcttcga tcaactccaa ccacccttaa tcgtgaccac cgacggacaa 120
 aaaaggcgca ctcaaagcca tcaccacgac ctggccgaca acgaaaatcc aacgctgcct 180
 cgtccacgtc aaacgcaacg tccaaaaaca cgtcacccta agaccctgac tgagctcgcc 240
 gaaaagcact ccggggtctc tccttga 267

<210> 4
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tn_5 F

<400> 4
 tgaattcgag ctcggtaccc caccgacgcg catctgcct 39

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

<220>
 <223> Tn_5 R

<400> 5
 ggtgtggtga ctttcagcag ttcccggggg ggaggaggca tgtggtgttg 50

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

<220>
 <223> Tn_3 F

<400> 6
 caacaccaca tgcctcctcc cccccgggaa ctgctgaaag tcaccacacc 50

<210> 7
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tn_3 R

<400> 7
 gtcgactcta gaggatcccc ctcccaaacc attgaggaat gg 42

<210> 8
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CJ7

<400> 8
 agaaacatcc cagcgctact aatagggagc gttgaccttc cttccacgga ccggtaatcg 60
 gagtgcctaa aaccgcatgc ggcttaggct ccaagatagg ttctgcgcgg ccgggtaatg 120
 catcttcttt agcaacaagt tgaggggtag gtgcaaataa gaacgacata gaaatcgtct 180
 cctttctgtt tttaatcaac atacaccacc acctaaaaat tccccgacca gcaagttcac 240
 agtattcggg cacaatatcg ttgccaaaat attgtttcgg aatatcatgg gatacgtacc 300

caacgaaagg aaacactc

318

<210> 9
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CJ7_yjeH F

<400> 9
 acaccacatg cctcctcccc agaaacatcc cagcgctac

39

<210> 10
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CJ7_yjeH R

<400> 10
 agttcttggt tgagtcact catagtgttt cctttcggtg ggt

43

<210> 11
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yjeH F

<400> 11
 acccaacgaa aggaaacact atgagtggac tcaaacaaga actg

44

<210> 12
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yjeH R

<400> 12
 gactttcagc agttcccggg ttatgtgggt atgccatttt ccgg

44

<210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> F92N F

<400>	13		
cggctggctg aatttatcgg tca			23
<210>	14		
<211>	23		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	F92N R		
<400>	14		
tgaccgataa attcagccag ccg			23
<210>	15		
<211>	23		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	F351L F		
<400>	15		
caatggcatc cttattatga ttt			23
<210>	16		
<211>	23		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	F351L R		
<400>	16		
aaatcataat aaggatgcca ttg			23
<210>	17		
<211>	1161		
<212>	ADN		
<213>	Chưa biết		
<220>			
<223>	Corynebacterium glutamicum metB		
<400>	17		
ttgtcttttg acccaaacac ccagggtttc tccactgcat cgattcacgc tgggtatgag			60
ccagacgact actacggttc gattaacacc ccaatctatg cctccaccac cttcgcgag			120
aacgctccaa acgaactgcy caaaggctac gagtacaccc gtgtgggcaa cccaccatc			180
gtggcattag agcagaccgt cgcagcactc gaaggcgcaa agtatggccg cgcattctcc			240
tccggcatgg ctgcaaccga catcctgttc cgcacatcc tcaagccggg cgatcacatc			300
gtcctcggca acgatgctta cggcggaacc taccgcctga tcgacaccgt attcaccgca			360

tggggcgctcg aatacacgct tgttgatacc tccgtcgtgg aagaggtcaa ggcagcgatc 420
 aaggacaaca ccaagctgat ctgggtggaa accccaacca acccagcact tggcatcacc 480
 gacatcgaag cagtagcaaa gctcaccgaa ggcaccaacg ccaagctggg tgttgacaac 540
 accttcgcat ccccatacct gcagcagcca ctaaaactcg ggcacacgc agtcctgcac 600
 tccaccacca agtacatcgg aggacactcc gacgttggtg gcggccttgt ggttaccaac 660
 gaccaggaaa tggacgaaga actgctgttc atgcagggcg gcacggacc gatcccatca 720
 gttttcgatg catacctgac cgcccggtggc ctcaagacct ttgcagtgcg catggatcgc 780
 cactgcgaca acgcagaaaa gatcgcgga ttcctggact cccgccaga ggtctccacc 840
 gtgctctacc caggtctgaa gaaccacca ggccacgaag tcgcagcgaa gcagatgaag 900
 cgcttcggcg gcatgatctc cgctcgtttc gcaggcgcg aagaagcagc taagaagttc 960
 tgtacctcca ccaaactgat ctgtctggcc gagtccctcg gtggcgtgga atccctcctg 1020
 gagcaccag caaccatgac ccaccagtca gctgccggt ctcagctcga ggttccccgc 1080
 gacctcgtgc gcatctccat tggattgaa gacattgaag acctgctgc agatgtcgag 1140
 caggccctca ataaccttta g 1161

<210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> metB_N_del F

<400> 18
 tctagacgcc cgcatactgg ctcc 24

<210> 19
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> metB_N_del R

<400> 19
 cccatccact aaacttaaag agatgtgatc gcccgcc 37

<210> 20
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> metB_C_del F

<400> 20
tgtttaagtt tagtgatgg ggaagaacca cccaggcc 38

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

<220>
<223> metB_C_del R

<400> 21
gtcgaccaat cgtccagagg gcg 23

<210> 22
<211> 1314
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Corynebacterium glutamicum metY

<400> 22
atgccaaagt acgacaattc caatgctgac cagtggggct ttgaaacccg ctccattcac 60
gcaggccagt cagtagacgc acagaccagc gcacgaaacc ttccgatcta ccaatccacc 120
gctttcgtgt tcgactccgc tgagcacgcc aagcagcggt tcgcacttga ggatctaggg 180
cctgtttact cccgcctcac caaccaacc gttgaggctt tggaaaaccg catcgcttcc 240
ctcgaagggtg gcgtccacgc tgtagcggtc tcctccggac aggccgcaac caccaacgcc 300
atgttgaacc tggcaggagc gggcgaccac atcgtcacct cccacgcct ctacgggtggc 360
accgagactc tattccttat cactcttaac cgctgggta tcgatgtttc ctctgtggaa 420
aaccgccgacg accctgagtc ctggcaggca gccgttcagc caaacaccaa agcattcttc 480
ggcgagactt tcgccaaccc acaggcagac gtcctggata ttcttgcggt ggctgaagtt 540
gcgcaccgca acagcggttc actgatcatc gacaacacca tcgctaccgc agcgctcgtg 600
cgcccgctcg agctcggcgc agacgttgct gtcgcttccc tcaccaagtt ctacaccggc 660
aacggctccg gactgggagg cgtgcttctc gacggcgga agttcgattg gactgtcgaa 720
aaggatggaa agccagtatt cccctacttc gtcactccag atgctgctta ccacggattg 780
aagtacgcag accttggtgc accagccttc ggctcaagg ttcgcgttgg ctttctacgc 840
gacaccggct ccaccctctc cgcattcaac gcatgggctg cagtccaggg catcgacacc 900
ctttccctgc gcctggagcg ccacaacgaa aacgccatca aggttgaga attcctcaac 960
aaccacgaga aggtggaaaa ggttaacttc gcaggcctga aggattcccc ttggtacgca 1020
accaaggaaa agcttggcct gaagtacacc ggctccgttc tcaccttcga gatcaagggc 1080

ggcaaggatg aggcttgggc atttatcgac gccctgaagc tacactccaa ccttgcaaac 1140
 atcggcgatg ttcgctccct cgttggtcac ccagcaacca ccaccattc acagtccgac 1200
 gaagctggcc tggcacgcgc gggcgttacc cagtccacgc tcgcctgtc cgttggcatc 1260
 gagaccattg atgatatcat cgtgacctc gaaggcggct ttgctgcaat ctag 1314

<210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> metY_N_del F

<400> 23
 tctagaccat cctgcaccat ttag 24

<210> 24
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> metY_N_del R

<400> 24
 cccatccact aaacttaaac acgctcctgc caggttc 37

<210> 25
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> metY_C_del F

<400> 25
 tgtttaagtt tagtggatgg gcttggtagc caaccaagg 39

<210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> metY_C_del R

<400> 26
 gtcgacgatt gctccggctt cgg 23

<210> 27
 <211> 1266
 <212> ADN

<213> Chưa biết

<220>

<223> Corynebacterium glutamicum lysC

<400> 27

```

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

```

<210> 28

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> lysC_L377K_5 F

<400> 28

tcctctagag ctgcgcagtg ttgaatacg

29

<210> 29
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC_L377K_5 R

<400> 29
 aggtggaaat cttttcgatg ttc 23

<210> 30
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC_L377K_3 F

<400> 30
 gaacatcgaa aagatttcca cct 23

<210> 31
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC_L377K_3 R

<400> 31
 gactctagag ttcacctcag agacgatta 29

<210> 32
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Corynebacterium glutamicum metX

<400> 32
 atgccacccc tcgcgcttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc 60
 gaagccggag caatcattac aaacgctgaa atcgctatc accgctgggg tgaataccgc 120
 gtagataaag aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgaa acgccctcac tggagattcc 180
 aacgcagccg attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt 240
 tactgcgtga tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctgggtcc 300
 atgcatccag atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag 360
 gtaaacgccg aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcattca ccacggtcgc cgcagtactt 420

```

ggtggttcca tgggtggtgc cgcacccta gagtgggccc caatgtaccc agaaactggt 480
ggcgagctg ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaaat cggcattcaa 540
tccgccccaa ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa 600
tccggctgca accagccac cggactoggc gccgcccgc gcacgcacca cctcacctac 660
cgtggcgaac tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaaccca 720
ctcggtcctt accgcaagcc cgaccagcgc ttgcgcgtgg aatcctactt ggactaccaa 780
gcagacaagc tagtacagcg ttctgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc 840
aaccgccacg acattggctg cgaccgcgga ggctcaaca aggcaactga atccatcaaa 900
gttccagtc ttgtgcagc cgtagatacc gatattttgt acccctacca ccagcaagaa 960
cacctctcca gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc cctgtcggc 1020
cacgatgctt tctcaccga aagccgcaa atggatcgca tcgtgaggaa cttcttcagc 1080
ctcatctccc cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaa 1134

```

```

<210> 33
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> metX F

```

```

<400> 33
ggatcccctc gttgttcacc cagcaacc 28

```

```

<210> 34
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> metX R

```

```

<400> 34
ggatcccaaa gtcacaacta cttatgtag 30

```

```

<210> 35
<211> 418
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> YjeH F92N

```

```

<400> 35
Met Ser Gly Leu Lys Gln Glu Leu Gly Leu Ala Gln Gly Ile Gly Leu
1 5 10 15

```

Leu Ser Thr Ser Leu Leu Gly Thr Gly Val Phe Ala Val Pro Ala Leu
 20 25 30
 Ala Ala Leu Val Ala Gly Asn Asn Ser Leu Trp Ala Trp Pro Val Leu
 35 40 45
 Ile Ile Leu Val Phe Pro Ile Ala Ile Val Phe Ala Ile Leu Gly Arg
 50 55 60
 His Tyr Pro Ser Ala Gly Gly Val Ala His Phe Val Gly Met Ala Phe
 65 70 75 80
 Gly Ser Arg Leu Glu Arg Val Thr Gly Trp Leu Asn Leu Ser Val Ile
 85 90 95
 Pro Val Gly Leu Pro Ala Ala Leu Gln Ile Ala Ala Gly Phe Gly Gln
 100 105 110
 Ala Met Phe Gly Trp His Ser Trp Gln Leu Leu Leu Ala Glu Leu Gly
 115 120 125
 Thr Leu Ala Leu Val Trp Tyr Ile Gly Thr Arg Gly Ala Ser Ser Ser
 130 135 140
 Ala Asn Leu Gln Thr Val Ile Ala Gly Leu Ile Val Ala Leu Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Ile Trp Trp Ala Gly Asp Ile Lys Pro Ala Asn Ile Pro Phe Pro
 165 170 175
 Ala Pro Gly Asn Ile Glu Leu Thr Gly Leu Phe Ala Ala Leu Ser Val
 180 185 190
 Met Phe Trp Cys Phe Val Gly Leu Glu Ala Phe Ala His Leu Ala Ser
 195 200 205
 Glu Phe Lys Asn Pro Glu Arg Asp Phe Pro Arg Ala Leu Met Ile Gly
 210 215 220
 Leu Leu Leu Ala Gly Leu Val Tyr Trp Gly Cys Thr Val Val Val Leu
 225 230 235 240
 His Phe Asp Ala Tyr Gly Glu Lys Met Ala Ala Ala Ala Ser Leu Pro
 245 250 255
 Lys Ile Val Val Gln Leu Phe Gly Val Gly Ala Leu Trp Ile Ala Cys
 260 265 270
 Val Ile Gly Tyr Leu Ala Cys Phe Ala Ser Leu Asn Ile Tyr Ile Gln
 275 280 285
 Ser Phe Ala Arg Leu Val Trp Ser Gln Ala Gln His Asn Pro Asp His
 290 295 300
 Tyr Leu Ala Arg Leu Ser Ser Arg His Ile Pro Asn Asn Ala Leu Asn
 305 310 315 320
 Ala Val Leu Gly Cys Cys Val Val Ser Thr Leu Val Ile His Ala Leu
 325 330 335
 Glu Ile Asn Leu Asp Ala Leu Ile Ile Tyr Ala Asn Gly Ile Phe Ile
 340 345 350
 Met Ile Tyr Leu Leu Cys Met Leu Ala Gly Cys Lys Leu Leu Gln Gly

355 360 365
 Arg Tyr Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Leu Leu Cys Val Leu Leu
 370 375 380
 Leu Ala Met Val Gly Trp Lys Ser Leu Tyr Ala Leu Ile Met Leu Ala
 385 390 395 400
 Gly Leu Trp Leu Leu Leu Pro Lys Arg Lys Thr Pro Glu Asn Gly Ile
 405 410 415
 Thr Thr

 <210> 36
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> YjeH F351L

 <400> 36
 Met Ser Gly Leu Lys Gln Glu Leu Gly Leu Ala Gln Gly Ile Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Thr Ser Leu Leu Gly Thr Gly Val Phe Ala Val Pro Ala Leu
 20 25 30
 Ala Ala Leu Val Ala Gly Asn Asn Ser Leu Trp Ala Trp Pro Val Leu
 35 40 45
 Ile Ile Leu Val Phe Pro Ile Ala Ile Val Phe Ala Ile Leu Gly Arg
 50 55 60
 His Tyr Pro Ser Ala Gly Gly Val Ala His Phe Val Gly Met Ala Phe
 65 70 75 80
 Gly Ser Arg Leu Glu Arg Val Thr Gly Trp Leu Phe Leu Ser Val Ile
 85 90 95
 Pro Val Gly Leu Pro Ala Ala Leu Gln Ile Ala Ala Gly Phe Gly Gln
 100 105 110
 Ala Met Phe Gly Trp His Ser Trp Gln Leu Leu Leu Ala Glu Leu Gly
 115 120 125
 Thr Leu Ala Leu Val Trp Tyr Ile Gly Thr Arg Gly Ala Ser Ser Ser
 130 135 140
 Ala Asn Leu Gln Thr Val Ile Ala Gly Leu Ile Val Ala Leu Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Ile Trp Trp Ala Gly Asp Ile Lys Pro Ala Asn Ile Pro Phe Pro
 165 170 175
 Ala Pro Gly Asn Ile Glu Leu Thr Gly Leu Phe Ala Ala Leu Ser Val
 180 185 190
 Met Phe Trp Cys Phe Val Gly Leu Glu Ala Phe Ala His Leu Ala Ser
 195 200 205

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

Thr Thr

<210> 37
 <211> 5803
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDCM2

<400> 37
 gttcgtttgc tgtccataaa accgcccagt ctagctatcg ccatgtaagc ccaactgcaag 60
 ctacctgctt tctcttttgcg cttgcgtttt cccttgtcca gatagcccag tagctgacat 120
 tcatccgggg tcagcaccgt ttctgcggac tggctttcta cgtgttccgc ttccttttagc 180
 agcccttgcg ccctgagtgc ttgcggcagc gtgaagctag cttttatcgc cattcgccat 240
 tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc 300
 tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt 360

cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcgagctcgg taccgggga tcctctagag 420
tcgacctgca ggcatgcaag cttggcgtaa tcatggatcat agctgtttcc tgtgtgaaat 480
tggtatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg 540
ggcgcctaata gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag 600
tcgggaaacc tgcgtgccca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg 660
ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg 720
ctgcggcgag cggatatcagc tactcaaag gcggtaatac gggtatccac agaatacaggg 780
gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag 840
gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatoga 900
cgctcaagtc agagggtggc aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct 960
ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgcgc ttaccggata cctgtccgcc 1020
tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg 1080
gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca gccgcaccgc 1140
tgcccttat ccggtacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca 1200
ctggcagcag cactggtaa caggattagc agagcgagg atgtaggcgg tgctacagag 1260
ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct 1320
ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc 1380
accgctggta gcggtggtt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga 1440
tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctcaaggaa cgaaaactca 1500
cgtaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat cttttgggg 1560
tgggcgaaga actccagcat gagatccccg cgctggagga tcatccagcc ctgatagaaa 1620
cagaagccac tggagcacct caaaaacacc atcatacact aaatcagtaa gttggcagca 1680
tcacccgacg cactttgcgc cgaataaata cctgtgacgg aagatcactt cgcagaataa 1740
ataaatcctg gtgtccctgt tgataccggg aagccctggg ccaacttttg gcgaaaatga 1800
gacgttgatc ggcacgtaag aggtccaac tttcaccata atgaaataag atcactaccg 1860
ggcgtatttt ttgagttatc gagattttca ggagctgata gaaacagaag cactggagc 1920
acctcaaaaa caccatcata cactaaatca gtaagttggc agcatcacc gacgcacttt 1980
gcgccgaata aatacctgtg acggaagatc acttcgcaga ataaataaat cctggtgtcc 2040
ctgttgatac cgggaagccc tgggccaact tttggcgaaa atgagacgtt gatcggcacg 2100
taagaggttc caactttcac cataatgaaa taagatcact accgggcgta ttttttgagt 2160
tatcgagatt ttcaggagct ctttggcatc gtctctcgcc tgtccctca gttcagtaat 2220
ttcctgcatt tgctgtttc cagtcggtag atattccaca aaacagcagg gaagcagcgc 2280

ttttccgctg cataaccctg cttcgggggtc attatagcga ttttttcggt atatccatcc	2340
tttttcgcac gatatacagg attttgccaa agggttcgtg tagactttcc ttggtgtatc	2400
caacggcgctc agccggggcag gatagggtgaa gtaggcccac ccgcgagcgg gtgttccttc	2460
ttcactgtcc cttattcgca cctggcggtg ctcaacggga atcctgctct gcgaggctgg	2520
ccggctaccg ccggcgtaac agatgagggc aagcggatgg ctgatgaaac caagccaacc	2580
aggaagggca gccacacctat caaggtgtac tgccttccag acgaacgaag agcgattgag	2640
gaaaaggcgg cggcgggcgg catgagcctg tcggcctacc tgctggccgt cggccagggc	2700
tacaaaatca cgggcgtcgt ggactatgag cacgtccgcg agggcgctcc ggaaaacgat	2760
tccgaagccc aacctttcat agaaggcggc ggtggaatcg aaatctcgtg atggcaggtt	2820
gggcgtcgtc tggtcgggtca tttcgaaaaa ggtaggaat acggttagcc atttgccctgc	2880
ttttatatag ttcantatgg gattcacctt tatgttgata agaaataaaa gaaaatgcca	2940
ataggatata gccattttct tttgcgtttt tatttgtaa ctgttaattg tccttgttca	3000
aggatgctgt ctttgacaac agatgttttc ttgcctttga tggtcagcag gaagctcggc	3060
gcaaacgttg attgtttgtc tgcgtagaat cctctgtttg tcatatagct tgtaatcacg	3120
acattgtttc ctttcgcttg aggtacagcg aagtgtgagt aagtaaagggt tacatcgtta	3180
ggcggatcaa gatccatttt taacacaagg ccagttttgt tcagcggctt gtatgggcca	3240
gttaaagaat tagaaacata accaagcatg taaatatcgt tagacgtaat gccgtcaatc	3300
gtcatttttg atccgcggga gtcagtgaac aggtaccatt tgccgttcat tttaaagacg	3360
ttcgcgcgtt caatttcac tgttactgtg ttagatgcaa tcagcggttt catcactttt	3420
ttcagtgtgt aatcatcggt tagctcaatc ataccgagag cgccgtttgc taactcagcc	3480
gtgcgttttt tatcgctttg cagaagtttt tgactttctt gacggaagaa tgatgtgctt	3540
ttgccatagt atgctttgtt aaataaagat tcttcgcctt ggtagccatc ttcagttcca	3600
gtgtttgctt caaatactaa gtatttgtgg cttttatctt ctacgtagtg aggatctctc	3660
agcgtatggg tgtcgcctga gctgtagtgt cttcatcga tgaactgctg tacattttga	3720
tacgtttttc cgtcaccgtc aaagattgat ttataatcct ctacaccgtt gatgttcaaa	3780
gagctgtctg atgctgatac gttaacttgt gcagttgtca gtgtttgttt gccgtaatgt	3840
ttaccggaga aatcagtgtg gaataaacgg atttttccgt cagatgtaaa tgtggctgaa	3900
cctgaccatt cttgtgtttg gtcttttagg atagaatcat ttgcatcgaa tttgtcgtg	3960
tctttaaaga cgcggccagc gtttttccag ctgtcaatag aagtttcgcc gactttttga	4020
tagaacatgt aaatcgatgt gtcacccgca tttttaggat ctccggctaa tgcaaagacg	4080
atgtggtagc cgtgatagtt tgcgacagt cgcgcagcgt tttgtaatgg ccagctgtcc	4140
caaacgtcca ggccttttgc agaagagata tttttaattg tggacgaatc aaattcagaa	4200

acttgatatt tttcattttt ttgctgttca gggatttgca gcatatcatg gcgtgtaata	4260
tgggaaatgc cgtatgtttc cttatatggc ttttggttcg tttctttcgc aaacgcttga	4320
gttgcgctc ctgccagcag tgcggtagta aaggtaata ctgttgcttg ttttgcaaac	4380
tttttgatgt tcatcgttca tgtctccttt tttatgtact gtgttagcgg tctgcttctt	4440
ccagccctcc tgtttgaaga tggcaagtta gttacgcaca ataaaaaag acctaaaata	4500
tgtaaggggt gacgcaaag tatacacttt gccctttaca cattttaggt cttgcctgct	4560
ttatcagtaa caaaccgcg cgatttactt ttcgacctca ttctattaga ctctcgtttg	4620
gattgcaact ggtctatttt cctcttttgt ttgatagaaa atcataaaag gatttgcaga	4680
ctacgggcct aaagaactaa aaaatctatc tgtttctttt cattctctgt attttttata	4740
gtttctgttg catgggcata aagttgcctt tttaatcaca attcagaaaa tatcataata	4800
tctcatttca ctaaataata gtgaacggca ggtatatgtg atgggttaaa aaggatcacc	4860
ccagagtccc gctcagaaga actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc	4920
gggagcggcg ataccgtaaa gcacgaggaa gcggtcagcc cattcgccgc caagctcttc	4980
agcaatatca cgggtagcca acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc	5040
acagtcgatg aatccagaaa agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcatc	5100
gccatgggtc acgacgagat cctcgccgtc gggcatccgc gccttgagcc tggcgaacag	5160
ttcggctggc gcgagccct gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc	5220
ttccatccga gtacgtgctc gctcgatgcg atgtttcgtc tggtggtcga atgggcaggt	5280
agccggatca agcgtatgca gccgccgat tgcacagcc atgatggata ctttctcggc	5340
aggagcaagg tgagatgaca ggagatcctg ccccggaact tcgccaata gcagccagtc	5400
ccttcccgt tcagtgacaa cgtcgagaca gctgcgcaag gaacgcccgt cgtggccagc	5460
cacgatagcc gcgctgcctc gtcttgaggt tcattcaggg caccggacag gtcggtcttg	5520
acaaaaagaa ccgggcgccc ctgcgctgac agccggaaca cggcggcatc agagcagccg	5580
attgtctgtt gtgcccagtc atagccgaat agcctctcca cccaagcggc cggagaacct	5640
gcgtgcaatc catcttgttc aatcatgcga aacgatcctc atcctgtctc ttgatcagat	5700
cttgatcccc tgcgccatca gatccttggc ggcaagaaag ccatccagtt tactttgcag	5760
ggcttcccaa ccttaccaga gggcgcccca gctggcaatt ccg	5803

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.
2. Biến thể theo điểm 1, trong đó biến thể có khả năng sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin.
3. Polynucleotit mã hóa biến thể theo điểm 1.
4. Vector chứa polynucleotit theo điểm 3.
5. Vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1; và polynucleotit mã hóa biến thể.
6. Vi sinh vật theo điểm 5, trong đó vi sinh vật có khả năng tăng cường để sản sinh *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin so với vi sinh vật không biến đổi.
7. Vi sinh vật theo điểm 5, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.
8. Phương pháp sản xuất sản phẩm đích, trong đó phương pháp này bao gồm nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy, trong đó vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1; và polynucleotit mã hóa biến thể.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc thu hồi sản phẩm đích từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật.
10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó sản phẩm đích là *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin.

11. Phương pháp sản xuất methionin, trong đó phương pháp này bao gồm:

sản xuất *O*-axetylhomoserin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy, vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1; và polynucleotit mã hóa biến thể; và

chuyển đổi *O*-axetylhomoserin thành methionin bằng cách cho phản ứng *O*-axetylhomoserin với sulfua.

12. Phương pháp sản xuất glufosinat, trong đó phương pháp này bao gồm:

sản xuất *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy, vi sinh vật bao gồm ít nhất một trong số biến thể của protein màng trong YjeH bao gồm i) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 92 bằng asparagin, ii) thay thế axit amin tương ứng với vị trí thứ 351 bằng leuxin, hoặc iii) thay thế cả i) và ii) trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và có sự tương đồng tối thiểu 95% và tối đa 100% với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1; và polynucleotit mã hóa biến thể; và

chuyển đổi *O*-axetylhomoserin hoặc homoserin thành glufosinat.

13. Chế phẩm sản xuất homoserin bao gồm vi sinh vật theo điểm 5 hoặc dịch nuôi cấy vi sinh vật.

14. Chế phẩm sản xuất *O*-axetylhomoserin bao gồm vi sinh vật theo điểm 5 hoặc dịch nuôi cấy vi sinh vật.

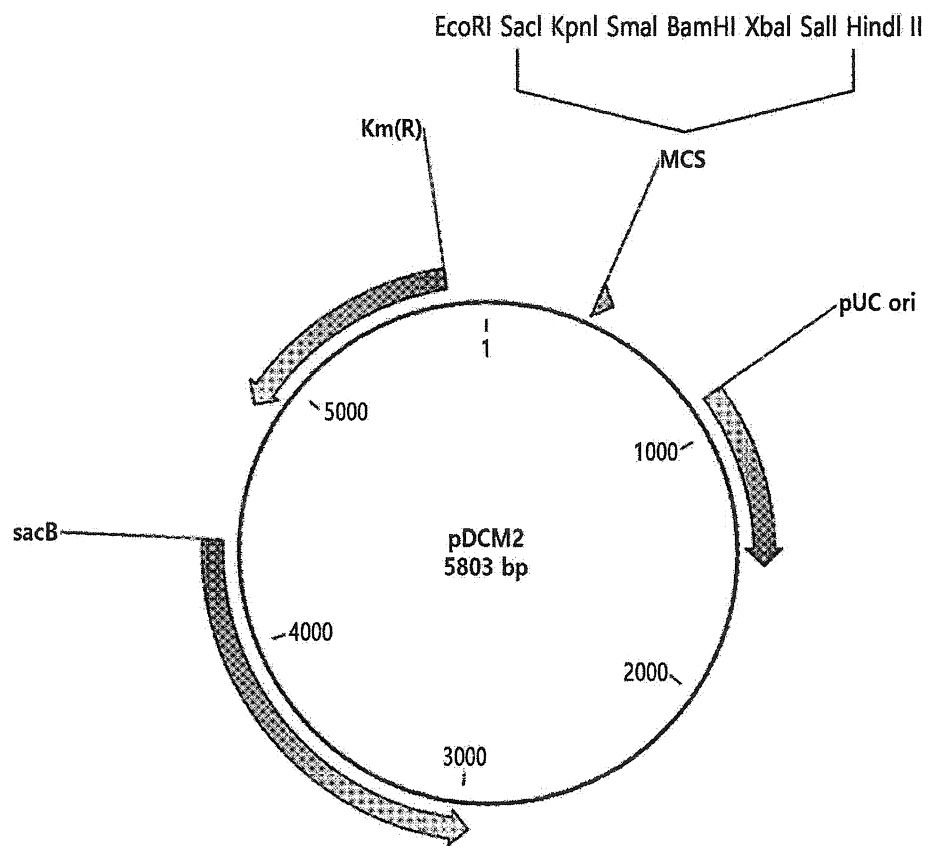


Fig.1