



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

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

(11)



1-0049124

(51)^{2022.01} C07K 14/34; C12P 13/08; C12N 15/77 (13) B

(21) 1-2023-04342

(22) 06/01/2022

(86) PCT/KR2022/000204 06/01/2022

(87) WO 2022/149865 14/07/2022

(30) 10-2021-0003609 11/01/2021 KR

(45) 25/07/2025 448

(43) 27/11/2023 428A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) SO, Yee-Seul (KR); KWON, Su Yon (KR); LEE, Kwang Woo (KR); SHIM, Jihyun (KR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) BIẾN THỂ PROTEIN GLXR VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THREONIN
BẰNG CÁCH SỬ DỤNG BIẾN THỂ NÀY

(21) 1-2023-04342

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể protein GlxR hoặc phương pháp sản xuất threonin sử dụng biến thể này, và biến thể protein GlxR theo một phương án được đưa vào vi sinh vật để làm giảm sản xuất sản phẩm phụ và làm tăng đáng kể khả năng sản xuất threonin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể protein GlxR hoặc phương pháp sản xuất threonin sử dụng biến thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

L-threonin là axit amin thiết yếu, và được sử dụng làm thức ăn hoặc thực phẩm bổ sung, nguyên liệu thô tổng hợp cho dược phẩm và dung dịch truyền trong y tế. L-threonin được sản xuất chủ yếu bằng công nghệ lên men vi sinh, và ví dụ, nó có thể được sản xuất bằng cách sử dụng vi sinh vật *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Serratia*, hoặc *Providencia* sp..

Gần đây, nhiều nỗ lực đã được thực hiện để cải tiến phương pháp điều chế L-threonin bằng cách sử dụng chủng *Corynebacterium* sp.. Khi công nghệ tái tổ hợp gen phát triển, các công nghệ để phát triển các chủng sản xuất L-threonin tiên tiến hơn đã được báo cáo bằng cách đưa vào các thay thế gen đặc hiệu vị trí, các khuếch đại gen và đột biến mất gen, và tương tự cho chủng sản xuất L-threonin đã được phát triển bởi kỹ thuật gây đột biến ngẫu nhiên. Ngoài ra, cũng có nỗ lực đưa vào gen ngoại lai từ vi khuẩn khác.

Mặc dù với các nỗ lực này, vẫn đòi hỏi phải phát triển của công nghệ cải tiến năng suất các hợp chất hữu ích như L-threonin.

Tài liệu đối chứng

Tài liệu sáng chế

(Tài liệu sáng chế 1) Công bố patent Mỹ số 2016-0369310

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Một ví dụ đề xuất biến thể protein GlxR mới. Biến thể protein GlxR này có thể là polypeptit trong đó axit amin ở vị trí trong số một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm vị trí thứ 45, 66, 166 và 168 từ đầu cùng N trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 và/hoặc tương ứng với chúng (ở một hoặc nhiều vị trí được chọn trên đây) được thay thế

bằng axit amin khác. Polypeptit này có thể có chức năng của chất điều hòa phiên mã chính điều hòa quá trình chuyển hóa.

Ví dụ khác đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể protein GlxR.

Ví dụ khác đề xuất vector chứa polynucleotit này.

Ví dụ khác đề xuất vi sinh vật chứa biến thể protein GlxR, polynucleotit, vector chứa polynucleotit này, hoặc kết hợp của chúng.

Ví dụ khác đề xuất phương pháp sản xuất threonin bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường.

Vi sinh vật này có thể là vi sinh vật *Corynebacterium* sp..

Giải pháp kỹ thuật

Một ví dụ được cung cấp trong sáng chế đề xuất công nghệ liên quan đến việc phát triển chủng có khả năng sản xuất threonin được cải tiến (tăng cường) bằng cách cải tiến protein GlxR và/hoặc gen *glxR* mã hóa protein này. Trong một ví dụ, threonin này có thể là L-threonin.

Một khía cạnh của sáng chế để đạt được mục đích này có thể đề xuất biến thể protein GlxR, trong đó gốc axit amin ở vị trí trong số một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm vị trí thứ 45, 66, 166 và 168 từ đầu cùng N trong trình tự axit amin của protein GlxR và/hoặc vị trí tương ứng với chúng được thay thế bằng gốc axit amin thuộc loại khác.

Mô tả chi tiết sáng chế

Ở đây, “GlxR (chất điều hòa phiên mã chung phụ thuộc AMP vòng giống CRP; ví dụ, Cg0350)” có thể có nghĩa là chất điều hòa chung không chỉ tham gia vào quá trình chuyển hóa cacbon mà còn tham gia vào nhiều chức năng tế bào khác nhau để điều hòa nhiều gen khác nhau, và ví dụ, nó có thể điều hòa sự biểu hiện của gen mã hóa các enzym bỏ qua axit glyoxylic, isoxitrat lyaza và/hoặc malat synthaza (ví dụ, *aceA* (cg2560) và *aceB* (cg2559)).

Protein GlxR có thể chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, và gen *glxR* mã hóa protein GlxR có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 2 hoặc bao gồm trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 2. Trình tự

axit amin của SEQ ID NO: 1 và trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 2 được mô tả trong Bảng 1 dưới đây.

Trình tự axit amin của protein GlxR và trình tự nucleotit (trình tự axit nucleic) của gen mã hóa protein GlxR (ví dụ, *glxR*) dễ dàng thu được từ cơ sở dữ liệu đã biết trong lĩnh vực này như Trung tâm quốc gia Mỹ về thông tin công nghệ sinh học (NCBI) và Ngân hàng dữ liệu ADN Nhật Bản (DDBJ), và ví dụ, nó có thể là GenBank Accession No. WP_003855810.1.

【Bảng 1】

Tên	Trình tự	SEQ ID NO
GlxR_axit amin	MEGVQEILSRAGIFQGVDP TAVNNLIQDMETVRFPR GATIFDEGEPGDRLYIITSGKVKLARHAPDGRENLLT IMGPSDMFGE LSIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMNS DMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLADL IFTDVPGRVAKTLLQLANRFGTQEAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKA LATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	SEQ ID NO: 1
<i>glxR</i> _axit nucleic	GTGGAAGGTGTACAGGAGATCCTGTCGCGCGCCG GAATTTTCAAGGCGTTGACCCAACGGCAGTCAA TAACCTCATCCAGGATATGGAGACCGTTCGCTTCC CACGCGGAGCAACCATCTTCGACGAGGGCGAGC CAGGTGACCGCCTTTACATCATCACCTCCGGCAA AGTGAAGCTTGCGCGCCACGCACCGGACGGCCG CGAAAACCTGCTGACCATCATGGGTCCTTCCGAC ATGTTCCGGTGAGCTCTCCATCTTCGACCCAGGCC ACGCACCTCCTCTGCAGTGTGTGTACCGAAGTT CATGCAGCAACCATGAACTCTGACATGCTGCGCA ACTGGGTAGCTGACCACCCAGCTATCGCTGAGCA GCTCCTGCGCGTTCTGGCTCGTCGTCTGCGTCGC ACCAACGCTTCCCTGGCTGACCTCATCTTCACCG ACGTCCCAGGCCGCGTTGCTAAGACCCTTCTGCA GCTGGCTAACCGCTTCGGCACCCAAGAAGCTGGC GCGCTGCGCGTGAACCACGACCTCACTCAGGAA GAAATCGCACAGCTCGTCGGTGCTTCCCGTGAAA CTGTGAATAAGGCTCTTGCAACGTTTCGCACACCG TGGCTGGATTCGCCTCGAGGGCAAGTCCGTCCTC ATTGTGGACACCGAGCATTGTCACGTCGCGCTC GATAA	SEQ ID NO: 2

Ở đây, thuật ngữ, “tương ứng với” đề cập đến gốc axit amin ở vị trí được liệt kê trong polypeptit, hoặc gốc axit amin mà tương tự, đồng nhất hoặc tương đồng với gốc được liệt kê trong polypeptit. Việc xác nhận axit amin ở vị trí tương ứng có thể là xác định axit amin cụ thể trong trình tự mà tham chiếu đến trình tự cụ thể. “Vùng tương ứng” được sử dụng ở đây nói chung đề cập đến vị trí giống hoặc tương ứng trong protein liên quan hoặc protein tham chiếu.

Ví dụ, trình tự axit amin bất kỳ được sắp xếp thẳng hàng với SEQ ID NO: 1, và dựa vào đó, mỗi gốc axit amin của trình tự axit amin này có thể được đánh số bằng cách tham chiếu đến vị trí số của gốc axit amin của SEQ ID NO: 1 và gốc axit amin tương ứng. Ví dụ, thuật toán sắp xếp thẳng hàng trình tự như được mô tả ở đây có thể xác nhận vị trí của một axit amin, hoặc vị trí mà tại đó biến đổi như đột biến thế, gắn xen hoặc mất đoạn xảy ra so với trình tự truy vấn (còn được gọi là “trình tự tham chiếu”).

Đối với việc sắp xếp thẳng hàng như vậy, ví dụ, thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), chương trình Needle của gói EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000), Trends Genet. 16: 276-277), và tương tự có thể được sử dụng, nhưng không bị giới hạn vào đó, và các chương trình sắp xếp thẳng hàng trình tự, thuật toán so sánh trình tự theo cặp, và tương tự đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng thích hợp.

Ở đây, polynucleotit hoặc polypeptit “chứa trình tự axit nucleic (trình tự nucleotit) hoặc trình tự axit amin cụ thể hoặc bao gồm trình tự này” có thể có nghĩa là polynucleotit hoặc polypeptit này nhất thiết là chứa trình tự axit nucleic (trình tự nucleotit) hoặc trình tự axit amin cụ thể này, và có thể được hiểu là bao gồm “trình tự gần như tương đương” trong đó đột biến (mất đoạn, thế, và/hoặc gắn xen) được bổ sung vào trình tự axit nucleic (trình tự nucleotit) hoặc trình tự axit amin cụ thể này (hoặc không loại trừ các đột biến này) trong phạm vi vẫn duy trì được chức năng ban đầu và/hoặc chức năng mong muốn của polynucleotit hoặc polypeptit này. Trong một ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit “chứa trình tự axit nucleic (trình tự nucleotit) hoặc trình tự axit amin cụ thể hoặc bao gồm trình tự này” có thể có nghĩa là polynucleotit hoặc polypeptit này (i) nhất thiết chứa trình tự axit nucleic (trình tự nucleotit) hoặc trình tự axit amin cụ thể này, hoặc (ii) bao gồm trình tự

axit nucleic hoặc trình tự axit amin có tỷ lệ tương đồng hoặc đồng nhất là 70% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, 91% hoặc cao hơn, 92% hoặc cao hơn, 93% hoặc cao hơn, 94% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, 96% hoặc cao hơn, 97% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, 99% hoặc cao hơn, 99,5% hoặc cao hơn, hoặc 99,9% hoặc cao hơn với trình tự axit nucleic (trình tự nucleotit) hoặc trình tự axit amin cụ thể này hoặc nhất thiết chứa nó và duy trì chức năng ban đầu và/hoặc chức năng mong muốn. Trong một ví dụ, chức năng mong muốn có thể có nghĩa là chức năng làm tăng hoặc tạo ra năng suất L-threonin của vi sinh vật.

Ở đây, “tỷ lệ tương đồng” có nghĩa là tỷ lệ phần trăm đồng nhất giữa hai gốc polynucleotit hoặc polypeptit. Tỷ lệ tương đồng giữa các trình tự từ một gốc đến gốc còn lại có thể được xác định bằng các giải pháp kỹ thuật đã biết. Ví dụ, tỷ lệ tương đồng có thể được xác định bằng cách sắp xếp thẳng hàng trực tiếp thông tin trình tự giữa hai phân tử polynucleotit hoặc hai phân tử polypeptit bằng cách sử dụng chương trình máy tính dễ dàng sẵn có để sắp xếp thẳng hàng thông tin trình tự, ví dụ, các tham số như điểm, tỷ lệ đồng nhất và tương tự, và các tham số tương tự. Chương trình máy tính có thể là BLAST (NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlign™ (DNASTAR Inc), và tương tự. Ngoài ra, tỷ lệ tương đồng giữa các polynucleotit có thể được xác định bằng cách lai các polynucleotit này trong các điều kiện để tạo thành chuỗi kép bền vững giữa các vùng tương đồng, và sau đó phân giải chúng bằng nucleaza đặc hiệu chuỗi đơn để xác nhận kích thước của đoạn được phân giải.

Ở đây, ‘tỷ lệ tương đồng hoặc tỷ lệ đồng nhất’ có nghĩa là mức độ tương tự giữa hai trình tự axit amin hoặc hai trình tự nucleotit đã đưa ra và có thể được thể hiện bằng tỷ lệ phần trăm. Các thuật ngữ, tỷ lệ tương đồng và tỷ lệ đồng nhất thường có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau.

Tỷ lệ tương đồng hoặc tỷ lệ đồng nhất trình tự của polynucleotit hoặc polypeptit được bảo tồn được xác định bằng thuật toán sắp xếp chuẩn, và điểm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình được sử dụng có thể được sử dụng cùng với nhau. Về cơ bản, trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được lai nói chung trong các điều kiện nghiêm ngặt trung bình hoặc cao với toàn bộ hoặc một phần của một trình tự. Rõ ràng là

việc lai còn bao gồm lai với polynucleotit chứa codon có tính đến codon thường hoặc suy biến codon trong polynucleotit.

Việc hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit bất kỳ có sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất hay không có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng thuật toán máy tính đã biết như chương trình “FASTA” sử dụng các tham số mặc định như Pearson et al (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444. Theo cách khác, điều này có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), như được thực hiện trong chương trình Needleman của gói EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277) (phiên bản 5.0.0 hoặc phiên bản mới hơn) (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J., et al, nucleic acids 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, and [CARILLO ET AL.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073). Ví dụ, tỷ lệ tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng BLAST hoặc ClustalW của Trung tâm quốc gia về thông tin công nghệ sinh học.

Tỷ lệ tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất của polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự, ví dụ, bằng cách sử dụng chương trình máy tính GAP như Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443, ví dụ, đã biết trong Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482. Nói tóm lại, chương trình GAP có thể được xác định là giá trị của phép chia số lượng các ký hiệu (nghĩa là, nucleotit hoặc axit amin) được sắp xếp thẳng hàng tương tự cho tổng số các ký hiệu trong trình tự ngắn hơn trong số hai trình tự. Tham số mặc định cho chương trình GAP có thể chứa (1) ma trận so sánh nhị phân (chứa các giá trị là 1 đối với đồng nhất và 0 đối với không đồng nhất) và ma trận so sánh có trọng số của Gribskov et al (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745 được mô tả trong Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979) (hoặc ma trận thay thế EDNAFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4)); (2) điểm phạt 3,0 cho mỗi khoảng cách và điểm phạt bổ sung 0,10 cho mỗi ký hiệu trong mỗi khoảng cách (hoặc điểm phạt mở khoảng

trống 10, điểm phạt kéo dài khoảng trống 0,5); và (3) không có điểm phạt cho các khoảng trống cuối cùng.

Một khía cạnh của sáng chế có thể đề xuất biến thể protein GlxR, trong đó axit amin ở vị trí trong số một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm vị trí thứ 45, 66, 166 và 168 từ đầu cùng N trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 và/hoặc tương ứng với chúng (với một hoặc nhiều vị trí được chọn trên đây) được thay thế bằng axit amin khác. “Axit amin khác” có thể có nghĩa là axit amin khác ngoại trừ các axit amin nằm ở vị trí trong số một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm vị trí thứ 45, 66, 166 và 168 của SEQ ID NO: 1 và/hoặc tương ứng với chúng.

Biến thể theo một ví dụ có thể chứa polypeptit, trong đó gốc axit amin ở vị trí trong số một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm vị trí thứ 45, 66, 166 và 168 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 và/hoặc tương ứng với chúng (ở một hoặc nhiều vị trí được chọn trên đây) được thay thế bằng gốc axit amin thuộc loại khác trong trình tự axit amin có tỷ lệ tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7% hoặc 99,9% hoặc cao hơn, với trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, rõ ràng là các biến thể có trình tự axit amin, trong đó một số trình tự được xóa bỏ, biến đổi, thay thế, thay thế bảo tồn hoặc được bổ sung cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế, nếu protein này có tỷ lệ tương đồng hoặc đồng nhất như vậy và có hoạt tính giống hoặc tương ứng với protein GlxR.

Trong một ví dụ, biến thể protein GlxR (chất điều hòa bỏ qua glyoxylat), chứa đột biến được chọn từ nhóm bao gồm (1) đến (4) dưới đây:

(1) thay thế gốc tương ứng với vị trí axit amin 45 từ đầu cùng N trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 (ví dụ, axit glutamic, hoặc glutamat) bằng alanin, serin, phenylalanin hoặc lysin;

(2) thay thế gốc tương ứng với vị trí axit amin 66 từ đầu cùng N trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 (ví dụ, axit aspartic, hoặc aspartat) bằng alanin, phenylalanin hoặc lysin;

(3) thay thế gốc tương ứng với vị trí axit amin 166 từ đầu cùng N trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 (ví dụ, threonin) bằng axit aspartic, phenylalanin hoặc lysin; và

(4) thay thế gốc tương ứng với vị trí axit amin 168 từ đầu cùng N trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 (ví dụ, axit glutamic, hoặc glutamat) bằng alanin, phenylalanin hoặc lysin.

Ngoài ra, biến thể theo sáng chế có thể chứa axit amin, trong đó gốc axit amin ở vị trí trong số một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm vị trí thứ 45, 66, 166 và 168 dựa vào trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 và/hoặc tương ứng với chúng (ở một hoặc nhiều vị trí được chọn trên đây) được thay thế bằng gốc axit amin thuộc loại khác, mà có tỷ lệ tương đồng hoặc đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7% hoặc 99,9% hoặc cao hơn với trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 3 đến 15. Ngoài ra, rõ ràng là các biến thể có trình tự axit amin, trong đó một số trình tự được xóa bỏ, biến đổi, thay thế, thay thế bảo tồn hoặc được bổ sung cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế, nếu trình tự axit amin này có tỷ lệ tương đồng hoặc đồng nhất như vậy và thể hiện tác dụng tương ứng với biến thể theo sáng chế.

Ví dụ, có nhiều trường hợp có sự gắn xen trình tự hoặc xóa bỏ trình tự mà không làm thay đổi chức năng của biến thể theo sáng chế ở đầu cùng N, đầu cùng C và/hoặc trong trình tự axit amin, đột biến xuất hiện tự nhiên, đột biến câm hoặc thế bảo tồn.

“Thế bảo tồn” có nghĩa là thay thế một axit amin bằng axit amin khác có các đặc điểm cấu trúc và/hoặc hóa học tương tự. Sự thay thế axit amin này thường có thể xảy ra dựa trên sự tương tự về độ phân cực, điện tích, độ tan, tính kỵ nước, tính ưa nước và/hoặc bản chất lưỡng tính của gốc này. Thông thường, sự thế bảo tồn có thể có rất ít hoặc không có ảnh hưởng gì đến hoạt tính của protein hoặc polypeptit.

Ở đây, thuật ngữ “biến thể” đề cập đến polypeptit, trong đó một hoặc nhiều axit amin được thế bảo tồn và/hoặc được biến đổi nhờ đó trở nên khác biệt với trình tự axit amin trước khi đột biến của biến thể này, nhưng các chức năng hoặc đặc điểm được duy trì. Biến thể này thường có thể được xác định bằng cách biến đổi một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin của polypeptit và đánh giá các đặc điểm của polypeptit biến đổi. Nói cách khác, khả năng của biến thể có thể được tăng cường, không thay đổi hoặc bị giảm so với polypeptit trước khi đột biến. Ngoài ra, một số biến thể có thể bao gồm các biến thể, trong đó một hoặc nhiều phần như trình tự dẫn đầu đầu cùng N hoặc miền xuyên màng

được loại bỏ. Các biến thể khác có thể bao gồm các biến thể, trong đó một phần đã được loại bỏ từ đầu cùng N và/hoặc đầu cùng C của protein trưởng thành. Thuật ngữ “biến thể” có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với các thuật ngữ như thể đột biến, biến đổi, polypeptit đột biến, protein bị đột biến, đột biến và biến thể, và tương tự (trong tiếng Anh là, modification, modified polypeptit, modified protein, variant, mutein, divergent, v.v.), và với điều kiện là nó là thuật ngữ được sử dụng theo nghĩa được gây đột biến, và không bị giới hạn vào đó. Ngoài ra, biến thể này có thể chứa đột biến mất đoạn hoặc gắn xen các axit amin có ảnh hưởng tối thiểu đến các đặc điểm và cấu trúc bậc hai của polypeptit này. Ví dụ, trình tự tín hiệu (hoặc trình tự dẫn đầu) tham gia vào sự hoán vị protein đồng dịch mã hoặc sau dịch mã có thể được liên hợp ở đầu cùng N của biến thể này. Ngoài ra, biến thể này có thể được liên hợp với các trình tự khác hoặc các cầu nối để xác định, tinh chế hoặc tổng hợp.

Theo một ví dụ, biến thể protein GlxR có thể chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 15 hoặc bao gồm trình tự axit amin này. Các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 15 được mô tả trong Bảng 2 dưới đây.

【Bảng 2】

Tên	Trình tự	SEQ ID NO
GlxR_E45A	MEGVQEILSRAGIFQGVDPTAVNNLIQDMETVRFPR GATIFDEGAPGDRLYIITSGKVKLARHAPDGRENLL TIMGPSDMFGELSIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMN SDMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLAD LIFTDVPGRVAKTLLQLANRFGTQEAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKAATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	SEQ ID NO: 3
GlxR_E45S	MEGVQEILSRAGIFQGVDPTAVNNLIQDMETVRFPR GATIFDEGSPGDRLYIITSGKVKLARHAPDGRENLLT IMGPSDMFGELSIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMNS DMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLADL IFTDVPGRVAKTLLQLANRFGTQEAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKAATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	SEQ ID NO: 4
GlxR_E45F	MEGVQEILSRAGIFQGVDPTAVNNLIQDMETVRFPR	SEQ ID NO: 5

	GATIFDEGFPGDRLYIITSGKVKLARHAPDGRENLLT IMGPSDMFGELSIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMNS DMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLADL IFTDVPGRVAKTLLQLANRFGTQEAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKALATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	
GlxR_E45K	MEGVQEILSRAGIFQGVDPTAVNNLIQDMETVRFPR GATIFDEGKPGDRLYIITSGKVKLARHAPDGRENLL TIMGPSDMFGELSIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMN SDMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLAD LIFTDVPGRVAKTLLQLANRFGTQEAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKALATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	SEQ ID NO: 6
GlxR_D66A	MEGVQEILSRAGIFQGVDPTAVNNLIQDMETVRFPR GATIFDEGEPGDRLYIITSGKVKLARHAPAGRENLLT IMGPSDMFGELSIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMNS DMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLADL IFTDVPGRVAKTLLQLANRFGTQEAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKALATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	SEQ ID NO: 7
GlxR_D66F	MEGVQEILSRAGIFQGVDPTAVNNLIQDMETVRFPR GATIFDEGEPGDRLYIITSGKVKLARHAPFGRENLLT IMGPSDMFGELSIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMNS DMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLADL IFTDVPGRVAKTLLQLANRFGTQEAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKALATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	SEQ ID NO: 8
GlxR_D66K	MEGVQEILSRAGIFQGVDPTAVNNLIQDMETVRFPR GATIFDEGEPGDRLYIITSGKVKLARHAPKGRENLLT IMGPSDMFGELSIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMNS DMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLADL IFTDVPGRVAKTLLQLANRFGTQEAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKALATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	SEQ ID NO: 9
GlxR_T166D	MEGVQEILSRAGIFQGVDPTAVNNLIQDMETVRFPR GATIFDEGEPGDRLYIITSGKVKLARHAPDGRENLLT IMGPSDMFGELSIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMNS DMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLADL IFTDVPGRVAKTLLQLANRFGDQEAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKALATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	SEQ ID NO: 10
GlxR_T166F	MEGVQEILSRAGIFQGVDPTAVNNLIQDMETVRFPR	SEQ ID NO: 11

	GATIFDEGEPGDRLYIITSGKVKLARHAPDGRENLLT IMGPSDMFGEISIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMNS DMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLADL IFTDVPGRVAKTLLQLANRFGFQEAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKAATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	
GlxR_T166K	MEGVQEILSRAGIFQGVDP TAVNNLIQDMETVRFPR GATIFDEGEPGDRLYIITSGKVKLARHAPDGRENLLT IMGPSDMFGEISIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMNS DMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLADL IFTDVPGRVAKTLLQLANRFGKQEAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKAATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	SEQ ID NO: 12
GlxR_E168A	MEGVQEILSRAGIFQGVDP TAVNNLIQDMETVRFPR GATIFDEGEPGDRLYIITSGKVKLARHAPDGRENLLT IMGPSDMFGEISIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMNS DMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLADL IFTDVPGRVAKTLLQLANRFGTQAAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKAATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	SEQ ID NO: 13
GlxR_E168F	MEGVQEILSRAGIFQGVDP TAVNNLIQDMETVRFPR GATIFDEGEPGDRLYIITSGKVKLARHAPDGRENLLT IMGPSDMFGEISIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMNS DMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLADL IFTDVPGRVAKTLLQLANRFGTQFAGALRVNHDLTQ EEIAQLVGASRETVNKAATFAHRGWIRLEGKSVLI VDTEHLARRAR	SEQ ID NO: 14
GlxR_E168K	MEGVQEILSRAGIFQGVDP TAVNNLIQDMETVRFPR GATIFDEGEPGDRLYIITSGKVKLARHAPDGRENLLT IMGPSDMFGEISIFDPGPRTSSAVCVTEVHAATMNS DMLRNWVADHPAIAEQLLRVLARRLRRTNASLADL IFTDVPGRVAKTLLQLANRFGTQKAGALRVNHDLT QEEIAQLVGASRETVNKAATFAHRGWIRLEGKSV LIVDTEHLARRAR	SEQ ID NO: 15

Biến thể protein GlxR theo một ví dụ là chất điều hòa phiên mã chung, như protein GlxR trước khi đột biến (ví dụ, protein GlxR chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1), và ví dụ, nó có thể có chức năng của chất điều hòa đối với các gen bỏ qua glyoxylat (ví dụ, *ace A* và/hoặc *ace B*).

Biến thể protein GlxR theo một ví dụ có thể có hoạt tính bị suy yếu so với protein GlxR (protein kiểu hoang (ví dụ, protein GlxR chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1))

trước khi đột biến. “Hoạt tính bị suy yếu của protein GlxR” có thể có nghĩa là mức hoạt tính của chất điều hòa phiên mã chung trong tế bào bị giảm so với protein này trước khi đột biến. Sự suy yếu là khi hoạt tính của chính protein này bị giảm so với hoạt tính của protein có trong các vi sinh vật ban đầu (ví dụ, vi sinh vật kiểu hoang, chủng bố mẹ, vi sinh vật chủ, vi sinh vật không biến đổi, v.v.) do sự đột biến của gen mã hóa protein GlxR, và khi mức biểu hiện của enzym này bị giảm xuống do sự ức chế phiên mã và/hoặc ức chế dịch mã của gen mã hóa protein GlxR, và do đó mức chung của hoạt tính enzym trong tế bào là thấp, sự kết hợp của chúng cũng có thể được bao gồm.

Ở đây, biến thể protein GlxR có thể được sử dụng với ý nghĩa giống như protein GlxR đột biến, biến thể GlxR và GlxR đột biến.

Khía cạnh khác của sáng chế có thể đề xuất polynucleotit, mã hóa biến thể protein GlxR.

Ở đây, “polynucleotit” đề cập đến chuỗi ADN hoặc ARN có chiều dài nhất định hoặc dài hơn như polyme của các nucleotit, trong đó các monome nucleotit được nối thành dạng chuỗi dài bằng các liên kết đồng hóa trị, và cụ thể hơn là, đoạn polynucleotit mã hóa biến thể.

Polynucleotit có thể được bao gồm mà không có giới hạn, với điều kiện là nó là trình tự polynucleotit mã hóa biến thể protein GlxR theo một ví dụ. Polynucleotit theo một ví dụ có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa biến thể protein GlxR, trong đó axit amin ở vị trí trong số một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm vị trí thứ 45, 66, 166 và 168, từ đầu cùng N trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 và/hoặc tương ứng với chúng (ở một hoặc nhiều vị trí được chọn trên đây), hoặc bao gồm trình tự axit nucleic, và ví dụ, nó có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 15 hoặc bao gồm trình tự axit nucleic.

Polynucleotit có thể có nhiều biến đổi khác nhau trong vùng mã hóa trong phạm vi mà không làm thay đổi trình tự axit amin của biến thể này theo một ví dụ, xem xét sự thoái biến codon hoặc các codon ưu tiên trong các sinh vật mà mong muốn biểu hiện biến thể theo một ví dụ. Do đó, bằng sự thoái biến codon, polypeptit chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 15 hoặc polynucleotit có khả năng mã hóa polypeptit có

tỷ lệ tương đồng (hoặc đồng nhất) với nó cũng có thể được bao gồm.

Polynucleotit theo một ví dụ có thể được bao gồm mà không có giới hạn, với điều kiện là nó là đoạn dò mà có thể được tạo ra từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự có khả năng lai trong điều kiện nghiêm ngặt với trình tự bổ sung cho toàn bộ hoặc một phần của polynucleotit theo một ví dụ. “Điều kiện nghiêm ngặt” nghĩa là điều kiện cho phép lai đặc hiệu giữa các polynucleotit. Điều kiện này được mô tả cụ thể trong tài liệu (Xem J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 9,50-9,51, 11.7-11.8). Ví dụ, điều kiện, trong đó các polynucleotit có tỷ lệ tương đồng hoặc đồng nhất cao, các polynucleotit có tỷ lệ tương đồng hoặc đồng nhất là 70% hoặc cao hơn, 75% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, 96% hoặc cao hơn, 97% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn, được lai, và các polynucleotit có tỷ lệ tương đồng hoặc đồng nhất thấp không được lai, hoặc điều kiện để rửa một lần, cụ thể là, hai hoặc 3 lần, ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với điều kiện rửa lai southern chung là 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, cụ thể là, 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, cụ thể hơn là, 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS.

Kỹ thuật lai đòi hỏi là hai axit nucleic có các trình tự bổ sung, mặc dù bắt cặp nhằm giữa các bazơ là có thể phụ thuộc vào độ nghiêm ngặt của phép lai. Ở đây, “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ nucleotit có khả năng lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenin là bổ sung với thymine và xytosin là bổ sung với guanin. Do đó, polynucleotit theo một ví dụ cũng có thể bao gồm đoạn axit nucleic được phân lập bổ sung với toàn bộ trình tự cũng như các trình tự axit nucleic gần như tương tự.

Cụ thể là, polynucleotit có tỷ lệ tương đồng hoặc đồng nhất với polynucleotit theo một ví dụ có thể được phát hiện bằng cách sử dụng điều kiện lai bao gồm lai ở giá trị T_m bằng 50°C đến 65°C (ví dụ, 55°C) sử dụng điều kiện được đề cập trên đây. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là 60°C, 63°C hoặc 65°C, nhưng không bị giới hạn vào đó, và nó có thể được điều chỉnh thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực theo mục đích.

Độ nghiêm ngặt thích hợp để lai polynucleotit phụ thuộc vào chiều dài và mức độ

bổ sung của polynucleotit này, và các tham số đã được biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ, xem J. J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 9,50-9,51, 11.7-11.8).

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

Ở đây, “vector” có thể chứa sản phẩm ADN chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa polypeptit đích được liên kết điều khiển được với vùng kiểm soát biểu hiện thích hợp (hoặc trình tự kiểm soát biểu hiện) nhờ đó biểu hiện polypeptit đích trong vật chủ thích hợp. Vùng kiểm soát biểu hiện có thể chứa trình tự khởi động có khả năng khởi động phiên mã, trình tự điều khiển bất kỳ để điều hòa sự phiên mã này, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom mRNA thích hợp, và trình tự điều hòa sự kết thúc phiên mã và dịch mã. Vector này có thể được sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen vật chủ và có thể được tích hợp vào bộ gen của chính nó, sau khi được biến nạp vào tế bào vật chủ thích hợp.

Vector được sử dụng ở đây không bị giới hạn cụ thể, và vector bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ về vector được sử dụng thông thường có thể bao gồm plasmid tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmid, virus và thể thực khuẩn. Ví dụ, để làm vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmid, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, và Charon21A, và tương tự có thể được sử dụng, và để làm vector plasmid, vector dựa trên pDZ, dựa trên pBR, dựa trên pUC, dựa trên pBluescriptII, dựa trên pGEM, dựa trên pTZ, dựa trên pCL và dựa trên pET, và tương tự có thể được sử dụng. Cụ thể là, các vector pDZ, pDC, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, và tương tự có thể được sử dụng.

Trong một ví dụ, polynucleotit mã hóa protein (ví dụ, protein GlxR) trong nhiễm sắc thể có thể được thay thế bằng polynucleotit cam nhờ vector để gắn xen nhiễm sắc thể trong tế bào. Việc gắn xen vào nhiễm sắc thể của polynucleotit có thể đạt được bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, phương pháp tái tổ hợp tương đồng, nhưng

không bị giới hạn vào đó. Gen đánh dấu chọn lọc để xác nhận sự gắn xen vào nhiễm sắc thể có thể được bao gồm thêm. Gen đánh dấu chọn lọc được sử dụng để chọn lọc các tế bào đã được biến nạp bằng vector, nghĩa là, để xác nhận phân tử polynucleotit đích đã được gắn xen hay chưa, và các gen đánh dấu mang lại kiểu hình có thể chọn lọc được như tính kháng thuốc, dinh dưỡng thụ động, tính kháng chất gây độc tế bào hoặc sự biểu hiện protein đột biến bề mặt có thể được sử dụng. Trong môi trường được xử lý bằng tác nhân chọn lọc, chỉ các tế bào biểu hiện gen đánh dấu có thể chọn lọc tồn tại hoặc thể hiện các tính trạng biểu hiện khác, do đó các tế bào đã biến nạp có thể được chọn lọc.

Ở đây, “biến nạp” có nghĩa là đưa vector chứa polynucleotit mã hóa polynucleotit đích vào tế bào chủ hoặc vi sinh vật chủ nhờ đó polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit này có thể được biểu hiện trong tế bào chủ này. Polynucleotit được biến nạp có thể bao gồm toàn bộ chúng bất kể chúng được gắn xen vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ hay nằm ngoài nhiễm sắc thể, với điều kiện là chúng có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Ngoài ra, polynucleotit chứa ADN và/hoặc ARN mã hóa polypeptit đích (ví dụ, biến thể GlxR). Polynucleotit này có thể được đưa vào ở dạng bất kỳ với điều kiện là nó có thể được đưa vào và được biểu hiện trong tế bào chủ. Ví dụ, polynucleotit này có thể được đưa vào tế bào chủ ở dạng catxet biểu hiện, là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết cho việc tự biểu hiện. Catxet biểu hiện này có thể chứa trình tự khởi động, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom và tín hiệu kết thúc dịch mã, mà thường được liên kết điều khiển được với polynucleotit này. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện có khả năng tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ ở dạng riêng của nó và được liên kết điều khiển được với trình tự cần thiết cho sự biểu hiện trong tế bào chủ, nhưng không bị giới hạn vào đó. Phương pháp biến nạp được bao gồm mà không có giới hạn với điều kiện là nó là phương pháp đưa gen vào tế bào, và có thể được thực hiện bằng cách chọn kỹ thuật chuẩn thích hợp đã biết trong lĩnh vực này tùy thuộc vào tế bào chủ. Ví dụ, phương pháp xung điện, phương pháp kết tủa canxi phosphat (CaPO_4), phương pháp kết tủa canxi clorua (CaCl_2), phương pháp vi tiêm, phương pháp gây nhiễm retrovirus, phương pháp polyetylen glycol (PEG), phương pháp DEAE-dextran, phương pháp cation liposom, và/hoặc phương pháp lithi axetat-DMSO, và tương tự có thể được sử dụng, nhưng

không bị giới hạn vào đó.

Vectơ có thể là sản phẩm ADN chứa trình tự axit nucleic của polynucleotit mã hóa protein đích được liên kết điều khiển được với trình tự điều hòa thích hợp để cho phép biểu hiện protein đích (ví dụ, biến thể GlxR) trong vật chủ thích hợp. Trình tự điều hòa có thể bao gồm trình tự khởi động có khả năng khởi động phiên mã, trình tự điều khiển bất kỳ để điều hòa sự phiên mã này, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom mARN thích hợp và trình tự điều hòa sự kết thúc phiên mã và dịch mã. Vectơ này có thể được sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen vật chủ và có thể được tích hợp vào bộ gen của chính nó, sau khi được biến nạp vào tế bào vật chủ thích hợp.

Ở đây, “được liên kết điều khiển được” có nghĩa là trình tự polynucleotit được liên kết chức năng với trình tự khởi động mà khởi động và gây ra sự phiên mã của polynucleotit mã hóa biến thể đích theo sáng chế.

Khía cạnh khác của sáng chế có thể đề xuất vi sinh vật (hoặc, chủng, tế bào tái tổ hợp), chứa một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm biến thể protein GlxR, polynucleotit mã hóa biến thể protein GlxR, và vectơ chứa polynucleotit này. Ở đây, “vi sinh vật” có thể bao gồm vi khuẩn một tế bào.

Ở đây, “chủng (hoặc, vi sinh vật)” bao gồm cả vi sinh vật kiểu hoang và vi sinh vật đã trải qua biến đổi di truyền tự nhiên hoặc nhân tạo, và là vi sinh vật trong đó cơ chế cụ thể bị suy yếu hoặc được tăng cường do các nguyên nhân như gắn xen gen ngoại lai hoặc sự tăng cường hoặc bất hoạt hoạt tính của gen nội sinh, là vi sinh vật chứa biến đổi di truyền để sản xuất polypeptit, protein hoặc sản phẩm mong muốn.

Vi sinh vật (hoặc, chủng, tế bào tái tổ hợp) có thể là chủng chứa một hoặc nhiều loại được chọn từ biến thể protein GlxR, polynucleotit theo một ví dụ và vectơ chứa polynucleotit theo một ví dụ; chủng được biến đổi để biểu hiện biến thể protein GlxR hoặc polynucleotit theo một ví dụ; chủng (ví dụ, chủng tái tổ hợp) biểu hiện biến thể protein GlxR hoặc polynucleotit theo một ví dụ; hoặc chủng (ví dụ, chủng tái tổ hợp) có hoạt tính của biến thể protein GlxR, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Trong một ví dụ, vi sinh vật (hoặc, chủng, tế bào tái tổ hợp) có thể có khả năng sản xuất threonin (ví dụ, L-threonin). Vi sinh vật (hoặc, chủng, tế bào tái tổ hợp) có thể có khả

năng sản xuất threonin tăng cường so với vi sinh vật chưa được biến đổi, tế bào trước khi tái tổ hợp, chủng mẹ và/hoặc chủng kiểu hoang, hoặc có thể được tạo ra khả năng sản xuất threonin khác với vi sinh vật chưa được biến đổi, tế bào trước khi tái tổ hợp, chủng mẹ và/hoặc chủng kiểu hoang, mà không có khả năng sản xuất threonin.

Ở đây, “có khả năng sản xuất threonin (ví dụ, L-threonin)” có nghĩa là tế bào và/hoặc vi sinh vật có khả năng sản xuất threonin một cách tự nhiên, hoặc vi sinh vật trong đó khả năng sản xuất threonin được tạo ra cho chủng mẹ không có khả năng sản xuất threonin. Thuật ngữ này có thể được sử dụng để chỉ trường hợp mà vi sinh vật có khả năng sản xuất L-threonin bằng cách đưa vào biến thể protein GlxR theo một ví dụ và/hoặc trường hợp mà vi sinh vật có khả năng sản xuất L-threonin bằng cách đưa biến thể protein GlxR vào vi sinh vật không có khả năng sản xuất L-threonin. Ví dụ, vi sinh vật *Corynebacterium* sp. có khả năng sản xuất L-threonin có thể có nghĩa là bản thân vi sinh vật tự nhiên hoặc vi sinh vật *Corynebacterium* sp. có khả năng sản xuất L-threonin tăng cường, trong đó gen ngoại lai liên quan đến cơ chế sản xuất threonin được gắn xen vào hoặc hoạt tính của gen nội tại được tăng cường, hoặc làm suy yếu hoặc bất hoạt.

Vi sinh vật, trong đó đột biến protein GlxR theo một ví dụ được đưa vào, có thể có threonin (ví dụ, L-threonin) được tăng cường, so với cùng loại vi sinh vật chưa được biến đổi. Ở đây, “vi sinh vật chưa được biến đổi” không loại trừ các chủng chứa đột biến mà có thể xuất hiện tự nhiên trong vi sinh vật, và có thể có nghĩa là chủng kiểu hoang hoặc chính là chủng kiểu tự nhiên, hoặc chủng trước khi tính trạng này được thay đổi do đột biến di truyền gây ra bởi các yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo. Ví dụ, vi sinh vật chưa được biến đổi có thể có nghĩa là chủng mà trong đó biến thể GlxR theo một ví dụ chưa được đưa vào hoặc trước khi đưa vào. “Vi sinh vật chưa được biến đổi” có thể được sử dụng thay thế với “chủng trước khi biến đổi”, “vi sinh vật trước khi biến đổi”, “chủng không đột biến”, “chủng không biến đổi”, “vi sinh vật không đột biến” hoặc “vi sinh vật chuẩn”. Đột biến protein GlxR được đưa vào vi sinh vật trên đây có thể có nghĩa là biến thể protein GlxR, polynucleotit mã hóa biến thể protein GlxR và/hoặc vectơ chứa polynucleotit này. Trong một ví dụ, vi sinh vật chưa được biến đổi protein, là chủng so sánh sự tăng khả năng sản xuất threonin có thể là chủng ATCC13032, chủng KCCM12000P, và/hoặc chủng

KCCM12120P, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Trong một ví dụ, chủng tái tổ hợp có khả năng sản xuất tăng có thể có khả năng sản xuất threonin tăng là khoảng 1% hoặc cao hơn, khoảng 2,5% hoặc cao hơn, khoảng 5% hoặc cao hơn, khoảng 6% hoặc cao hơn, khoảng 7% hoặc cao hơn, khoảng 8% hoặc cao hơn, khoảng 9% hoặc cao hơn, khoảng 10% hoặc cao hơn, khoảng 10,5% hoặc cao hơn, khoảng 11% hoặc cao hơn, khoảng 11,5% hoặc cao hơn, khoảng 12% hoặc cao hơn, khoảng 12,5% hoặc cao hơn, khoảng 13% hoặc cao hơn, khoảng 13,5% hoặc cao hơn, khoảng 14% hoặc cao hơn, khoảng 14,5% hoặc cao hơn, khoảng 15% hoặc cao hơn, khoảng 15,5% hoặc cao hơn, khoảng 16% hoặc cao hơn, khoảng 16,5% hoặc cao hơn, khoảng 17% hoặc cao hơn, khoảng 17,5% hoặc cao hơn, khoảng 18% hoặc cao hơn, khoảng 18,5% hoặc cao hơn, khoảng 19% hoặc cao hơn, khoảng 19,5% hoặc cao hơn, khoảng 20% hoặc cao hơn, khoảng 20,5% hoặc cao hơn, khoảng 21% hoặc cao hơn, khoảng 21,5% hoặc cao hơn, khoảng 22% hoặc cao hơn, khoảng 22,5% hoặc cao hơn, khoảng 23% hoặc cao hơn, khoảng 23,5% hoặc cao hơn, khoảng 24% hoặc cao hơn, khoảng 24,5% hoặc cao hơn, khoảng 25% hoặc cao hơn, khoảng 25,5% hoặc cao hơn, khoảng 26% hoặc cao hơn, khoảng 26,5% hoặc cao hơn, khoảng 27% hoặc cao hơn, (giới hạn trên không bị giới hạn cụ thể, và ví dụ, khoảng 200% hoặc nhỏ hơn, khoảng 150% hoặc nhỏ hơn, khoảng 100% hoặc nhỏ hơn, khoảng 50% hoặc nhỏ hơn, khoảng 45% hoặc nhỏ hơn, khoảng 40% hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng 35% hoặc nhỏ hơn), so với chủng mẹ trước khi đột biến hoặc vi sinh vật chưa được biến đổi. Trong ví dụ khác, chủng tái tổ hợp có khả năng sản xuất tăng có thể có khả năng sản xuất threonin tăng khoảng 1,1 lần hoặc cao hơn, khoảng 1,12 lần hoặc cao hơn, khoảng 1,13 lần hoặc cao hơn, 1,15 lần hoặc cao hơn, 1,16 lần hoặc cao hơn, 1,17 lần hoặc cao hơn, 1,18 lần hoặc cao hơn, 1,19 lần hoặc cao hơn, khoảng 1,2 lần hoặc cao hơn, khoảng 1,25 lần hoặc cao hơn, khoảng 1,26 lần hoặc cao hơn, hoặc khoảng 1,3 lần hoặc cao hơn (giới hạn trên không bị giới hạn cụ thể, và ví dụ, khoảng 10 lần hoặc nhỏ hơn, khoảng 5 lần hoặc nhỏ hơn, khoảng 3 lần hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng 2 lần hoặc nhỏ hơn), so với chủng mẹ trước đột biến hoặc vi sinh vật chưa được biến đổi. Trong ví dụ khác, chủng tái tổ hợp có khả năng sản xuất tăng có thể có khả năng sản xuất threonin tăng khoảng 1,1 lần hoặc cao hơn, khoảng 1,12 lần hoặc cao hơn, so với chủng mẹ trước đột

biến hoặc vi sinh vật chưa được biến đổi. Thuật ngữ, “khoảng” là phạm vi bao gồm toàn bộ $\pm 0,5$, $\pm 0,4$, $\pm 0,3$, $\pm 0,2$, $\pm 0,1$, và tương tự, và nó bao gồm toàn bộ các giá trị số nằm trong khoảng bằng hoặc tương tự với giá trị số sau thuật ngữ khoảng.

Việc gắn xen polynucleotit vào bộ gen tế bào chủ (nhiễm sắc thể) hoặc đưa vào đột biến nhờ đó gen nội sinh của tế bào chủ (ví dụ, gen *glxR*) mã hóa biến thể protein GlxR có thể được thực hiện bằng cách chọn thích hợp một phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và ví dụ, nó có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hệ endonucleaza được dẫn đường bởi ARN; ví dụ, (a) endonucleaza được dẫn đường bởi ARN (ví dụ, protein Cas9, v.v.), gen mã hóa của nó, hoặc vector chứa gen này; và (b) ARN dẫn đường (ví dụ, ARN dẫn đường đơn (sgARN), v.v.), ADN mã hóa của nó, hoặc hỗn hợp chứa vector chứa ADN (ví dụ, hỗn hợp của protein endonucleaza được dẫn đường bởi ARN và ARN dẫn đường, v.v.), hoặc phức hợp (ví dụ, một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm protein dung hợp axit ribonucleic (RNP), vector tái tổ hợp (ví dụ, vector chứa gen mã hóa endonucleaza được dẫn đường bởi ARN và ADN mã hóa ARN dẫn đường cùng với nhau, v.v.), và tương tự), nhưng không bị giới hạn vào đó. Sự biến đổi của một phần hoặc toàn bộ polynucleotit trong vi sinh vật theo một ví dụ (ví dụ, biến đổi để mã hóa biến thể protein được đề cập trên đây) có thể được gây ra bởi (a) tái tổ hợp tương đồng sử dụng vector để gắn xen nhiễm sắc thể vào vi sinh vật hoặc biên tập bộ gen bằng cách sử dụng kéo cắt gen (nucleaza được thao tác di truyền, ví dụ, CRISPR-Cas9) và/hoặc (b) xử lý bằng ánh sáng và/hoặc hóa chất như tia cực tím và chiếu xạ, và tương tự, nhưng không bị giới hạn vào đó. Phương pháp để biến đổi một phần hoặc toàn bộ gen này có thể bao gồm phương pháp bằng công nghệ tái tổ hợp ADN. Ví dụ, một phần hoặc toàn bộ gen này có thể được xóa bỏ bằng cách tiêm trình tự nucleotit hoặc vector chứa trình tự nucleotit có tỷ lệ tương đồng với gen đích để gây ra sự tái tổ hợp tương đồng. Trình tự nucleotit hoặc vector được tiêm có thể chứa gen đánh dấu chọn lọc trội, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Vi sinh vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp) có thể còn chứa đột biến để làm tăng khả năng sản xuất threonin, và vị trí của đột biến này và/hoặc loại gen và/hoặc protein được gây đột biến có thể được bao gồm mà không có giới hạn với điều kiện là nó làm tăng khả năng sản xuất threonin. Tế bào tái tổ hợp có thể được sử dụng mà không có giới hạn với

điều kiện là nó là tế bào có thể biến nạp.

Để phân biệt với vi sinh vật trong đó khả năng sản xuất threonin được tăng cường hoặc khả năng sản xuất threonin được tạo ra bằng cách đưa vào đột biến protein GlxR, vi sinh vật trước khi đưa vào đột biến protein GlxR có thể được đại diện bởi vi sinh vật chủ (hoặc chủng mẹ, vi sinh vật chưa được biến đổi).

Trong một ví dụ, vi sinh vật chứa biến thể protein GlxR, polynucleotit mã hóa biến thể này, và/hoặc vector chứa polynucleotit này có thể,

- (i) còn chứa polynucleotit và/hoặc vector tái tổ hợp, ngoài bộ gen, và/hoặc
- (ii) chứa polynucleotit, làm gen mã hóa protein GlxR nội sinh (ví dụ, gen *glxR*).

(ii) “chứa polynucleotit, làm gen mã hóa protein GlxR nội sinh (ví dụ, gen *glxR*)” có thể có nghĩa là (a) polynucleotit được đưa vào (gắn xen) bằng cách thay thế gen mã hóa protein GlxR nội sinh (ví dụ, gen *glxR*), và/hoặc (b) gen mã hóa protein GlxR nội sinh (ví dụ, gen *glxR*) được gây đột biến để có trình tự axit nucleic của polynucleotit này (nghĩa là, trình tự axit nucleic mã hóa biến thể protein GlxR) bằng công nghệ biên tập gen.

Trong một ví dụ, protein GlxR hoặc gen mã hóa protein này có thể thu được từ vi sinh vật chủ (nội tại) hoặc thu được từ vi sinh vật khác (ngoại lai).

Trong một ví dụ, trong vi sinh vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp), polynucleotit theo một ví dụ có thể được tích hợp vào nhiễm sắc thể, và ví dụ, polynucleotit theo một ví dụ có thể được thay thế cho gen tự nhiên ở vị trí gen *glxR* trong nhiễm sắc thể hoặc được tích hợp ở vị trí gen bổ sung.

Vi sinh vật này có thể là vi sinh vật *Corynebacterium* sp..

Vi sinh vật *Corynebacterium* sp. có thể bao gồm *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium amoniacgenes*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium alkanolyticum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium melassecola*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium herculis*, *Corynebacterium crudilactis*, *Corynebacterium deserti*, *Corynebacterium stationis*, *Corynebacterium singulare*, *Corynebacterium halotolerans*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium amoniacgenes*, *Corynebacterium pollutisoli*, *Corynebacterium imitans*,

Corynebacterium testudinoris, và/hoặc *Corynebacterium flavescens*, và tương tự.

Vi sinh vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp) có thể bao gồm cả vi sinh vật được tạo ra nhân tạo bằng cách biến nạp, hoặc vi sinh vật xuất hiện tự nhiên. Ví dụ, vi sinh vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp) này có thể được biến nạp bằng vector chứa polynucleotit mã hóa biến thể protein GlxR theo một ví dụ.

Vi sinh vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp) có thể là vi sinh vật, trong đó trình tự polynucleotit theo một phương án được tích hợp vào nhiễm sắc thể. Tái tổ hợp tương đồng cho phép, kết hợp với việc sử dụng vector theo một ví dụ, sự trao đổi các đoạn ADN trên nhiễm sắc thể để polynucleotit theo một ví dụ được phân phối vào tế bào nhờ vector này. Để tái tổ hợp hiệu quả giữa các phân tử ADN vòng của vector và ADN đích trên nhiễm sắc thể, trong vùng ADN cần được trao đổi chứa polynucleotit theo một ví dụ, trình tự nucleotit tương đồng với vị trí đích ở cuối cùng được tạo ra; và chúng quyết định vị trí tích hợp của vector và sự trao đổi ADN. Ví dụ, polynucleotit theo một ví dụ có thể được trao đổi với gen *glxR* tự nhiên ở vị trí gen tự nhiên trong nhiễm sắc thể hoặc có thể được tích hợp ở vị trí gen bổ sung.

Khía cạnh khác của sáng chế có thể đề xuất phương pháp sản xuất threonin, bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp) trong môi trường. Threonin này có thể là L-threonin. Vi sinh vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp) là như được mô tả trên đây.

Ở đây, “nuôi cấy” đề cập đến việc nuôi vi sinh vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp) trong điều kiện môi trường được kiểm soát thích hợp. Việc nuôi cấy có thể được thực hiện theo môi trường và các điều kiện nuôi cấy thích hợp đã biết trong lĩnh vực này, và nó nên thỏa mãn các yêu cầu về chủng cụ thể theo cách thích hợp, và có thể được biến đổi thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Phương pháp nuôi cấy có thể bao gồm ví dụ, nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ có bổ sung cơ chất, hoặc kết hợp của chúng, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Ở đây, “môi trường” có nghĩa là chất, trong đó các chất dinh dưỡng cần thiết để nuôi cấy chủng *Corynebacterium glutamicum* theo sáng chế là thành phần chính, và cung cấp chất dinh dưỡng và các yếu tố sinh trưởng, và tương tự, bao gồm nước là thiết yếu đối với

sự sống còn và sinh trưởng. Cụ thể là, môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật theo một ví dụ có thể được sử dụng mà không có giới hạn cụ thể với điều kiện là nó là môi trường được sử dụng cho việc nuôi cấy thông thường của vi sinh vật, nhưng vi sinh vật theo một ví dụ có thể được nuôi cấy trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH, và tương tự trong điều kiện hiếu khí trong môi trường thông thường chứa nguồn cacbon thích hợp, nguồn nitơ, nguồn phospho, hợp chất vô cơ, axit amin và/hoặc vitamin, và tương tự.

Trong một ví dụ, môi trường để nuôi cấy vi sinh vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp) có thể tham khảo tài liệu ["Manual of Methods for General Bacteriology" by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)], nhưng không bị giới hạn vào đó.

Đối với nguồn cacbon, hydrat cacbon như glucoza, saccaroza, lactoza, fructoza, sucroza và maltoza; các rượu đường như mannitol và sorbitol; các axit hữu cơ như pyruvat, lactat và xitrat; các axit amin như axit glutamic, methionin và lysin, và các chất tương tự có thể được bao gồm. Ngoài ra, các chất dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên như sản phẩm thủy phân tinh bột, rỉ đường, mật mía đen, cám gạo, bột sắn, bã mía và nước ngâm ngô có thể được sử dụng, và cụ thể là, hydrat cacbon như glucoza và rỉ đường đã xử lý sơ bộ tiệt trùng (nghĩa là, rỉ đường được chuyển hóa thành đường khử), và tương tự có thể được sử dụng, và lượng thích hợp khác của các nguồn cacbon có thể được sử dụng khác nhau mà không có giới hạn. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng một mình hoặc 2 loại hoặc nhiều hơn có thể được sử dụng kết hợp, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Đối với nguồn nitơ, các nguồn nitơ vô cơ như amoniac, amoni sulfat, amoni xitrat, amoni phosphat, amoni cacbonat, amoni nitrat, và tương tự; và các nguồn nitơ hữu cơ bao gồm các axit amin như axit glutamic, methionin, glutamin, pepton, NZ-amin, cao thịt (meat extract), dịch chiết nấm men, dịch chiết mạch nha, nước ngâm ngô, sản phẩm thủy phân casein, cá hoặc sản phẩm phân giải của nó, bánh đậu tương được khử béo hoặc sản phẩm phân giải của nó có thể được sử dụng. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng một mình hoặc hai loại hoặc nhiều hơn có thể được sử dụng kết hợp, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Đối với nguồn phospho, kali phosphat monobasic, kali phosphat dibasic, hoặc muối

chứa natri tương ứng với chúng, hoặc tương tự có thể được bao gồm. Đối với hợp chất vô cơ, natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sulfat, sắt sulfat, mangan sulfat, canxi cacbonat, và tương tự có thể được sử dụng, và ngoài ra, các axit amin, vitamin và/hoặc các tiền chất thích hợp, và tương tự có thể được bao gồm. Các thành phần hoặc các tiền chất này có thể được bổ sung vào môi trường theo mẻ hoặc theo cách liên tục. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn vào đó.

Ngoài ra, môi trường này có thể chứa muối kim loại như magie sulfat hoặc sắt sulfat cần thiết cho sự sinh trưởng, nhưng không bị giới hạn vào đó. Ngoài ra, các nguyên liệu sinh trưởng thiết yếu như các axit amin và vitamin có thể được bao gồm. Ngoài ra, các tiền chất thích hợp cho môi trường có thể được sử dụng. Môi trường hoặc thành phần đơn lẻ có thể được bổ sung theo từng mẻ hoặc theo cách liên tục bằng phương pháp thích hợp trong dung dịch nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Theo một ví dụ, hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, phosphat, sulfat, và tương tự có thể được bổ sung vào môi trường trong quá trình nuôi cấy theo cách thích hợp, để điều chỉnh độ pH của môi trường. Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy, chất chống tạo bọt như polyglycol este của axit béo có thể được sử dụng để ức chế sự tạo bọt. Ngoài ra, để duy trì trạng thái hiếu khí của môi trường, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào môi trường, hoặc để duy trì trạng thái kỵ khí và vi hiếu khí, khí không được bơm vào hoặc khí nitơ, hydro hoặc cacbon dioxit có thể được bơm vào, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Theo một ví dụ, nhiệt độ nuôi cấy có thể được duy trì là 20°C đến 45°C, 25°C đến 40°C, hoặc 30°C đến 37°C. Thời gian nuôi cấy có thể được tiếp tục đến khi chất thích hợp (ví dụ, L-threonin) thu được với lượng mong muốn, và ví dụ, thời gian này có thể là từ 10 đến 160 giờ.

Phương pháp sản xuất threonin theo một ví dụ có thể còn bao gồm bước tạo ra vi sinh vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp) theo một ví dụ, tạo ra môi trường để nuôi cấy vi sinh vật này, hoặc kết hợp của chúng (theo thứ tự bất kỳ), ví dụ, trước khi nuôi cấy.

Phương pháp sản xuất threonin theo một ví dụ có thể còn bao gồm bước phân lập và/hoặc thu hồi threonin từ môi trường đã nuôi cấy (môi trường nuôi cấy) và/hoặc vi sinh

vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp). Bước phân lập và/hoặc thu hồi có thể còn được bao gồm sau khi nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy có thể đề cập đến môi trường nuôi cấy vi sinh vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp).

Bước phân lập và/hoặc thu hồi threonin có thể thu gom axit amin mong muốn (ví dụ, L-threonin) từ môi trường, dung dịch nuôi cấy hoặc vi sinh vật bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này phụ thuộc vào phương pháp nuôi cấy (ví dụ, phương pháp nuôi cấy theo mẻ, liên tục hoặc theo mẻ có bổ sung cơ chất, v.v.). Ví dụ, phương pháp như ly tâm, lọc, xử lý bằng chất kết tủa protein đã kết tinh (phương pháp tách muối), chiết, phun, sấy, làm bay hơi, kết tủa, kết tinh, phân rã bằng siêu âm, siêu lọc, thẩm tách, xung điện, hòa tan từng phần (ví dụ, kết tủa amoni sulfat), HPLC, và/hoặc sắc ký (ví dụ, trao đổi ion, ái lực, kỵ nước, lỏng và loại cỡ), và phương pháp tương tự có thể được sử dụng, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Phương pháp sản xuất threonin theo một ví dụ có thể còn bao gồm bước tinh chế. Bước tinh chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này. Trong một ví dụ, khi phương pháp sản xuất threonin bao gồm cả bước phân lập và/hoặc thu hồi và tinh chế, việc tinh chế threonin có thể được bao gồm thêm trước hoặc sau bước phân lập và/hoặc thu hồi, hoặc bước phân lập và/hoặc thu hồi và tinh chế có thể được thực hiện ở các thời điểm khác nhau (hoặc liên tục) theo thứ tự bất kỳ, hoặc có thể được thực hiện đồng thời hoặc bằng cách được tích hợp thành một bước, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Khía cạnh khác của sáng chế có thể đề xuất chế phẩm để sản xuất threonin (ví dụ, L-threonin), chứa một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm biến thể protein GlxR, polynucleotit mã hóa biến thể protein GlxR, vector chứa polynucleotit này và vi sinh vật (hoặc chủng, tế bào tái tổ hợp) chứa polynucleotit hoặc vector này. Biến thể, polynucleotit, vector, vi sinh vật, môi trường và threonin, và tương tự là như được mô tả trên đây.

Trong một ví dụ, chế phẩm để sản xuất có thể còn bao gồm tá dược thích hợp bất kỳ thường được sử dụng cho chế phẩm để sản xuất axit amin, và tá dược này có thể là ví dụ, chất bảo quản, chất làm ướt, chất gây rã, chất tạo huyền phù, chất đệm, chất ổn định hoặc chất tạo độ trương, hoặc tương tự, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Khía cạnh khác của sáng chế có thể đề xuất phương pháp làm tăng khả năng sản xuất threonin (ví dụ, L-threonin) của vi sinh vật hoặc phương pháp tạo ra khả năng sản xuất threonin (ví dụ, L-threonin) cho vi sinh vật, bao gồm đưa (ví dụ, biến nạp) biến thể protein GlxR, polynucleotit mã hóa protein này và/hoặc vectơ tái tổ hợp chứa polynucleotit này vào vi sinh vật.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Biến thể protein GlxR theo một ví dụ được đưa vào vi sinh vật, và nhờ đó, nó có thể làm giảm sự sản xuất các sản phẩm phụ và làm tăng đáng kể khả năng sản xuất threonin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ và ví dụ thử nghiệm. Tuy nhiên, các ví dụ và các ví dụ thử nghiệm này được dự định để minh họa sáng chế bằng cách lấy ví dụ, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn vào các ví dụ và các ví dụ thử nghiệm này.

Ví dụ 1: Xây dựng thư viện vectơ để đưa đột biến vào ORF gen *glxR*

Để phát hiện biến thể, trong đó sự biểu hiện của protein GlxR của *Corynebacterium glutamicum* (SEQ ID NO: 1) hoặc hoạt tính của nó được thay đổi, thư viện vectơ được xây dựng bằng phương pháp sau đây.

Đầu tiên, các đoạn môi của SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17, trong đó vị trí nhận biết SmaI enzym giới hạn được chèn vào đoạn 5' và đoạn 3' ở vị trí cách khoảng 1000bp, tiến và lùi, tương ứng, từ vị trí 133 đến 135, 196 đến 198, 496 đến 498, và 502 đến 504 trong trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 2) của gen *glxR* bằng cách sử dụng ADN bộ gen được chiết từ chủng WT (ATCC13032) làm khuôn.

Cụ thể là, các đoạn ADN nằm ở các đầu cùng 5' và 3' của gen *glxR* (mỗi đoạn 1000bp) được tạo ra ở dạng được nối với vectơ pDZ (Công bố patent Hàn Quốc số 10-2008-0025355). Đoạn gen đầu cùng 5' sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 16 và 18 và đoạn gen đầu cùng 3' sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 17 và 19 được xây dựng bằng PCR sử dụng nhiễm sắc thể của chủng WT làm khuôn. Các điều kiện PCR được lặp lại biến tính ở 94°C trong 5 phút, biến tính ở 94°C trong 30 giây, bắt cặp ở 55°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 1 phút, 24 lần, và sau đó thực hiện polyme hóa ở 72°C trong

10 phút. Sau khi tinh chế đoạn ADN đã khuếch đại sử dụng kit tinh chế PCR của Quiagen, nó được sử dụng làm đoạn ADN gắn xen để xây dựng vector.

Mặt khác, vector pDZ đã được xử lý với enzym giới hạn SmaI và sau đó được xử lý nhiệt ở 65°C trong 60 phút và đoạn ADN gắn xen được khuếch đại qua PCR được nối bằng cách sử dụng kit Infusion Cloning, và sau đó được biến nạp vào E. coli DH5 α . Chúng này được đưa vào đĩa trên môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/l). Sau khi chọn các khuẩn lạc đã được biến nạp bằng vector mà gen mong muốn đã được gắn xen vào đó nhờ PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 20 và 21, plasmit thu được bằng cách sử dụng phương pháp chiết plasmit đã được biết một cách phổ biến. Plasmit này được ký hiệu là pDZ-glxR (E45A).

Bằng phương pháp giống như vậy, pDZ-glxR (D66A) sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 16 và 28, 17 và 29, pDZ-glxR (T166D) sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 16 và 34, 17 và 35, và pDZ-glxR (E168A) sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 16 và 40, 17 và 41 được tạo ra.

Các trình tự axit nucleic của các đoạn mồi được sử dụng trong ví dụ này được mô tả trong Bảng 3 dưới đây.

【Bảng 3】

Tên	Trình tự (5'→3')	SEQ ID NO
glxR L1	GAATTCGAGCTCGGTACCCTGAGACCCCA CGCGAG	SEQ ID NO: 16
glxR R2	GACTCTAGAGGATCCCCATCGACGGTGTC ACCCAC	SEQ ID NO: 17
glxR(E45A) L2	GTAAAGGCGGTACCTGGC _g CGCCCTCGT CGAAGATGG	SEQ ID NO: 18
glxR(E45A) R1	CCATCTTCGACGAGGGCG _c GCCAGGTGAC CGCCTTTAC	SEQ ID NO: 19
pDZ_F	TATTACGCCAGCTGGCGAAAG	SEQ ID NO: 20
pDZ_R	TTCCGGCTCGTATGTTGTGTG	SEQ ID NO: 21
glxR(E45S) L2	GTAAAGGCGGTACCTGG _{Gaga} GCCCTCGTC GAAGATGG	SEQ ID NO: 22
glxR(E45S) R1	CCATCTTCGACGAGGGC _{tct} CCAGGTGACC GCCTTTAC	SEQ ID NO: 23
glxR(E45F) L2	GTAAAGGCGGTACCTGG _{Gaaa} GCCCTCGTC	SEQ ID NO: 24

	GAAGATGG	
glxR(E45F) R1	CCATCTTCGACGAGGGCtttCCAGGTGACCG CCTTTAC	SEQ ID NO: 25
glxR(E45K) L2	GTAAAGGCGGTTCACCTGGCTtGCCCTCGTC GAAGATGG	SEQ ID NO: 26
glxR(E45K) R1	CCATCTTCGACGAGGGCaAGCCAGGTGAC CGCCTTTAC	SEQ ID NO: 27
glxR(D66A) L2	GGTTTTTCGCGGCCtgCCGGTGCGTGGCGCG CAAG	SEQ ID NO: 28
glxR(D66A) R1	GCGCCACGCACCGGcaGGCCGCGAAAACC TGCTG	SEQ ID NO: 29
glxR(D66F) L2	CAGCAGGTTTTTCGCGGCCaaaCGGTGCGTG GCGC	SEQ ID NO: 30
glxR(D66F) R1	GCGCCACGCACCGtttGGCCGCGAAAACCT GCTG	SEQ ID NO: 31
glxR(D66K) L2	GGTTTTTCGCGGCCtttCCGGTGCGTGGCGCG CAAG	SEQ ID NO: 32
glxR(D66K) R1	GCGCCACGCACCGaaaGGCCGCGAAAACC TGCTG	SEQ ID NO: 33
glxR(T166D) L2	GCCAGCTTCTTGtGccGAAGCGGTTAGC CAGC	SEQ ID NO: 34
glxR(T166D) R1	AACCGCTTCGGCgaCCAAGAAGCTGGCGC GCTG	SEQ ID NO: 35
glxR(T166F) L2	GCCAGCTTCTTGgaaGCCGAAGCGGTTAGC CAGC	SEQ ID NO: 36
glxR(T166F) R1	AACCGCTTCGGCttCCAAGAAGCTGGCGCG CTG	SEQ ID NO: 37
glxR(T166K) L2	GCCAGCTTCTTGtttGCCGAAGCGGTTAGCC AGC	SEQ ID NO: 38
glxR(T166K) R1	AACCGCTTCGGCaaaCAAGAAGCTGGCGCG CTG	SEQ ID NO: 39
glxR(E168A) L2	AGCGCGCCAGCagCTTGGGCGCCGAAGCG GTTAG	SEQ ID NO: 40
glxR(E168A) R1	CTTCGGCGCCCAAGctGCTGGCGCGCTGCG CGTG	SEQ ID NO: 41
glxR(E168F) L2	AGCGCGCCAGCaaaTTGGGCGCCGAAGCG GTTAG	SEQ ID NO: 42
glxR(E168F) R1	CTTCGGCGCCCAAttGCTGGCGCGCTGCGC GTG	SEQ ID NO: 43
glxR(E168K) L2	AGCGCGCCAGCcttTTGGGCGCCGAAGCGG TTAG	SEQ ID NO: 44

glxR(E168K) R1	CTTCGGCGCCCAAaagGCTGGCGCGCTGCG CGTG	SEQ ID NO: 45
----------------	--	---------------

Tổng số 4 loại vector pDZ-glXR (E45A), pDZ-glXR (D66A), pDZ-glXR (T166D) và pDZ-glXR (E168A) chứa polypeptit biến thể, trong đó các axit amin thứ 45, 66, 166 và 168 của SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng các axit amin khác, được tạo ra như trên, và các vector này là các vector có thể thay thế axit amin thứ 45 glutamat (axit glutamic, E) của protein GlxR thành alanin (A), axit amin thứ 66 aspartat (axit aspartic, D) thành alanin (A), axit amin 166 threonin (T) thành aspartat (D), và axit amin thứ 168 glutamat (E) thành alanin (A), tương ứng.

Ví dụ 2: Đánh giá khả năng sản xuất L-threonin của chủng biến thể *glxR* dựa vào vi sinh vật *Corynebacterium* sp. kiểu hoang

Trong các ví dụ này, dựa vào *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, khả năng sản xuất L-threonin của chủng biến thể *glxR*, trong đó axit amin thứ 45 glutamat, axit amin thứ 66 aspartat, axit amin thứ 166 threonin, và axit amin thứ 168 glutamat được thay thế lần lượt bằng alanin, alanin, aspartat và glutamat, trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 1) của protein GlxR kiểu hoang được sở hữu nội sinh bởi chủng ATCC13032, được đánh giá.

Các vector pDZ-glXR (E45A), pDZ-glXR (D66A), pDZ-glXR (T166D) và pDZ-glXR (E168A) được tạo ra trong ví dụ 1 được biến nạp bằng phương pháp xung điện. Các chủng trong đó đột biến thể nucleotit khác loài được đưa vào gen *glxR* theo cách này được ký hiệu là ATCC13032 Δ glxR::*glxR* (E45A), ATCC13032 Δ glxR::*glxR* (D66A), ATCC13032 Δ glxR::*glxR* (T166D), ATCC13032 Δ glxR::*glxR* (E168A), tương ứng. 4 chủng được tạo ra bằng cách sử dụng chủng ATCC13032 làm nhóm đối chứng [ATCC13032 Δ glxR::*glxR* (E45A), ATCC13032 Δ glxR::*glxR* (D66A), ATCC13032 Δ glxR::*glxR* (T166D), ATCC13032 Δ glxR::*glxR* (E168A)] được nuôi cấy trong phương pháp sau đây để đo tốc độ tiêu thụ đường, và sản lượng sản xuất threonin và lysin.

Đầu tiên, mỗi chủng được cấy vào bình nón được ngăn ở góc 250ml chứa môi trường nhân giống 25ml, và được nuôi cấy kèm theo lắc ở 200rpm ở 30°C trong 20 giờ. Sau đó, 1ml dung dịch nuôi cấy nhân giống được cấy vào bình nón được ngăn ở góc 250ml chứa

môi trường sản xuất 24ml, và được nuôi cấy kèm theo lắc ở 200rpm ở 32°C trong 24 giờ. Thành phần của môi trường nhân giống và môi trường sản xuất được mô tả trong Bảng 4 dưới đây, tương ứng. Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, nồng độ của L-lysine và L-threonine được đo bằng cách sử dụng HPLC (Waters 2478), và đương lượng còn lại trong môi trường (đương lượng dư) được phân tích bằng cách sử dụng máy phân tích Hóa sinh (YSI 2900) để đo tốc độ tiêu thụ đường, và kết quả được thể hiện trong Bảng 5.

【Bảng 4】

Loại môi trường	Thành phần
Môi trường nhân giống (độ pH=7,0)	Glucose 20 g, pepton 10 g, dịch chiết nấm men 5 g, urê 1,5 g, KH_2PO_4 4 g, K_2HPO_4 8g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, biotin 100 μg , thiamin HCl 1000 μg , canxi-axit pantothenic 2000 μg , nicotinamit 2000 μg (dựa trên nước cất 1 lit)
Môi trường sản xuất L-THREONINE (độ pH=7,2)	Glucose 30g, KH_2PO_4 2g, urê 3g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40g, pepton 2,5g, CSL(Sigma) 5g(10 ml), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g, Leuxin 400mg, CaCO_3 20g (dựa trên nước cất 1 lit)

【Bảng 5】

Chủng	Nồng độ L-Thr (g/L)	Tốc độ tiêu thụ đường (g/hr)	Nồng độ L-LYS (g/L)
ATCC13032	0	3,65	1,2
ATCC13032 $\Delta\text{glxR}::\text{glxR}^*$ (E45A)	0,22	4,22	0
ATCC13032 $\Delta\text{glxR}::\text{glxR}^*$ (D66A)	0,16	3,98	0,2
ATCC13032 $\Delta\text{glxR}::\text{glxR}^*$ (T166D)	0,1	-	1
ATCC13032 $\Delta\text{glxR}::\text{glxR}^*$ (E168A)	0,06	-	0,7

Như được thể hiện trong Bảng 5, khi các axit amin thứ 45, 66, 166 và 168 của protein GlxR được thế, tương ứng, so với chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, nồng độ của L-threonine đã sản xuất được tăng cường và nồng độ của sản phẩm phụ L-lysine được giảm xuống.

Ngoài ra, như được thể hiện trong Bảng 5, có thể xác nhận được là tốc độ tiêu thụ đường cũng được cải thiện, khi các axit amin thứ 45 hoặc 66 của protein Glx được thay thế bằng alanine. Theo đó, vì chủng trong đó biến thể trong đó axit amin thứ 45 hoặc 68 được thay thế bằng alanine so với chủng mẹ (E45A hoặc D66A) có tốc độ tiêu thụ đường nhanh

hơn, thời gian cần thiết để sản xuất cùng một lượng L-threonin được rút ngắn, và khả năng sản xuất L-threonin được cải thiện.

Ví dụ 3: Xây dựng thư viện vector, trong đó các axit amin thứ 45, 66, 166 và 168 của gen *glxR* được thay thế bằng các axit amin có các đặc điểm khác

Đã xác nhận được là tốc độ tiêu thụ đường và khả năng sản xuất L-threonin được cải thiện, khi các axit amin 45, 66, 166 và 168 của protein GlxR được thay thế bằng các axit amin khác trong ví dụ 2. Để xác nhận thêm về hiệu quả khi các axit amin thứ 45, 66, 166 và 168 của protein GlxR (SEQ ID NO: 1) được thay thế bằng các axit amin có các đặc điểm khác, việc thế các axit amin kiểu hoang bằng các axit amin chứa đột biến được thử. Để đưa vào tổng số 13 loại đột biến thể nucleotit khác loài chứa các đột biến E45A, D66A, T166D và E168A được xác nhận trong ví dụ 2, mỗi vector tái tổ hợp được tạo ra bằng phương pháp giống như ví dụ 1.

pDZ-*glxR* (E45S) sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 16 và 22, 17 và 23, pDZ-*glxR* (E45F) sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 16 và 24, 17 và 25, pDZ-*glxR* (E45K) sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 16 và 26, 17 và 27, pDZ-*glxR* (D66F) sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 16 và 30, 17 và 31, pDZ-*glxR* (D66K) sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 16 và 32, 17 và 33, pDZ-*glxR* (T166F) sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 16 và 36, 17 và 37, pDZ-*glxR* (T166K) sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 16 và 38, 17 và 39, pDZ-*glxR* (E168F) sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 16 và 42, 17 và 43, và pDZ-*glxR* (E168K) sử dụng các đoạn môi của SEQ ID NO: 16 và 44, 17 và 45 được tạo ra, tương ứng. Các trình tự axit nucleic của các đoạn môi được sử dụng trong ví dụ này được mô tả trong Bảng 3 trên đây.

Ví dụ 4: Phân tích khả năng sản xuất L-threonin cho các biến thể axit amin thứ 45, 66, 166 và 168 của gen *glxR* dựa vào vi sinh vật *Corynebacterium* sp. kiểu hoang

Thư viện vector được xây dựng trong ví dụ 3 được biến nạp vào chủng ATCC13032 bằng phương pháp xung điện. Các chủng, trong đó đột biến thể nucleotit khác loài được đưa vào gen *glxR* theo cách này được ký hiệu là ATCC13032 Δ *glxR*::*glxR** (E45S),

ATCC13032 Δ glxR::glxR* (E45F), ATCC13032 Δ glxR::glxR* (E45K), ATCC13032 Δ glxR::glxR* (D66F), ATCC13032 Δ glxR::glxR* (D66K), ATCC13032 Δ glxR::glxR* (T166F), ATCC13032 Δ glxR::glxR* (T166K), ATCC13032 Δ glxR::glxR* (E168F), và ATCC13032 Δ glxR::glxR* (E168K).

Chủng ATCC13032 được sử dụng làm nhóm đối chứng và được nuôi cấy bằng phương pháp giống như ví dụ 2 để đo khả năng sản xuất L-threonin và L-lysine và tốc độ tiêu thụ đường, và kết quả được mô tả trong Bảng 6.

【Bảng 6】

Chủng	Nồng độ L-Thr (g/L)	Tốc độ tiêu thụ đường (g/hr)	Nồng độ L-LYS (g/L)
ATCC13032	0	3,47	0,4
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (E45A)	0,2	4,02	0,4
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (E45S)	0,1	3,50	0,3
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (E45F)	0,1	-	0,4
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (E45K)	0,07	3,66	0,3
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (D66A)	0,22	3,76	0,2
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (D66F)	0,11	-	0,1
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (D66K)	0,06	-	0,4
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (T166D)	0,18	3,86	0,4
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (T166F)	0,07	-	0,3
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (T166K)	0,04	3,52	0,3
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (E168A)	0,15	3,81	0,3
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (E168F)	0,1	-	0,2
ATCC13032 Δ glxR::glxR* (E168K)	0,05	-	0,1

Kết quả thử nghiệm là, khi axit amin thứ 45 glutamat trong protein GlxR (SEQ ID NO: 1) được thay thế bằng alanin, serin, phenylalanin hoặc lysin, khả năng sản xuất L-threonin (Thr) được tạo ra cho chủng này, và tốc độ tiêu thụ đường được cải thiện, và khả năng sản xuất các sản phẩm phụ như lysin được giảm đi. Ngoài ra, khi axit amin thứ 66 aspartat trong protein GlxR (SEQ ID NO: 1) được thay thế bằng alanin, phenylalanin hoặc lysin, khả năng sản xuất L-threonin được tạo ra cho chủng này, và tốc độ tiêu thụ đường được cải thiện, và khả năng sản xuất các sản phẩm phụ như lysin được giảm đi. Ngoài ra, khi axit amin thứ 166 threonin trong protein GlxR (SEQ ID NO: 1) được thay thế bằng

aspartat, phenylalanin hoặc lysin, khả năng sản xuất L-threonin được tạo ra cho chủng này, và tốc độ tiêu thụ đường được cải thiện, và khả năng sản xuất các sản phẩm phụ như lysin được giảm đi. Ngoài ra, khi axit amin thứ 168 glutamat trong protein GlxR (SEQ ID NO: 1) được thay thế bằng alanin, phenylalanin hoặc lysin, khả năng sản xuất L-threonin được tạo ra cho chủng này, và tốc độ tiêu thụ đường được cải thiện, và khả năng sản xuất các sản phẩm phụ như lysin được giảm đi.

Ví dụ 5: Phân tích khả năng sản xuất L-threonin và tốc độ sinh trưởng cho chủng biến thể glxR đưa vào chủng sản xuất threonin

Trong ví dụ này, để kiểm tra rõ ràng nồng độ threonin và tốc độ sinh trưởng theo việc đưa vào đột biến *glxR*, khả năng sản xuất L-threonin được đánh giá bằng cách đưa 4 loại vector được tạo ra trong ví dụ 1 vào chủng sản xuất L-threonin. Để tạo ra chủng sản xuất L-threonin, bằng cách thay đổi trình tự nucleotit từ vị trí 1128 đến 1131 của gen mã hóa protein LysC kiểu hoang từ TTG thông thường đến AAG để giải quyết vấn đề ức chế liên hệ ngược của LysC (aspartat kinaza) đóng vai trò là enzym quan trọng hàng đầu trong con đường tổng hợp threonin từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 kiểu hoang, chủng trong đó đột biến biến thể LysC (L377K), trong đó axit amin thứ 377 Leuxin từ đầu cùng N của protein LysC kiểu hoang được thay thế bằng lysin, được đưa vào được tạo ra. Trình tự axit amin của LysC (L377K) được mô tả trong Bảng 7 dưới đây là SEQ ID NO: 46.

Vector tái tổ hợp để đưa đột biến vào được tạo ra bằng phương pháp sau đây. Để tạo ra các chủng trong đó đột biến LysC (L377K) được đưa vào, các đoạn môi của SEQ ID NO: 47 và 48 trong đó vị trí nhận biết enzym giới hạn SmaI được chèn vào đoạn 5' và đoạn 3' ở vị trí cách khoảng 500bp, tiến và lùi, tương ứng, từ vị trí 1128 đến 1131 của gen *lysC* bằng cách sử dụng ADN bộ gen được chiết từ chủng ATCC13032 được tổng hợp. Để đưa vào đột biến thể nucleotit khác loài LysC (L377K), các đoạn môi của SEQ ID NO: 49 và 50 để thay thế trình tự nucleotit từ vị trí 1128 đến 1131 của gen *lysC* được tổng hợp.

Cụ thể là, plasmid pDZ-lysC (L377K) được tạo ra ở dạng, trong đó các đoạn ADN (mỗi đoạn 515, 538 bp) nằm ở đầu cùng 5' và 3' của gen *lysC* được nối với vector pDZ.

Đoạn gen đầu cùng 5' được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 47 và 49 sử dụng nhiễm sắc thể của chủng ATCC13032 làm khuôn qua PCR. Các điều kiện PCR được lặp lại biến tính ở 94°C trong 5 phút, biến tính ở 94°C trong 1 phút, bắt cặp ở 56°C trong 1 phút, và polyme hóa ở 72°C trong 40 giây, 30 lần, và sau đó thực hiện polyme hóa ở 72°C trong 10 phút. Bằng phương pháp giống như vậy, đoạn gen nằm ở đầu cùng 3' của gen *lysC* được tạo ra bằng cách sử dụng các SEQ ID NO: 48 và 50 qua PCR. Sau khi tinh chế đoạn ADN đã khuếch đại sử dụng kit tinh chế PCR của Quiagen, nó được sử dụng làm đoạn ADN gắn xen để xây dựng vector.

Mặt khác, vector pDZ đã được xử lý với enzym giới hạn SmaI và sau đó được xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút và đoạn ADN gắn xen được khuếch đại qua PCR được nối bằng cách sử dụng kit Infusion Cloning, và sau đó được biến nạp vào *E. coli* DH5α. Chủng này được đưa vào đĩa trên môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/l). Sau khi chọn các khuẩn lạc đã được biến nạp bằng vector mà gen mong muốn đã được gắn xen vào đó nhờ PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 47 và 48, plasmit thu được bằng cách sử dụng phương pháp chiết plasmit đã được biết một cách phổ biến. Plasmit này được ký hiệu là pDZ-*lysC* (L377K). Trình tự axit nucleic của các đoạn mồi được sử dụng trong ví dụ này được mô tả trong Bảng 7 dưới đây.

【Bảng 7】

Tên	Trình tự	SEQ ID NO
LysC_L377K	MALVVQKYGGSSLESAERIRNVAERIVATKKAG NDVVVCSAMGDTTDELLELAAAVNPVPPARE MDMLLTAGERISNALVAMAIESLGAEASFTGS QAGVLTTERHGNARIVDVTTPGRVREALDEGKIC IVAGFQGVNKETRDVTTLGRGGSDDTAVALAA ALNADVCEIYSDVDGVYTADPRIVPNAQKLEK LSFEEMLELAAVGSKILVLRSEYARAFNVPLR VRSSYSNDPGTLIAGSMEDIPVEEAVLTGVATDK SEAKVTVLGISDKPGEAAKVFRALADAEINIDM VLQNVSSVEDGTTDITFTCPRS DGRRAMEILKK LQVQGNWTNVLYDDQVGKVS LVGAGMKSH GVTAEFMEALRDVNVNIEKISTSEIRISVLIRE DLDAARALHEQFQLGGEDEAVVYAGTGR	SEQ ID NO: 46
LysC L1	TCGAGCTCGGTACCCGCTGCGCAGTGTGAAT	SEQ ID NO: 47

	AC	
LysC R2	CTCTAGAGGATCCCCGTTTCACCTCAGAGACG ATT	SEQ ID NO: 48
lysC(L377K) L2	TGGAAATCTTTTCGATGTTTCACGTTGACAT	SEQ ID NO: 49
lysC(L377K) R1	ATGTCAACGTGAACATCGAAAAGATTTCC	SEQ ID NO: 50

pDZ-lysC (L377K) được tạo ra trên đây được biến nạp vào chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 bằng phương pháp xung điện. Chủng trong đó đột biến thể nucleotit khác loài được đưa vào gen *lysC* theo cách này được ký hiệu là CJP1. CJP1 được ký hiệu là CA01-2307, và nó được lưu trữ ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) là cơ quan lưu trữ quốc tế theo Hiệp ước Budapest, và nó được cấp số truy nhập KCCM12000P.

Đối với chủng KCCM12000P được tạo ra trên đây, đột biến được đưa vào gen mã hóa homoserin dehydrogenaza (Hom) sản xuất homoserin mà là chất trung gian phổ biến của con đường sinh tổng hợp L-threonin và L-isoLeuxin. Cụ thể là, bằng cách thay thế trình tự nucleotit từ vị trí 1218 đến 1221 của gen mã hóa homoserin dehydrogenaza kiểu hoang từ TTG thành AAG, chủng trong đó đột biến Hom (R407H) biến thể ở dạng trong đó axit amin thứ 407 từ đầu cùng N của homoserin dehydrogenaza kiểu hoang, arginin được thay thế bằng histidin được tạo ra. Trình tự axit amin của Hom (R407H) được mô tả trong Bảng 8 dưới đây là SEQ ID NO: 51. Vector tái tổ hợp để đưa đột biến vào được tạo ra bằng phương pháp sau đây.

Đầu tiên, các đoạn mồi của SEQ ID NO: 52 và 53 trong đó vị trí nhận biết enzym giới hạn Sall được chèn vào đoạn 5' và đoạn 3' ở vị trí cách khoảng 600bp, tiến và lùi, tương ứng, từ vị trí 1219 đến 1221 của gen *hom* bằng cách sử dụng ADN bộ gen được chiết từ chủng ATCC13032 làm khuôn được tổng hợp. Để đưa vào đột biến thể nucleotit khác loài Hom (R407H), các đoạn mồi của SEQ ID NO: 54 và 55 để thay thế trình tự nucleotit từ vị trí 1219 đến 1221 của gen *hom* được tổng hợp.

Cụ thể là, plasmit pDZ-hom (R407H) được tạo ra ở dạng trong đó các đoạn ADN (mỗi đoạn 600bp) nằm ở đầu cùng 5' và 3' của gen *hom*. Đoạn gen đầu cùng 5' được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 52 và 54 bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của chủng WT nhờ PCR. Các điều kiện PCR được lặp lại biến tính ở 94°C trong 2

phút, biến tính ở 94°C trong 1 phút, bắt cặp ở 56°C trong 1 phút, và polyme hóa ở 72°C trong 40 giây, 30 lần, và sau đó thực hiện polyme hóa ở 72°C trong 10 phút. Bằng phương pháp giống như vậy, đoạn gen nằm ở đầu cùng 3' của gen *hom* được tạo ra bằng cách sử dụng các SEQ ID NO: 53 và 55 qua PCR. Sau khi tinh chế đoạn ADN đã khuếch đại sử dụng kit tinh chế PCR của Quiagen, nó được sử dụng làm đoạn ADN gắn xen để xây dựng vector.

Mặt khác, vector pDZ đã được xử lý với enzym giới hạn SalI và sau đó được xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút và đoạn ADN gắn xen được khuếch đại qua PCR được nối bằng cách sử dụng kit Infusion Cloning, và sau đó được biến nạp vào *E. coli* DH5 α . Chúng này được đưa vào đĩa trên môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/l). Sau khi chọn các khuẩn lạc đã được biến nạp bằng vector mà gen mong muốn đã được gắn xen vào đó nhờ PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 52 và 53, plasmit thu được bằng cách sử dụng phương pháp chiết plasmit đã được biết một cách phổ biến. Plasmit này được ký hiệu là pDZ-*hom* (R407H). Trình tự axit nucleic của các đoạn mồi được sử dụng trong ví dụ này được mô tả trong Bảng 8 dưới đây.

【Bảng 8】

Tên	Trình tự	SEQ ID NO
Hom_R407H	MTSASAPSFNPGKGPGSAVGIALLGFGTVGTE VMRLMTEYGDDEL AHRIGGP LEVRGIAVSDISK PREGVAPELLTEDAFALIEREDVDIVVEVIGGIE YPREVVLAALKAGKSVVTANKALVAAHSAEL ADAAEAANVDLYFEAAVAGAIPVVGPLRRSLA GDQIQSVMGIVNGTTNFILDAMDSTGADYADS LAEATRLGYAEADPTADVEGHDAASKAAILAS IAFHTRVTADDVYCEGISNISAADIEAAQQAGH TIKLLAICEKFTNKEGKSAISARVHPTLLPVSH LASVNKSFNAIFVEAEAAGR LMFYGNAGGA PTASAVLGDVVG AARNKVHGG RAPGESTYAN LPIADFGETTTRYHLDMDVEDRVGVLAELASL FSEQGISLRTIRQEERDDDAHLIVVTHSALESD LSRTVELLKAKPVVKAINSVIRLERD	SEQ ID NO: 51
hom L1	ATCCTCTAGAGTCGACCCAACTGCAGACGTC GAA	SEQ ID NO: 52
hom R2	ATGCCTGCAGGTCGACATAGACAGATTTGTC	SEQ ID NO: 53

	CACG	
hom(R407H) L2	GTGACCACGATCAGATGTGCATCATCATCGC GCTC	SEQ ID NO: 54
hom(R407H) R1	GCGATGATGATGCACATCTGATCGTGGTCAC CCAC	SEQ ID NO: 55

pDZ-hom (R407H) được tạo ra trên đây được biến nạp vào KCCM12000P bằng phương pháp xung điện. Chủng trong đó đột biến thể nucleotit khác loài được đưa vào gen *hom* theo cách này được ký hiệu là KCCM12000P-R398Q, và nó được lưu trữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) là cơ quan lưu trữ quốc tế theo Hiệp ước Budapest, và nó được cấp số truy nhập KCCM12120P (Patent Hàn Quốc số 10-1947959).

Các vector pDZ-glxR (E45A), pDZ-glxR (D66A), pDZ-glxR (T166D) và pDZ-glxR (E168A) được tạo ra trong ví dụ 1 được biến nạp vào chủng KCCM12120P bằng phương pháp xung điện, tương ứng. Chủng, trong đó đột biến thể nucleotit được đưa vào gen *glxR* được tạo ra, và KCCM12120P Δ glxR::*glxR** (E45A) được ký hiệu là CA09-2373, và KCCM12120P Δ glxR::*glxR** (D66A) được ký hiệu là CA09-2374, và KCCM12120P Δ glxR::*glxR** (T166D) được ký hiệu là CA09-2325, và KCCM12120P Δ glxR::*glxR** (E168A) được ký hiệu là CA09-2324, tương ứng.

Tổng số 4 loại biến thể *glxR* được nuôi cấy bằng phương pháp sau đây sử dụng chủng sản xuất L-threonin, chủng KCCM12120P, để đo sản lượng sản xuất L-threonin, tốc độ tiêu thụ đường và nồng độ sản xuất các sản phẩm phụ như L-lysin.

Mỗi chủng được cấy vào bình nón được ngăn ở góc 250ml chứa môi trường nhân giống 25ml, và được nuôi cấy kèm theo lắc ở 200rpm ở 30°C trong 20 giờ. Sau đó, 1ml dung dịch nuôi cấy nhân giống được cấy vào bình nón được ngăn ở góc 250ml chứa môi trường sản xuất 24ml, và được nuôi cấy kèm theo lắc ở 200rpm ở 32°C trong 48 giờ. Thành phần của môi trường nhân giống và môi trường sản xuất được mô tả trong Bảng 9 dưới đây, tương ứng. Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, nồng độ của L-lysin và L-threonin và tốc độ tiêu thụ đường được đo bằng cách sử dụng HPLC và máy phân tích Hóa sinh (YSI 2900), và kết quả được thể hiện trong Bảng 10.

【Bảng 9】

Loại môi trường	Thành phần
Môi trường nhân giống (độ pH=7,0)	Glucosa 20 g, pepton 10 g, dịch chiết nấm men 5 g, urê 1,5 g, KH ₂ PO ₄ 4 g, K ₂ HPO ₄ 8 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,5 g, biotin 100 µg, thiamin HCl 1000 µg, canxi-axit pantothenic 2000 µg, nicotinamit 2000 µg (dựa trên nước cất 1 lit)
Môi trường sản xuất L-THREONINE (độ pH=7,0)	Glucosa 100g, KH ₂ PO ₄ 2g, urê 3g, (NH ₄) ₂ SO ₄ 25g, pepton 2,5g, CSL(Sigma) 5g(10 ml), MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,5g, biotin 100 µg, thiamin HCl 1000 µg, canxi-axit pantothenic 2000 µg, nicotinamit 3000 µg, CaCO ₃ 30g (dựa trên nước cất 1 lit)

【Bảng 10】

Chủng	Nồng độ L-Thr (g/L)	Tốc độ tiêu thụ đường (g/giờ)	Nồng độ L-LYS (g/L)
KCCM12120P	7,62	4,04	0,36
CA09-2373	9,23	4,66	0,28
CA09-2374	9,67	4,21	0,31
CA09-2325	8,87	4,13	0,35
CA09-2324	8,90	4,22	-

Như được thể hiện trong Bảng 10, kết quả của việc đo nồng độ sản xuất L-threonin và các sản phẩm phụ (L-lysin) bằng cách nuôi cấy 4 loại chủng biến thể *glxR* (CA09-2373, CA09-2374, CA09-2325, CA09-2324) sử dụng chủng sản xuất L-threonin, chủng KCCM12120P làm nhóm đối chứng, có thể xác nhận được là cả 4 loại chủng, trong đó đột biến thể được đưa vào gen *glxR*, làm giảm khả năng sản xuất các sản phẩm phụ khác bao gồm L-lysin hoặc không có thay đổi lớn so với nhóm đối chứng, nhưng khả năng sản xuất L-threonin được tăng đáng kể. Ngoài ra, có thể xác nhận được là trong tất cả các chủng CA09-2373, CA09-2374, CA09-2325, và CA09-2324, so với nhóm đối chứng, tốc độ tiêu thụ đường được cải thiện, và thời gian cần thiết để sản xuất cùng một lượng L-threonin được rút ngắn và khả năng sản xuất L-threonin được cải thiện.

Các chủng CA09-2373, CA09-2374, CA09-2325 và CA09-2324 đc lưu trữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) là cơ quan lưu trữ quốc tế theo Hiệp ước Budapest, và chúng được cấp các số truy nhập KCCM12901P, KCCM12902P, KCCM12900P, và KCCM12899P, tương ứng.

【SỐ TRUY NHẬP】

Tên cơ quan lưu trữ: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (nước ngoài)

Số truy nhập: KCCM12899P

Ngày truy nhập: 20201217

Tên cơ quan lưu trữ: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (nước ngoài)

Số truy nhập: KCCM12900P

Ngày truy nhập: 20201217

Tên cơ quan lưu trữ: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (nước ngoài)

Số truy nhập: KCCM12901P

Ngày truy nhập: 20201217

Tên cơ quan lưu trữ: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (nước ngoài)

Số truy nhập: KCCM12902P

Ngày truy nhập: 20201217



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To, CJ CheilJedang Corporation
CJ CHEILJEDANG CENTER,
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, SEOUL 100-400
REPUBLIC OF KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA09-2324	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12899P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on December. 17. 2020 (date of the original deposit). ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjeonac-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 03641 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: December. 17. 2020

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.



Form BP/4 (sole page)

한국미생물보존센터 (KCCM) 03641 서울시 서대문구 홍제4로2가길 45 유림빌딩 Tel: 02-391-0550, 396-0950 Fax: 02-397-3859
KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS 45 Hongjeonac-2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, 03641, Korea Tel: 82-2-391-0550, 396-0950 Fax: 82-2-397-3859



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To: CJ CheilJedang Corporation
CJ CHEILJEDANG CENTER,
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, SEOUL 100-400
REPUBLIC OF KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA09-2325	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12900P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on December. 17. 2020 (date of the original deposit). ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjeonae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 03641 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: December. 17. 2020

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Form BP/4 (sole page)

한국미생물보존센터 KCCM

03641 서울특별시 서대문구 홍제내2가길 45 유림빌딩 Tel: 02-391-0950, 398-0950 Fax: 02-392-2859

KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

Yochim Bldg., 45, Hongjeonae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, 03641, Korea Tel: 82-2-391-0950, 398-0950 Fax: 82-2-392-2859



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To: CJ CheilJedang Corporation
CJ CHEILJEDANG CENTER,
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, SEOUL 100-400
REPUBLIC OF KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA09-2373	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12901P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on December. 17. 2020 (date of the original deposit). ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjenae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 03641 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: December. 17. 2020.

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Form BP/4 (sole page)

한국미생물보존센터 KCCM 2020-0950
03641 서울시 서대문구 홍제나2가길 45 유림빌딩 Tel: 02-391-0950, 399-0950 Fax: 02-392-2656
KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS KCCM 2020-0950
Yocim Bldg., 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, 03641, Korea Tel: 82-2-391-0950, 399-0950 Fax: 82-2-392-2656



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To. CJ CheilJedang Corporation
CJ CHEILJEDANG CENTER,
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, SEOUL 100-400
REPUBLIC OF KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA09-2374	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12902P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on December. 17. 2020 (date of the original deposit). ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjennae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 03641 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: December. 17. 2020.

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Form BP/4 (sole page)

한국미생물보존센터 (KCCM) KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS
 03641 서울특별시 서대문구 홍제내2가길 45 유림빌딩 Tel: 02-391-0950, 396-0950 Fax: 02-392-2859
 Yurim Bldg., 45, Hongjennae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, 03641, Korea Tel: 82-2-391-0950, 396-0950 Fax: 82-2-392-2859

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể protein GlxR (chất điều hòa bỏ qua glyoxylat), chứa đột biến được chọn từ nhóm bao gồm từ (1) đến (4) dưới đây:

- (1) thay thế gốc tương ứng với vị trí axit amin thứ 45 từ đầu cùng N trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 bằng alanin, serin, phenylalanin hoặc lysin;
- (2) thay thế gốc tương ứng với vị trí axit amin thứ 66 từ đầu cùng N trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 bằng alanin, phenylalanin hoặc lysin;
- (3) thay thế gốc tương ứng với vị trí axit amin thứ 166 từ đầu cùng N trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 bằng axit aspartic, phenylalanin hoặc lysin; và
- (4) thay thế gốc tương ứng với vị trí axit amin thứ 168 từ đầu cùng N trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 bằng alanin, phenylalanin hoặc lysin.

2. Polynucleotit, mã hóa biến thể protein GlxR theo điểm 1.

3. Vi sinh vật, chứa ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm biến thể protein GlxR theo điểm 1 và polynucleotit mã hóa biến thể protein GlxR.

4. Vi sinh vật theo điểm 3, trong đó vi sinh vật này có khả năng sản xuất L-threonin.

5. Vi sinh vật theo điểm 3, trong đó vi sinh vật này là *Corynebacterium* sp..

6. Vi sinh vật theo điểm 5, trong đó vi sinh vật *Corynebacterium* sp. là *Corynebacterium glutamicum*.

7. Phương pháp sản xuất L-threonin, bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 3 đến 6 trong môi trường.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu hồi L-threonin từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật.

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Biến thể protein GlxR hoặc phương pháp sản xuất threonin bằng cách sử dụng biến thể này

<130> OPP20213678KR

<150> KR 10-2021-000369

<151> 2021-01-11

<160> 55

<170> koPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 227

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> GlxR_axit amin

<400> 1

Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly
1 5 10 15

Val Asp Pro Thr Ala Val Asn Asn Leu Ile Gln Asp Met Glu Thr Val
20 25 30

Arg Phe Pro Arg Gly Ala Thr Ile Phe Asp Glu Gly Glu Pro Gly Asp
35 40 45

Arg Leu Tyr Ile Ile Thr Ser Gly Lys Val Lys Leu Ala Arg His Ala
50 55 60

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

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

Val Cys Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Met Asn Ser Asp Met Leu
100 105 110

Arg Asn Trp Val Ala Asp His Pro Ala Ile Ala Glu Gln Leu Leu Arg
115 120 125

Val Leu Ala Arg Arg Leu Arg Arg Thr Asn Ala Ser Leu Ala Asp Leu
130 135 140

Ile Phe Thr Asp Val Pro Gly Arg Val Ala Lys Thr Leu Leu Gln Leu
145 150 155 160

Ala Asn Arg Phe Gly Thr Gln Glu Ala Gly Ala Leu Arg Val Asn His
165 170 175

Asp Leu Thr Gln Glu Glu Ile Ala Gln Leu Val Gly Ala Ser Arg Glu
180 185 190

Thr Val Asn Lys Ala Leu Ala Thr Phe Ala His Arg Gly Trp Ile Arg
195 200 205

Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg
210 215 220

Arg Ala Arg
225

<210> 2

<211> 684

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR_axit nucleic

<400> 2

gtggaaggtg tacaggagat cctgtcgcgc gccggaattt ttcaaggcgt tgaccaaacg	60
gcagtcaata acctcatcca ggatatggag accgttcgct tcccacgcgg agcaaccatc	120
ttcgacgagg gcgagccagg tgaccgcctt tacatcatca cctccggcaa agtgaagctt	180
gcgcgccacg caccggacgg ccgcgaaaac ctgctgacca tcatgggtcc ttccgacatg	240
ttcggtgagc tctccatctt cgacccaggc ccacgcacct cctctgcagt gtgtgtcacc	300
gaagttcatg cagcaaccat gaactctgac atgctgcgca actgggtagc tgaccacca	360
gctatcgctg agcagctcct gcgcgttctg gctcgtcgtc tgcgtcgcac caacgcttcc	420
ctggctgacc tcatcttcac cgacgtccca ggccgcgttg ctaagaccct tctgcagctg	480
gctaaccgct tcggcaccca agaagctggc gcgctgcgcg tgaaccacga cctcactcag	540
gaagaaatcg cacagctcgt cgggtgcttcc cgtgaaactg tgaataaggc tcttgcaacg	600
ttcgcacacc gtggctggat tcgcctcgag ggcaagtccg tcctcattgt ggacaccgag	660
catttggcac gtcgcgctcg ataa	684

<210> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> GlxR_E45A

<400> 3

Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly
 1 5 10 15

Val Asp Pro Thr Ala Val Asn Asn Leu Ile Gln Asp Met Glu Thr Val
 20 25 30

Arg Phe Pro Arg Gly Ala Thr Ile Phe Asp Glu Gly Ala Pro Gly Asp
 35 40 45

Arg Leu Tyr Ile Ile Thr Ser Gly Lys Val Lys Leu Ala Arg His Ala
 50 55 60

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

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

Val Cys Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Met Asn Ser Asp Met Leu
 100 105 110

Arg Asn Trp Val Ala Asp His Pro Ala Ile Ala Glu Gln Leu Leu Arg
 115 120 125

Val Leu Ala Arg Arg Leu Arg Arg Thr Asn Ala Ser Leu Ala Asp Leu
 130 135 140

Ile Phe Thr Asp Val Pro Gly Arg Val Ala Lys Thr Leu Leu Gln Leu
 145 150 155 160

Ala Asn Arg Phe Gly Thr Gln Glu Ala Gly Ala Leu Arg Val Asn His
 165 170 175

Asp Leu Thr Gln Glu Glu Ile Ala Gln Leu Val Gly Ala Ser Arg Glu
 180 185 190

Thr Val Asn Lys Ala Leu Ala Thr Phe Ala His Arg Gly Trp Ile Arg

195 200 205
 Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg
 210 215 220

 Arg Ala Arg
 225

 <210> 4
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> GlxR_E45S

 <400> 4
 Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly
 1 5 10 15

 Val Asp Pro Thr Ala Val Asn Asn Leu Ile Gln Asp Met Glu Thr Val
 20 25 30

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

 Arg Leu Tyr Ile Ile Thr Ser Gly Lys Val Lys Leu Ala Arg His Ala
 50 55 60

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

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

 Val Cys Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Met Asn Ser Asp Met Leu

100	105	110
Arg Asn Trp Val Ala Asp His Pro Ala Ile Ala Glu Gln Leu Leu Arg		
115	120	125
Val Leu Ala Arg Arg Leu Arg Arg Thr Asn Ala Ser Leu Ala Asp Leu		
130	135	140
Ile Phe Thr Asp Val Pro Gly Arg Val Ala Lys Thr Leu Leu Gln Leu		
145	150	155
		160
Ala Asn Arg Phe Gly Thr Gln Glu Ala Gly Ala Leu Arg Val Asn His		
165	170	175
Asp Leu Thr Gln Glu Glu Ile Ala Gln Leu Val Gly Ala Ser Arg Glu		
180	185	190
Thr Val Asn Lys Ala Leu Ala Thr Phe Ala His Arg Gly Trp Ile Arg		
195	200	205
Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg		
210	215	220
Arg Ala Arg		
225		

<210> 5
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GlxR_E45F

<400> 5
 Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly

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

Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg
 210 215 220

Arg Ala Arg
 225

<210> 6
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GlxR_E45K

<400> 6
 Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly
 1 5 10 15

Val Asp Pro Thr Ala Val Asn Asn Leu Ile Gln Asp Met Glu Thr Val
 20 25 30

Arg Phe Pro Arg Gly Ala Thr Ile Phe Asp Glu Gly Lys Pro Gly Asp
 35 40 45

Arg Leu Tyr Ile Ile Thr Ser Gly Lys Val Lys Leu Ala Arg His Ala
 50 55 60

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

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

Val Cys Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Met Asn Ser Asp Met Leu
 100 105 110

Arg Asn Trp Val Ala Asp His Pro Ala Ile Ala Glu Gln Leu Leu Arg
 115 120 125

Val Leu Ala Arg Arg Leu Arg Arg Thr Asn Ala Ser Leu Ala Asp Leu
 130 135 140

Ile Phe Thr Asp Val Pro Gly Arg Val Ala Lys Thr Leu Leu Gln Leu
 145 150 155 160

Ala Asn Arg Phe Gly Thr Gln Glu Ala Gly Ala Leu Arg Val Asn His
 165 170 175

Asp Leu Thr Gln Glu Glu Ile Ala Gln Leu Val Gly Ala Ser Arg Glu
 180 185 190

Thr Val Asn Lys Ala Leu Ala Thr Phe Ala His Arg Gly Trp Ile Arg
 195 200 205

Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg
 210 215 220

Arg Ala Arg
 225

<210> 7
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GlxR_D66A

<400> 7
 Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly
 1 5 10 15

Val Asp Pro Thr Ala Val Asn Asn Leu Ile Gln Asp Met Glu Thr Val
 20 25 30

Arg Phe Pro Arg Gly Ala Thr Ile Phe Asp Glu Gly Glu Pro Gly Asp
 35 40 45

Arg Leu Tyr Ile Ile Thr Ser Gly Lys Val Lys Leu Ala Arg His Ala
 50 55 60

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

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

Val Cys Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Met Asn Ser Asp Met Leu
 100 105 110

Arg Asn Trp Val Ala Asp His Pro Ala Ile Ala Glu Gln Leu Leu Arg
 115 120 125

Val Leu Ala Arg Arg Leu Arg Arg Thr Asn Ala Ser Leu Ala Asp Leu
 130 135 140

Ile Phe Thr Asp Val Pro Gly Arg Val Ala Lys Thr Leu Leu Gln Leu
 145 150 155 160

Ala Asn Arg Phe Gly Thr Gln Glu Ala Gly Ala Leu Arg Val Asn His
 165 170 175

Asp Leu Thr Gln Glu Glu Ile Ala Gln Leu Val Gly Ala Ser Arg Glu
 180 185 190

Thr Val Asn Lys Ala Leu Ala Thr Phe Ala His Arg Gly Trp Ile Arg
 195 200 205

Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg
 210 215 220

Arg Ala Arg
225

<210> 8
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> GlxR_D66F

<400> 8
Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly
1 5 10 15

Val Asp Pro Thr Ala Val Asn Asn Leu Ile Gln Asp Met Glu Thr Val
20 25 30

Arg Phe Pro Arg Gly Ala Thr Ile Phe Asp Glu Gly Glu Pro Gly Asp
35 40 45

Arg Leu Tyr Ile Ile Thr Ser Gly Lys Val Lys Leu Ala Arg His Ala
50 55 60

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

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

Val Cys Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Met Asn Ser Asp Met Leu
100 105 110

Arg Asn Trp Val Ala Asp His Pro Ala Ile Ala Glu Gln Leu Leu Arg
115 120 125

Val Leu Ala Arg Arg Leu Arg Arg Thr Asn Ala Ser Leu Ala Asp Leu
 130 135 140

Ile Phe Thr Asp Val Pro Gly Arg Val Ala Lys Thr Leu Leu Gln Leu
 145 150 155 160

Ala Asn Arg Phe Gly Thr Gln Glu Ala Gly Ala Leu Arg Val Asn His
 165 170 175

Asp Leu Thr Gln Glu Glu Ile Ala Gln Leu Val Gly Ala Ser Arg Glu
 180 185 190

Thr Val Asn Lys Ala Leu Ala Thr Phe Ala His Arg Gly Trp Ile Arg
 195 200 205

Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg
 210 215 220

Arg Ala Arg
 225

<210> 9
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GlxR_D66K

<400> 9
 Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly
 1 5 10 15

Val Asp Pro Thr Ala Val Asn Asn Leu Ile Gln Asp Met Glu Thr Val
 20 25 30

Arg Phe Pro Arg Gly Ala Thr Ile Phe Asp Glu Gly Glu Pro Gly Asp
 35 40 45

Arg Leu Tyr Ile Ile Thr Ser Gly Lys Val Lys Leu Ala Arg His Ala
 50 55 60

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

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

Val Cys Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Met Asn Ser Asp Met Leu
 100 105 110

Arg Asn Trp Val Ala Asp His Pro Ala Ile Ala Glu Gln Leu Leu Arg
 115 120 125

Val Leu Ala Arg Arg Leu Arg Arg Thr Asn Ala Ser Leu Ala Asp Leu
 130 135 140

Ile Phe Thr Asp Val Pro Gly Arg Val Ala Lys Thr Leu Leu Gln Leu
 145 150 155 160

Ala Asn Arg Phe Gly Thr Gln Glu Ala Gly Ala Leu Arg Val Asn His
 165 170 175

Asp Leu Thr Gln Glu Glu Ile Ala Gln Leu Val Gly Ala Ser Arg Glu
 180 185 190

Thr Val Asn Lys Ala Leu Ala Thr Phe Ala His Arg Gly Trp Ile Arg
 195 200 205

Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg
 210 215 220

Arg Ala Arg

225

<210> 10

<211> 227

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> GlxR_T166D

<400> 10

Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly
 1 5 10 15

Val Asp Pro Thr Ala Val Asn Asn Leu Ile Gln Asp Met Glu Thr Val
 20 25 30

Arg Phe Pro Arg Gly Ala Thr Ile Phe Asp Glu Gly Glu Pro Gly Asp
 35 40 45

Arg Leu Tyr Ile Ile Thr Ser Gly Lys Val Lys Leu Ala Arg His Ala
 50 55 60

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

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

Val Cys Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Met Asn Ser Asp Met Leu
 100 105 110

Arg Asn Trp Val Ala Asp His Pro Ala Ile Ala Glu Gln Leu Leu Arg
 115 120 125

Val Leu Ala Arg Arg Leu Arg Arg Thr Asn Ala Ser Leu Ala Asp Leu

130 135 140
 Ile Phe Thr Asp Val Pro Gly Arg Val Ala Lys Thr Leu Leu Gln Leu
 145 150 155 160
 Ala Asn Arg Phe Gly Asp Gln Glu Ala Gly Ala Leu Arg Val Asn His
 165 170 175
 Asp Leu Thr Gln Glu Glu Ile Ala Gln Leu Val Gly Ala Ser Arg Glu
 180 185 190
 Thr Val Asn Lys Ala Leu Ala Thr Phe Ala His Arg Gly Trp Ile Arg
 195 200 205
 Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg
 210 215 220
 Arg Ala Arg
 225

<210> 11
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GlxR_T166F

<400> 11
 Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly
 1 5 10 15
 Val Asp Pro Thr Ala Val Asn Asn Leu Ile Gln Asp Met Glu Thr Val
 20 25 30
 Arg Phe Pro Arg Gly Ala Thr Ile Phe Asp Glu Gly Glu Pro Gly Asp

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

<210> 12
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GlxR_T166K

<400> 12
 Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly
 1 5 10 15

Val Asp Pro Thr Ala Val Asn Asn Leu Ile Gln Asp Met Glu Thr Val
 20 25 30

Arg Phe Pro Arg Gly Ala Thr Ile Phe Asp Glu Gly Glu Pro Gly Asp
 35 40 45

Arg Leu Tyr Ile Ile Thr Ser Gly Lys Val Lys Leu Ala Arg His Ala
 50 55 60

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

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

Val Cys Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Met Asn Ser Asp Met Leu
 100 105 110

Arg Asn Trp Val Ala Asp His Pro Ala Ile Ala Glu Gln Leu Leu Arg
 115 120 125

Val Leu Ala Arg Arg Leu Arg Arg Thr Asn Ala Ser Leu Ala Asp Leu
 130 135 140

Ile Phe Thr Asp Val Pro Gly Arg Val Ala Lys Thr Leu Leu Gln Leu
145 150 155 160

Ala Asn Arg Phe Gly Lys Gln Glu Ala Gly Ala Leu Arg Val Asn His
165 170 175

Asp Leu Thr Gln Glu Glu Ile Ala Gln Leu Val Gly Ala Ser Arg Glu
180 185 190

Thr Val Asn Lys Ala Leu Ala Thr Phe Ala His Arg Gly Trp Ile Arg
195 200 205

Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg
210 215 220

Arg Ala Arg
225

<210> 13
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> GlxR_E168A

<400> 13
Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly
1 5 10 15

Val Asp Pro Thr Ala Val Asn Asn Leu Ile Gln Asp Met Glu Thr Val
20 25 30

Arg Phe Pro Arg Gly Ala Thr Ile Phe Asp Glu Gly Glu Pro Gly Asp
35 40 45

Arg Leu Tyr Ile Ile Thr Ser Gly Lys Val Lys Leu Ala Arg His Ala
50 55 60

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

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

Val Cys Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Met Asn Ser Asp Met Leu
100 105 110

Arg Asn Trp Val Ala Asp His Pro Ala Ile Ala Glu Gln Leu Leu Arg
115 120 125

Val Leu Ala Arg Arg Leu Arg Arg Thr Asn Ala Ser Leu Ala Asp Leu
130 135 140

Ile Phe Thr Asp Val Pro Gly Arg Val Ala Lys Thr Leu Leu Gln Leu
145 150 155 160

Ala Asn Arg Phe Gly Thr Gln Ala Ala Gly Ala Leu Arg Val Asn His
165 170 175

Asp Leu Thr Gln Glu Glu Ile Ala Gln Leu Val Gly Ala Ser Arg Glu
180 185 190

Thr Val Asn Lys Ala Leu Ala Thr Phe Ala His Arg Gly Trp Ile Arg
195 200 205

Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg
210 215 220

Arg Ala Arg
225

<210> 14

<211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GlxR_E168F

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

Ala Asn Arg Phe Gly Thr Gln Phe Ala Gly Ala Leu Arg Val Asn His
 165 170 175

Asp Leu Thr Gln Glu Glu Ile Ala Gln Leu Val Gly Ala Ser Arg Glu
 180 185 190

Thr Val Asn Lys Ala Leu Ala Thr Phe Ala His Arg Gly Trp Ile Arg
 195 200 205

Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg
 210 215 220

Arg Ala Arg
 225

<210> 15
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GlxR_E168K

<400> 15
 Met Glu Gly Val Gln Glu Ile Leu Ser Arg Ala Gly Ile Phe Gln Gly
 1 5 10 15

Val Asp Pro Thr Ala Val Asn Asn Leu Ile Gln Asp Met Glu Thr Val
 20 25 30

Arg Phe Pro Arg Gly Ala Thr Ile Phe Asp Glu Gly Glu Pro Gly Asp
 35 40 45

Arg Leu Tyr Ile Ile Thr Ser Gly Lys Val Lys Leu Ala Arg His Ala
 50 55 60

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

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

Val Cys Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Met Asn Ser Asp Met Leu
100 105 110

Arg Asn Trp Val Ala Asp His Pro Ala Ile Ala Glu Gln Leu Leu Arg
115 120 125

Val Leu Ala Arg Arg Leu Arg Arg Thr Asn Ala Ser Leu Ala Asp Leu
130 135 140

Ile Phe Thr Asp Val Pro Gly Arg Val Ala Lys Thr Leu Leu Gln Leu
145 150 155 160

Ala Asn Arg Phe Gly Thr Gln Lys Ala Gly Ala Leu Arg Val Asn His
165 170 175

Asp Leu Thr Gln Glu Glu Ile Ala Gln Leu Val Gly Ala Ser Arg Glu
180 185 190

Thr Val Asn Lys Ala Leu Ala Thr Phe Ala His Arg Gly Trp Ile Arg
195 200 205

Leu Glu Gly Lys Ser Val Leu Ile Val Asp Thr Glu His Leu Ala Arg
210 215 220

Arg Ala Arg
225

<210> 16
<211> 35
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR L1

<400> 16

gaattcgagc tcggtaccct gagacccac gcgag

35

<210> 17

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR R2

<400> 17

gactctagag gatcccatc gacggtgtca cccac

36

<210> 18

<211> 38

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR(E45A) L2

<400> 18

gtaaaggcgg tcacctggcg cgccctcgtc gaagatgg

38

<210> 19

<211> 38

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR(E45A) R1

<400> 19

ccatcttcga cgagggcgcg ccaggtgacc gcctttac

38

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pDZ_F (pDZ vector sequencing primer_forward)

<400> 20

tattacgcca gctggcgaaa g

21

<210> 21

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> pDZ_R (đoạn nối giải trình tự vectơ pDZ_đảo)

<400> 21

ttccggctcg tatgttgtgt g

21

<210> 22

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

<220>
<223> glxR(E45S) L2

<400> 22
gtaaaggcgg tcacctggag agccctcgtc gaagatgg

38

<210> 23
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> glxR(E45S) R1

<400> 23
ccatcttcga cgagggctct ccaggtgacc gcctttac

38

<210> 24
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> glxR(E45F) L2

<400> 24
gtaaaggcgg tcacctggaa agccctcgtc gaagatgg

38

<210> 25
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> glxR(E45F) R1

<400> 25
ccatcttcga cgagggttt ccaggtgacc gcctttac

38

<210> 26
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> glxR(E45K) L2

<400> 26
gtaaaggcgg tcacctggct tgccctcgtc gaagatgg

38

<210> 27
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> glxR(E45K) R1

<400> 27
ccatcttcga cgagggaag ccaggtgacc gcctttac

38

<210> 28
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> glxR(D66A) L2

<400> 28
ggtttttcgcg gcctgccggt gcgtggcgcg caag

34

<210> 29
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> glxR(D66A) R1

<400> 29
gcgccacgca ccggcaggcc gcgaaaacct gctg

34

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

<220>
<223> glxR(D66F) L2

<400> 30
cagcaggttt tcgcggccaa acggtgcgtg gcgc

34

<210> 31
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> glxR(D66F) R1

<400> 31
gcgccacgca ccgttttgcc gcgaaaacct gctg

34

<210> 32
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> glxR(D66K) L2

<400> 32
ggtttttcgcg gcctttccgg tgcgtggcgc gcaag

35

<210> 33
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> glxR(D66K) R1

<400> 33

gcgccacgca ccgaaaggcc gcgaaaacct gctg

34

<210> 34

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR(T166D) L2

<400> 34

gccagcttct tggtcgccga agcggtttagc cagc

34

<210> 35

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR(T166D) R1

<400> 35

aaccgcttcg gcgaccaaga agctggcgcg ctg

33

<210> 36

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR(T166F) L2

<400> 36

gccagcttct tggaagccga agcggtttagc cagc

34

<210> 37

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR(T166F) R1

<400> 37

aaccgcttcg gcttccaaga agctggcgcg ctg

33

<210> 38

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR(T166K) L2

<400> 38

gccagcttct tgtttgccga agcggtttagc cagc

34

<210> 39

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR(T166K) R1

<400> 39

aaccgcttcg gcaaacaaga agctggcgcg ctg

33

<210> 40

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR(E168A) L2

<400> 40

agcgcgccag cagcttgggc gccgaagcgg ttag

34

<210> 41

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR(E168A) R1

<400> 41

cttcggcgcc caagctgctg gcgcgctgcg cgtg

34

<210> 42

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR(E168F) L2

<400> 42
agcgcgccag caaattgggc gccgaagcgg ttag

34

<210> 43
<211> 34`
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> glxR(E168F) R1

<400> 43
cttcggcgcc caatttgctg gcgcgctgcg cgtg

34

<210> 44
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> glxR(E168K) L2

<400> 44
agcgcgccag ccttttgggc gccgaagcgg ttag

34

<210> 45
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> glxR(E168K) R1

<400> 45

cttcggcgcc caaaaggctg gcgcgctgcg cgtg

34

<210> 46

<211> 421

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LysC_L377K

<400> 46

Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125

Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 130 135 140

Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160

Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175

Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240

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

Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270

Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285

Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350

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

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

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

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

Ala Gly Thr Gly Arg
 420

<210> 47
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC L1

<400> 47
 tcgagctcgg tacccgctgc gcagtgttga atac

34

<210> 48
 <211> 34

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> lysC R2

<400> 48
ctctagagga tccccgttca cctcagagac gatt

34

<210> 49
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> lysC(L377K) L2

<400> 49
tggaaatcctt ttcgatgttc acgttgacat

30

<210> 50
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> lysC(L377K) R1

<400> 50
atgtcaacgt gaacatcgaa aagatttcca

30

<210> 51

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

<220>
 <223> Hom_R407H

<400> 51

Met Thr Ser Ala Ser Ala Pro Ser Phe Asn Pro Gly Lys Gly Pro Gly
 1 5 10 15

Ser Ala Val Gly Ile Ala Leu Leu Gly Phe Gly Thr Val Gly Thr Glu
 20 25 30

Val Met Arg Leu Met Thr Glu Tyr Gly Asp Glu Leu Ala His Arg Ile
 35 40 45

Gly Gly Pro Leu Glu Val Arg Gly Ile Ala Val Ser Asp Ile Ser Lys
 50 55 60

Pro Arg Glu Gly Val Ala Pro Glu Leu Leu Thr Glu Asp Ala Phe Ala
 65 70 75 80

Leu Ile Glu Arg Glu Asp Val Asp Ile Val Val Glu Val Ile Gly Gly
 85 90 95

Ile Glu Tyr Pro Arg Glu Val Val Leu Ala Ala Leu Lys Ala Gly Lys
 100 105 110

Ser Val Val Thr Ala Asn Lys Ala Leu Val Ala Ala His Ser Ala Glu
 115 120 125

Leu Ala Asp Ala Ala Glu Ala Ala Asn Val Asp Leu Tyr Phe Glu Ala
 130 135 140

Ala Val Ala Gly Ala Ile Pro Val Val Gly Pro Leu Arg Arg Ser Leu
 145 150 155 160

Ala Gly Asp Gln Ile Gln Ser Val Met Gly Ile Val Asn Gly Thr Thr
 165 170 175

Asn Phe Ile Leu Asp Ala Met Asp Ser Thr Gly Ala Asp Tyr Ala Asp
 180 185 190

Ser Leu Ala Glu Ala Thr Arg Leu Gly Tyr Ala Glu Ala Asp Pro Thr
 195 200 205

Ala Asp Val Glu Gly His Asp Ala Ala Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala
 210 215 220

Ser Ile Ala Phe His Thr Arg Val Thr Ala Asp Asp Val Tyr Cys Glu
 225 230 235 240

Gly Ile Ser Asn Ile Ser Ala Ala Asp Ile Glu Ala Ala Gln Gln Ala
 245 250 255

Gly His Thr Ile Lys Leu Leu Ala Ile Cys Glu Lys Phe Thr Asn Lys
 260 265 270

Glu Gly Lys Ser Ala Ile Ser Ala Arg Val His Pro Thr Leu Leu Pro
 275 280 285

Val Ser His Pro Leu Ala Ser Val Asn Lys Ser Phe Asn Ala Ile Phe
 290 295 300

Val Glu Ala Glu Ala Ala Gly Arg Leu Met Phe Tyr Gly Asn Gly Ala
 305 310 315 320

Gly Gly Ala Pro Thr Ala Ser Ala Val Leu Gly Asp Val Val Gly Ala
 325 330 335

Ala Arg Asn Lys Val His Gly Gly Arg Ala Pro Gly Glu Ser Thr Tyr
 340 345 350

Ala Asn Leu Pro Ile Ala Asp Phe Gly Glu Thr Thr Thr Arg Tyr His

355 360 365
 Leu Asp Met Asp Val Glu Asp Arg Val Gly Val Leu Ala Glu Leu Ala
 370 375 380

 Ser Leu Phe Ser Glu Gln Gly Ile Ser Leu Arg Thr Ile Arg Gln Glu
 385 390 395 400

 Glu Arg Asp Asp Asp Ala His Leu Ile Val Val Thr His Ser Ala Leu
 405 410 415

 Glu Ser Asp Leu Ser Arg Thr Val Glu Leu Leu Lys Ala Lys Pro Val
 420 425 430

 Val Lys Ala Ile Asn Ser Val Ile Arg Leu Glu Arg Asp
 435 440 445

<210> 52
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hom L1

<400> 52
 atcctctaga gtcgacccaa ctgcagacgt cgaa

34

<210> 53
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hom R2

<400> 53

atgcctgcag gtcgacatag acagatttgt ccacg

35

<210> 54

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hom(R407H) L2

<400> 54

gtgaccacga tcagatgtgc atcatcatcg cgctc

35

<210> 55

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hom(R407H) R1

<400> 55

gcgatgatga tgcacatctg atcgtgggtca cccac

35