



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0048722
(51)^{2022.01} C12N 9/10; C12P 13/12; C12P 13/06; (13) B
C12N 15/77
-

- (21) 1-2023-06236 (22) 10/03/2022
(86) PCT/KR2022/003357 10/03/2022 (87) WO 2022/191633 15/09/2022
(30) 10-2021-0031643 10/03/2021 KR
(45) 25/07/2025 448 (43) 26/02/2024 431
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea
(72) CHANG, Jin Sook (KR); CHO, Seung Hyun (KR); KIM, Seo-Yun (KR); LEE,
Jaemin (KR); BAEK, Min Ji (KR); LEE, Imsang (KR).
(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)
-

- (54) BIẾN THỂ SYNTHAZA XITRAT, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA BIẾN THỂ
NÀY, VI SINH VẬT THUỘC CHI CORYNEBACTERIUM VÀ PHƯƠNG PHÁP
SẢN XUẤT VÀ CHẾ PHẨM ĐỂ SẢN XUẤT O-AXETYL-L-HOMOSERIN
HOẶC L-METHIONIN

(21) 1-2023-06236

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể synthaza xitrat mới, polynucleotit mã hóa biến thể này, vi sinh vật chứa biến thể này, và phương pháp sản xuất O-axetyl-L-homoserin và L-methionin, chế phẩm để sản xuất O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin sử dụng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể synthaza xitrat mới, polynucleotit mã hóa biến thể này, vi sinh vật chứa biến thể này, và phương pháp sản xuất O-axetyl-L-homoserin và L-methionin và chế phẩm để sản xuất O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Để sản xuất các L-axit amin và các chất có lợi khác, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để phát triển các vi sinh vật có sản lượng và công nghệ cho quá trình lên men hiệu quả cao. Ví dụ, các phương pháp tiếp cận cụ thể đối với vật liệu đích, chẳng hạn như phương pháp tăng biểu hiện gen mã hóa enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp O-axetyl-L-homoserin hoặc phương pháp loại bỏ gen không cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp, đã được sử dụng rộng rãi (patent Hoa Kỳ số US 8283152 B2).

Trong khi đó, synthaza xitrat (citrate synthase: CS) là enzym tạo ra xitrat bằng cách xúc tác quá trình ngưng tụ axetyl-CoA và oxaloaxetat, được tạo ra trong quá trình đường phân của vi sinh vật, và cũng là enzym quan trọng để xác định dòng cacbon đi vào con đường TCA.

Những thay đổi về kiểu hình ở các chủng sản sinh L-lysin do việc xóa gen *gltA* mã hóa synthaza xitrat đã được báo cáo trong tài liệu trước đó (Ooyen et al., Biotechnol. Bioeng., 109(8):2070-2081, 2012). Tuy nhiên, những chủng bị xóa gen *gltA* này có nhược điểm là không chỉ sự tăng trưởng bị ức chế mà tỷ lệ tiêu thụ đường của chúng cũng giảm đáng kể, do đó dẫn đến sản lượng lysin trên một đơn vị thời gian thấp. Theo đó, vẫn cần nghiên cứu sâu hơn để tính đến cả việc tăng hiệu quả năng suất L-axit amin và sự phát triển của các chủng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Nhờ những nỗ lực chuyên sâu để sản xuất O-axetyl-L-homoserin và L-methionin với hiệu suất cao, các tác giả sáng chế đã hoàn thiện sáng chế bằng cách xác nhận rằng

biến thể synthaza xitrat mới làm tăng khả năng sản sinh O-axetyl-L-homoserin và L-methionin.

Mục đích của sáng chế là đề xuất biến thể synthaza xitrat trong đó lysin là axit amin tương ứng với vị trí 415 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng histidin.

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

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, chứa biến thể theo sáng chế hoặc polynucleotit mã hóa biến thể.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin sử dụng vi sinh vật theo sáng chế.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm để sản xuất O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin chứa vi sinh vật theo sáng chế; môi trường nuôi cấy trong đó vi sinh vật theo sáng chế được phát triển; hoặc sự kết hợp của chúng.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Khi biến thể synthaza xitrat theo sáng chế được sử dụng, O-axetyl-L-homoserin và L-methionin có thể được sản xuất với hiệu suất cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết sau đây. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ trong sáng chế có thể được áp dụng tương ứng cho phần mô tả và các phương án khác với các đặc tính thông thường. Tức là, tất cả sự kết hợp của các chi tiết khác nhau được bộc lộ trong sáng chế đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi bảo hộ của sáng chế không chỉ bị giới hạn bởi các mô tả chi tiết dưới đây. Ngoài ra, nhiều bài báo và tài liệu sáng chế đã được trích dẫn trong bản mô tả này. Nội dung của các bài báo và tài liệu sáng chế được đưa vào bản mô tả này bằng cách tham chiếu toàn bộ, và mức độ lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế cũng như nội dung của sáng chế sẽ được mô tả rõ ràng hơn.

Khía cạnh của sáng chế là đề xuất biến thể synthaza xitrat trong đó lysin là axit amin tương ứng với vị trí 415 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng histidin.

Biến thể theo sáng chế có thể biến thể, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 415 dựa trên các trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 là histidin, và có sự tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7% hoặc 99,9% so với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Ví dụ, biến thể theo sáng chế có thể là biến thể, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 415 dựa trên trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 là histidin, và có thể có hoặc bao gồm trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7% hoặc 99,9% so với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, hoặc có thể chỉ bao gồm hoặc về cơ bản chỉ bao gồm trình tự axit amin. Ngoài ra, rõ ràng rằng bất kỳ biến thể có trình tự axit amin, trong đó một phần của trình tự bị xóa, biến đổi, thay thế, hoặc thay thế bảo thủ hoặc thêm vào, cũng có thể thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế miễn là trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất này và biểu hiện hiệu quả tương ứng với hiệu quả của biến thể theo sáng chế.

Ví dụ, có thể là trường hợp trong đó đầu N, đầu C và/hoặc bên trong trình tự axit amin được thêm vào hoặc xóa bằng trình tự không làm thay đổi chức năng của biến thể theo sáng chế, đột biến xảy ra tự nhiên, đột biến câm, hoặc thay thế bảo thủ.

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 các tính chất hóa học và/hoặc cấu trúc tương tự. 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. Cụ thể, các thay thế bảo thủ có thể có ít hoặc không có ảnh hưởng đến hoạt tính của protein hoặc polypeptit.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể” đề cập đến polypeptit có một hoặc nhiều trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của biến thể trước khi đột biến bởi sự thay thế bảo thủ và/hoặc biến đổi sao cho các chức năng và các đặc tính của polypeptit được giữ lại. Các biến thể này thường có thể được xác định bằng cách biến đổi một hoặc nhiều trình tự axit amin nêu trên của polypeptit và đánh giá các đặc tính của polypeptit đã biến đổi. Tức là, khả năng của các biến thể có thể được tăng cường, không thay đổi, hoặc giảm đi so với polypeptit trước khi biến đổi. Hơn nữa, một số biến thể có thể bao gồm những biến thể trong đó một hoặc nhiều vùng, chẳng hạn như trình tự dẫn đầu đầu

N hoặc miền xuyên màng được loại bỏ. Ngoài ra, các biến thể khác có thể bao gồm những biến thể trong đó một vùng đã được loại bỏ khỏi đầu N và/hoặc đầu C của protein trưởng thành. Thuật ngữ “biến thể” có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ như được biến đổi, polypeptit biến đổi, protein biến đổi, đột biến, mutein, phân kỳ, biến thể, v.v., miễn là các thuật ngữ được sử dụng để thể hiện sự biến đổi. Đối với mục đích của sáng chế, biến thể có thể là biến thể trong đó lysin (Lys, K), là axit amin tương ứng với vị trí 415 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng histidin (His, H).

Ngoài ra, các biến thể có thể còn bao gồm việc xóa hoặc thêm các axit amin có ảnh hưởng tối thiểu đến các tính chất và cấu trúc bậc hai của polypeptit. Ví dụ, các biến thể có thể được liên hợp với trình tự tín hiệu (hoặc dẫn đầu) ở đầu N tham gia vào chuyển dịch của các protein đồng dịch mã hoặc sau dịch mã. Ngoài ra, các biến thể còn có thể được liên hợp với trình tự hoặc liên kết khác để xác định, tinh chế, hoặc tổng hợp polypeptit.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” có nghĩa là mức độ kết hợp với hai trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit, 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 có thể được sử dụng với hàm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình được sử dụng. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất thường được mong muốn có thể lai hóa theo toàn bộ hoặc một phần của các trình tự trong các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc trung bình. Rõ ràng rằng việc lai hóa với các polynucleotit chứa đơn vị mã hóa (codon) thông thường hoặc các codon thoái biến trong lai hóa các polynucleotit cũng được xem xét.

Ví dụ, bất kỳ hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng thuật toán máy tính đã biết như thuật toán “FASTA” bằng cách sử dụng các thông số mặc định. Thay vào đó, có thể xác định bằng thuật toán Needleman–Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443–453) được thực hiện bằng cách sử dụng 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) (tốt hơn là phiên bản 5.0.0 hoặc cao hơn) (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 hoặc ClustalW của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI).

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa các polynucleotit hoặc polypeptit có thể, ví dụ, được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng, ví dụ, chương trình máy tính GAP chẳng hạn như Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443 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 đồng, tương tự, hoặc đồng nhất như giá trị thu được bằng cách chia số lượng các ký hiệu được căn chỉnh (tức là, các nucleotit hoặc axit amin) giống nhau cho tổng số ký hiệu trong một đoạn ngắn hơn của hai trình tự. 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) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov et al. (1986), Nucl. Acids Res. 14:6745, như được đưa ra 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.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương ứng với” đề cập đến gốc axit amin ở vị trí được nêu trong peptit, hoặc gốc axit amin tương tự, giống nhau, hoặc tương đồng với gốc axit amin được nêu trong peptit. Việc xác định axit amin ở vị trí tương ứng có thể là xác định axit amin cụ thể trong trình tự đề cập đến trình tự cụ thể. Như được sử dụng ở đây, “vùng tương ứng” thường đề cập đến vị trí tương tự hoặc tương ứng trong protein liên quan hoặc protein tham chiếu.

Ví dụ, bất kỳ trình tự axit amin được sắp xếp theo SEQ ID NO: 1, và dựa trên sự

sắp xếp này, mỗi gốc axit amin của trình tự axit amin có thể được đánh số theo vị trí số của gốc axit amin tương ứng với axit amin gốc có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Ví dụ, thuật toán căn chỉnh trình tự như được mô tả ở đây có thể xác định vị trí của axit amin hoặc vị trí mà các biến đổi như thay thế, thêm hoặc xóa xảy ra so với trình tự truy vấn (còn được gọi là “trình tự tham chiếu”).

Ví dụ về việc căn chỉnh có thể được xác định bởi thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), được thực hiện bằng cách sử dụng 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), v.v., nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó, và các chương trình căn chỉnh trình tự, chẳng hạn như các thuật toán so sánh trình tự theo cặp, v.v., đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng thích hợp.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “synthaza xitrat” đề cập đến enzym tạo ra xitrat bằng cách xúc tác quá trình ngưng tụ axetyl-CoA và oxaloaxetat, được tạo ra trong quá trình đường phân của vi sinh vật. Ngoài ra, synthaza xitrat xúc tác phản ứng ngưng tụ của hai gốc cacbon axetat từ axetyl-CoA và phân tử của 4-cacbon oxaloaxetat để tạo ra 6-cacbon xitrat. Thuật ngữ “synthaza xitrat” có thể được sử dụng thay thế cho “enzym tổng hợp xitrat”, “CS”, “GltA protein”, hoặc “GltA”. Theo sáng chế, trình tự của GltA có thể thu được từ cơ sở dữ liệu đã biết của ngân hàng gen NCBI. Ngoài ra, GltA có thể là polypeptit có hoạt tính synthaza xitrat được mã hóa bởi gen *gltA*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Biến thể theo sáng chế có thể có hoạt tính tăng O-axetyl-L-homoserin hoặc hoạt tính sản sinh L-methionin so với polypeptit kiểu đại.

Biến thể theo sáng chế có thể là biến thể synthaza xitrat trong đó asparagin là axit amin tương ứng với vị trí 241 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng threonin.

Biến thể theo sáng chế có thể là biến thể, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 241 dựa trên trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 là threonin, và có sự tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất nhiều hơn 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7% hoặc 99,9% so với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Ví dụ, biến thể theo

sáng chế có thể là biến thể, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 241 dựa trên trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 trong trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 là histidin, và có thể có hoặc bao gồm trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất nhiều hơn 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7% hoặc 99,9% so với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, hoặc có thể chỉ bao gồm hoặc về cơ bản chỉ bao gồm trình tự axit amin. Ngoài ra, rõ ràng rằng bất kỳ biến thể có trình tự axit amin, trong đó một phần của trình tự bị xóa, biến đổi, thay thế, thay thế bảo thủ hoặc thêm vào, cũng có thể thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế miễn là trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất và biểu hiện hiệu quả tương ứng với hiệu quả của biến thể theo sáng chế.

Biến thể theo sáng chế có thể có sự đồng nhất trình tự nhiều hơn 80% so với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.

Ngoài ra, biến thể theo sáng chế có thể bao gồm polypeptit được thể hiện bởi trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3. Trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 có thể là trình tự axit amin trong đó lysin tương ứng với vị trí 415 trong trình tự axit amin ở vị trí 362 đến vị trí 415 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng histidin.

Biến thể theo sáng chế có thể bao gồm trình tự axit amin có công thức chung 1 dưới đây:

Công thức chung 1

X_1N HGGDATX₂FMN KVKNKEDGVR LMGFGHRVYK NYDPRAAIVK
ETAHEILEHL GGDDLIDLAI KLEEIALADD X₃FISRKLYPN VDFYTGLIYR
AMGFPTDFFT VLFAIGRLPG WIAHYREQLG AAGNH (SEQ ID NO: 33);

trong đó công thức chung nêu trên,

X_1 là asparagin hoặc serin;

X_2 là alanin hoặc axit glutamic; và

X_3 là tyrosin hoặc xystein.

Biến thể theo sáng chế có thể là biến thể synthaza xitrat trong đó lysin là axit amin tương ứng với vị trí 415 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, được thay thế bằng histidin, và asparagin, là axit amin tương ứng với vị trí 241 của trình tự

axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng threonin.

Biến thể theo sáng chế có thể có sự đồng nhất trình tự nhiều hơn 90% so với trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 6. Ngoài ra, biến thể theo sáng chế có thể bao gồm, chỉ bao gồm, hoặc về cơ bản bao gồm trình tự axit amin có sự đồng nhất trình tự nhiều hơn 90% so với trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 6. Ví dụ, biến thể theo sáng chế có thể có sự đồng nhất trình tự 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, hoặc 99,7% so với trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 6, có thể bao gồm trình tự axit amin có sự đồng nhất trình tự, hoặc có thể chỉ bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm trình tự axit amin có sự đồng nhất trình tự.

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

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit” là polyme của các nucleotit có trong các đơn phân nucleotit được liên kết trong mạch dài bằng liên kết cộng hóa trị, là sợi ADN hoặc ARN có độ dài nhất định. Tốt hơn là, polynucleotit có thể đề đến phân đoạn polynucleotit mã hóa biến thể.

Trong polynucleotit theo sáng chế, có thể bao gồm các nucleotit tương ứng với các vị trí từ 1243 đến 1245 dựa trên trình tự axit nucleic có mã nhận biết SEQ ID NO: 2 là CAC, và bất kỳ polynucleotit được thể hiện bởi trình tự axit nucleic có sự tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7%, hoặc 99,9% hoặc nhiều hơn, và ít hơn 100% so với trình tự axit nucleic có mã nhận biết SEQ ID NO: 2. Ngoài ra, trong polynucleotit theo sáng chế, có thể bao gồm các nucleotit tương ứng với các vị trí từ 1243 đến 1245 và 721 đến 723 dựa trên trình tự axit nucleic có mã nhận biết SEQ ID NO: 2 là CAC và ACC, và bất kỳ polynucleotit được thể hiện bởi trình tự axit nucleic có sự tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,%, 99,7%, hoặc 99,9% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit nucleic có các mã nhận biết SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 7. Ngoài ra, rõ ràng rằng bất kỳ polynucleotit được thể hiện bởi trình tự axit nucleic, trong đó một phần của trình tự bị xóa, biến đổi, thay thế, thay thế bảo thủ hoặc thêm vào, cũng có thể thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế miễn là trình tự axit amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất và mã hóa polypeptit hoặc protein biểu hiện hiệu quả tương ứng với hiệu quả của biến thể theo sáng chế.

Polynucleotit theo sáng chế có thể thực hiện các biến đổi khác nhau trong vùng mã hóa trong phạm vi không làm thay đổi trình tự axit amin của biến thể theo sáng chế, do sự thoái biến codon hoặc trong sự xem xét các codon được ưu tiên trong sinh vật trong đó biến thể theo sáng chế được biểu hiện. Trong phần mô tả này, trình tự có sự tương đồng hoặc đồng nhất, codon mã hóa axit amin tương ứng với vị trí 415 có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể là một trong các codon mã hóa histidin. Ngoài ra, trong trình tự có sự tương đồng hoặc đồng nhất, codon mã hóa axit amin tương ứng với vị trí 241 có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 có thể là một trong các codon mã hóa threonin.

Ngoài ra, polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm đầu dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ bất kỳ trình tự có thể lai hóa với trình tự bổ sung cho toàn bộ hoặc một phần của trình tự polynucleotit theo sáng chế trong các điều kiện nghiêm ngặt mà không bị giới hạn ở đây. “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 (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, 9.50-9.51, 11.7-11.8). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện trong đó các polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất cao nhiều hơn 70%, nhiều hơn 75%, nhiều hơn 80%, nhiều hơn 85%, nhiều hơn 90%, nhiều hơn 95%, nhiều hơn 96%, nhiều hơn 97%, nhiều hơn 98%, hoặc 99% lai với nhau và các polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên không lai với nhau, hoặc các điều kiện rửa của lai Southern, tức là, rửa một lần, tốt hơn là hai đến ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, tốt hơn là 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, và tốt nhất là 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS.

Sự lai hóa đòi hỏi hai axit nucleic 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 nucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin được bổ sung với thymine, và xytosin được bổ sung với guanin. Do đó, polynucleotit của sáng chế có thể bao gồm các phân đoạn nucleotit được tách chiết bổ sung với toàn bộ trình tự cũng như các trình tự axit nucleic giống nhau về cơ bản.

Cụ thể, các polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất với polynucleotit theo

sáng chế có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai bao gồm bước lai với giá trị T_m ở nhiệt độ 55°C trong các điều kiện nêu trên. 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 kiểm soát thích hợp bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy thuộc vào mục đích sử dụng.

Độ nghiêm ngặt thích hợp trong lai hóa các polynucleotit tùy thuộc vào chiều dài của các polynucleotit và mức độ bổ sung, và các thông số của chúng đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, Sambrook et al.).

Trong một ví dụ, polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm polynucleotit được thể hiện bởi trình tự axit nucleic ở các vị trí từ 1084 đến 1245 dựa trên trình tự axit nucleic có mã nhận biết SEQ ID NO: 5, hoặc polynucleotit được thể hiện bởi trình tự axit nucleic có mã nhận biết SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 7.

Trong polynucleotit theo sáng chế, biến đã được mô tả ở trên trong các lĩnh vực khác.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất vector chứa polynucleotit theo sáng chế. Vector có thể là vector biểu hiện để biểu hiện polynucleotit trong tế bào vật chủ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Vector theo sáng chế có thể bao gồm cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa polypeptit đích được liên kết chức năng với trình tự điều hòa (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, bất kỳ trình tự toán tử 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.

Vector được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và bất kỳ vector đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Các ví dụ của vector thường có thể bao gồm các plasmit, cosmit, virus và thể thực khuẩn tái tổ hợp hoặc tự nhiên. Ví dụ, như vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmit, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, và Charon21A; và như vector plasmit, những vector dựa trên pDZ, pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL và pET, v.v. có thể được sử dụng. Cụ

thể, có thể sử dụng pDZ, pDC, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117(Biotechnology letters tập 13, No. 10, các trang. 721-726(1991), đơn patent Hàn Quốc số 10-1992-0007401), vector pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, v.v. có thể được sử dụng.

Trong một ví dụ, polynucleotit mã hóa polypeptit đích có thể được chèn vào nhiễm sắc thể thông qua vector để chèn nhiễm sắc thể nội bào. Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng, tuy nhiên phương pháp không bị giới hạn ở đây. Vector có thể còn bao gồm chỉ dấu chọn lọc để xác nhận sự chèn vào nhiễm sắc thể. Chỉ dấu chọn lọc là để lựa chọn các tế bào được biến nạp với vector, tức là để xác nhận xem phân tử axit nucleic đích đã được chèn vào hay chưa, và các chỉ dấu cung cấp các kiểu hình có thể chọn lọc, chẳng hạn như kháng thuốc, dinh dưỡng thụ động, kháng các chất gây độc tế bào, hoặc biểu hiện của các polypeptit bề mặt có thể được sử dụng. Chỉ các tế bào biểu hiện chỉ dấu chọn lọc có thể tồn tại hoặc biểu 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.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến việc đưa vector chứa polynucleotit mã hóa polypeptit đích vào tế bào vật chủ hoặc vi sinh vật sao cho polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ. Miễn là polynucleotit đã biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ, không quan trọng liệu polynucleotit đã biến nạp được chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ và nằm trong đó hoặc nằm bên ngoài nhiễm sắc thể, và cả hai trường hợp có thể được bao gồm. Ngoài ra, polynucleotit có thể bao gồm ADN và/hoặc ARN mã hóa polypeptit đích. Polynucleotit có thể được đưa vào ở bất kỳ dạng nào miễn là polynucleotit được đưa vào tế bào vật chủ và 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 biểu hiện độc lập của nó. Catxet biểu hiện thông thường có thể bao gồm vùng gen khởi động được liên kết chức năng với polynucleotit, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom, hoặc tín hiệu kết thúc dịch mã. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ ở dạng ban đầu và được liên kết chức năng đến các trình tự yêu cầu đối với sự biểu hiện trong tế bào vật chủ, tuy nhiên sáng

chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được liên kết chức năng” có nghĩa là trình tự polynucleotit được liên kết chức năng với trình tự vùng gen khởi động bắt đầu và làm trung gian phiên mã của polynucleotit mã hóa biến thể đích của sáng chế.

Trong vector theo sáng chế, biến thể và polynucleotit đã được mô tả ở trên trong các khía cạnh khác.

Khía cạnh khác nữa theo sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, chứa biến thể theo sáng chế hoặc polynucleotit theo sáng chế.

Vi sinh vật theo sáng chế có thể bao gồm biến thể theo sáng chế, polynucleotit mã hóa biến thể, hoặc vector chứa polynucleotit theo sáng chế.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “vi sinh vật (hoặc chủng)” bao gồm tất cả vi sinh vật kiểu dại, hoặc các vi sinh vật biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo, và có thể là vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể bị suy giảm hoặc tăng cường do chèn gen ngoại sinh, hoặc do sự tăng cường hoặc bất hoạt hoạt tính của gen nội sinh, v.v., và có thể là vi sinh vật bao gồm sự biến đổi gen để sản xuất polypeptit, protein hoặc sản phẩm mong muốn.

Vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều biến thể theo sáng chế, polynucleotit theo sáng chế, và vector chứa polynucleotit theo sáng chế; vi sinh vật được biến đổi để biểu hiện biến thể theo sáng chế hoặc polynucleotit theo sáng chế; vi sinh vật (ví dụ, chủng tái tổ hợp) biểu hiện biến thể theo sáng chế hoặc polynucleotit theo sáng chế; hoặc vi sinh vật (ví dụ, chủng tái tổ hợp) có hoạt tính biến thể theo sáng chế, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Vi sinh vật theo sáng chế có thể là chủng có hoạt tính sản sinh O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin.

Vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật có hoạt tính sản sinh GltA, O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin tự nhiên, hoặc vi sinh vật được đưa biến thể theo sáng chế hoặc polynucleotit mã hóa biến thể này (hoặc vector chứa polynucleotit) vào chủng bố mẹ không có hoạt tính sản sinh GltA, O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin tự nhiên, và/hoặc vi sinh vật được đưa vào hoạt tính sản sinh GltA, O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Trong một ví dụ, vi sinh vật theo sáng chế là tế bào hoặc vi sinh vật được biến nạp

với polynucleotit theo sáng chế hoặc vector chứa polynucleotit theo sáng chế để biểu hiện biến thể theo sáng chế, và các mục đích theo sáng chế, vi sinh vật theo sáng chế có thể bao gồm tất cả vi sinh vật có khả năng sản sinh O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin, chứa biến thể theo sáng chế. Ví dụ, chủng theo sáng chế có thể là chủng tái tổ hợp mà khả năng sản sinh O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin tăng lên bằng cách đưa polynucleotit mã hóa biến thể theo sáng chế vào vi sinh vật kiểu đại hoặc vi sinh vật sản sinh O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin. Chủng tái tổ hợp với khả năng sản sinh GltA, O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin tăng cường có thể là vi sinh vật có khả năng sản sinh GltA, O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin tăng cường so với vi sinh vật kiểu đại hoặc vi sinh vật không biến đổi của synthaza xitrat (tức là, vi sinh vật biểu hiện protein kiểu đại (SEQ ID NO: 1) hoặc vi sinh vật không biểu hiện biến thể theo sáng chế), nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Ví dụ, vi sinh vật không biến đổi của synthaza xitrat là chủng đích để so sánh sự tăng lên trong khả năng sản sinh GltA, O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin, có thể là chủng ATCC14067, chủng ATCC13032, và chủng ATCC13869, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Trong một ví dụ, chủng tái tổ hợp có khả năng sản sinh tăng cường có thể khả năng sản sinh GltA, O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin lên đến khoảng nhiều hơn 1%, nhiều hơn 5%, nhiều hơn 7%, khoảng nhiều hơn 10%, khoảng nhiều hơn 20%, hoặc khoảng nhiều hơn 30% (giới hạn trên không bị giới hạn cụ thể, ví dụ, khoảng ít hơn 200%, khoảng ít hơn 150%, khoảng ít hơn 100%, khoảng ít hơn 50%, khoảng ít hơn 45%, khoảng ít hơn 40%, hoặc khoảng ít hơn 30%) so với khả năng sản sinh O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin của chủng bố mẹ trước vi sinh vật không biến đổi hoặc biến đổi, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó, miễn là có giá trị + tăng so với khả năng sản sinh của chủng bố mẹ trước vi sinh vật không biến đổi hoặc biến đổi. Trong ví dụ khác, chủng tái tổ hợp có khả năng sản sinh tăng cường có thể có khả năng sản sinh GltA, O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin tăng cường khoảng nhiều hơn 1,01 lần, khoảng nhiều hơn 1,05 lần, khoảng nhiều hơn 1,07 lần, khoảng nhiều hơn 1,1 lần, khoảng nhiều hơn 1,2 lần, hoặc khoảng nhiều hơn 1,3 lần (giới hạn trên không bị giới hạn, ví dụ, khoảng ít hơn 10 lần, khoảng ít hơn 5 lần, khoảng ít hơn 3 lần, hoặc khoảng ít hơn 2 lần) so với khả năng sản sinh của chủng bố mẹ trước vi sinh vật không biến đổi hoặc biến đổi.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “khoảng” đề cập đến phạm vi bao gồm tất cả

$\pm 0,5$, $\pm 0,4$, $\pm 0,3$, $\pm 0,2$, $\pm 0,1$, v.v., và bao gồm tất cả giá trị tương đương hoặc tương tự giá trị sau đó, nhưng phạm vi không bị giới hạn ở đó.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “vi sinh vật không biến đổi” không loại trừ chủng chứa đột biến có thể xảy ra tự nhiên trong vi sinh vật, và có thể đề cập đến chủng kiểu dại hoặc chủng kiểu tự nhiên, hoặc chủng trước khi tính trạng bị thay đổi do sự biến đổi gen do các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo gây ra. Ví dụ, vi sinh vật không biến đổi có thể đề cập đến chủng trong đó biến thể protein đã mô tả ở trên không được đưa vào, hoặc chủng trước khi đưa vào. “Chủng không biến đổi” có thể được sử dụng thay thế cho “chủng trước khi biến đổi”, “vi sinh vật trước khi biến đổi”, “chủng không đột biến”, “chủng không biến đổi”, “vi sinh vật không đột biến” hoặc “vi sinh vật tham chiếu”.

Trong ví dụ khác theo sáng chế, vi sinh vật theo sáng chế có thể là *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium crudilactis*, *Corynebacterium deserti*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium stationis*, *Corynebacterium singulare*, *Corynebacterium halotolerans*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium pollutisoli*, *Corynebacterium imitans*, *Corynebacterium testudinoris*, hoặc *Corynebacterium flavescens*.

Vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật trong đó protein NCgl2335 còn được làm suy giảm.

Ngoài ra, vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật trong đó hoạt tính của chất xuất khẩu axit amin mạch nhánh/L-methionin (YjeH) còn được tăng cường.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “suy giảm” của polypeptit có nghĩa là bao gồm cả hoạt tính được làm suy giảm hoặc không có hoạt tính so với hoạt tính nội tại. Suy giảm có thể được sử dụng thay thế cho nhau bằng các thuật ngữ chẳng hạn như bất hoạt, thiếu hụt, giảm điều hòa, giảm, làm giảm, suy yếu, v.v..

Suy giảm còn có thể bao gồm trường hợp trong đó hoạt tính của bản thân polypeptit được làm giảm hoặc loại bỏ so với hoạt tính của polypeptit có sẵn ban đầu bởi vi sinh vật do sự đột biến của polynucleotit mã hóa polypeptit; trường hợp trong đó mức độ tổng thể của hoạt tính protein nội bào thấp hơn so với hoạt tính của chủng tự nhiên, do sự ức chế biểu hiện hoặc ức chế dịch mã của gen mã hóa protein, trường hợp trong đó toàn bộ mức độ của hoạt tính polypeptit nội bào và/hoặc nồng độ (mức độ biểu hiện) giảm so với chủng tự nhiên do sự ức chế biểu hiện gen của polynucleotit mã hóa

polypeptit, hoặc sự ức chế dịch mã thành polypeptit, v.v.; trường hợp trong đó polynucleotit không biểu hiện hoàn toàn; và/hoặc trường hợp trong đó không có hoạt tính polypeptit được quan sát ngay cả khi polynucleotit được biểu hiện. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hoạt tính nội sinh” đề cập đến hoạt tính của polypeptit cụ thể có sẵn ban đầu bởi chúng bố mẹ trước khi biến nạp, vì sinh vật không biến đổi hoặc kiểu dại, khi một tính trạng bị thay đổi do biến đổi gen gây ra bởi các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo, và có thể được sử dụng thay thế cho “hoạt tính trước khi biến đổi”. Sự biểu hiện trong đó hoạt tính của polypeptit được “bất hoạt, thiếu hụt, giảm, điều chỉnh xuống, giảm hoặc suy yếu” so với hoạt tính nội sinh của nó có nghĩa là hoạt tính polypeptit giảm so với hoạt tính của polypeptit cụ thể có sẵn ban đầu bởi chúng bố mẹ trước khi biến nạp hoặc vi sinh vật không biến đổi.

Suy giảm của hoạt tính polypeptit có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, nhưng phương pháp không bị giới hạn ở đó, và có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, Nakashima N et al., *Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing*. Int J Mol Sci. 2014;15(2):2773-2793, Sambrook et al. *Molecular Cloning* 2012, v.v.).

Cụ thể, suy giảm của hoạt tính polypeptit theo sáng chế có thể là:

- 1) xóa tất cả hoặc một phần gen mã hóa polypeptit;
- 2) biến đổi vùng điều hòa biểu hiện (hoặc trình tự điều hòa biểu hiện) sao cho làm giảm sự biểu hiện của gen mã hóa polypeptit;
- 3) biến đổi trình tự axit amin tạo thành polypeptit sao cho hoạt tính polypeptit được loại bỏ hoặc làm suy giảm (ví dụ, xóa/thay thế/thêm vào một hoặc nhiều axit amin trên trình tự axit amin);
- 4) biến đổi trình tự gen mã hóa polypeptit sao cho hoạt tính polypeptit được loại bỏ hoặc làm suy giảm (ví dụ, xóa/thay thế/thêm vào một hoặc nhiều nucleotit trên trình tự nucleotit của gen polypeptit để mã hóa polypeptit được biến đổi để loại bỏ hoặc làm suy giảm hoạt tính của polypeptit);
- 5) biến đổi trình tự nucleotit mã hóa codon khởi đầu hoặc 5'-UTR của phiên mã gen mã hóa polypeptit;

6) đưa vào antisense oligonucleotit (ví dụ, ARN antisense) liên kết bổ sung với phiên mã gen mã hóa polypeptit;

7) thêm vào trình tự bổ sung cho trình tự Shine–Dalgarno ở phía trước của trình tự SD của gen mã hóa polypeptit để tạo ra cấu trúc thứ cấp, nhờ đó ức chế sự liên kết của ribosom;

8) kỹ thuật phiên mã ngược (reverse transcription engineering: RTE) thêm vào vùng gen khởi động, được phiên mã ngược ở đầu 3' của khung đọc mở (open reading frame: ORF) của trình tự gen mã hóa polypeptit; hoặc

9) sự kết hợp hai hoặc nhiều phương pháp được chọn từ 1) đến 8), nhưng sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở đó.

Ví dụ, xóa một phần hoặc tất cả gen mã hóa polypeptit theo phương pháp 1) có thể là xóa tất cả polypeptit mã hóa polypeptit đích nội sinh bên trong nhiễm sắc thể, hoặc thay thế polynucleotit bằng polynucleotit có nucleotit được xóa một phần, hoặc gen chỉ dấu.

Biến đổi vùng điều hòa biểu hiện (trình tự điều hòa biểu hiện) theo phương pháp 2) có thể là tạo ra biến đổi trên vùng điều hòa biểu hiện (trình tự điều hòa biểu hiện) bằng việc xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ, hoặc sự kết hợp của chúng; hoặc thay thế trình tự bằng trình tự có hoạt tính suy yếu hơn. Vùng điều hòa biểu hiện có thể bao gồm vùng gen khởi động, trình tự toán tử, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom, trình tự điều hòa sự kết thúc phiên mã và dịch mã, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Biến đổi trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit theo phương pháp 3) và phương pháp 4) có thể là tạo ra biến đổi trên trình tự bằng việc xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ của trình tự axit amin của polypeptit hoặc trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit, hoặc sự kết hợp của chúng để làm suy giảm hoạt tính của polypeptit, hoặc thay thế trình tự với trình tự axit amin hoặc polynucleotit được biến đổi để có hoạt tính yếu hơn, hoặc trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit được biến đổi để không có hoạt tính, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Ví dụ, biểu hiện gen có thể được ức chế hoặc làm suy giảm bằng cách đưa đột biến vào trình tự polynucleotit để tạo ra codon kết thúc, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Biến đổi trình tự nucleotit mã hóa codon khởi đầu hoặc 5'-UTR của phiên mã gen mã hóa polypeptit theo phương pháp 5) có thể là, ví dụ, thay thế trình tự nucleotit bằng trình tự nucleotit mã hóa codon khởi đầu khác có mức biểu hiện polypeptit thấp hơn codon khởi đầu nội sinh, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Đưa vào antisense oligonucleotit (ví dụ, ARN antisense) liên kết bổ sung với phiên mã gen mã hóa polypeptit theo phương pháp 6) có thể được tìm thấy trong tài liệu [Weintraub, H. et al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Tập 1(1) 1986].

Thêm vào trình tự bổ sung cho trình tự Shine–Dalgarno ở phía trước của trình tự SD của gen mã hóa polypeptit để tạo ra cấu trúc thứ cấp, nhờ đó ức chế sự liên kết của ribosom theo phương pháp 7) có thể là ức chế dịch mã mARN hoặc có thể là ức chế dịch mã hoặc làm giảm tốc độ dịch mã.

Ngoài ra, kỹ thuật phiên mã ngược (reverse transcription engineering: RTE) thêm vào vùng gen khởi động, được phiên mã ngược ở đầu 3' của khung đọc mở (ORF) của trình tự gen mã hóa polypeptit theo phương pháp 8), có thể tạo ra antisense nucleotit bổ sung vào phiên mã gen mã hóa polypeptit để làm suy giảm hoạt tính.

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “tăng cường” của hoạt tính polypeptit có nghĩa là hoạt tính của polypeptit tăng lên so với hoạt tính nội sinh của nó. Sự tăng cường có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ chẳng hạn như kích hoạt, điều chỉnh lên, biểu hiện quá mức, tăng lên, v.v.. Cụ thể, việc kích hoạt, tăng cường, điều chỉnh lên, biểu hiện quá mức và tăng lên có thể bao gồm tất cả trường hợp trong đó hoạt tính không sẵn có ban đầu được biểu hiện, hoặc hoạt tính được tăng cường so với hoạt tính nội sinh hoặc hoạt tính trước khi biến đổi. Thuật ngữ “hoạt tính nội sinh” đề cập đến hoạt tính của polypeptit cụ thể có sẵn ban đầu bởi chủng bố mẹ trước khi biến nạp hoặc vi sinh vật không biến đổi, khi tính trạng bị thay đổi do biến đổi gen gây ra bởi các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo, và có thể được sử dụng thay thế cho “hoạt tính trước khi biến đổi”. “Tăng cường”, “điều chỉnh lên”, “biểu hiện quá mức” hoặc “tăng lên” hoạt tính của polypeptit so với hoạt tính nội sinh của nó có nghĩa là hoạt tính và/hoặc nồng độ (mức độ biểu hiện) của polypeptit được tăng cường so với hoạt tính của polypeptit cụ thể có sẵn ban đầu bởi chủng bố mẹ trước khi biến đổi hoặc vi sinh vật không biến đổi.

Việc tăng cường có thể đạt được bằng cách đưa polypeptit ngoại lai, hoặc tăng

cường hoạt tính và/hoặc nồng độ (mức độ biểu hiện) của polypeptit nội sinh. Việc tăng cường hoạt tính của polypeptit có thể được xác nhận bằng cách tăng mức độ hoạt tính của polypeptit, mức độ biểu hiện, hoặc lượng sản phẩm tiết ra từ polypeptit.

Có thể áp dụng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật để tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein, và phương pháp này không bị giới hạn ở đây, miễn là có thể tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc protein mong muốn so với hoạt tính của vi sinh vật trước khi sửa đổi. Phương pháp có thể là nhưng không giới hạn ở phương pháp sử dụng kỹ thuật di truyền và/hoặc kỹ thuật protein đã biết đối với những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật là phương pháp sinh học phân tử thông thường.

Sự tăng cường hoạt tính của polypeptit có thể được áp dụng bởi nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và phương pháp này không bị giới hạn miễn là có thể tăng cường hoạt tính của polypeptit đích so với hoạt tính của vi sinh vật trước khi biến đổi. Cụ thể, có thể sử dụng kỹ thuật di truyền và/hoặc kỹ thuật protein đã biết đối với những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, là phương pháp sinh học phân tử thông thường, nhưng phương pháp không bị giới hạn ở đó (ví dụ, Sitnicka et al. *Functional Analysis of Genes*. *Advances in Cell Biology*. 2010, tập 2. 1-16, Sambrook et al. *Molecular Cloning* 2012, v.v.).

Cụ thể, sự tăng cường hoạt tính của polypeptit theo sáng chế có thể là:

- 1) tăng số lượng bản sao nội bào của polynucleotit mã hóa polypeptit;
- 2) thay thế vùng điều hòa biểu hiện của gen mã hóa polypeptit trên nhiễm sắc thể bằng trình tự có hoạt tính mạnh hơn;
- 3) biến đổi trình tự nucleotit mã hóa codon ban đầu hoặc 5'-UTR của phiên mã gen mã hóa polypeptit;
- 4) biến đổi trình tự axit amin của polypeptit sao cho hoạt tính của polypeptit được tăng cường;
- 5) biến đổi trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit sao cho hoạt tính của polypeptit được tăng cường (ví dụ, biến đổi trình tự polynucleotit của gen polypeptit để mã hóa polypeptit đã biến đổi để tăng cường hoạt tính của polypeptit);
- 6) đưa vào polypeptit ngoại lai biểu hiện hoạt tính của polypeptit hoặc

polynucleotit ngoại lai mã hóa polypeptit;

7) tối ưu hóa codon của polynucleotit mã hóa polypeptit;

8) phân tích cấu trúc bậc ba của polypeptit và nhờ đó lựa chọn và biến đổi vùng tiếp xúc, hoặc biến đổi hóa học vùng tiếp xúc; hoặc

9) sự kết hợp của hai hoặc nhiều cách được chọn từ 1) đến 8), nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Cụ thể, tăng số lượng bản sao nội bào của polynucleotit mã hóa polypeptit theo phương pháp 1) có thể là đưa vector vào tế bào vật chủ, được liên kết chức năng với polynucleotit mã hóa polypeptit và có thể sao chép và hoạt động không phụ thuộc vào tế bào chủ. Thay vào đó, phương pháp có thể là một bản sao hoặc hai bản sao của polynucleotit mã hóa polypeptit vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ. Việc đưa vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách đưa vector vào tế bào vật chủ, có thể chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Vector đã được mô tả ở trên.

Thay thế vùng điều hòa biểu hiện (hoặc trình tự điều hòa biểu hiện) của gen mã hóa polypeptit trên nhiễm sắc thể với trình tự có hoạt tính mạnh theo phương pháp 2) có thể là ví dụ, gây đột biến trên trình tự bằng việc xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ, hoặc sự kết hợp của chúng để tăng cường thêm hoạt tính của vùng điều hòa biểu hiện, hoặc thay thế trình tự bằng trình tự có hoạt tính mạnh hơn. Vùng điều hòa biểu hiện có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở vùng gen khởi động, trình tự toán tử, trình tự mã hóa vị trí liên kết với ribosom, và trình tự điều hòa việc kết thúc phiên mã và dịch mã, v.v.. Trong một ví dụ, có thể là thay thế vùng gen khởi động ban đầu bằng vùng gen khởi động mạnh, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Các ví dụ về vùng gen khởi động mạnh đã biết 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, vùng gen khởi động yccA, v.v., nhưng vùng gen khởi động mạnh không bị giới hạn ở đó.

Biến đổi trình tự nucleotit của codon khởi đầu hoặc 5'-UTR của phiên mã gen mã hóa polypeptit theo phương pháp 3) có thể ví dụ, bằng cách thay thế trình tự nucleotit bằng trình tự nucleotit mã hóa codon khởi đầu khác có mức biểu hiện polypeptit cao hơn codon khởi đầu nội sinh, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Biến đổi trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit theo phương pháp 4) và phương pháp 5) có thể bằng cách gây đột biến trên trình tự bằng việc xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ trình tự axit amin của polypeptit hoặc trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit, hoặc sự kết hợp các phương pháp để tăng cường hoạt tính của polypeptit, hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit đã biến đổi để có hoạt tính mạnh hơn, hoặc trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit đã biến đổi để tăng cường hoạt tính, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Cụ thể, việc thay thế có thể được thực hiện bằng cách đưa polynucleotit vào nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp tương đồng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Vector được sử dụng ở đây có thể còn bao gồm chỉ dấu lựa chọn để xác định phần chèn vào nhiễm sắc thể. Chỉ dấu lựa chọn đã được mô tả ở trên.

Đưa vào polynucleotit ngoại lai biểu hiện hoạt tính của polypeptit theo phương pháp 6) có thể bằng cách đưa vào tế bào vật chủ polynucleotit ngoại lai mã hóa polypeptit biểu hiện hoạt tính đồng nhất/tương tự với hoạt tính của polypeptit. Polynucleotit ngoại lai có thể được sử dụng mà không giới hạn về nguồn gốc hoặc trình tự của nó miễn là biểu hiện hoạt tính đồng nhất/tương tự với hoạt tính của polypeptit. Việc đưa vào có thể được thực hiện bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, bằng cách lựa chọn thích hợp phương pháp biến nạp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và biểu hiện của polynucleotit đã đưa vào tế bào vật chủ cho phép sản sinh polypeptit, nhờ đó tăng hoạt tính của nó.

Tối ưu hóa codon của polynucleotit mã hóa polypeptit theo phương pháp 7) có thể bằng cách tối ưu hóa polynucleotit nội sinh để tăng phiên mã hoặc dịch mã trong tế bào vật chủ, hoặc bằng cách tối ưu hóa các codon sao cho phiên mã hoặc dịch mã đã tối ưu hóa của polynucleotit ngoại lai có thể đạt được bên trong tế bào vật chủ.

Ngoài ra, phân tích cấu trúc bậc ba của polypeptit và nhờ đó lựa chọn và biến đổi vùng tiếp xúc, hoặc biến đổi hóa học vùng tiếp xúc theo phương pháp 8) có thể, ví dụ, bằng cách so sánh thông tin trình tự của polypeptit cần phân tích với cơ sở dữ liệu, trong

đó thông tin trình tự của các protein đã biết được lưu trữ, để xác định các lựa chọn protein mạch khuôn theo mức độ tương tự trình tự, và do đó xác nhận cấu trúc dựa trên thông tin, nhờ đó chọn và biến nạp hoặc biến đổi vị trí tiếp xúc cần biến đổi hoặc biến đổi hóa học.

Sự tăng cường hoạt tính polypeptit có thể có nghĩa là hoạt tính hoặc nồng độ (mức độ biểu hiện) của polypeptit tương ứng tăng so với hoạt tính hoặc nồng độ (mức độ biểu hiện) của polypeptit được biểu hiện trong chủng kiểu đại hoặc vi sinh vật trước khi biến đổi, hoặc lượng sản phẩm được sản sinh từ polypeptit tăng lên, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Biến đổi một phần hoặc tất cả polynucleotit trong vi sinh vật theo sáng chế (ví dụ, biến đổi để mã hóa biến thể protein đã được mô tả ở trên) có thể đạt được bởi (a) tái tổ hợp tương đồng sử dụng vector để chèn nhiễm sắc thể trong vi sinh vật hoặc chỉnh sửa bộ gen bằng cách sử dụng nuclease đã điều chế (ví dụ, CRISPR-Cas9), và/hoặc (b) có thể được tạo ra bằng ánh sáng, chẳng hạn như tia cực tím và bức xạ, v.v. và/hoặc xử lý hóa học, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Phương pháp biến đổi một phần hoặc tất cả gen có thể bao gồm phương pháp sử dụng công nghệ tái tổ hợp ADN. Ví dụ, một phần hoặc tất cả gen có thể được xóa bằng cách bơm trình tự nucleotit hoặc vector chứa trình tự nucleotit tương đồng với gen đích vào vi sinh vật để tạo ra tái tổ hợp tương đồng. Trình tự nucleotit đã bơm hoặc vector có thể bao gồm chỉ dấu lựa chọn chính, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Cụ thể, vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật bao gồm polypeptit được thể hiện bằng trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 26 và/hoặc polynucleotit được thể hiện bởi trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 27; và có thể là vi sinh vật chứa đột biến được chọn từ nhóm bao gồm bất hoạt của polypeptit được thể hiện bởi trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 16 và/hoặc xóa của polynucleotit được thể hiện bởi trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 17.

Trong vi sinh vật theo sáng chế, biến thể, polynucleotit, v.v. đã được mô tả ở trên trong các lĩnh vực khác nêu trên.

Khía cạnh khác nữa theo sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất O-acetyl-L-homoserin hoặc L-methionin, trong đó phương pháp này bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa biến thể theo sáng chế hoặc polynucleotit theo sáng

chế trong môi trường nuôi cấy.

Phương pháp sản xuất O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin theo sáng chế có thể bao gồm nuôi cấy chủng *Corynebacterium glutamicum* chứa biến thể theo sáng chế, polynucleotit theo sáng chế, hoặc vectơ theo sáng chế, trong môi trường nuôi cấy.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nuôi cấy” có nghĩa là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế được nuôi cấy trong các điều kiện môi trường được kiểm soát thích hợp. Quá trình nuôi cấy của sáng chế có thể được thực hiện trong môi trường nuôi cấy thích hợp và các điều kiện nuôi cấy đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Quá trình nuôi cấy này có thể được điều chỉnh dễ dàng để sử dụng bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo chủng cần chọn. Cụ thể, việc nuôi cấy có thể là nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ có cấp dinh dưỡng, 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 hỗn hợp các nguyên liệu chứa các nguyên liệu dinh dưỡng cần thiết cho việc nuôi cấy của vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế làm thành phần chính, và môi trường nuôi cấy cung cấp các nguyên liệu dinh dưỡng và các yếu tố sinh trưởng, cùng với nước cần thiết cho sự tồn tại và phát triển. Cụ thể, môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế có thể là bất kỳ môi trường nào thường được sử dụng để nuôi cấy truyền thống các vi sinh vật mà không bị bất kỳ giới hạn cụ thể nào. Tuy nhiên, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong các điều kiện hiếu khí trong môi trường truyền thống chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, hợp chất vô cơ, axit amin và/hoặc vitamin thích hợp, v.v., trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH, v.v..

Cụ thể, môi trường nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể tìm thấy trong tài liệu ["Manual of Methods for General Bacteriology" by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)].

Theo sáng chế, nguồn cacbon có thể bao gồm các hydrat cacbon, chẳng hạn như glucoza, sacaroza, lactoza, fructoza, sucroza, maltoza, v.v.; các rượu đường như mannitol, sorbitol, v.v.; các axit hữu cơ như axit pyruvic, axit lactic, axit xitric, v.v.; các axit amin như axit glutamic, metionin, lysin, v.v.. Ngoài ra, nguồn cacbon có thể bao gồm các chất dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên chẳng hạn như tinh bột hydrolysat, mật đường,

mật đường đen, cám gạo, sắn, mật mía, và dịch chiết ngô, v.v.. Cụ thể, các hydrat cacbon chẳng hạn như glucoza và mật đường đã qua xử lý khử trùng (tức là mật đường chuyển thành đường khử) có thể được sử dụng, và ngoài ra, lượng thích hợp các nguồn cacbon khác có thể được sử dụng mà không bị giới hạn ở đây. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp hai hoặc nhiều loại với nhau, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Nguồn nitơ có thể bao gồm các nguồn nitơ vô cơ, chẳng hạn như amoni, amoni sulfat, amoni clorua, amoni axetat, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat, v.v.; các axit amin, chẳng hạn như axit glutamic, methionin, glutamin, v.v.; và các nguồn nitơ hữu cơ, chẳng hạn như pepton, NZ-amin, cao thịt, dịch chiết nấm men, cao mạch nha, dịch chiết ngô, casein hydrolysat, cá hoặc các sản phẩm phân hủy của chúng, bánh đậu nành đã khử chất béo hoặc các sản phẩm phân hủy của chúng, v.v.. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp hai hoặc nhiều loại của chúng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Nguồn phospho có thể bao gồm monokali phosphat, đikali phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng, v.v.. Các ví dụ về hợp chất vô cơ có thể bao gồm natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sulfat, sắt sulfat, mangan sulfat, canxi cacbonat v.v.. Ngoài ra, có thể sử dụng các axit amin, vitamin, và/hoặc tiền chất thích hợp. Những thành phần cấu tạo hoặc tiền chất này có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy theo mẻ hoặc nuôi cấy liên tục, nhưng các nguồn phospho không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng cách thêm hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, axit sulfuric, v.v. trong quá trình nuôi cấy chủng *Corynebacterium glutamicum* theo sáng chế theo cách thích hợp. Ngoài ra, sự hình thành bong bóng có thể được ngăn chặn trong quá trình nuôi cấy bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt như este polyglycol axit béo. Ngoài ra, khí oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy để duy trì các điều kiện hiếu khí của môi trường nuôi cấy; hoặc khí nitơ, khí hydro, hoặc cacbon đioxit có thể được bơm vào để duy trì các điều kiện kỵ khí hoặc vi hiếu khí mà không cần bơm khí, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Nhiệt độ trong quá trình nuôi cấy theo sáng chế có thể nằm trong khoảng từ 20°C

đến 45°C, tốt hơn là từ 25°C đến 40°C, và việc nuôi cấy có thể được thực hiện trong khoảng từ 10 giờ đến 160 giờ, nhưng quá trình nuôi cấy không bị giới hạn ở đó.

O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin đã sản xuất bởi quá trình nuôi cấy theo sáng chế có thể được giải phóng vào môi trường nuôi cấy hoặc giữ lại trong các tế bào.

Phương pháp sản xuất O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin theo sáng chế có thể còn bao gồm bước điều chế vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế, bước điều chế môi trường để nuôi cấy vi sinh vật, hoặc sự kết hợp của chúng (bất kể thứ tự, theo bất kỳ thứ tự nào), ví dụ, trước bước nuôi cấy.

Phương pháp sản xuất O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin theo sáng chế có thể còn bao gồm bước thu hồi O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin từ môi trường nuôi cấy (môi trường trong đó dịch nuôi cấy được phát triển) hoặc vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế. Bước thu hồi có thể còn bao gồm sau bước nuôi cấy.

Trong bước thu hồi, O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin mong muốn có thể được thu gom bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế, ví dụ, sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo phương pháp nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, hoặc nuôi cấy theo mẻ có cấp dinh dưỡng. Ví dụ, các phương pháp chẳng hạn như ly tâm, lọc, xử lý bằng chất kết tủa kết tinh protein (phương pháp tách muối), tách chiết, nghiền bằng sóng âm, siêu lọc, thẩm tách, các loại sắc ký khác nhau như sắc ký rây phân tử (lọc gel), sắc ký hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực, v.v., và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) hoặc sự kết hợp các phương pháp có thể được sử dụng, và O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy hoặc các vi sinh vật sử dụng các phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Ngoài ra, phương pháp sản xuất O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin theo sáng chế có thể còn bao gồm bước tinh chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Trong một ví dụ, khi phương pháp sản xuất O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin theo sáng chế bao gồm cả bước thu hồi và bước tinh chế, bước thu hồi và bước tinh chế có thể được thực hiện liên tục hoặc không liên tục bất kể thứ tự hoặc đồng thời, hoặc có thể được tích hợp vào một bước, nhưng phương pháp này không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, phương pháp sản xuất L-methionin theo sáng chế có thể còn bao gồm

bước chuyển đổi O-axetyl-L-homoserin thành L-methionin. Trong phương pháp sản xuất L-methionin theo sáng chế, bước chuyển đổi có thể còn bao gồm sau bước nuôi cấy hoặc bước thu hồi. Bước chuyển đổi có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (patent Hoa Kỳ số US 8426171 B2). Trong một phương án, phương pháp sản xuất L-methionin theo sáng chế có thể bao gồm bước sản xuất L-methionin bằng cách cho tiếp xúc O-axetyl-L-homoserin và metyl mercaptan với O-axetylhomoserin sulfhydrylaza, xystathionin gamma-synthaza, hoặc O-suxinyl homoserin sulfhydrylaza.

Trong phương pháp theo sáng chế, biến thể, polynucleotit, vector, vi sinh vật, v.v., đã được mô tả trong các lĩnh vực khác nêu trên.

Khía cạnh khác nữa theo sáng chế là đề xuất chế phẩm để sản xuất O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin, trong đó chế phẩm này bao gồm: vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa biến thể theo sáng chế, polynucleotit mã hóa biến thể theo sáng chế, hoặc vector chứa polynucleotit theo sáng chế; môi trường trong đó vi sinh vật được phát triển; hoặc sự kết hợp của chúng.

Chế phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm bất kỳ tá dược thích hợp nào thường được sử dụng trong các chế phẩm để sản xuất các axit amin, và các tá dược này bao gồm, ví dụ, chất bảo quản, chất làm ướt, chất phân tán, chất tạo huyền phù, chất đệm, chất ổn định, hoặc chất đẳng trương, v.v., nhưng không bị giới hạn ở đó.

Trong chế phẩm theo sáng chế, biến thể, polynucleotit, vector, chủng, môi trường nuôi cấy, v.v., đã được mô tả trong các khía cạnh khác nêu trên.

Ví dụ thực hiện của sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dựa trên các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ chỉ là các ví dụ ưu tiên được mô tả nhằm mục đích minh họa, và do đó, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn ở bởi các ví dụ này. Trong khi đó, các dấu hiệu kỹ thuật không được mô tả ở đây có thể được hiểu đầy đủ và thực hiện dễ dàng bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế hoặc lĩnh vực kỹ thuật tương tự.

Ví dụ 1: Điều chế vector biến thể synthaza xitrat (GltA)

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng gốc axit amin thứ 415 của GltA như vị

trí liên kết axetyl-CoA và dự đoán rằng khi axit amin được thay thế bằng một axit amin khác, hoạt tính của synthaza xitrat bị suy giảm khi asparagin là axit amin thứ 241 của GltA được thay thế bằng threonin (patent Hàn Quốc số 10-1915433).

Theo đó, điều chế vectơ, trong đó lysin là axit amin thứ 415 của GltA được thay thế bằng axit amin khác, và asparagin là axit amin thứ 241 được thay thế bằng threonin. Cụ thể, điều chế vectơ chứa các đột biến, trong đó lysin là axit amin thứ 415 của GltA được thay thế bằng histidin (K415H), và ngoài ra, asparagin là axit amin thứ 241 được thay thế bằng threonin (N241T).

PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 10, và SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 11, dựa trên ADN bộ gen *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 kiểu đại làm mạch khuôn. PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên hỗn hợp của hai phân đoạn thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 11 để thu được phân đoạn. PCR được thực hiện trong các điều kiện biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, tiếp theo 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, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút và 30 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Vectơ pDCM2 (SEQ ID NO: 32, công bố đơn patent Hàn Quốc số 10-2020-0136813) được xử lý với SmaI, và sản phẩm PCT thu được ở trên được thực hiện nhân dòng hợp nhất. Việc nhân dòng hợp nhất được thực hiện sử dụng bộ kit nhân dòng In-Fusion® HD (Clontech). Plasmit thu được được đặt tên là pDCM2-gltA(K415H).

Ngoài ra, vectơ tái tổ hợp để đưa vào đột biến gltA(K415H/N241T) được điều chế. Cụ thể, đột biến định hướng tại chỗ (*BMC Biotechnology* tập 9, số báo: 61 (2009)) được thực hiện sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 13, dựa trên plasmit pDCM2-gltA(K415H) làm mạch khuôn để thay thế asparagin là axit amin thứ 241 bằng threonin (N241T). Do đó, plasmit thu được được đặt tên là pDCM2-gltA(K415H/N241T). Các trình tự của cặp mồi được sử dụng trong ví dụ này được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

SEQ ID NO:	Cặp mồi	Các trình tự
8	Đoạn mồi 1	TCGAGCTCGGTACCC

		CCGTTCGTATGATCGGTTCCGCACAGGCC
9	Đoạn mồi 2	GTGCAGCAGGCAAC CAC ATCAACCGCCCACG
10	Đoạn mồi 3	CGTGGGCGGTTGAT GTG GTTGCCTGCTGCAC
11	Đoạn mồi 4	CTCTAGAGGATCCCC GCCGTAAGCAGCCTCTGGTGGGAATGGTCAGC
12	Đoạn mồi 5	GCTGACCACGAGCAG ACC TGCTCCACCTCCACCGT
13	Đoạn mồi 6	ACGGTGGAGGTGGAGCAGGT CTGCTCGTGGTCAGC

Ví dụ 2: Điều chế chủng tăng cường sản sinh O-Axetyl-L-Homoserin và đánh giá khả năng sản sinh O-Axetyl-L-Homoserin

Ví dụ 2.1: Điều chế chủng được liên kết với biến thể protein màng ngoại lai YjeH

Để xác định hiệu quả của biến thể YjeH là protein màng ngoại lai và chất sản sinh O-axetyl homoserin, được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, vector để đưa vào nhiễm sắc thể chứa gen *yjeH* mã hóa biến thể YjeH có nguồn gốc từ *E. coli* (SEQ ID NO: 26) được điều chế.

Cụ thể, để điều chế vector xóa transposaza, cặp mồi để khuếch đại vùng phía trước 5' (SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19) và cặp mồi để khuếch đại vùng phía sau 3' (SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 21) xung quanh gen mã hóa transposaza (SEQ ID NO: 17, Gen số NCgl2335) được điều chế. Vị trí enzym giới hạn XbaI được chèn ở mỗi đầu của 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: 19 và SEQ ID NO: 20 được điều chế để lai chéo với nhau sao cho trình tự enzym giới hạn SmaI được bố trí ở vị trí đã điều chế. Các trình tự đoạn mồi được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2

SEQ ID NO:	Tên các trình tự	Các trình tự
18	Tn_5 F	tgaattcgagctcggtacccCACCGACGCGCATCTGCCT
19	Tn_5 R	GGTGTGGTGACTTTCAGCAGTTCCCGGGGGG GAGGAGGCATGTGGTGTG
20	Tn_3 F	CAACACCACATGCCTCCTCCCCCCCCGGGAAC TGCTGAAAGTCACCACACC
21	Tn_3 R	gtcgactctagaggatccccCTCCCAAACCATGAGGA ATGG

PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 18 và SEQ

ID NO: 19, và SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 21, dựa trên nhiễm sắc thể của ATCC13032 kiểu đại làm mạch khuôn. PCR được thực hiện trong các điều kiện biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tiếp theo 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, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được phân đoạn ADN (851 bp) ở vùng phía trước 5' và phân đoạn ADN (847 bp) ở vùng phía sau 3' xung quanh vùng xóa gen NCgl2335.

PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 21, dựa trên hai phân đoạn ADN đã khuếch đại làm mạch khuôn. PCR được thực hiện trong các điều kiện biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tiếp theo 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, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, phân đoạn ADN (1648 bp) bao gồm vị trí có khả năng xóa gen mã hoá transposaza (SEQ ID NO: 17, gen số NCgl2335) được khuếch đại.

Do đó, các sản phẩm PCR thu được được thực hiện nhân dòng hợp nhất thành vector pDCM2 được xử lý với enzym giới hạn SmaI sử dụng bộ kit nhân dòng In-Fusion® HD (Clontech). Vector nhân dòng được biến nạp vào *E. coli* DH5 α , và *E. coli* đã biến nạp được cấy trên đĩa trên môi trường rắn LB chứa 25 mg/L của kanamycin. Các khuẩn lạc được biến nạp với plasmit trong đó gen đích được chèn vào được chọn thông qua PCR, và sau đó plasmit thu được bằng cách tách chiết plasmit. Cuối cùng, vector tái tổ hợp pDCM2- Δ NCgl2335, trong đó catxet xóa NCgl2335 được nhân dòng, được điều chế.

Để xác định tính hiệu quả của chất vận chuyển O-axetyl homoserin, vector đưa vào nhiễm sắc thể chứa gen mã hóa biến thể YjeH có nguồn gốc từ *E. coli* (SEQ ID NO: 27) được điều chế. Để giải quyết vấn đề này, vector biểu hiện gen *yjeH* được điều chế bằng cách sử dụng vùng gen khởi động CJ7 (patent Hoa Kỳ số 7662943 B2). Cặp mồi (SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23) để khuếch đại vùng của vùng gen khởi động CJ7 và cặp mồi (SEQ ID NOS: 24 và SEQ ID NO: 25) để khuếch đại vùng *yjeH* của *E. coli* được điều chế. Đoạn mồi các trình tự được thể hiện ở bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

SEQ ID NO:	Tên các trình tự	Các trình tự
------------	------------------	--------------

22	CJ7_yjeH F	ACACCACATGCCTCCTCcccAGAAACATCCCA GCGCTAC
23	CJ7_yjeH R	AGTTCTTGTTTGAGTCCACTCATAGTGTTTCC TTTCGTTGGGT
24	yjeH F	ACCCAACGAAAGGAAACACTATGAGTGGAC TCAAACAAGAACTG
25	yjeH R	GACTTTCAGCAGTTcccgggTTATGTGGTTATGC CATTTTCCGG

PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23, dựa trên pECCG117-PCJ7-gfp (US 7662943 B2, p117-Pcj7-gfp) làm mạch khuôn, và sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25, dựa trên nhiễm sắc thể kiểu dại *E. coli* làm mạch khuôn. PCR được thực hiện trong các điều kiện biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tiếp theo 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, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được phân đoạn ADN (360 bp) của vùng của vùng gen khởi động CJ7 và phân đoạn ADN (1297 bp) của vùng gen *yjeH* của *E. coli*.

PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 24, dựa trên hai phân đoạn ADN đã khuếch đại làm mạch khuôn. PCR được thực hiện trong các điều kiện biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tiếp theo 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, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, phân đoạn ADN (1614 bp) bao gồm các vị trí trong đó vùng gen khởi động CJ7 và gen *yjeH* được đưa vào được khuếch đại.

Phân đoạn ADN xóa gen thu được thông qua PCR được nhân dòng thành vector pDCM2- Δ NCgl2335 được xử lý với enzym giới hạn SmaI sử dụng bộ kit nhân dòng In-Fusion® HD (Clontech), và pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco, WT) vector tái tổ hợp được điều chế. Ngoài ra, vector tái tổ hợp để đưa vào gen đột biến *yjeH* (eco, F351L) được điều chế.

Cụ thể, phenylalanin là axit amin thứ 351 của trình tự axit amin YjeH được thay thế bằng leuxin (F351L) dựa trên plasmit pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco, WT) làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29. Plasmit chứa gen đã điều chế theo đó mã hóa YjeH(F351L) được đặt tên là pDCM2-

Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L). Các trình tự đoạn mồi được thể hiện ở bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

SEQ ID NO:	Tên các trình tự	Các trình tự
28	F351L F	CAATGGCATCCTTATTATGATT
29	F351L R	AAATCATAATAAGGATGCCATTG

Do đó pDCM2- Δ NCgl2335 và pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L) thu được được biến nạp vào chủng ATCC13032 bằng phương pháp xung điện. Thông qua lai chéo thứ cấp, ATCC13032 Δ NCgl2335 xóa NCgl2335 và ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L) thu được trên nhiễm sắc thể. Việc chèn gen NCgl2335 bất hoạt và gen *yjeH* mới được đưa vào *E. coli* cuối cùng được xác nhận bằng PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 21, và sau đó so sánh với ATCC13032 trong đó gen NCgl2335 không bị bất hoạt.

Ví dụ 2-2. Đánh giá khả năng sản sinh O-Axetyl Homoserin

Để so sánh khả năng sản sinh O-axetyl homoserin (O-AH) của ATCC13032 Δ NCgl2335 và ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L) đã điều chế trong ví dụ 2-1, và chủng kiểu đại ATCC13032, các chủng được nuôi cấy theo cách sau đây để phân tích O-axetyl homoserin trong dung dịch nuôi cấy.

Một vòng bạch kim của các chủng được cấy vào bình tam giác 250 ml chứa 25 ml môi trường sản xuất O-axetyl homoserin dưới đây, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 33°C trong 20 giờ. Nồng độ O-axetyl homoserin được phân tích bằng HPLC, và các nồng độ đã phân tích được thể hiện ở bảng 5.

Môi trường nuôi cấy sản xuất O-Axetyl Homoserin (độ pH 7,2)

Glucosa 30 g, KH₂PO₄ 2 g, ure 3 g, (NH₄)₂SO₄ 40 g, pepton 2,5 g, dịch chiết ngô (CSL, Sigma) 5 g (10 ml), MgSO₄.7H₂O 0,5 g, CaCO₃ 20 g (trong 1L nước cất)

Bảng 5

Tên các chủng	O-Axetyl Homoserin (g/L)
ATCC13032	0,3
ATCC13032 Δ NCgl2335	0,3

ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)	1,0
---	-----

Kết quả là, như được thể hiện ở bảng 5, khi chủng đối chứng ATCC13032 được nuôi cấy, O-axetyl-L-homoserin được tích trữ ở 0,3 g/L, và xác nhận rằng ngay cả khi gen transposaza NCgl2335 bị xóa, không bị ảnh hưởng đến việc sản sinh O-axetyl-L-homoserin. Cụ thể, xác nhận rằng khi gen đột biến *yjeH* được biểu hiện, O-axetyl-L-homoserin được tích tụ ở 1,0 g/L.

Ví dụ 2-3. Đưa các biến thể GltA (K415H, N241T+K415H) vào các chủng sản sinh O-Axetyl-L-Homoserin và khả năng sản sinh của chủng

Khả năng sản sinh O-axetyl-L-homoserin được đánh giá bằng cách đưa các biến thể GltA vào các chủng sản sinh O-axetyl-L-homoserin của ví dụ 2-2. Các vector pDCM2-gltA(K415H) và pDCM2-gltA(N241T/K415H) được điều chế trong ví dụ 1 được biến nạp vào từng chủng kiểu đại ATCC13032 và ATCC13032 Δ NCgl2335, và chủng sản sinh O-axetyl-L-homoserin của ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L). Các chủng được đưa vào với vector trên nhiễm sắc thể bởi tái tổ hợp tương đồng các trình tự được chọn trong môi trường nuôi cấy chứa 25 mg/L kanamycin.

Sau đó, các phân đoạn gen được khuếch đại dựa trên các chất biến nạp *Corynebacterium glutamicum*, trong đó việc tái tổ hợp thứ cấp được hoàn thành, bằng PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 30 và SEQ ID NO: 31, và các chủng được đưa vào với các đột biến *gltA*(K415H) và *gltA*(N241T/K415H) được xác nhận bằng phân tích giải trình tự gen. Các trình tự đoạn mồi được thể hiện ở bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

SEQ ID NO:	Tên các trình tự	Các trình tự
30	<i>gltA</i> -F	ATGTTTGAAAGGGATATCGT
31	<i>gltA</i> -R	TTAGCGCTCCTCGCGAGGAAC

Các chủng tái tổ hợp được đặt tên dựa trên *Corynebacterium glutamicum* như được thể hiện dưới đây, và việc đánh giá độ chuẩn được thực hiện theo cách tương tự như trong ví dụ 2-2, và các kết quả được thể hiện ở bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

Các chủng	O-AH (g/L)
-----------	------------

ATCC13032	0,3
ATCC13032 <i>gltA</i> (K415H)	0,4
ATCC13032 Δ NCgl2335	0,3
ATCC13032 Δ NCgl2335 <i>gltA</i> (K415H)	0,4
ATCC13032 Δ NCgl2335 <i>gltA</i> (K415H+N241T)	0,5
ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7- <i>yjeH</i> (eco,F351L)	1,0
ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7- <i>yjeH</i> (eco,F351L) <i>gltA</i> (K415H)	1,3
ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7- <i>yjeH</i> (eco,F351L) <i>gltA</i> (K415H+N241T)	1,5

Như có thể nhìn thấy từ các kết quả ở trên, tất cả chủng được đưa vào với đột biến *GltA* K415H và đột biến kết hợp *GltA* K415H+N241T SEQ ID NO: thể hiện tăng khả năng sản sinh O-axetyl-L-homoserin so với chủng bố mẹ trong đó các đột biến không được đưa vào.

ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-*yjeH*(eco,F351L) *gltA*(K415H) được đặt tên là CM04-1006 và được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM) theo Hiệp ước Budapest vào ngày 21 tháng 10 năm 2020, được cấp số lưu chủng KCCM12809P. Ngoài ra, ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-*yjeH*(eco,F351L) *gltA*(K415H+N241T) được đặt tên là CM04-1007 và được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) theo Hiệp ước Budapest vào ngày 21 tháng 10 năm 2020, được cấp số lưu chủng KCCM12810P.

Dựa trên phần mô tả ở trên, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ có thể hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện dưới các hình thức cụ thể khác mà không thay đổi nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Về vấn đề này, các phương án ví dụ được bộc lộ ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa mà không giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngược lại, sáng chế không chỉ bao gồm các phương án ví dụ mà còn các phương án thay thế, biến đổi, tương đương và các phương án khác có thể đều thuộc nguyên lý và phạm vi bảo hộ của sáng chế được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể synthaza xitrat trong đó lysin là axit amin tương ứng với vị trí 415 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng histidin, và asparagin là axit amin tương ứng với vị trí 241 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng threonin.
2. Biến thể theo điểm 1, trong đó biến thể có sự tương đồng trình tự ít nhất 80% so với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1.
3. Biến thể theo điểm 1, trong đó biến thể bao gồm polypeptit được thể hiện bởi trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 6.
4. Biến thể theo điểm 1, trong đó biến thể bao gồm polypeptit được thể hiện bởi trình tự axit amin có công thức chung 1 dưới đây:

công thức chung 1

X₁N HGGDATX₂FMN KVKNKEDGVR LMGFGHRVYK NYDPRAAIVK
ETAHEILEHL GGDDLDDLAI KLEEIALADD X₃FISRKLYPN VDFYTGLIYR
AMGFPTDFFT VLFAIGRLPG WIAHYREQLG AAGNH (SEQ ID NO: 33);

trong đó trong công thức chung 1,

X₁ là asparagine hoặc serin;

X₂ là alanin hoặc axit glutamic; và

X₃ là tyrosin hoặc xystein.

5. Biến thể theo điểm 1, trong đó biến thể có sự tương đồng trình tự ít nhất 90% so với trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 6.
6. Polynucleotit mã hóa biến thể theo điểm bất kỳ từ 1 đến 5.
7. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, trong đó vi sinh vật chứa biến thể synthaza xitrat trong đó lysin là axit amin tương ứng với vị trí 415 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng histidin, và asparagin là axit amin tương ứng với vị trí 241 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng threonin, hoặc polynucleotit mã hóa biến thể.
8. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó vi sinh vật có khả năng sản sinh O-acetyl-L-homoserin.

9. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó vi sinh vật là *Corynebacterium glutamicum*.

10. Phương pháp sản xuất O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin, trong đó phương pháp bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa biến thể synthaza xitrat trong đó lysin là axit amin tương ứng với vị trí 415 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng histidin, và asparagin là axit amin tương ứng với vị trí 241 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng threonin, hoặc polynucleotit mã hóa biến thể trong môi trường nuôi cấy.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phương pháp còn bao gồm thu hồi O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin từ môi trường hoặc vi sinh vật được nuôi cấy.

12. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phương pháp còn bao gồm chuyển đổi O-axetyl-L-homoserin thành L-methionin.

13. Chế phẩm để sản xuất O-axetyl-L-homoserin hoặc L-methionin, trong đó chế phẩm này bao gồm: vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa biến thể synthaza xitrat trong đó lysin là axit amin tương ứng với vị trí 415 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng histidin, và asparagin là axit amin tương ứng với vị trí 241 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng threonin, hoặc polynucleotit mã hóa biến thể; môi trường trong đó vi sinh vật được phát triển; hoặc sự kết hợp của chúng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> BIẾN THỂ SYNTHAZA XITRAT, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA BIẾN THỂ NÀY, VI SINH VẬT THUỘC CHI CORYNEBACTERIUM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ CHẾ PHẨM SẢN XUẤT O-AXETYL-L-HOMOSERIN HOẶC L-METHIONIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

<130> OPA21399-PCT

<150> KR 10-2021-0031643

<151> 2021-03-10

<160> 33

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 437

<212> PRT

<213> Chưa biết

<220>

<223> ATCC 13032 GltA AA

<400> 1

Met Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu
1 5 10 15

His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu
20 25 30

Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu
35 40 45

Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys
50 55 60

Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr
85 90 95

Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe
100 105 110

Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser
115 120 125

Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala
130 135 140

Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro
145 150 155 160

Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys
165 170 175

Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro

180	185	190
Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg		
195	200	205
Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met		
210	215	220
Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln		
225	230	235
Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn		
245	250	255
Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu		
260	265	270
His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys		
275	280	285
Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn		
290	295	300
Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys		
305	310	315
Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile		
325	330	335
Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu		
340	345	350
Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr		
355	360	365
Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe		
370	375	380
Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly		
385	390	395
Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile		
405	410	415
Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val		
420	425	430
Pro Arg Glu Glu Arg		
435		

<210> 2

<211> 1314

<212> ADN

<213> Chưa biết

<220>

<223> ATCC13032 GltA NT

<400> 2

```

atgtttgaaa gggatatcgt ggctactgat aacaacaagg ctgtcctgca ctaccccggt 60
ggcgaagtctg aaatggacat catcgaggct tctgagggta acaacgggtgt tgtcctgggc 120
aagatgctgt ctgagactgg actgatcact tttgacccag gttatgtgag cactggctcc 180
accgagtcga agatcaccta catcgatggc gatgcgggaa tcctgcggtta ccgcggtat 240
gacatcgctg atctggctga gaatgccacc ttcaacgagg tttcttacct acttatcaac 300
ggtgagctac caaccccaga tgagcttcac aagttaacg acgagattcg ccaccacacc 360
cttctggacg aggacttcaa gtcccagttc aacgtgttcc cacgcgacgc tcacccaatg 420
gcaaccttgg cttcctcggg taacatthttg tctacctact accaggacca gctgaacca 480
ctcgatgagg cacagcttga taaggcaacc gttcgcctca tggcaaagggt tccaatgctg 540
gctgcgtacg cacaccgcg cgcgaagggt gctccttaca tgtaccaga caactccctc 600
aatgcgcgtg agaacttcct gcgcatgatg ttcggttacc caaccgagcc atacgagatc 660
gacccaatca tgggtcaaggc tctggacaag ctgctcatcc tgcacgctga ccacgagcag 720
aactgctcca cctccaccgt tcgtatgatc ggttccgcac aggccaacat gtttgtctcc 780
atcgctgggtg gcatcaacgc tctgtccggc cactgcacg gtggcgcaaa ccaggctggt 840
ctggagatgc tcgaagacat caagagcaac cacggtggcg acgcaaccga gttcatgaac 900
aaggtcaaga acaaggaaga cggcgtccgc ctcatgggct tcggacaccg cgtttacaag 960
aactacgatc cacgtgcagc aatcgtcaag gagaccgcac acgagatcct cgagcacctc 1020
gggtggcgacg atcttctgga tctggcaatc aagctggaag aaattgcact ggctgatgat 1080
tacttcatct cccgcaagct ctacccgaac gtagacttct acaccggcct gatctaccgc 1140
gcaatgggct tcccaactga cttcttcacc gtattgttcg caatcggtcg tctgccagga 1200
tggatcgctc actaccgca gcagctcggg gcagcaggca acaagatcaa ccgccacgc 1260
caggtctaca ccggcaacga atcccgcaag ttggttcctc gcgaggagcg ctaa 1314

```

<210> 3
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> ATCC 13032 GltA K415H 362~415

<400> 3
 Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu
 1 5 10 15
 Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe
 20 25 30

Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu
 35 40 45

Gly Ala Ala Gly Asn His
 50

<210> 4
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ATCC13032 GltA K415H AA

<400> 4
 Met Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu
 1 5 10 15
 His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu
 20 25 30
 Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu
 35 40 45
 Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys
 50 55 60
 Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr
 65 70 75 80
 Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr
 85 90 95
 Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe
 100 105 110
 Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser
 115 120 125
 Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala
 130 135 140
 Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro
 145 150 155 160
 Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys
 165 170 175
 Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro
 180 185 190
 Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg
 195 200 205
 Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met
 210 215 220
 Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln
 225 230 235 240

<210>	5
<211>	1314
<212>	ADN
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	ATCC13032 GltA K415H NT

39

```

ggtagagctac caaccccaga tgagcttcac aagtttaacg acgagattcg ccaccacacc 360
cttctggacg aggacttcaa gtcccagttc aacgtgttcc cacgcgacgc tcacccaatg 420
gcaaccttgg cttcctcggg taacattttg tctacctact accaggacca gctgaaccca 480
ctcgatgagg cacagcttga taaggcaacc gttcgcctca tggcaaaggt tccaatgctg 540
gctgcgtacg cacaccgcgc acgcaagggg gtccttaca tgtaccaga caactccctc 600
aatgcgcgtg agaacttcct gcgcatgatg ttcggttacc caaccgagcc atacgagatc 660
gaccaatca tgggtcaaggc tctggacaag ctgctcatcc tgcacgctga ccacgagcag 720
aactgctcca cctccaccgt tcgtatgatc ggttccgcac aggccaacat gtttgtctcc 780
atcgctggtg gcatcaacgc tctgtccggc cactgcacg gtggcgcaaa ccaggctggt 840
ctggagatgc tcgaagacat caagagcaac cacggtggcg acgcaaccga gttcatgaac 900
aaggtaaga acaaggaaga cggcgtccgc ctcattgggt tcggacaccg cgtttacaag 960
aactacgatc cacgtgcagc aatcgtcaag gagaccgcac acgagatcct cgagcacctc 1020
ggtggcgacg atcttctgga tctggcaatc aagctggaag aaattgcact ggctgatgat 1080
tacttcatct cccgcaagct ctacccgaac gtagacttct acaccggcct gatctaccgc 1140
gcaatggggt tcccaactga cttcttcacc gtattgttcg caatcggtcg tctgccagga 1200
tggtatcgctc actaccgga gcagctcggg gcagcaggca accacatcaa ccgcccacgc 1260
caggtctaca ccggcaacga atcccgcaag ttggttcctc gcgaggagcg ctaa 1314

```

<210> 6
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ATCC13032 GltA K415H+ N241T AA

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

41

Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val
 420 425 430

Pro Arg Glu Glu Arg
 435

<210> 7
 <211> 1314
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ATCC13032 GltA K415H+ N241T NT

<400> 7
 atgtttgaaa gggatatcgt ggctactgat aacaacaagg ctgtcctgca ctaccccgggt 60
 ggcgagttcg aaatggacat catcgaggct tctgagggta acaacgggtgt tgtcctgggc 120
 aagatgctgt ctgagactgg actgatcact tttagaccag gttatgtgag cactggctcc 180
 accgagtcga agatcaccta catcgatggc gatgcgggaa tcctgcgtta ccgcggctat 240
 gacatcgctg atctggctga gaatgccacc ttcaacgagg tttcttacct acttatcaac 300
 ggtgagctac caacccaga tgagcttcac aagtttaacg acgagattcg ccaccacacc 360
 cttctggacg aggacttcaa gtcccagttc aacgtgttcc cacgcgacgc tcaccaatg 420
 gcaaccttgg cttcctcggg taacattttg tctacctact accaggacca gctgaaccca 480
 ctcgatgagg cacagcttga taaggcaacc gttcgcctca tggcaaagggt tccaatgctg 540
 gctgcgtacg cacaccgcg cgcgaagggt gctccttaca tgtaccaga caactccctc 600
 aatgcgcgtg agaacttcct gcgcatgatg ttcggttacc caaccgagcc atacgagatc 660
 gacccaatca tgggtcaaggc tctggacaag ctgctcatcc tgcacgctga ccacgagcag 720
 acctgctcca cctccaccgt tcgtatgatc ggttccgcac aggccaacat gtttgtctcc 780
 atcgctggtg gcatcaacgc tctgtccggc cactgacag gtggcgcaaa ccaggctggt 840
 ctggagatgc tcgaagacat caagagcaac cacggtggcg acgcaaccga gttcatgaac 900
 aaggtcaaga acaaggaaga cggcgtccgc ctcatgggct tcggacaccg cgtttacaag 960
 aactacgatc cacgtgcagc aatcgtcaag gagaccgcac acgagatcct cgagcacctc 1020
 ggtggcgacg atcttctgga tctggcaatc aagctggaag aaattgcact ggctgatgat 1080
 tacttcatct cccgcaagct ctaccgaac gtagacttct acaccggcct gatctaccgc 1140
 gcaatgggct tcccaactga cttcttcacc gtattgttcg caatcggtcg tctgccagga 1200
 tggatcgctc actaccgca gcagctcggg gcagcaggca accacatcaa ccgcccacgc 1260
 caggtctaca ccggcaacga atcccgcaag ttggttcctc gcgaggagcg ctaa 1314

<210> 8
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 1

<400> 8
 tcgagctcgg taccgccgtt cgtatgatcg gttccgcaca ggcc

44

<210> 9
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 2

<400> 9
 gtgcagcagg caaccacatc aaccgcccac g

31

<210> 10
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 3

<400> 10
 cgtgggcggt tgatgtgggt gcctgctgca c

31

<210> 11
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 4

<400> 11
 ctctagagga tccccgccgt aagcagcctc tgggtggaatg gtcagc

46

<210> 12
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 5

<400> 12
gctgaccacg agcagacctg ctccacctcc accgt

35

<210> 13
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 6

<400> 13
acggtggagg tggagcaggt ctgctcgtgg tcagc

35

<210> 14
<211> 418
<212> PRT
<213> Chưa biết

<220>
<223> YjeH AA

<400> 14
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> 15
 <211> 1257
 <212> ADN
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> YjeH NT

<400> 15
 atgagtggac tcaaacaaga actggggctg gccagggca ttggcctgct atcgacgtca 60

```

ttattaggca ctggcgtggt tgccgttcct gcgttagctg cgctggtagc gggcaataac 120
agcctgtggg cgtggcccggt ttgattatc ttagtggtcc cgattgcgat tgtgtttgcg 180
attctgggtc gccactatcc cagcgcaggc ggcgtcgcgc acttcgtcgg tatggcgttt 240
ggttcgcggc ttgagcgagt caccggctgg ctgtttttat cggtcattcc cgtgggtttg 300
cctgccgcac tacaaattgc cgccgggttc ggccaggcga tgtttggtg gcatagctgg 360
caactgttgt tggcagaact cggtacgctg gcgctggtgt ggtatatcgg tactcgcggg 420
gccagttcca gtgctaact acaaaccgtt attgccggac ttatcgtcgc gctgattgtc 480
gctatctggg gggcgggcca 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 cctatgggtga aaaaatggcg gcggcagcat cgcttccaaa aattgtagtg 780
cagttgttcg gtgtaggagc gttatggatt gcctgcgtga ttggctatct ggcctgcttt 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 tttatctggt atgcatgctg 1080
gcaggctgta aattattgca aggacgttat cgactactgg cggtgggttg cgggctgtta 1140
tgcgttctgt tactggcaat ggtcggctgg aaaagtctct atgcgctgat catgctggcg 1200
gggttatggc tgttgctgcc aaaacgaaaa acgccgaaa atggcataac cacataa 1257

```

```

<210> 16
<211> 88
<212> PRT
<213> Chưa biết

```

```

<220>
<223> NCgl2335 AA

```

```

<400> 16
Met Ala Tyr Thr Phe Asp His Val Val Ala Trp Arg Trp Cys Thr Lys
  1             5             10             15

Glu Asp Ala Tyr Asn Tyr Thr His Leu Phe Asp Gln Leu Gln Pro Pro
          20             25             30

Leu Ile Val Thr Thr Asp Gly Gln Lys Arg Arg Thr Gln Ser His His
      35             40             45

```


His Asp Leu Ala Asp Asn Glu Asn Pro Thr Leu Pro Arg Pro Arg Gln
 50 55 60

Thr Gln Arg Pro Lys Thr Arg His Pro Lys Thr Arg Ala Glu Leu Ala
 65 70 75 80

Glu Lys His Ser Gly Val Ser Pro
 85

<210> 17
 <211> 267
 <212> ADN
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> NCgl2335 NT

<400> 17
 gtggcctaca ctttcgacca cgtcgctgcc tggcgctggt 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> 18
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tn_5 F

<400> 18 39
 tgaattcgag ctcggtaccc caccgacgag catctgcct

<210> 19
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tn_5 R

<400> 19 50
 ggtgtggtga ctttcagcag ttcccggggg ggaggaggca tgtggtgttg

<210> 20
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tn_3 F

<400> 20

caacaccaca tgcctcctcc cccccgggaa ctgctgaaag tcaccacacc

50

<210> 21

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tn_3 R

<400> 21

gtcgactcta gaggatcccc ctcccaaacc attgaggaat gg

42

<210> 22

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CJ7_yjeH F

<400> 22

acaccacatg cctcctcccc agaaacatcc cagcgctac

39

<210> 23

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CJ7_yjeH R

<400> 23

agttcttggt tgagtcact catagtgttt cctttcggtg ggt

43

<210> 24

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> yjeH F

<400> 24

acccaacgaa aggaaacact atgagtggac tcaaacaaga actg

44

<210> 25
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yjeH R

<400> 25
 gactttcagc agttcccggg ttatgtgggt atgccatttt ccgg

44

<210> 26
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yjeH F351L AA

<400> 26
 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> 27
 <211> 1257
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yjeH F351L NT

<400> 27
 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 tatggcggtt 240

gggttcgcggc ttgagcgagt caccggctgg ctgaatttat cggtcattcc cgtggggttg 300
 cctgccgcac tacaaattgc cgccgggttc ggccaggcga tgtttggtg gcatagctgg 360
 caactgttgt tggcagaact cggtagctg gcgctggtgt ggtatatcgg tactcgcggt 420
 gccagttcca gtgctaattct acaaaccgtt attgccggac ttatcgtcgc gctgattgtc 480
 gctatctggg gggcggggcga tatcaaacct gcgaatatcc cctttccggc acctggtaat 540
 atcgaactta ccgggttatt tgctgcgtta tcagtgatgt tctgggtgtt tgctgggtctg 600
 gaggcatttg cccatctcgc ctcggaattt aaaaatccag agcgtgattt tcctcgtgct 660
 ttgatgattg gtctgctgct ggcaggatta gtctactggg gctgtacggg agtcgtctta 720
 cacttcgacg cctatgggtga aaaaatggcg gcggcagcat cgcttccaaa aattgtagtg 780
 cagttgttcg gtgtaggagc gttatggatt gcctgcgtga ttggctatct ggcctgcttt 840
 gccagtctca acatttatat acagagcttc gccgcctgg tctggtcgca ggcgcaacat 900
 aatcctgacc actacctggc acgcctctct tctcgccata tcccgaataa tgccctcaat 960
 gcgggtgctcg gctgctgtgt ggtgagcact ttgggtgattc atgctttaga gatcaatctg 1020
 gacgctctta ttatttatgc caatggcatc cttattatga tttatctggt atgcatgctg 1080
 gcaggctgta aattattgca aggacgttat cgactactgg cggtggttgg cgggctgtta 1140
 tgcgttctgt tactggcaat ggtcggctgg aaaagtctct atgcgctgat catgctggcg 1200
 gggttatggc tgttgctgcc aaaacgaaaa acgccggaaa atggcataac cacataa 1257

<210> 28
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> F351L F

<400> 28
 caatggcatc cttattatga ttt 23

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

<220>
 <223> F351L R

<400> 29
 aatcataat aaggatgcca ttg 23

<210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> gltA-F

<400> 30
 atgtttgaaa gggatatcgt 20

<210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> gltA-R

<400> 31
 tttagcgctcc tcgcgaggaa c 21

<210> 32
 <211> 5803
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDCM2

<400> 32
 gttcgccttgc tgtccataaa accgcccagt ctagctatcg ccatgtaagc cactgcaag 60
 ctacctgctt tctctttgcg cttgcgtttt cccttggtcca gatagcccag tagctgacat 120
 tcatccgggg tcagcaccgt ttctgcggac tggctttcta cgtgttccgc ttcctttagc 180
 agcccttgcg ccctgagtgc ttgcggcagc gtgaagctag cttttatcgc cattcgccat 240
 tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc 300
 tggcgaaagg gggatgtgct gcaagggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt 360
 cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcgagctcgg taccggggga tcctctagag 420
 tcgacctgca ggcattgcaag cttggcgtaa tcatggatcat agctgtttcc tgtgtgaaat 480
 tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg 540
 ggtgcctaata gaggtagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag 600
 tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggt 660
 ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggctcgttcg 720

ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac ggttatccac agaatacagg 780
 gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag 840
 gccgcgttgc tggcggttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga 900
 cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct 960
 ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc 1020
 tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg 1080
 gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc 1140
 tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca 1200
 ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag 1260
 ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct 1320
 ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc 1380
 accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga 1440
 tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctcgacg ctcaagtggaa cgaaaactca 1500
 cgttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttgggg 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 aggttccaac tttcaccata atgaaataag atcactaccg 1860
 ggcgtatttt ttgagttatc gagattttca ggagctgata gaaacagaag ccaactggagc 1920
 acctcaaaaa caccatcata cactaaatca gtaagttggc agcatcaccc gacgcacttt 1980
 gcgccgaata aatacctgtg acggaagatc acttcgcaga ataaataaat cctggtgtcc 2040
 ctggtgatac cgggaagccc tgggccaact tttggcgaaa atgagacgtt gatcggcacg 2100
 taagagggtc caactttcac cataatgaaa taagatcact accgggcgta ttttttgagt 2160
 tatcgagatt ttcaggagct ctttggcatc gtctctcgcc tgtccctca gttcagtaat 2220
 ttctgcatt tgctgtttc cagtcggtag atattccaca aaacagcagg gaagcagcgc 2280
 ttttccgctg cataaccctg cttcggggtc attatagcga ttttttcggt atatccatcc 2340
 tttttcgcac gatatacagg attttgccaa agggttcgtg tagactttcc ttggtgtatc 2400
 caacggcgtc agccgggcag gataggtgaa gtaggccac ccgcgagcgg gtgttccttc 2460
 ttcactgtcc cttattcgca cctggcggtg ctcaacggga atcctgctct gcgaggctgg 2520
 ccggctaccg ccggcgtaac agatgagggc aagcggatgg ctgatgaaac caagccaacc 2580

aggaagggca gcccacctat caaggtgtac tgccttccag acgaacgaag agcgattgag 2640
 gaaaaggcgg cggcggccgg catgagcctg tcggcctacc tgctggccgt cggccagggc 2700
 tacaaaatca cgggcgtcgt ggactatgag cacgtccgcg agggcgtccc ggaaaacgat 2760
 tccgaagccc aacctttcat agaaggcggc ggtggaatcg aaatctcgtg atggcagggt 2820
 gggcgtcgtc tggtcggtca tttcgaaaaa ggtaggaat acggttagcc atttgcctgc 2880
 ttttatatag ttcantatgg gattcacctt tatgttgata agaaataaaa gaaaatgcc 2940
 ataggatata ggcattttct tttgcgtttt tatttgtaa ctgttaattg tccttgttca 3000
 aggatgctgt ctttgacaac agatgttttc ttgcctttga tgttcagcag gaagctcggc 3060
 gcaaacgttg attgtttgtc tgcgtagaat cctctgtttg tcatatagct tgtaatcacg 3120
 acattgtttc ctttcgcttg aggtacagcg aagtgtgagt aagtaaaggc tacatcggt 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 caaataactaa gtatttggtg cctttatctt ctacgtagtg aggatctctc 3660
 agcgtatggt tgcgcctga gctgtagtgt ccttcacgca 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 tgcgacagtg ccgtcagcgt tttgtaatgg ccagctgtcc 4140
 caaacgtcca ggccttttgc agaagagata tttttaattg tggacgaatc aaattcagaa 4200
 acttgatatt tttcattttt ttgctgttca gggatttgca gcataatcat gcgtgtaata 4260
 tgggaaatgc cgtatgtttc cttatatggc ttttggttcg tttctttcgc aaacgcttga 4320
 gttgcgcctc ctgccagcag tgcggtagta aaggtaata ctgttgcttg ttttgcaaac 4380


```

tttttgatgt tcacgttca tgtctccttt tttatgtact gtgttagcgg tctgcttctt 4440
ccagccctcc tgtttgaaga tggcaagtta gttacgcaca ataaaaaaag acctaaaata 4500
tgtaaggggt gacgccaaag tatacacttt gccctttaca catttttaggt 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 gcgagcccct gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc 5220
ttccatccga gtacgtgctc gctcgatgcg atgtttcgct tggtggtcga atgggcaggt 5280
agccggatca agcgtatgca gccgccgat tgcacagcc atgatggata ctttctcggc 5340
aggagcaagg tgagatgaca ggagatcctg ccccggcact tcgccaata gcagccagtc 5400
ccttcccgtc tcagtgacaa cgtcgagaca gctgcgcaag gaacgcccgt cgtggccagc 5460
cacgatagcc gcgctgcctc gtcttgaggt tcattcaggg caccggacag gtcggtcttg 5520
acaaaaagaa ccgggcgccc ctgcgctgac agccggaaca cggcggcac 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

```

<210> 33
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Công thức chung 1

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (1)

<223> Xaa là N hoặc S.

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM MISC

<222> (9)

<223> Xaa là A hoặc E.

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM MISC

<222> (73)

<223> Xaa là Y hoặc C.

<400> 33

Xaa Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Xaa Phe Met Asn Lys Val Lys Asn
1 5 10 15

Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys
20 25 30

Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile
35 40 45

Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu
50 55 60

Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Xaa Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr
65 70 75 80

Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe
85 90 95

Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly
100 105 110

Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn His
115 120 125