



(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)



1-0049830

(51)^{2022.01} C12N 15/77; C12P 13/08; C12N 9/88; (13) B
C12N 9/02; C12N 9/10

(21) 1-2023-02049

(22) 01/09/2021

(86) PCT/KR2021/011717 01/09/2021

(87) WO 2022/050671 10/03/2022

(30) 10-2020-0111084 01/09/2020 KR

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/07/2023 424A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) CHANG, Jin Sook (KR); KIM, Seon Hye (KR); YOON, Byoung Hoon (KR); KIM, Ju-yeon (KR); KIM, Hyung Joon (KR); CHOI, Sun Hyoung (KR).

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

(54) VI SINH VẬT SẢN SINH L-VALIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-VALIN
SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(21) 1-2023-02049

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản sinh L-valin và phương pháp sản xuất L-valin sử dụng vi sinh vật này, và khi vi sinh vật bao gồm kết hợp của các enzym có hoạt tính được tăng cường hoặc giảm theo sáng chế được nuôi cấy, L-valin có thể được sản xuất với sản lượng cao.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản sinh L-valin và phương pháp sản xuất L-valin sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

L-valin là axit amin mạch nhánh, được tổng hợp trong các vi sinh vật, bắt đầu từ axit pyruvic thông qua axit axetolactic, axit dihydroxy isovaleric, và axit ketoisovaleric. Các chất chuyển hóa trung gian này được tạo ra bởi phản ứng được xúc tác bởi axit axetohydroxy synthaza, axetohydroxy axit isomeroreductaza, dihydroxy axit dehydrataza, và transaminaza B. Tuy nhiên, các enzym này cũng tham gia vào sinh tổng hợp L-isoleuxin bắt đầu từ ketobutyric axit và pyruvic axit, và L-leuxin cũng được sinh tổng hợp từ chất chuyển hóa trung gian, ketoisovaleric axit, thông qua 2-isopropylmalic axit, 3-isopropylmalic axit, và ketoisocaproic axit. Do đó, bởi vì các enzym được sử dụng trong các con đường sinh tổng hợp của các axit amin mạch nhánh, tức là, L-valin, L-isoleuxin, và L-leuxin giống nhau, được biết rằng việc sản xuất công nghiệp một loại axit amin mạch nhánh thông qua quá trình lên men là khó khăn. Ngoài ra, sự ức chế phản hồi xảy ra bởi sản phẩm L-valin cuối cùng hoặc dẫn xuất của nó, điều này gây khó khăn cho việc sản xuất hàng loạt công nghiệp L-valin.

Tuy nhiên, cho đến nay đã có những nghiên cứu về phương pháp sản xuất valin thông qua sự ức chế phản hồi (patent Hoa Kỳ số 10457919), nhưng chưa có nghiên cứu nào về việc tăng khả năng sản sinh valin thông qua việc kết hợp các enzym với hoạt tính tăng cường hoặc giảm theo sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo đó, các tác giả đã tiến hành nhiều nghiên cứu về phương pháp hiệu quả để sản xuất L-valin, và kết quả là, xác nhận rằng vi sinh vật có hoạt tính dihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường; hoạt tính transaminaza C giảm; hoạt tính pyruvat dehydrogenaza suy giảm; hoạt tính xitrat synthaza giảm; hoặc sự kết hợp của chúng có khả năng sản sinh L-valin vượt trội so với vi sinh vật kiểu dại, nhờ đó hoàn thiện sáng chế.

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật sản sinh L-valin có hoạt tính dihydroxy-acid dehydrataza được tăng cường; và bất kỳ một hoặc nhiều sự kết hợp được chọn từ (1) đến (3) dưới đây:

- (1) hoạt tính transaminaza C giảm;
- (2) hoạt tính pyruvat dehydrogenaza suy giảm;
- (3) hoạt tính xitrat synthaza giảm.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-valin, trong đó phương pháp này bao gồm nuôi cấy vi sinh vật.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Khi nuôi cấy vi sinh vật sản sinh L-valin của sáng chế, L-valin có thể được sản xuất với sản lượng cao. Theo đó, các hiệu quả của sự tiện lợi trong sản xuất và giảm chi phí sản xuất có thể được kỳ vọng ở khía cạnh công nghiệp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ trong sáng chế có thể được áp dụng cho các phần mô tả và phương án khác liên quan đến các đặc điểm chung. Tức là, tất cả sự kết hợp của các chi tiết khác nhau được bộc lộ trong sáng chế đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả chi tiết dưới đây.

Ngoài ra, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể nhận biết hoặc xác nhận, chỉ sử dụng các thí nghiệm thông thường, nhiều phương án tương đương theo các phương án cụ thể của sáng chế được mô tả ở đây. Ngoài ra, các phương án tương đương như vậy đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Khía cạnh của sáng chế là đề xuất vi sinh vật sản sinh L-valin có hoạt tính dihydroxy-acid dehydrataza được tăng cường; và bất kỳ một hoặc nhiều sự kết hợp được chọn từ (1) đến (3) dưới đây:

- (1) hoạt tính transaminaza C giảm;
- (2) hoạt tính pyruvat dehydrogenaza suy giảm;
- (3) hoạt tính xitrat synthaza giảm.

Theo một phương án, vi sinh vật sản sinh valin có thể là vi sinh vật có hoạt tính dihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường và hoạt tính transaminaza C giảm.

Theo phương án khác, vi sinh vật sản sinh valin có thể là vi sinh vật có dihydroxy-axit dehydrataza hoạt tính được tăng cường và hoạt tính pyruvat dehydrogenaza suy giảm.

Theo phương án khác nữa, vi sinh vật sản sinh valin có thể là vi sinh vật có hoạt tính dihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường và hoạt tính xitrat synthaza giảm.

Theo phương án khác nữa, vi sinh vật sản sinh valin có thể là vi sinh vật có hoạt tính dihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường và hoạt tính xitrat synthaza giảm, và ngoài ra có hoạt tính transaminaza C giảm hoặc hoạt tính pyruvat dehydrogenaza suy giảm, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “dihydroxy-axit dehydrataza” là enzym tham gia vào tổng hợp của ketoiso-valerat, tiền chất của valin, trong con đường sinh tổng hợp sản sinh L-valin có nguồn gốc từ pyruvat thông qua axetolactat, dihydroxy-isovalerat thành ketoiso-valerat. Theo sáng chế, việc sản sinh L-valin có thể được thúc đẩy bằng cách tăng cường hoạt tính của dihydroxy-axit dehydrataza, và do đó tăng tổng hợp của ketoiso-valerat.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “transaminaza C” là enzym tham gia vào con đường tổng hợp L-alanin từ pyruvat.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “pyruvat dehydrogenaza” là enzym tham gia vào tổng hợp axetyl-coA từ pyruvic axit.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “xitrat synthaza” là enzym tổng hợp xitrat từ axetyl-coA.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sự tăng cường” có nghĩa là hoạt tính của protein tăng lên so với hoạt tính nội sinh của nó. Sự tăng cường có thể được sử dụng thay thế cho nhau với các thuật ngữ như kích hoạt, điều chỉnh tăng, biểu hiện quá mức, tăng lên, v.v.. Cụ thể, sự kích hoạt, điều chỉnh tăng, biểu hiện quá mức và tăng lên có thể bao gồm cả hai trường hợp trong đó hoạt tính không có sẵn ban đầu được biểu hiện, hoặc hoạt tính được tăng cường so với hoạt tính nội sinh của nó hoặc hoạt tính trước khi biến đổi. “Hoạt tính nội sinh” đề cập đến hoạt tính của polypeptit cụ thể có sẵn ban

đầu bởi chúng bố mẹ trước khi biến đổi hoặc vi sinh vật không biến đổi, khi tính trạng được thay đổi do biến đổi gen gây ra bởi yếu tố tự nhiên hoặc nhân tạo, và có thể được sử dụng thay thế cho “hoạt tính trước khi biến đổi”. “Sự tăng cường”, “điều chỉnh tăng”, “biểu hiện quá mức” hoặc “tăng lên” trong hoạt tính của polypeptit so với hoạt tính nội sinh của nó có nghĩa là hoạt tính và/hoặc nồng độ (mức độ biểu hiện) của polypeptit được tăng cường so với hoạt tính của polypeptit cụ thể có sẵn ban đầu bởi chúng bố mẹ trước khi biến đổi hoặc vi sinh vật không biến đổi.

Sự tăng cường có thể đạt được bằng cách đưa vào polypeptit ngoại lai, hoặc bằng cách tăng cường hoạt tính và/hoặc nồng độ (mức độ biểu hiện) của polypeptit nội sinh. Sự tăng cường hoạt tính của dihydroxy-axit dehydrataza có thể được xác định từ sự tăng lên của mức hoạt tính của polypeptit, mức độ biểu hiện, hoặc lượng sản phẩm được sản sinh từ polypeptit.

Sự tăng cường hoạt tính của dihydroxy-axit dehydrataza có thể đạt được bằng nhiều phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và không bị giới hạn miễn là có thể tăng cường hoạt tính của polypeptit đích so với hoạt tính của vi sinh vật trước khi biến đổi. Cụ thể, kỹ thuật gen và/hoặc kỹ thuật protein đã biết đối với những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, là phương pháp phổ biến của sinh học phân tử, có thể được sử dụng, tuy nhiên phương pháp không bị giới hạn ở đây (ví dụ, Sitnicka et al. Functional Analysis of Genes. Advances in Cell Biology. 2010, Vol. 2. 1-16, Sambrook et al. Molecular Cloning 2012, v.v.).

Cụ thể, sự tăng cường hoạt tính của dihydroxy-axit dehydrataza theo sáng chế có thể đạt được bằng các phương pháp sau đây:

- 1) tăng số lượng bản sao nội bào của polynucleotit mã hóa polypeptit;
- 2) thay thế vùng điều hòa biểu hiện của gen mã hóa polypeptit trên nhiễm sắc thể bằng trình tự có hoạt tính mạnh hơn;
- 3) biến đổi trình tự nucleotit mã hóa codon (đơn vị mã hóa) khởi đầu hoặc 5'-UTR của bản sao gen mã hóa polypeptit;
- 4) biến đổi trình tự axit amin của polypeptit sao cho hoạt tính của polypeptit được tăng cường;
- 5) biến đổi trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit sao cho hoạt tính của

polypeptit được tăng cường (ví dụ, biến đổi trình tự polynucleotit của gen polypeptit để mã hóa polypeptit đã được biến đổi để tăng cường hoạt tính của polypeptit);

6) đưa vào polypeptit ngoại lai biểu hiện hoạt tính polypeptit hoặc polynucleotit ngoại lai mã hóa polypeptit;

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

8) phân tích cấu trúc bậc ba của polypeptit và từ đó lựa chọn và biến đổi vị trí tiếp xúc, hoặc biến đổi về mặt hóa học vị trí tiếp xúc; hoặc

9) sự kết hợp của hai hoặc nhiều phương pháp được chọn từ 1 đến 8), tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể là,

Phương pháp 1) để tăng số lượng bản sao nội bào của polynucleotit mã hóa polypeptit có thể được thực hiện bằng cách đưa vector vào tế bào vật chủ, được liên kết chức năng với polynucleotit mã hóa polypeptit và có thể sao chép và hoạt động không phụ thuộc vào tế bào vật chủ. Ngoài ra, phương pháp có thể được thực hiện bằng cách đưa một hoặc nhiều bản sao của các polynucleotit mã hóa polypeptit vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ. Việc đưa vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách đưa vector có khả năng chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ vào tế bào vật chủ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Vector đã được mô tả ở trên.

Phương pháp 2) để thay thế vùng điều hòa biểu hiện (hoặc trình tự điều hòa biểu hiện) của gen mã hóa polypeptit trên nhiễm sắc thể bằng trình tự có hoạt tính mạnh có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách tạo ra sự biến đổi trên trình tự thông qua xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ, hoặc sự kết hợp của chúng để tăng cường thêm hoạt tính của vùng điều hòa biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự có hoạt tính mạnh hơn. Vùng điều hòa biểu hiện có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở vùng gen khởi động, trình tự vận hành, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom, và trình tự điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã, v.v.. Trong một ví dụ, phương pháp có thể bao gồm thay thế vùng gen khởi động ban đầu bằng vùng gen khởi động mạnh, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Các ví dụ của vùng gen khởi động mạnh đã biết có thể bao gồm các vùng gen khởi động từ CJ1 đến CJ7 (patent Hoa Kỳ số US 7662943 B2), vùng gen khởi động

lac, vùng gen khởi động trp, vùng gen khởi động trc, vùng gen khởi động tac, vùng gen khởi động lambda phage PR, vùng gen khởi động PL, vùng gen khởi động tet, vùng gen khởi động gapA, vùng gen khởi động SPL7, vùng gen khởi động SPL13 (sm3) (patent Hoa Kỳ số US 10584338 B2), vùng gen khởi động O2 (patent Hoa Kỳ số US 10273491 B2), vùng gen khởi động tkt, vùng gen khởi động yccA, v.v., tuy nhiên vùng gen khởi động mạnh không bị giới hạn ở đây.

Phương pháp 3) để biến đổi trình tự nucleotit mã hóa codon khởi động hoặc 5'-UTR phiên mã gen mã hóa polypeptit có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách thay thế trình tự nucleotit bằng trình tự nucleotit mã hóa codon khởi động khác có mức biểu hiện cao hơn của polypeptit so với codon khởi động nội sinh, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

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

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

Phương pháp 7) để tối ưu hóa codon của polynucleotit mã hóa polypeptit có thể được thực hiện bằng tối ưu hóa codon của polynucleotit nội sinh để tăng sự phiên mã hoặc dịch mã bên trong tế bào vật chủ, hoặc bằng cách tối ưu hóa các codon sao cho sự phiên mã và dịch mã được tối ưu hóa của polynucleotit ngoại lai có thể được thực hiện bên trong tế bào vật chủ.

Ngoài ra, phương pháp 8) để phân tích cấu trúc bậc ba của polypeptit và từ đó lựa chọn và sửa đổi vị trí tiếp xúc, hoặc sửa đổi về mặt hóa học vị trí tiếp xúc có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách so sánh thông tin trình tự của polypeptit cần phân tích với cơ sở dữ liệu, trong đó thông tin trình tự của các protein đã biết được lưu trữ, để xác định các ứng viên (candidate) protein mạch khuôn theo mức đồng nhất của trình tự, và do đó xác nhận cấu trúc dựa trên thông tin, nhờ đó lựa chọn và biến nạp hoặc sửa đổi vị trí tiếp xúc cần được sửa đổi hoặc sửa đổi về mặt hóa học.

“Vector” theo sáng chế là cấu trúc phân tử ADN được sử dụng như chất trung gian để vận chuyển nhân tạo các vật liệu gen ngoại lai đến các tế bào khác và có thể bao gồm cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa polypeptit đích được liên kết chức năng với vùng điều hòa biểu hiện (trình tự điều hòa biểu hiện) thích hợp để có thể biểu hiện polypeptit đích trong tế bào vật chủ thích hợp. Vùng điều hòa biểu hiện có thể bao gồm vùng gen khởi động có khả năng bắt đầu phiên mã, bất kỳ trình tự toán tử nào điều hòa phiên mã, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom mARN thích hợp, và trình tự để điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã. Sau khi biến nạp vào tế bào vật chủ thích hợp, vector có thể sao chép hoặc hoạt động độc lập với bộ gen vật chủ, hoặc có thể tích hợp vào bộ gen của chúng.

Vector được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và bất kỳ vector đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Các ví dụ của vector thường được sử dụng có thể bao gồm plasmit, cosmit, virus và thể thực khuẩn tái tổ hợp hoặc tự nhiên. Ví dụ, như vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmit, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, và Charon21A, v.v. có thể được sử dụng; và như vector plasmit, các vector loại pDZ, loại pBR, loại pUC, loại pBluescriptII, loại pGEM, loại pTZ, loại pCL, và loại pET, v.v. có thể được sử dụng. Cụ thể, các vector pDZ, pDC, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, và pCC1BAC, v.v. có thể được sử dụng.

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

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

Ngoài ra, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được liên kết chức năng” đề cập đến trình tự gen được liên kết chức năng với trình tự vùng gen khởi động cho phép bắt đầu và làm trung gian phiên mã của polynucleotit mã hóa protein đích của sáng chế.

Việc tăng cường protein hoạt tính như vậy có thể có nghĩa là hoạt tính của protein tương ứng không có sẵn ban đầu được biểu hiện, hoặc hoạt tính hoặc nồng độ của nó thường tăng lên 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% hoặc 500%, và tối đa 1000% hoặc tối thiểu 2000% dựa trên hoạt tính hoặc nồng độ của protein kiểu dại hoặc chủng vi sinh ban đầu, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, việc tăng cường của hoạt tính dihydroxy-axit dehydrataza có thể có nghĩa là hoạt tính dihydroxy-axit dehydrataza trong vi sinh vật được tăng cường so với hoạt tính của vi sinh vật kiểu dại, vi sinh vật trước khi biến đổi hoặc vi sinh vật có protein không biến đổi, nhờ đó tăng tổng hợp của ketoiso-valerat, là tiền chất của L-valin, từ dihydroxy-isovalerat, dẫn đến tăng sản sinh L-valin.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “giảm” là khái niệm toàn diện bao gồm cả trường hợp hoạt tính của protein được biểu hiện trong vi sinh vật ở trạng thái tự nhiên hoặc trước khi biến đổi bị suy giảm hoặc loại bỏ (xóa), tức là khi so sánh với hoạt tính nội sinh hoặc một bản sao của gen mã hóa protein trong tế bào, và có thể có nghĩa là hoạt tính là từ 0% đến 100%.

Thuật ngữ “giảm hoạt tính” của protein có nghĩa là hoạt tính của protein được loại bỏ hoặc hiệu quả ít hơn chức năng ban đầu của nó được thực hiện, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Tức là, cụ thể, việc giảm hoạt tính bao gồm cả “xóa hoạt tính” và “suy giảm hoạt tính”.

Thuật ngữ “xóa hoạt tính” có nghĩa là enzym hoặc protein hoàn toàn không được biểu hiện so với chủng kiểu dại tự nhiên, chủng bố mẹ hoặc chủng có protein không biến đổi, hoặc hoạt tính của chúng không được quan sát thấy ngay cả khi enzym hoặc protein được biểu hiện.

Theo sáng chế, xóa hoạt tính có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ về các phương pháp có thể bao gồm: 1) xóa một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa protein; 2) biến đổi trình tự gen mã hóa protein sao cho hoạt tính của protein được loại bỏ hoặc suy giảm; 3) đưa antisense oligonucleotit (ví dụ, antisense ARN), liên kết bổ sung với phiên mã gen mã hóa protein; 4) thêm trình tự bổ sung vào trình tự Shine–Dalgarno (SD) trên phía sau của trình tự SD của gen mã hóa protein để tạo ra cấu trúc thứ cấp, nhờ đó ức chế gắn

ribosom; 5) kỹ thuật phiên mã ngược (reverse transcription engineering: RTE) thêm vùng gen khởi động, được phiên mã ngược trên đầu 3' của khung đọc mở (open reading frame: ORF) của trình tự gen mã hóa protein; hoặc sự kết hợp của chúng, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, “suy giảm hoạt tính” có thể có nghĩa là hiệu quả ít hơn chức năng ban đầu của nó được thực hiện, và có thể đạt được bằng các phương pháp bao gồm: xóa một phần gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể; thay thế gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể bằng gen đột biến sao cho hoạt tính của protein giảm; đưa đột biến vào trình tự điều hòa biểu hiện của gen mã hóa protein trên nhiễm sắc thể; thay thế trình tự điều hòa biểu hiện của gen mã hóa protein bằng trình tự có hoạt tính yếu (ví dụ, thay thế vùng gen khởi động của gen bằng vùng gen khởi động yếu hơn vùng gen khởi động nội sinh), v.v., tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây, và các phương pháp đã biết để làm suy giảm hoạt tính có thể được sử dụng mà không bị giới hạn ở đây.

Việc giảm hoạt tính protein có thể có nghĩa là hoạt tính của protein tương ứng được loại bỏ, hoặc hoạt tính hoặc nồng độ của nó thường giảm 0%, 1%, 5%, 10 %, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% dựa trên hoạt tính hoặc nồng độ trong protein kiểu dại hoặc chủng vi sinh ban đầu, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể, hoạt tính của transaminaza C trong vi sinh vật có thể giảm so với hoạt tính của chủng kiểu dại tự nhiên, chủng bố mẹ trước khi đột biến, hoặc chủng có protein không biến đổi. Theo một phương án, vi sinh vật có thể không có hoạt tính của protein transaminaza C do xóa gen transaminaza C, hoặc có thể có hoạt tính suy giảm như trình tự mã hóa codon khởi đầu của gen transaminaza C được biến đổi thành GTG, nhờ đó giảm biểu hiện của protein transaminaza C.

Ngoài ra, cụ thể, hoạt tính của pyruvat dehydrogenaza trong vi sinh vật có thể giảm so với hoạt tính của chủng kiểu dại tự nhiên, chủng bố mẹ trước khi đột biến, hoặc chủng có protein không biến đổi. Theo một phương án, vi sinh vật có thể không có hoạt tính của protein pyruvat dehydrogenaza do xóa gen pyruvat dehydrogenaza, hoặc có thể có hoạt tính suy giảm như trình tự mã hóa codon khởi đầu của gen pyruvat dehydrogenaza được biến đổi thành GTG, nhờ đó giảm biểu hiện của protein pyruvat dehydrogenaza. Theo phương án khác, như trình tự của gen pyruvat dehydrogenaza

được đột biến trong vi sinh vật, vi sinh vật có thể biểu hiện đột biến pyruvat dehydrogenaza có hoạt tính suy giảm hơn hoạt tính của protein kiểu dại, trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 432 hoặc 435 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 được thay thế bằng axit amin khác. Cụ thể, đột biến pyruvat dehydrogenaza có hoạt tính suy giảm hơn hoạt tính của protein kiểu dại có thể bao gồm trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, cụ thể, hoạt tính của xitrat synthaza trong vi sinh vật có thể giảm so với hoạt tính của chủng kiểu dại tự nhiên, chủng bố mẹ trước khi đột biến, hoặc chủng có protein không biến đổi. Theo một phương án, vi sinh vật có thể không có hoạt tính của protein xitrat synthaza do xóa gen xitrat synthaza, hoặc có thể có hoạt tính suy giảm hoặc có thể có hoạt tính suy giảm như trình tự mã hóa codon khởi đầu của gen xitrat synthaza được biến đổi thành GTG, nhờ đó giảm biểu hiện của protein xitrat synthaza. Theo phương án khác, như trình tự của gen xitrat synthaza được đột biến trong vi sinh vật, vi sinh vật có thể biểu hiện đột biến xitrat synthaza có hoạt tính giảm hơn hoạt tính của protein kiểu dại, trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 241 hoặc 312 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 4 được thay thế bằng axit amin khác. Cụ thể, đột biến xitrat synthaza có hoạt tính giảm hơn hoạt tính của protein kiểu dại có thể bao gồm trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 7 hoặc SEQ ID NO: 8, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Thuật ngữ ‘thay thế bằng axit amin khác’ không bị giới hạn miễn là axit amin trước khi thay thế được thế bằng axit amin khác. Cụ thể, nó có thể được thay thế bằng bất kỳ một axit amin được chọn từ lysin, histidin, glutamic axit, aspartic axit, glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tryptophan, prolin, serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, arginin và glutamin.

Cụ thể hơn là, pyruvat dehydrogenaza có hoạt tính suy giảm có thể là pyruvat dehydrogenaza trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 432 hoặc 435 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 với axit amin không phân cực.

Ngoài ra, cụ thể hơn là, xitrat synthaza có hoạt tính giảm có thể là xitrat synthaza trong đó axit amin tương ứng với vị trí thứ 241 hoặc 312 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 4 được thay thế bằng axit amin phân cực hoặc

không phân cực.

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

Theo sáng chế, có thể sử dụng cách đánh số cụ thể các vị trí gốc axit amin trong protein được sử dụng ở đây. Ví dụ, có thể đánh số lại các vị trí gốc axit amin của protein theo sáng chế thành các vị trí tương ứng bằng cách sắp xếp trình tự của protein theo sáng chế với protein đích được so sánh.

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

Sự tương đồng hoặc đồng nhất trình tự của các polynucleotit hoặc polypeptit bảo thủ có thể được xác định bằng các thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn và có thể được sử dụng với hàm phạt khoảng trống dịch chuyển mặc định được thiết lập bởi chương trình được sử dụng. Về cơ bản, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất thông thường được mong muốn lai hóa với toàn bộ hoặc một phần trình tự trong các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc trung bình. Rõ ràng rằng sự lai hóa với các polynucleotit chứa codon thông thường hoặc các codon thoái biến trong lai hóa các polynucleotit cũng được bao gồm.

Ví dụ, bất kỳ hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng thuật toán máy tính đã biết như thuật toán “FASTA” (Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444) bằng cách sử dụng các thông số mặc định. Thay vào đó, có thể xác định bằng thuật toán Needleman–Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443–453) được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình Needleman của gói Bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu (The European Molecular Biology Open Software Suite: EMBOSS) (Rice et al., 2000, Trends Genet. 16:276–277) (tốt hơn là, phiên bản 5.0.0 hoặc cao hơn) (gói chương trình GCG (Devereux, J. et al., Axit nucleics Research

12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F., et al., J MOLEC BIOL 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, và [CARILLO ETA/](1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Ví dụ, sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng BLAST hoặc ClustalW của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI).

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa các polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng, ví dụ, chương trình máy tính GAP như Needleman et al., (1970), J Mol Biol. 48:443 như đã đưa ra bởi Smith và Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình máy tính GAP xác định sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất như giá trị thu được bằng cách chia số lượng các ký hiệu được căn chỉnh (tức là, các nucleotit hoặc axit amin) giống nhau cho tổng số ký hiệu trong đoạn ngắn hơn của hai trình tự. Các tham số mặc định cho chương trình GAP có thể bao gồm: (1) ma trận so sánh nhị phân (chứa giá trị 1 cho đồng nhất và 0 cho không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov et al. (1986), Nucl. Acids Res. 14:6745, như được đưa ra bởi Schwartz và Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979) (hoặc ma trận thay thế EDNAFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4)); (2) hàm phạt 3,0 cho mỗi khoảng trống dịch chuyển và hàm phạt bổ sung 0,10 cho mỗi ký hiệu trong mỗi khoảng trống dịch chuyển (hoặc hàm phạt mở khoảng trống dịch chuyển 10 và hàm phạt mở rộng khoảng trống dịch chuyển 0,5); và (3) không có hàm phạt cho các khoảng trống dịch chuyển cuối cùng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể” đề cập đến protein một hoặc nhiều axit amin khác với trình tự đã nêu bằng sự thay thế bảo thủ và/hoặc biến đổi sao cho các chức năng và các đặc tính của protein vẫn giữ lại. Các biến thể này khác với các trình tự đã xác định bằng sự thay thế, xóa hoặc thêm vào một số axit amin. Các biến thể này thường được xác định bằng cách biến đổi một hoặc nhiều trình tự axit amin nêu trên của protein và đánh giá các đặc tính của protein đã biến đổi. Tức là, khả năng của các biến thể có thể được tăng cường, không thay đổi hoặc giảm đi so với protein tự nhiên. Các biến thể khác có thể bao gồm biến thể trong đó một vùng đã được loại bỏ từ đầu N và/hoặc đầu C của protein trưởng thành. Thuật ngữ “biến thể” có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ như biến đổi, protein biến đổi, polypeptit biến đổi, đột

biến, mutein, phân kỳ, biến thể, hoặc tương tự, v.v. miễn là các thuật ngữ được sử dụng để thể hiện sự thay đổi, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Đối với mục đích của sáng chế, biến thể có thể biến thể trong đó hoạt tính protein bị giảm hoặc suy giảm so với hoạt tính của protein kiểu dại hoặc không biến đổi mà không giới hạn ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thay thế bảo thủ” đề cập đến sự thay thế một axit amin bằng axit amin khác có cấu trúc và/hoặc các tính chất hóa học tương tự. Việc thay thế axit amin này thường có thể xảy ra dựa trên sự giống nhau về độ phân cực, điện tích, tính hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng tính của một gốc.

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

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật sản sinh L-valin” đề cập đến vi sinh vật có khả năng sản sinh lượng L-valin dư từ nguồn cacbon trong môi trường so với vi sinh vật kiểu dại hoặc không biến đổi. Ngoài ra, vi sinh vật sản sinh L-valin có thể là vi sinh vật tái tổ hợp. Cụ thể, vi sinh vật không bị giới hạn cụ thể ở loại của nó miễn là có thể sản sinh L-valin, và có thể là vi sinh vật thuộc chi *Enterobacter*, chi *Escherichia*, chi *Erwinia*, chi *Serratia*, chi *Providencia*, chi *Corynebacterium*, và chi *Brevibacterium*. Cụ thể, nó có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* hoặc chi *Escherichia*.

Cụ thể hơn, vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* có thể là *Escherichia coli*, và vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium glutamicum*, và bất kỳ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* hoặc chi *Escherichia* có khả năng tăng sản sinh L-valin, trong đó có thể bao gồm hoạt tính dihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường; và bất kỳ một hoặc nhiều sự kết hợp được chọn từ hoạt tính transaminaza C giảm; hoạt tính pyruvat dehydrogenaza giảm; hoặc hoạt tính xitrat synthaza giảm được đưa vào.

Chủng bố mẹ của vi sinh vật sản sinh L-valin, được biến đổi để có hoạt tính

đihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường; và bất kỳ một hoặc nhiều sự kết hợp được chọn từ (1) đến (3) dưới đây:

- (1) hoạt tính transaminaza C giảm;
- (2) hoạt tính pyruvat dehydrogenaza suy giảm; và
- (3) hoạt tính xitrat synthaza giảm, không bị giới hạn cụ thể miễn là đó là vi sinh vật sản sinh L-valin.

Vi sinh vật sản sinh L-valin có thể là vi sinh vật tự nhiên, hoặc vi sinh vật có khả năng sản sinh L-valin được cải thiện bằng cách chèn gen liên quan đến cơ chế sản xuất L-valin bên ngoài hoặc tăng cường hoặc giảm (làm suy giảm hoặc ức chế) hoạt tính của gen nội sinh.

Theo một phương án, vi sinh vật có thể là vi sinh vật sản sinh L-valin có hoạt tính đihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường so với chủng kiểu đại hoặc chủng bố mẹ trước khi biến đổi, và hoạt tính giảm của transaminaza C so với chủng kiểu đại hoặc chủng bố mẹ trước khi đột biến. Cụ thể, đihydroxy-axit dehydrataza có thể được mã hóa bởi gen *ilvD*, và transaminaza C có thể được mã hóa bởi *avtA* gene. Các gen có thể có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo phương án khác, vi sinh vật có thể là vi sinh vật sản sinh L-valin có hoạt tính đihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường so với chủng kiểu đại hoặc chủng bố mẹ trước khi biến đổi, và hoạt tính suy giảm của pyruvat dehydrogenaza so với chủng kiểu đại hoặc chủng bố mẹ trước khi biến đổi. Cụ thể, đihydroxy axit dehydrataza có thể được mã hóa bởi gen *ilvD*, và pyruvat dehydrogenaza có thể được mã hóa bởi gen *aceE*. Các gen có thể có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo phương án khác nữa, vi sinh vật có thể là vi sinh vật sản sinh L-valin có hoạt tính đihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường so với chủng kiểu đại hoặc chủng bố mẹ trước khi biến đổi, và hoạt tính giảm của xitrat synthaza so với chủng kiểu đại hoặc chủng bố mẹ trước khi biến đổi. Cụ thể, đihydroxy axit dehydrataza có thể được mã hóa bởi gen *ilvD*, và xitrat synthaza có thể được mã hóa bởi gen *gluA*. Các gen có thể có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, tuy nhiên sáng chế

không bị giới hạn ở đây.

Ngoài vi sinh vật nêu trên, vi sinh vật có thể là vi sinh vật sản sinh L-valin trong đó hoạt tính của transaminaza C bị giảm hoặc hoạt tính của pyruvat dehydrogenaza bị giảm so với chủng kiểu đại hoặc chủng bố mẹ trước khi biến đổi, hoặc có thể là vi sinh vật sản sinh L-valin trong đó hoạt tính của transaminaza C bị giảm và hoạt tính của pyruvat dehydrogenaza bị giảm so với chủng kiểu đại hoặc chủng bố mẹ trước khi biến đổi.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp sản sinh L-valin, trong đó phương pháp này bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật sản sinh L-valin, khác biệt ở chỗ có hoạt tính dihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường; và bất kỳ một hoặc nhiều sự kết hợp được chọn từ (1) đến (3) dưới đây:

- (1) hoạt tính transaminaza C giảm;
- (2) hoạt tính pyruvat dehydrogenaza suy giảm; và
- (3) hoạt tính xitrat synthaza giảm.

“L-valin” theo sáng chế có thể bao gồm không chỉ L-valin, mà còn có dạng muối của nó.

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

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “môi trường” đề cập đến hỗn hợp các nguyên liệu chứa các chất dinh dưỡng cần thiết để nuôi cấy vi sinh vật làm các thành phần chính, và môi trường cung cấp các chất dinh dưỡng, và các yếu tố tăng trưởng, cùng với nước cần thiết cho sự tồn tại và tăng trưởng. Cụ thể, môi trường nuôi cấy và các điều kiện nuôi cấy khác được sử dụng cho nuôi cấy vi sinh vật của sáng chế có thể là bất kỳ môi trường nuôi cấy được sử dụng cho nuôi cấy thông thường các vi sinh vật mà không giới hạn ở đây. Tuy nhiên, vi sinh vật của sáng chế có thể được nuôi cấy

trong các điều kiện hiếu khí trong môi trường thông thường chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, hợp chất vô cơ, axit amin, và/hoặc vitamin thích hợp, trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH, v.v..

Theo sáng chế, nguồn cacbon có thể bao gồm các cacbohyđrat, chẳng hạn như glucoza, sacaroza, lactoza, fructoza, sucroza, và maltoza, v.v.; rượu đường, như mannitol, sorbitol, v.v.; các axit hữu cơ, như axit pyruvic, axit lactic, axit xitric, v.v.; các axit amin, như axit glutamic, methionin, lysin, v.v.. Ngoài ra, nguồn cacbon có thể bao gồm các chất dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên như dịch thủy phân tinh bột, mật đường, mật đường đen, cám gạo, sắn, bã mía, và dịch chiết ngô, v.v.. Các cacbohyđrat như glucoza và mật đường đã xử lý trước vô trùng (tức là mật đường được chuyển hóa thành đường giảm) có thể được sử dụng, và ngoài ra, và các nguồn cacbon khác với lượng thích hợp có thể được sử dụng mà không bị giới hạn ở đây. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp ít nhất hai nguồn cacbon, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

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

Nguồn phospho có thể bao gồm monokali phosphat, đibazơ kali phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng, v.v.. Các ví dụ về các hợp chất vô cơ có thể bao gồm clorua natri, clorua canxi, clorua sắt, magie sulfat, sulfat sắt, sulfat mangan, carbonat canxi, v.v.. Ngoài ra, các axit amin, vitamin, và/hoặc các tiền chất thích hợp cũng có thể được bao gồm. Các thành phần hoặc tiền chất cấu tạo này có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy theo mẻ hoặc nuôi cấy liên tục, tuy nhiên các nguồn phospho không bị giới hạn ở đây.

Theo sáng chế, độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng cách thêm vào hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, axit

lưu huỳnh, v.v. trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật theo phương pháp thích hợp. Ngoài ra, việc tạo thành bọt có thể được ngăn chặn trong quá trình nuôi cấy sử dụng chất khử bọt như axit béo polyglycol este. Ngoài ra, khí oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy để duy trì các điều kiện hiếu khí của môi trường nuôi cấy; hoặc khí nitơ, hydro, hoặc khí cacbon đioxit có thể được bơm vào để duy trì điều kiện kỵ khí và vi hiếu khí, mà không cần bơm khí, tuy nhiên khí không bị giới hạn ở đây.

Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy có thể nằm trong khoảng nhiệt độ từ 20°C đến 50°C, tốt hơn là từ 30°C đến 37°C, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây. Việc nuôi cấy có thể được thực hiện cho đến khi thu được lượng sản phẩm mong muốn của các nguyên liệu hữu ích, cụ thể trong khoảng từ 10 đến 100 giờ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

L-valin được sản xuất bằng nuôi cấy theo sáng chế có thể được giải phóng vào môi trường hoặc giữ lại trong các tế bào.

Phương pháp sản xuất L-valin theo sáng chế có thể còn bao gồm bước điều chế vi sinh vật theo sáng chế, bước điều chế môi trường để nuôi cấy chủng, hoặc sự kết hợp của chúng (bất kể theo thứ tự này hoặc bất kỳ thứ tự khác), ví dụ, trước hoặc sau bước nuôi cấy.

Phương pháp sản xuất L-valin theo sáng chế có thể còn bao gồm bước thu hồi L-valin từ môi trường nuôi cấy (môi trường trong đó nuôi cấy phát triển) hoặc vi sinh vật theo sáng chế. Bước thu hồi có thể còn bao gồm sau bước nuôi cấy.

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

thuật.

Ngoài ra, phương pháp sản xuất L-valin theo sáng chế có thể còn bao gồm bước tinh chế, có thể được thực hiện sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Theo một phương án, khi phương pháp sản xuất L-valin theo sáng chế bao gồm cả bước thu hồi và bước tinh chế, bước thu hồi và bước tinh chế có thể được thực hiện liên tục hoặc không liên tục bất kể thứ tự nào hoặc có thể được thực hiện đồng thời, hoặc có thể được tích hợp thành một bước, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo phương pháp của sáng chế, polynucleotit, vectơ, vi sinh vật, L-valin, v.v., đã được mô tả ở các khía cạnh khác nêu trên.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp tăng khả năng sản sinh L-valin, trong đó phương pháp này còn bao gồm biến đổi thành vi sinh vật, khác biệt ở chỗ có hoạt tính dihydroxy-acid dehydrataza được tăng cường; và bất kỳ một hoặc nhiều kết hợp được chọn từ (1) đến (3) dưới đây:

- (1) hoạt tính pyruvat dehydrogenaza giảm;
- (2) hoạt tính pyruvat dehydrogenaza suy giảm; và
- (3) hoạt tính xitrat synthaza giảm.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất việc sử dụng vi sinh vật có hoạt tính dihydroxy-acid dehydrataza được tăng cường; và bất kỳ một hoặc nhiều kết hợp được chọn từ (1) đến (3) dưới đây:

- (1) hoạt tính transaminaza C giảm;
- (2) hoạt tính pyruvat dehydrogenaza suy giảm; và
- (3) hoạt tính xitrat synthaza giảm.

Các ví dụ của sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ là các ví dụ được ưu tiên nhằm mục đích minh họa, và do đó, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn ở đây hoặc bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1: Điều chế chủng gốc sản sinh valin và đánh giá chủng này

Một loại đột biến [ilvN(A42V)]; Biotechnology và Bioprocess Engineering, tháng

6 năm 2014, tập 19, phát hành lần 3, các trang 456-467] được đưa vào các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại và ATCC13869 để điều chế chủng có khả năng sản sinh L-valin được tăng cường.

Cụ thể, bộ gen ADN của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại được tách chiết bằng cách sử dụng bộ kit mini tách chiết G-spin Total ADN (intron, Cat. No 17045) theo cách thức đã đưa ra trong bộ kit. PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10 và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12 dựa trên bộ gen ADN làm mạch khuôn để thu được đoạn gen 537 bp tương ứng. Các điều kiện PCR như sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, và sau đó 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; ủ để gắn mồi 55°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, tiếp theo kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút.

PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên hai đoạn thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 12 để thu được sản phẩm PCR 1044 bp (sau đây được gọi là “đoạn được đưa vào đột biến 2”).

Sau đó, đoạn được đưa vào đột biến 2 thu được được xử lý với enzym giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MaA), và sau đó được gắn vào vector pDZ, đã được xử lý với cùng một enzym giới hạn, sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA) để điều chế vector chứa đoạn được đưa vào đột biến 2. Vector để đưa đột biến A42V vào gen *ilvN* được đặt tên là pDZ-*ilvN*(A42V).

Bảng 1

Các đoạn mồi	Các trình tự nucleotit	SEQ ID NO:
Đoạn mồi 1	AATTTCTAGAGGCAGACCCTATTCTATGAAGG	9
Đoạn mồi 2	AGTGTTTCGGTCTTTACAGACACGAGGGAC	10
Đoạn mồi 3	GTCCCTCGTGTCTGTAAAGACCGAAACACT	11
Đoạn mồi 4	AATTTCTAGACGTGGGAGTGTCACCTCGCTTGG	12

Sau đó, pDZ-*ilvN*(A42V) được biến nạp vào từng chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại và chủng ATCC13869 để tạo ra tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể (van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999). Các chủng đã đưa vào với vector trên nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp các trình tự tương đồng được chọn trong môi trường chứa 25 mg/L kanamycin.

Tiếp theo, các đoạn gen được khuếch đại dựa trên các thể biến nạp *Corynebacterium glutamicum* đã chọn ở trên bằng PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 21, và việc đưa vào đột biến được xác nhận bằng cách phân tích trình tự. Các chủng tái tổ hợp được đặt tên tương ứng là *Corynebacterium glutamicum* CJ7V và CJ8V.

Thử nghiệm về độ chuẩn lên men được tiến hành dựa trên *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại và ATCC13869, và các chủng CJ7V và CJ8V đã điều chế ở trên. Mỗi chủng được nuôi cấy truyền trong môi trường dinh dưỡng, và sau đó được cấy chuyển vào trong bình tam giác 250 ml chứa 25 ml môi trường sản xuất và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 30°C trong 72 giờ ở tốc độ 200 vòng/phút. Sau đó, nồng độ của L-valin được phân tích sử dụng HPLC, và nồng độ phân tích L-valin được thể hiện ở bảng 2 dưới đây.

Môi trường dinh dưỡng (độ pH 7,2)

Glucosa 10 g, cao thịt 5 g, polypepton 10 g, natri clorua 2,5 g, dịch chiết nấm men 5 g, aga 20 g, ure 2 g (trong 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)>

Glucosa 100 g, (NH₄)₂SO₄ 40 g, protein đậu nành 2,5 g, dịch chiết ngô 5 g, ure 3 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, biotin 100 µg, thiamin-HCl 1 mg, canxi-pantothenic axit 2 mg, nicotinamit 3 mg, CaCO₃ 30 g (trong 1 L nước cất)

Bảng 2

Các chủng	OD600	Valin (g/L)
ATCC14067	95	1,5
CJ7V	77	2,2
ATCC13869	115	1,0
CJ8V	89	1,9

Như được thể hiện trong các kết quả ở trên, xác nhận rằng khả năng sản sinh L-valin tăng lên trong các chủng CJ7V và CJ8V được đưa vào với đột biến gen *ilvN*(A42V) so với các chủng kiểu dại *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 và ATCC13869.

Ví dụ 2: Điều chế các chủng có khả năng sản sinh valin cao và đánh giá chủng

này

Ví dụ 2-1. Điều chế các chủng được tăng cường gen *ilvD* sinh tổng hợp valin và đánh giá chủng này

Vector pDZ-Pcj7-*ilvD* để thay thế vùng gen khởi động của gen *ilvD* được điều chế sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16, và SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 để điều chế chủng có khả năng sản sinh valin cao, trong đó biểu hiện của gen *ilvD* sinh tổng hợp valin được tăng cường.

Bảng 3

Các trình tự đoạn mồi để điều chế các vector được tăng cường *ilvD*

Các đoạn mồi	Các trình tự nucleotit	SEQ ID NO:
Đoạn mồi 5	TTCGAGCTCGGTACCCGGTCTAGAGCACTTTCGCTCGCACC	13
Đoạn mồi 6	GATTTGAAAAGCGCATCAGAAACATCCCAGCGCTAC	14
Đoạn mồi 7	GTAGCGCTGGGATGTTTCTGATGCGCTTTTCAAATC	15
Đoạn mồi 8	GAAACACTATGATCCCACTTCGTTCAAAAGTCAACACCGTC	16
Đoạn mồi 9	GACGGTGGTGACTTTTGAACGAAGTGGGATCATAGTGTTTC	17
Đoạn mồi 10	GCATGCCTGCAGGTCTAGAGCGTGTGCAACGCCGTC	18

Cụ thể, để điều chế pDZ-Pcj7-*ilvD*, PCR được thực hiện sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16, và SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 dựa trên bộ gen ADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại làm mạch khuôn để thu được đoạn gen tương ứng. Các điều kiện PCR như sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, và sau đó 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; ủ để gắn mồi 55°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, tiếp theo kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút.

PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên các đoạn thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 18 để thu được đoạn được đưa vào đột biến 3. Sau đó, đoạn được đưa vào đột biến 3 thu được được xử

lý với enzym giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MaA), và sau đó được gắn vào vector pDZ, đã được xử lý với cùng enzym giới hạn, sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA) để điều chế vector, được đặt tên là pDZ-Pcj7-ilvD.

Sau đó, pDZ-Pcj7-ilvD đã điều chế ở trên được biến nạp vào từng CJ7V, CJ8V, và KCCM11201P, là các chủng gốc sản sinh valin, để tạo ra tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể (van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999). Các chủng đã đưa vào với vector trên nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp các trình tự tương đồng được chọn trong môi trường chứa 25 mg/L kanamycin. Tiếp theo, các đoạn gen được khuếch đại dựa trên các thể biến nạp *Corynebacterium glutamicum* đã chọn ở trên bằng PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 18, và việc đưa vào đột biến được xác nhận bằng phân tích trình tự gen. Các chủng tái tổ hợp đã chọn được đặt tên tương ứng là *Corynebacterium glutamicum* CJ7V:ilvD, CJ8V:ilvD, KCCM11201P:ilvD. Độ chuẩn lên men của các chủng được tăng cường gen ilvD đã chọn được thực hiện theo cách giống như trong ví dụ 1 và các kết quả được thể hiện dưới đây.

Bảng 4

Khả năng sản sinh L-valin của các chủng được tăng cường ilvD

Các chủng	OD600	Valin (g/L)
CJ7V	77	2,2
CJ7V:ilvD	73	2,6
CJ8V	89	1,9
CJ8V:ilvD	88	2,2
KCCM11201P	62	2,6
KCCM11201P:ilvD	60	2,9

Như được thể hiện trong các kết quả bên trên, khi ilvD, một trong số các gen tổng hợp valin được tăng cường, xác nhận rằng khả năng sản sinh valin của tất cả các chủng CJ7V, CJ8V và KCCM11201P sản sinh valin được tăng cường.

Ví dụ 2-2. Điều chế các chủng bị suy giảm alg và xóa avtA và đánh giá chủng này

Để điều chế các chủng có khả năng sản sinh valin cao, nỗ lực đã được thực hiện để làm suy giảm (biến đổi codon khởi động của gen avtA với GTG) hoặc xóa avtA.

Theo đó, vector để điều chế chủng suy giảm avtA (biến đổi codon khởi động của gen avtA với GTG) được điều chế sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20, và SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22 dưới đây, và vector để điều chế hoạt tính xóa avtA; sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24, và SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26 dưới đây, được đặt tên là tương ứng pDZ-avtA(A1g) và pDZ-avtA(del).

Cụ thể, để điều chế vector suy giảm avtA (pDZ-avtA(A1g)), PCR được thực hiện sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20, và SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22, dựa trên bộ gen ADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu đại làm mạch khuôn. Các điều kiện PCR như sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, và sau đó 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; ủ để gắn mồi 55°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, tiếp theo kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên từng đoạn thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 22 để thu được đoạn được đưa vào đột biến 4. Sau đó, đoạn thu được đã đưa vào đột biến 4 được xử lý với enzym giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA), và sau đó được gắn vào vector pDZ, được xử lý với cùng enzym giới hạn, sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA) để điều chế vector pDZ-avtA(A1g) ADN.

Để điều chế vector (pDZ-avtA(del)) xóa avtA, PCR được thực hiện sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24, và SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26, dựa trên bộ gen ADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu đại làm mạch khuôn. Các điều kiện PCR như sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, và sau đó 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; ủ để gắn mồi 55°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, tiếp theo kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên từng đoạn thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 26 để thu được đoạn được đưa vào đột biến 5. Sau đó, đoạn được đưa vào đột biến 5 thu được được xử lý với enzym giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA), và sau đó được gắn vào vector pDZ, đã được xử lý với cùng enzym giới hạn, sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA) để điều chế vector pDZ-avtA(del).

Bảng 5

Các trình tự đoạn môi để điều chế các vector của các chủng suy giảm hoặc xóa avtA

Các đoạn môi	Các trình tự nucleotit	SEQ ID NO:
Đoạn môi 11	GCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGACCGCTTCC TTGGCTGCCTGAAGATG	19
Đoạn môi 12	TGCTTGGCTTCACAAGAGACAAGCCT	20
Đoạn môi 13	AGGCTTGTCTCTTGTGAAGCCAAGCA	21
Đoạn môi 14	GCCTGCAGGTTCGACCTAGATCTAGACCTCATCA GAGATAAGAACAGCATC	22
Đoạn môi 15	GCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGATACTCCGG TCTGCTTTATGCAGGTA	23
Đoạn môi 16	AACTAACCTAGTCGCTTAAGAGACAAGCCTATC TGC	24
Đoạn môi 17	GCAGATAGGCTTGTCTCTTAAGCGACTAGGTTA GTT	25
Đoạn môi 18	GCCTGCAGGTTCGACCTAGATCTAGAAAGTGCC ACGAGCATTTTCATCAGCT	26

Sau đó, pDZ-avtA(del) và pDZ-avtA(A1g) được biến nạp vào từng CJ7V:ilvD, CJ8V:ilvD, và KCCM11201P:ilvD, là các chủng sản sinh valin, để tạo ra tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể (van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999). Các chủng đã đưa vào với các vector trên nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp các trình tự tương đồng được chọn trong môi trường chứa 25 mg/L kanamycin.

Tiếp theo, các đoạn gen được khuếch đại dựa trên các thể biến nạp *Corynebacterium glutamicum* đã chọn ở trên bằng PCR sử dụng các cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24, và SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26, và việc đưa vào đột biến được xác nhận bằng phân tích trình tự gen theo cách giống như trong ví dụ 1. Các chủng tái tổ hợp được đặt tên là *Corynebacterium glutamicum* CJ7V:ilvD-avtA(del), CJ7V:ilvD-avtA (a1g), CJ8V:ilvD-avtA(del), CJ8V:ilvD-avtA (a1g), KCCM11201P:ilvD-avtA(del), và KCCM11201P:ilvD-avtA (a1g) như được thể hiện dưới đây, và đánh giá độ chuẩn được thực hiện theo cách giống như trong ví dụ 1.

Bảng 6

Khả năng sản sinh L-valin của các chủng suy giảm hoặc xóa avtA

Các chủng	OD600	Valin (g/L)
CJ7V:ilvD	73	2,6
CJ7V:ilvD-avtA(del)	71	2,8
CJ7V:ilvD-avtA(a1g)	73	2,6
CJ8V:ilvD	89	1,9
CJ8V:ilvD-avtA(del)	86	2,1
CJ8V:ilvD-avtA(a1g)	89	2,0
KCCM11201P:ilvD	60	2,9
KCCM11201P:ilvD-avtA(del)	57	3,2
KCCM11201P:ilvD-avtA (a1g)	60	2,9

Như được thể hiện trong các kết quả bên trên, khi avtA bị xóa, khả năng sản sinh valin được tăng cường, và khi biểu hiện avtA bị suy giảm, khả năng sản sinh valin tăng lên trong chủng CJ8V:ilvD-avtA (alg) so với chủng CJ8V:ilvD, thể hiện mức khả năng sản sinh valin cao hơn hoặc bằng so với các chủng được tăng cường ilvD. Xác nhận rằng khả năng sản sinh valin được tăng cường trong tất cả các trường hợp của các chủng được tăng cường ilvD, và các chủng suy giảm hoặc xóa avtA so với các chủng CJ7V, CJ8V và KCCM11201P như được thể hiện ở bảng 4.

Ví dụ 2-3. Điều chế các chủng (a1g, Q432A, K435A) suy giảm hoặc xóa aceE và đánh giá chủng này

Để điều chế các chủng có khả năng sản sinh valin cao, nỗ lực được thực hiện để làm suy giảm hoặc xóa aceE. Theo đó, để điều chế các chủng suy giảm aceE, vector để điều chế chủng, trong đó codon khởi động của gen aceE được biến đổi thành GTG, được điều chế sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28, và SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30, vector để điều chế chủng aceE(Q432A) được điều chế sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 32, và SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 36, và vector để điều chế chủng aceE(K435A) được điều chế sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 34, và SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36. Ngoài ra, vector để điều chế chủng xóa aceE (aceE(del)) được điều chế sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 37 và SEQ ID NO: 38, và SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 40. Do đó, các vector đã điều chế được đặt tên tương ứng là pDZ-aceE(A1g), pDZ-aceE(Q432A), pDZ-aceE(K435A), và pDZ-aceE(del).

Cụ thể, để điều chế vector làm suy giảm codon khởi động của aceE, PCR được thực hiện sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28, và SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30, dựa trên bộ gen ADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại làm mạch khuôn. Các điều kiện PCR như sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, và sau đó 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; ủ để gắn mồi 55°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, tiếp theo kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên từng đoạn thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 30 để thu được đoạn được đưa vào đột biến 6. Sau đó, đoạn được đưa vào đột biến 6 thu được được xử lý với enzym giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA), và sau đó được gắn vào vector pDZ, đã được xử lý với cùng enzym giới hạn, sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA) để điều chế vector pDZ-aceE(A1g) ADN.

Để điều chế vector đưa vào đột biến aceE(Q432A), PCR được thực hiện sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28, và SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 36, dựa trên bộ gen ADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại làm mạch khuôn. Các điều kiện PCR như sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, và sau đó 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; ủ để gắn mồi 55°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, tiếp theo kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên từng đoạn thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NOS: 27 và 36 để thu được đoạn được đưa vào đột biến 7. Sau đó, đoạn được đưa vào đột biến 7 thu được được xử lý với enzym giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA), và sau đó được gắn vào vector pDZ, đã được xử lý với cùng enzym giới hạn, sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA) để điều chế vector pDZ-aceE(Q432A) ADN.

Để điều chế vector đưa vào đột biến aceE(K435A), PCR được thực hiện sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 34, và SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36, dựa trên bộ gen ADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại làm mạch khuôn. Các điều kiện PCR như sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, và sau đó 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; ủ để gắn mồi 55°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây,

tiếp theo kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên từng đoạn thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 36 để thu được đoạn được đưa vào đột biến 8. Sau đó, đoạn được đưa vào đột biến 8 thu được được xử lý với XbaI enzyme giới hạn (New England Biolabs, Beverly, MA), và sau đó được gắn vào vector pDZ, đã được xử lý với cùng enzyme giới hạn, sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA) để điều chế vector pDZ-aceE(K435A) ADN.

Để điều chế vector đưa vào đột biến aceE(del), PCR được thực hiện sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 37 và SEQ ID NO: 38, và SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 40, dựa trên bộ gen ADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại làm mạch khuôn. Các điều kiện PCR như sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, và sau đó 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; ủ để gắn mồi 55°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, tiếp theo kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên từng đoạn thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NOS: 37 và 40 để thu được đoạn được đưa vào đột biến 9. Sau đó, đoạn được đưa vào đột biến 9 thu được được xử lý với enzyme giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA), và sau đó được gắn vào vector pDZ, đã được xử lý với cùng enzyme giới hạn, sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA) để điều chế vector pDZ-aceE(del) ADN.

Bảng 7

Các trình tự đoạn mồi để điều chế các vector của các chủng suy giảm và xóa aceE và

Các đoạn mồi	Các trình tự nucleotit	SEQ ID NO:
Đoạn mồi 19	GCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGATACCGTC CAACCGGTACTTTGAACC	27
Đoạn mồi 20	TTGATCGGCCACTTCCACAC	28
Đoạn mồi 21	GGTGTGGAAGTGGCCGATCAA	29
Đoạn mồi 22	GCCTGCAGGTCGACCTAGATCTAGAGATCGTC TTCAGAAAGGCGACCCTC	30
Đoạn mồi 23	GCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAACCGTGG CATCAAGGACACCTCTGA	31
Đoạn mồi 24	AGCTTCTTCATTGCGTGGGTTG	32

Đoạn mồi 25	CAACCCACGCAATGAAGAAGCT	33
Đoạn mồi 26	AAGCGTCAGTGCCTTCATCTG	34
Đoạn mồi 27	CCAGATGAAGGCACTGACGCTT	35
Đoạn mồi 28	GCCTGCAGGTGCGACCTAGATCTAGAAGATGG AGTCACCGGTGCGCTGGAA	36
Đoạn mồi 29	GCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAACCTTTC CCTGGAATTTTTTCCTT	37
Đoạn mồi 30	TGTCCCTTGAGGTGATTTCACACCTCCTGTTG GAATG	38
Đoạn mồi 31	TCCAACAGGAGGTGTGGAAATCACCTCAAGG GACAGA	39
Đoạn mồi 32	GCCTGCAGGTGCGACCTAGATCTAGATGCTGCG CGGCAAGCGCCGTGGATT	40

Sau đó, pDZ-aceE(del), pDZ-aceE(A1g), pDZ-aceE(Q432A), và pDZ-aceE(K435A) được biến nạp vào từng CJ7V:ilvD, CJ8V:ilvD, và KCCM11201P:ilvD, là các chủng sản sinh valin, để tạo ra tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể (van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999). Các chủng đã đưa vào với các vector trên nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp các trình tự tương đồng được chọn trong môi trường chứa 25 mg/L kanamycin.

Tiếp theo, các đoạn gen được khuếch đại dựa trên các thể biến nạp *Corynebacterium glutamicum* đã chọn ở trên bằng PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 36, và việc đưa vào đột biến được xác nhận bằng phân tích trình tự gen. Các chủng tái tổ hợp được đặt tên là *Corynebacterium glutamicum* CJ7V:ilvD-aceE(del), CJ7V:ilvD-aceE (a1g), CJ7V:ilvD-aceE(Q432A), CJ7V:ilvD-aceE(K435A), CJ8V:ilvD-aceE(del), CJ8V:ilvD-aceE (a1g), CJ8V:ilvD-aceE(Q432A), CJ8V:ilvD-aceE(K435A), KCCM11201P:ilvD-aceE(del), KCCM11201P:ilvD-aceE(a1g), KCCM11201P:ilvD-aceE(Q432A), và KCCM11201P:ilvD-aceE(K435A) như được thể hiện dưới đây, và đánh giá độ chuẩn được thực hiện theo cách giống như trong ví dụ 1.

Bảng 8

Khả năng sản sinh L-valin của các chủng suy giảm và xóa aceE

Các chủng	OD600	Valin (g/L)
CJ7V:ilvD	73	2,6
xóa CJ7V:ilvD-aceE	21	1,1

suy giảm CJ7V:ilvD-aceE (a1g)	69	2,8
suy giảm CJ7V:ilvD-aceE (Q432A)	59	2,7
suy giảm CJ7V:ilvD-aceE (K435A)	62	3,0
CJ8V:ilvD	89	1,9
xóa CJ8V:ilvD-aceE	29	1,1
suy giảm CJ8V:ilvD-aceE (a1g)	87	2,0
suy giảm CJ8V:ilvD-aceE (Q432A)	77	2,1
suy giảm CJ8V:ilvD-aceE (K435A)	81	2,4
KCCM11201P:ilvD	60	2,9
xóa KCCM11201P:ilvD-aceE	13	1,0
suy giảm KCCM11201P:ilvD-aceE (a1g)	59	3,0
suy giảm KCCM11201P:ilvD-aceE (Q432A)	43	2,9
suy giảm KCCM11201P:ilvD-aceE (K435A)	53	3,4

Như được thể hiện trong các kết quả bên trên, ngoài ra, khi aceE bị xóa trong các chủng có hoạt tính của dihydroxy-acid dehydratase (ilvD) được tăng cường, mức độ tăng trưởng và tiêu thụ đường giảm nhanh chóng, dẫn đến khả năng sản sinh valin giảm. Trong khi đó, đối với trường hợp các chủng với aceE suy giảm, xác nhận rằng mức độ tăng trưởng và tiêu thụ đường là không đáng kể và khả năng sản sinh valin tăng lên, mặc dù có sự khác biệt theo mức độ suy giảm.

Ví dụ 2-4. Điều chế các chủng suy giảm gltA (a1g, N241T, M312I) và đánh giá chủng này

Để điều chế các chủng có khả năng sản sinh valin cao, nỗ lực đã được thực hiện để làm suy giảm gltA. Theo đó, vector để điều chế chủng suy giảm gltA, trong đó codon khởi động của gen gltA được biến đổi với GTG, được điều chế sử dụng các cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 42, và SEQ ID NO: 43 và SEQ ID NO: 44, vector để điều chế chủng gltA(N241T) được điều chế sử dụng các cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 46, và SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 50, và vector để điều chế chủng gltA(M312I) được điều chế sử dụng các cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 48, và SEQ ID NO: 49 và SEQ ID NO: 50. Sau đó, các vector đã điều chế được đặt tên tương ứng là pDZ-gltA(A1g), pDZ-gltA(N241T), và pDZ-gltA(M312I).

Để điều chế vector đưa vào đột biến làm suy giảm codon khởi động gltA, PCR được thực hiện sử dụng các cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 41 và SEQ ID

NO: 42, và SEQ ID NO: 43 và SEQ ID NO: 44, dựa trên bộ gen ADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu đại làm mạch khuôn. Các điều kiện PCR như sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, và sau đó 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; ủ để gắn mồi 55°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, tiếp theo kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên từng đoạn (A, B) thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 44 để thu được đoạn được đưa vào đột biến 10. Sau đó, đoạn được đưa vào đột biến 10 thu được được xử lý với enzym giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA), và sau đó được gắn vào vector pDZ, đã được xử lý với cùng enzym giới hạn, sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA) để điều chế vector pDZ-gltA(A1g) ADN.

Để điều chế vector đưa vào đột biến gltA(N241T), PCR được thực hiện sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 46, và SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 50, dựa trên bộ gen ADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu đại làm mạch khuôn. Các điều kiện PCR như sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, và sau đó 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; ủ để gắn mồi 55°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, tiếp theo kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên từng đoạn (A, B) thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 50 để thu được đoạn được đưa vào đột biến 11. Sau đó, đoạn được đưa vào đột biến 11 thu được được xử lý với enzym giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA), và sau đó được gắn vào vector pDZ, đã được xử lý với cùng enzym giới hạn, sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA) để điều chế vector pDZ-gltA(N241T) ADN.

Để điều chế vector đưa vào đột biến gltA(M312I), PCR được thực hiện sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 48, và SEQ ID NOS: 49 và SEQ ID NO: 50, dựa trên bộ gen ADN của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu đại làm mạch khuôn. Các điều kiện PCR như sau: biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, và sau đó 25 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây; ủ để gắn mồi 55°C trong 30 giây; và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây, tiếp theo kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên từng đoạn (A, B) thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận

biết SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 50 để thu được đoạn được đưa vào đột biến 12. Sau đó, đoạn được đưa vào đột biến 12 thu được được xử lý với enzym giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MaA), và sau đó được gắn vào vector pDZ, đã được xử lý với cùng enzym giới hạn, sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA) để điều chế vector pDZ-gltA(M312I) ADN.

Bảng 9

Các trình tự đoạn môi để điều chế các vector của các chủng suy giảm gltA

Các đoạn môi	Các trình tự nucleotit	SEQ ID NO:
Đoạn môi 37	GCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAACCCTGAA GCTGTCAGTTCCTAGCA	41
Đoạn môi 38	CCCTTTCAAACACATTTGTTC	42
Đoạn môi 39	CGAACAAATGTGTTTGAAAGGG	43
Đoạn môi 40	GCCTGCAGGTCGACCTAGATCTAGATGCGCGGT GTGCGTACGCAGCCAGC	44
Đoạn môi 41	GCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGATATGTGAG CACTGGCTCTACCGAGT	45
Đoạn môi 42	AGGTGGAGCAGGTCTGCTCGTG	46
Đoạn môi 43	CACGAGCAGACCTGCTCCACCT	47
Đoạn môi 44	TGTCCGAAGCCGATGAGGCGGAC	48
Đoạn môi 45	CGTCCGCCTCATCGGCTTCGGACA	49
Đoạn môi 46	GCCTGCAGGTCGACCTAGATCTAGAGTCAGAGA TTACGAGATCTTCCGGT	50

Sau đó, pDZ-gltA(A1g), pDZ-gltA(N241T), và pDZ-gltA(M312I) được biến nạp vào từng CJ7V:ilvD, CJ8V:ilvD, và KCCM11201P:ilvD, là các chủng sản sinh valin, để tạo ra tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể (van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999). Các chủng đã đưa vào với các vector trên nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp các trình tự tương đồng được chọn trong môi trường chứa 25 mg/L kanamycin.

Tiếp theo, các đoạn gen được khuếch đại dựa trên các thể biến nạp *Corynebacterium glutamicum* đã chọn ở trên bằng PCR sử dụng cặp môi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 50, và việc đưa vào đột biến được xác nhận bằng phân tích trình tự gen. Các chủng tái tổ hợp được đặt tên là *Corynebacterium glutamicum* CJ7V:ilvD-gltA (a1g), CJ7V:ilvD-gltA(N241T), CJ7V:ilvD-gltA(M312I), CJ8V:ilvD-gltA(a1g), CJ8V:ilvD-gltA(N241T), CJ8V:ilvD-gltA(M312I),

KCCM11201P:ilvD-gltA(a1g), KCCM11201P:ilvD-gltA(N241T), và KCCM11201P:ilvD-gltA(M312I), và đánh giá độ chuẩn được thực hiện theo cách giống như trong ví dụ 1.

Bảng 10

Khả năng sản sinh L-valin của các chủng suy giảm gltA

Các chủng	OD600	Valin (g/L)
CJ7V:ilvD	73	2,6
CJ7V:ilvD-gltA(a1g)	69	2,7
CJ7V:ilvD-gltA(N241T)	61	2,8
CJ7V:ilvD-gltA(M312I)	63	2,8
CJ8V:ilvD	89	1,9
CJ8V:ilvD-gltA(a1g)	87	1,9
CJ8V:ilvD-gltA(N241T)	80	2,2
CJ8V:ilvD-gltA(M312I)	81	2,1
KCCM11201P:ilvD	60	2,9
KCCM11201P:ilvD-gltA(a1g)	59	3,0
KCCM11201P:ilvD-gltA(N241T)	51	3,2
KCCM11201P:ilvD-gltA(M312I)	55	3,1

Như được thể hiện trong các kết quả bên trên, khi gltA bị suy giảm trong các chủng có hoạt tính của dihydroxy-acit dehydrataza (ilvD) được tăng cường, xác nhận rằng mức độ tăng trưởng và tiêu thụ đường không đáng kể và khả năng sản sinh valin tăng lên, mặc dù có sự khác biệt theo mức độ suy giảm.

Ví dụ 2-5. Điều chế sự kết hợp của các chủng đối với các tính trạng đột biến hiệu quả và đánh giá chủng này

Từ các kết quả đã xác nhận trong các ví dụ 2-2 đến ví dụ 2-4, nỗ lực để xác định xem có hiệu ứng hiệp đồng trên về khả năng sản sinh valin hay không khi các đột biến khác nhau được kết hợp. Các vector pDZ-avtA(del) và pDZ-aceE(K435A) được biến nạp vào từng chủng CJ7V:ilvD-gltA (N241T) suy giảm, CJ8V:ilvD-gltA (N241T) suy giảm, và KCCM11201P:ilvD-gltA (N241T) suy giảm, là các chủng sản sinh valin đã điều chế ở ví dụ 2-4 (van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999). Các chủng được đưa vào với các vector trên nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp các trình tự tương đồng được chọn trong môi trường chứa 25 mg/L kanamycin.

Sau đó, các đoạn gen được khuếch đại dựa trên các thể biến nạp *Corynebacterium glutamicum*, trong đó tái hợp thứ cấp đã hoàn thành, bằng PCR sử dụng các cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 26, và SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 36, và sau đó các chủng được đưa vào đột biến được xác nhận bằng phân tích trình tự gen. Các chủng tái tổ hợp được đặt tên như thể hiện dưới đây, và đánh giá độ chuẩn được thực hiện theo cách giống như trong ví dụ 1.

Bảng 11

Khả năng sản sinh L-valin của sự kết hợp hiệu quả của các chủng

Các chủng	OD600	Valin (g/L)
suy giảm CJ7V:ilvD-gltA (N241T)	61	2,8
suy giảm CJ7V:ilvD-gltA (N241T)-suy giảm aceE (K435A)	59	3,2
suy giảm CJ7V:ilvD-gltA (N241T)-xóa avtA (del)	62	3,0
suy giảm CJ8V:ilvD-gltA (N241T)	80	2,2
suy giảm CJ8V:ilvD-gltA (N241T)-suy giảm aceE (K435A)	78	2,6
suy giảm CJ8V:ilvD-gltA (N241T)-xóa avtA (del)	83	2,5
suy giảm KCCM11201P:ilvD-gltA (N241T)	51	3,2
suy giảm KCCM11201P:ilvD-gltA (N241T)-suy giảm aceE (K435A)	50	3,6
suy giảm KCCM11201P:ilvD-gltA (N241T)-xóa avtA(del)	52	3,6

Như được thể hiện trong các kết quả bên trên, xác nhận rằng khi các chủng suy giảm aceE và các chủng xóa avtA được đưa vào các chủng được tăng cường ilvD và suy giảm gltA, mức độ tăng trưởng và tiêu thụ đường ở mức tương đương nhau, và khả năng sản sinh valin được tăng thêm.

Vector pDZ-aceE(K435A) được biến nạp vào chủng suy giảm KCCM11201P:ilvD-gltA (N241T), và chủng được đưa vào với đột biến ace(K435A) trên nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp các trình tự tương đồng được đặt tên là CA08-1592. CA08-1592 đã được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy các vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) theo Hiệp ước Budapest vào ngày 3 tháng 7 năm 2020, với số lưu chủng KCCM12761P.

Từ phần mô tả nêu trên, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện trong các hình thức cụ thể khác mà

không làm thay đổi nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Đối với vấn đề này, các phương án ví dụ được mô tả ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không nên được hiểu là giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngược lại, sáng chế không chỉ bao gồm các phương án ví dụ mà còn các thay đổi, biến đổi, phương án tương đương, và các phương án khác có thể đều thuộc nguyên lý và phạm vi bảo hộ của sáng chế như được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật sản sinh L-valin có hoạt tính đihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường; và bất kỳ một hoặc nhiều kết hợp được chọn từ (1) đến (3) dưới đây:

(1) hoạt tính transaminaza C giảm;

(2) hoạt tính pyruvat dehydrogenaza suy giảm; và

(3) hoạt tính xitrat synthaza giảm.

2. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật có hoạt tính đihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường; và hoạt tính transaminaza C giảm.

3. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật có hoạt tính đihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường; và hoạt tính pyruvat dehydrogenaza suy giảm.

4. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật có hoạt tính đihydroxy-axit dehydrataza được tăng cường; và hoạt tính xitrat synthaza giảm.

5. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật còn có hoạt tính transaminaza C giảm hoặc hoạt tính pyruvat dehydrogenaza suy giảm.

6. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó đihydroxy-axit dehydrataza được mã hóa bởi gen *ilvD*.

7. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó transaminaza C được mã hóa bởi gen *avtA*.

8. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó pyruvat dehydrogenaza được mã hóa bởi gen *aceE*.

9. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó xitrat synthaza được mã hóa bởi gen *gltA*.

10. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó pyruvat dehydrogenaza suy giảm khác biệt ở chỗ axit amin tương ứng với vị trí thứ 432 hoặc 435 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 3 được thay thế bằng axit amin khác.

11. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó xitrat synthaza giảm khác biệt ở chỗ axit amin tương ứng với vị trí thứ 241 hoặc 312 từ đầu N của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 4 được thay thế bằng axit amin khác.

12. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật sản sinh L-valin là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

13. Vi sinh vật theo điểm 12, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.

14. Phương pháp sản xuất L-valin, trong đó phương pháp này bao gồm nuôi cấy vi sinh vật theo bất kỳ điểm từ 1 đến 13.

15. Phương pháp sản xuất theo điểm 14, trong đó phương pháp này còn bao gồm thu hồi L-valin từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> VI SINH VẬT SẴN SINH L-VALIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-VALIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY
 <130> OPA21084-PCT
 <150> KR 10-2020-0111084
 <151> 2020-09-01
 <160> 50
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 613
 <212> PRT
 <213> Chưa biết
 <220>
 <223> Corynebacterium sp. dihydroxy-axit dehydrataza

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

Thr Cys Gly Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys
 195 200 205
 Leu Thr Glu Ala Leu Gly Leu Ser Leu Pro Gly Asn Gly Ser Thr Leu
 210 215 220
 Ala Thr His Ala Ala Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Ala Gly Glu Thr
 225 230 235 240
 Val Val Glu Leu Cys Arg Arg Tyr Tyr Gly Glu Glu Asp Glu Ser Val
 245 250 255
 Leu Pro Arg Gly Ile Ala Thr Lys Lys Ala Phe Glu Asn Ala Met Ala
 260 265 270
 Leu Asp Met Ala Met Gly Gly Ser Thr Asn Thr Ile Leu His Ile Leu
 275 280 285
 Ala Ala Ala Gln Glu Gly Glu Val Asp Phe Asp Leu Ala Asp Ile Asp
 290 295 300
 Glu Leu Ser Lys Asn Val Pro Cys Leu Ser Lys Val Ala Pro Asn Ser
 305 310 315 320
 Asp Tyr His Met Glu Asp Val His Arg Ala Gly Gly Ile Pro Ala Leu
 325 330 335
 Leu Gly Glu Leu Asn Arg Gly Gly Leu Leu Asn Lys Asp Val His Ser
 340 345 350
 Val His Ser Asn Asp Leu Glu Gly Trp Leu Asp Asp Trp Asp Ile Arg
 355 360 365
 Ser Gly Lys Thr Thr Glu Val Ala Thr Glu Leu Phe His Ala Ala Pro
 370 375 380
 Gly Gly Ile Arg Thr Thr Glu Ala Phe Ser Thr Glu Asn Arg Trp Asp
 385 390 395 400
 Glu Leu Asp Thr Asp Ala Ala Lys Gly Cys Ile Arg Asp Val Glu His
 405 410 415
 Ala Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Leu Val Val Leu Arg Gly Asn Ile Ser
 420 425 430
 Pro Asp Gly Ala Val Ile Lys Ser Ala Gly Ile Glu Glu Glu Leu Trp
 435 440 445
 Asn Phe Thr Gly Pro Ala Arg Val Val Glu Ser Gln Glu Glu Ala Val
 450 455 460
 Ser Val Ile Leu Thr Lys Thr Ile Gln Ala Gly Glu Val Leu Val Val
 465 470 475 480
 Arg Tyr Glu Gly Pro Ser Gly Gly Pro Gly Met Gln Glu Met Leu His
 485 490 495
 Pro Thr Ala Phe Leu Lys Gly Ser Gly Leu Gly Lys Lys Cys Ala Leu
 500 505 510

Ile Thr Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ile Gly
 515 520 525

His Val Ser Pro Glu Ala Ala His Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Glu
 530 535 540

Asn Gly Asp Ile Val Ser Ile Asp Val His Asn Arg Lys Leu Glu Val
 545 550 555 560

Gln Val Ser Asp Glu Glu Leu Gln Arg Arg Arg Asp Ala Met Asn Ala
 565 570 575

Ser Glu Lys Pro Trp Gln Pro Val Asn Arg Asn Arg Val Val Thr Lys
 580 585 590

Ala Leu Arg Ala Tyr Ala Lys Met Ala Thr Ser Ala Asp Lys Gly Ala
 595 600 605

Val Arg Gln Val Asp
 610

<210> 2
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> Corynebacterium sp. transaminaza C

<400> 2
 Met Lys Pro Ser Thr Arg Ser Asn Val Gln Pro Phe Arg Val Met Gln
 1 5 10 15

Met Leu Asp Arg Val His Arg Arg Arg Arg Glu Gly Lys Asp Thr Ile
 20 25 30

Met Phe Cys Ala Gly Gln Pro Ser Thr Gly Ala Pro Glu Ala Val Ile
 35 40 45

Glu Glu Ala Glu Ile Ala Leu Arg Ser Gly Pro Leu Gly Tyr Thr Glu
 50 55 60

Val Ile Gly Asp Arg Glu Phe Arg Glu Arg Ile Ala Asp Trp His Ser
 65 70 75 80

Ala Thr Tyr Asp Val Asp Thr Asn Pro Asp Asn Val Ile Val Thr Thr
 85 90 95

Gly Ser Ser Gly Gly Phe Val Ala Ser Phe Ile Ala Thr Leu Asp His
 100 105 110

Gly Asp Tyr Val Ala Met Pro Thr Pro Gly Tyr Pro Ala Tyr Arg Asn
 115 120 125

Ile Leu Glu Ser Leu Gly Ala Lys Val Leu Asn Leu Arg Cys Thr Ala
 130 135 140

Glu Thr Arg Phe Gln Pro Thr Ala Gln Met Leu Glu Glu Leu Pro His
 145 150 155 160

Lys Pro Lys Ala Val Ile Val Thr Ser Pro Gly Asn Pro Thr Gly Thr
 165 170 175
 Ile Ile Asp Pro Glu Glu Leu Glu Arg Ile Ala Lys Trp Cys Asp Asp
 180 185 190
 Asn Asp Ala Val Leu Ile Ser Asp Glu Asp Tyr His Gly Met Ser Phe
 195 200 205
 Gly Arg Pro Leu Ala Thr Ala His Gln Phe Ser Lys Asn Ala Ile Val
 210 215 220
 Val Gly Thr Leu Ser Lys Tyr Phe Ser Met Thr Gly Trp Arg Val Gly
 225 230 235 240
 Trp Ile Ile Val Pro Asp Glu Leu Val Thr Ser Ile Glu Asn Leu Gln
 245 250 255
 Ala Ser Leu Ser Leu Cys Ala Pro Ala Ile Gly Gln Ala Ala Gly Arg
 260 265 270
 Ala Ala Phe Thr Leu Glu Ala Gly Ala Glu Leu Asp Ala His Val Glu
 275 280 285
 Ala Tyr Arg Glu Ala Arg Glu Val Phe Val Asp Lys Leu Pro Glu Ile
 290 295 300
 Gly Leu Gly Thr Phe Ala Asp Pro Asp Gly Gly Leu Tyr Leu Trp Val
 305 310 315 320
 Asp Val Ser Ala Tyr Thr Asp Asp Ser Glu Glu Trp Val Leu Arg Leu
 325 330 335
 Leu Asp Glu Ala Gly Val Ala Val Ala Pro Gly Val Asp Phe Asp Pro
 340 345 350
 Glu Glu Gly His Lys Trp Ile Arg Leu Ser Leu Cys Ala Ser Lys Glu
 355 360 365
 Asp Thr Ile Glu Gly Val Arg Lys Ile Gly Glu Phe Ile Lys Lys
 370 375 380

<210> 3
 <211> 922
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> Corynebacterium sp. pyruvat dehydrogenaza

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

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

Asp Gly Ala Tyr Val Arg Glu His Phe Phe Gly Arg Asp Pro Arg Thr
 355 360 365
 Ala Lys Leu Val Glu Asn Met Thr Asp Glu Glu Ile Trp Lys Leu Pro
 370 375 380
 Arg Gly Gly His Asp Tyr Arg Lys Val Tyr Ala Ala Tyr Lys Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu Glu Thr Lys Asp Arg Pro Thr Val Ile Leu Ala His Thr Ile Lys
 405 410 415
 Gly Tyr Gly Leu Gly His Asn Phe Glu Gly Arg Asn Ala Thr His Gln
 420 425 430
 Met Lys Lys Leu Thr Leu Asp Asp Leu Lys Leu Phe Arg Asp Lys Gln
 435 440 445
 Gly Ile Pro Ile Thr Asp Glu Gln Leu Glu Lys Asp Pro Tyr Leu Pro
 450 455 460
 Pro Tyr Tyr His Pro Gly Glu Asp Ala Pro Glu Ile Lys Tyr Met Lys
 465 470 475 480
 Glu Arg Arg Ala Ala Leu Gly Gly Tyr Leu Pro Glu Arg Arg Glu Asn
 485 490 495
 Tyr Asp Pro Ile Gln Val Pro Pro Leu Asp Lys Leu Arg Ser Val Arg
 500 505 510
 Lys Gly Ser Gly Lys Gln Gln Ile Ala Thr Thr Met Ala Thr Val Arg
 515 520 525
 Thr Phe Lys Glu Leu Met Arg Asp Lys Gly Leu Ala Asp Arg Leu Val
 530 535 540
 Pro Ile Ile Pro Asp Glu Ala Arg Thr Phe Gly Leu Asp Ser Trp Phe
 545 550 555 560
 Pro Thr Leu Lys Ile Tyr Asn Pro His Gly Gln Asn Tyr Val Pro Val
 565 570 575
 Asp His Asp Leu Met Leu Ser Tyr Arg Glu Ala Pro Glu Gly Gln Ile
 580 585 590
 Leu His Glu Gly Ile Asn Glu Ala Gly Ser Met Ala Ser Phe Ile Ala
 595 600 605
 Ala Gly Thr Ser Tyr Ala Thr His Gly Lys Ala Met Ile Pro Leu Tyr
 610 615 620
 Ile Phe Tyr Ser Met Phe Gly Phe Gln Arg Thr Gly Asp Ser Ile Trp
 625 630 635 640
 Ala Ala Ala Asp Gln Met Ala Arg Gly Phe Leu Leu Gly Ala Thr Ala
 645 650 655
 Gly Arg Thr Thr Leu Thr Gly Glu Gly Leu Gln His Met Asp Gly His
 660 665 670
 Ser Pro Val Leu Ala Ser Thr Asn Glu Gly Val Glu Thr Tyr Asp Pro

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

<210> 4
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> Corynebacterium sp. xitrat synthaza

<400> 4
 Met Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu
 1 5 10 15

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

9

Phe Gln Gly His Ala Ser Pro Gly Met Tyr Ala Arg Ala Phe Met Glu
 165 170 175
 Gly Arg Leu Ser Glu Asp Asp Leu Asp Gly Phe Arg Gln Glu Val Ser
 180 185 190
 Arg Glu Gln Gly Gly Ile Pro Ser Tyr Pro His Pro His Gly Met Lys
 195 200 205
 Asp Phe Trp Glu Phe Pro Thr Val Ser Met Gly Leu Gly Pro Met Asp
 210 215 220
 Ala Ile Tyr Gln Ala Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Glu Asn Arg Gly Ile
 225 230 235 240
 Lys Asp Thr Ser Asp Gln His Val Trp Ala Phe Leu Gly Asp Gly Glu
 245 250 255
 Met Asp Glu Pro Glu Ser Arg Gly Leu Ile Gln Gln Ala Ala Leu Asn
 260 265 270
 Asn Leu Asp Asn Leu Thr Phe Val Val Asn Cys Asn Leu Gln Arg Leu
 275 280 285
 Asp Gly Pro Val Arg Gly Asn Thr Lys Ile Ile Gln Glu Leu Glu Ser
 290 295 300
 Phe Phe Arg Gly Ala Gly Trp Ser Val Ile Lys Val Val Trp Gly Arg
 305 310 315 320
 Glu Trp Asp Glu Leu Leu Glu Lys Asp Gln Asp Gly Ala Leu Val Glu
 325 330 335
 Ile Met Asn Asn Thr Ser Asp Gly Asp Tyr Gln Thr Phe Lys Ala Asn
 340 345 350
 Asp Gly Ala Tyr Val Arg Glu His Phe Phe Gly Arg Asp Pro Arg Thr
 355 360 365
 Ala Lys Leu Val Glu Asn Met Thr Asp Glu Glu Ile Trp Lys Leu Pro
 370 375 380
 Arg Gly Gly His Asp Tyr Arg Lys Val Tyr Ala Ala Tyr Lys Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu Glu Thr Lys Asp Arg Pro Thr Val Ile Leu Ala His Thr Ile Lys
 405 410 415
 Gly Tyr Gly Leu Gly His Asn Phe Glu Gly Arg Asn Ala Thr His Ala
 420 425 430
 Met Lys Lys Leu Thr Leu Asp Asp Leu Lys Leu Phe Arg Asp Lys Gln
 435 440 445
 Gly Ile Pro Ile Thr Asp Glu Gln Leu Glu Lys Asp Pro Tyr Leu Pro
 450 455 460
 Pro Tyr Tyr His Pro Gly Glu Asp Ala Pro Glu Ile Lys Tyr Met Lys
 465 470 475 480
 Glu Arg Arg Ala Ala Leu Gly Gly Tyr Leu Pro Glu Arg Arg Glu Asn

485	490	495
Tyr Asp Pro Ile Gln Val Pro Pro Leu Asp Lys Leu Arg Ser Val Arg 500	505	510
Lys Gly Ser Gly Lys Gln Gln Ile Ala Thr Thr Met Ala Thr Val Arg 515	520	525
Thr Phe Lys Glu Leu Met Arg Asp Lys Gly Leu Ala Asp Arg Leu Val 530	535	540
Pro Ile Ile Pro Asp Glu Ala Arg Thr Phe Gly Leu Asp Ser Trp Phe 545	550	555
Pro Thr Leu Lys Ile Tyr Asn Pro His Gly Gln Asn Tyr Val Pro Val 565	570	575
Asp His Asp Leu Met Leu Ser Tyr Arg Glu Ala Pro Glu Gly Gln Ile 580	585	590
Leu His Glu Gly Ile Asn Glu Ala Gly Ser Met Ala Ser Phe Ile Ala 595	600	605
Ala Gly Thr Ser Tyr Ala Thr His Gly Lys Ala Met Ile Pro Leu Tyr 610	615	620
Ile Phe Tyr Ser Met Phe Gly Phe Gln Arg Thr Gly Asp Ser Ile Trp 625	630	635
Ala Ala Ala Asp Gln Met Ala Arg Gly Phe Leu Leu Gly Ala Thr Ala 645	650	655
Gly Arg Thr Thr Leu Thr Gly Glu Gly Leu Gln His Met Asp Gly His 660	665	670
Ser Pro Val Leu Ala Ser Thr Asn Glu Gly Val Glu Thr Tyr Asp Pro 675	680	685
Ser Phe Ala Tyr Glu Ile Ala His Leu Val His Arg Gly Ile Asp Arg 690	695	700
Met Tyr Gly Pro Gly Lys Gly Glu Asp Val Ile Tyr Tyr Ile Thr Ile 705	710	715
Tyr Asn Glu Pro Thr Pro Gln Pro Ala Glu Pro Glu Gly Leu Asp Val 725	730	735
Glu Gly Leu His Lys Gly Ile Tyr Leu Tyr Ser Arg Gly Glu Gly Thr 740	745	750
Gly His Glu Ala Asn Ile Leu Ala Ser Gly Val Gly Met Gln Trp Ala 755	760	765
Leu Lys Ala Ala Ser Ile Leu Glu Ala Asp Tyr Gly Val Arg Ala Asn 770	775	780
Ile Tyr Ser Ala Thr Ser Trp Val Asn Leu Ala Arg Asp Gly Ala Ala 785	790	795
Arg Asn Lys Ala Gln Leu Arg Asn Pro Gly Ala Asp Ala Gly Glu Ala 805	810	815

Phe Val Thr Thr Gln Leu Lys Gln Thr Ser Gly Pro Tyr Val Ala Val
820 825 830

Ser Asp Phe Ser Thr Asp Leu Pro Asn Gln Ile Arg Glu Trp Val Pro
835 840 845

Gly Asp Tyr Thr Val Leu Gly Ala Asp Gly Phe Gly Phe Ser Asp Thr
850 855 860

Arg Pro Ala Ala Arg Arg Phe Phe Asn Ile Asp Ala Glu Ser Ile Val
865 870 875 880

Val Ala Val Leu Asn Ser Leu Ala Arg Glu Gly Lys Ile Asp Val Ser
885 890 895

Val Ala Ala Gln Ala Ala Glu Lys Phe Lys Leu Asp Asp Pro Thr Ser
900 905 910

Val Ser Val Asp Pro Asn Ala Pro Glu Glu
915 920

<210> 6

<211> 922

<212> PRT

<213> Chưa biết

<220>

<223> biến thể Corynebacterium sp. pyruvat dehydrogenaza

<400> 6

Met Ala Asp Gln Ala Lys Leu Gly Gly Lys Pro Ser Asp Asp Ser Asn
1 5 10 15

Phe Ala Met Ile Arg Asp Gly Val Ala Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Asp
20 25 30

Pro Glu Glu Thr Asn Glu Trp Met Asp Ser Leu Asp Gly Leu Leu Gln
35 40 45

Glu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Met Leu Arg Leu Leu Glu
50 55 60

Arg Ala Ser Ala Lys Arg Val Ser Leu Pro Pro Met Thr Ser Thr Asp
65 70 75 80

Tyr Val Asn Thr Ile Pro Thr Ser Met Glu Pro Glu Phe Pro Gly Asp
85 90 95

Glu Glu Met Glu Lys Arg Tyr Arg Arg Trp Ile Arg Trp Asn Ala Ala
100 105 110

Ile Met Val His Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ile Gly Val Gly Gly His
115 120 125

Ile Ser Thr Tyr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Tyr Glu Val Gly Phe Asn
130 135 140

His Phe Phe Arg Gly Lys Asp His Pro Gly Gly Gly Asp Gln Ile Phe

145	150	155	160
Phe Gln Gly His Ala Ser Pro Gly Met Tyr Ala Arg Ala Phe Met Glu	165	170	175
Gly Arg Leu Ser Glu Asp Asp Leu Asp Gly Phe Arg Gln Glu Val Ser	180	185	190
Arg Glu Gln Gly Gly Ile Pro Ser Tyr Pro His Pro His Gly Met Lys	195	200	205
Asp Phe Trp Glu Phe Pro Thr Val Ser Met Gly Leu Gly Pro Met Asp	210	215	220
Ala Ile Tyr Gln Ala Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Glu Asn Arg Gly Ile	225	230	235
Lys Asp Thr Ser Asp Gln His Val Trp Ala Phe Leu Gly Asp Gly Glu	245	250	255
Met Asp Glu Pro Glu Ser Arg Gly Leu Ile Gln Gln Ala Ala Leu Asn	260	265	270
Asn Leu Asp Asn Leu Thr Phe Val Val Asn Cys Asn Leu Gln Arg Leu	275	280	285
Asp Gly Pro Val Arg Gly Asn Thr Lys Ile Ile Gln Glu Leu Glu Ser	290	295	300
Phe Phe Arg Gly Ala Gly Trp Ser Val Ile Lys Val Val Trp Gly Arg	305	310	315
Glu Trp Asp Glu Leu Leu Glu Lys Asp Gln Asp Gly Ala Leu Val Glu	325	330	335
Ile Met Asn Asn Thr Ser Asp Gly Asp Tyr Gln Thr Phe Lys Ala Asn	340	345	350
Asp Gly Ala Tyr Val Arg Glu His Phe Phe Gly Arg Asp Pro Arg Thr	355	360	365
Ala Lys Leu Val Glu Asn Met Thr Asp Glu Glu Ile Trp Lys Leu Pro	370	375	380
Arg Gly Gly His Asp Tyr Arg Lys Val Tyr Ala Ala Tyr Lys Arg Ala	385	390	395
Leu Glu Thr Lys Asp Arg Pro Thr Val Ile Leu Ala His Thr Ile Lys	405	410	415
Gly Tyr Gly Leu Gly His Asn Phe Glu Gly Arg Asn Ala Thr His Gln	420	425	430
Met Lys Ala Leu Thr Leu Asp Asp Leu Lys Leu Phe Arg Asp Lys Gln	435	440	445
Gly Ile Pro Ile Thr Asp Glu Gln Leu Glu Lys Asp Pro Tyr Leu Pro	450	455	460
Pro Tyr Tyr His Pro Gly Glu Asp Ala Pro Glu Ile Lys Tyr Met Lys	465	470	475
			480

Glu Arg Arg Ala Ala Leu Gly Gly Tyr Leu Pro Glu Arg Arg Glu Asn
 485 490 495
 Tyr Asp Pro Ile Gln Val Pro Pro Leu Asp Lys Leu Arg Ser Val Arg
 500 505 510
 Lys Gly Ser Gly Lys Gln Gln Ile Ala Thr Thr Met Ala Thr Val Arg
 515 520 525
 Thr Phe Lys Glu Leu Met Arg Asp Lys Gly Leu Ala Asp Arg Leu Val
 530 535 540
 Pro Ile Ile Pro Asp Glu Ala Arg Thr Phe Gly Leu Asp Ser Trp Phe
 545 550 555 560
 Pro Thr Leu Lys Ile Tyr Asn Pro His Gly Gln Asn Tyr Val Pro Val
 565 570 575
 Asp His Asp Leu Met Leu Ser Tyr Arg Glu Ala Pro Glu Gly Gln Ile
 580 585 590
 Leu His Glu Gly Ile Asn Glu Ala Gly Ser Met Ala Ser Phe Ile Ala
 595 600 605
 Ala Gly Thr Ser Tyr Ala Thr His Gly Lys Ala Met Ile Pro Leu Tyr
 610 615 620
 Ile Phe Tyr Ser Met Phe Gly Phe Gln Arg Thr Gly Asp Ser Ile Trp
 625 630 635 640
 Ala Ala Ala Asp Gln Met Ala Arg Gly Phe Leu Leu Gly Ala Thr Ala
 645 650 655
 Gly Arg Thr Thr Leu Thr Gly Glu Gly Leu Gln His Met Asp Gly His
 660 665 670
 Ser Pro Val Leu Ala Ser Thr Asn Glu Gly Val Glu Thr Tyr Asp Pro
 675 680 685
 Ser Phe Ala Tyr Glu Ile Ala His Leu Val His Arg Gly Ile Asp Arg
 690 695 700
 Met Tyr Gly Pro Gly Lys Gly Glu Asp Val Ile Tyr Tyr Ile Thr Ile
 705 710 715 720
 Tyr Asn Glu Pro Thr Pro Gln Pro Ala Glu Pro Glu Gly Leu Asp Val
 725 730 735
 Glu Gly Leu His Lys Gly Ile Tyr Leu Tyr Ser Arg Gly Glu Gly Thr
 740 745 750
 Gly His Glu Ala Asn Ile Leu Ala Ser Gly Val Gly Met Gln Trp Ala
 755 760 765
 Leu Lys Ala Ala Ser Ile Leu Glu Ala Asp Tyr Gly Val Arg Ala Asn
 770 775 780
 Ile Tyr Ser Ala Thr Ser Trp Val Asn Leu Ala Arg Asp Gly Ala Ala
 785 790 795 800

Arg Asn Lys Ala Gln Leu Arg Asn Pro Gly Ala Asp Ala Gly Glu Ala
805 810 815

Phe Val Thr Thr Gln Leu Lys Gln Thr Ser Gly Pro Tyr Val Ala Val
820 825 830

Ser Asp Phe Ser Thr Asp Leu Pro Asn Gln Ile Arg Glu Trp Val Pro
835 840 845

Gly Asp Tyr Thr Val Leu Gly Ala Asp Gly Phe Gly Phe Ser Asp Thr
850 855 860

Arg Pro Ala Ala Arg Arg Phe Phe Asn Ile Asp Ala Glu Ser Ile Val
865 870 875 880

Val Ala Val Leu Asn Ser Leu Ala Arg Glu Gly Lys Ile Asp Val Ser
885 890 895

Val Ala Ala Gln Ala Ala Glu Lys Phe Lys Leu Asp Asp Pro Thr Ser
900 905 910

Val Ser Val Asp Pro Asn Ala Pro Glu Glu
915 920

<210> 7
<211> 922
<212> PRT
<213> Chưa biết

<220>
<223> biến thể *Corynebacterium* sp. xitrat synthaza

<400> 7
Met Ala Asp Gln Ala Lys Leu Gly Gly Lys Pro Ser Asp Asp Ser Asn
1 5 10 15
Phe Ala Met Ile Arg Asp Gly Val Ala Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Asp
20 25 30
Pro Glu Glu Thr Asn Glu Trp Met Asp Ser Leu Asp Gly Leu Leu Gln
35 40 45
Glu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Met Leu Arg Leu Leu Glu
50 55 60
Arg Ala Ser Ala Lys Arg Val Ser Leu Pro Pro Met Thr Ser Thr Asp
65 70 75 80
Tyr Val Asn Thr Ile Pro Thr Ser Met Glu Pro Glu Phe Pro Gly Asp
85 90 95
Glu Glu Met Glu Lys Arg Tyr Arg Arg Trp Ile Arg Trp Asn Ala Ala
100 105 110
Ile Met Val His Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ile Gly Val Gly Gly His
115 120 125
Ile Ser Thr Tyr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Tyr Glu Val Gly Phe Asn
130 135 140

His Phe Phe Arg Gly Lys Asp His Pro Gly Gly Gly Asp Gln Ile Phe
 145 150 155 160
 Phe Gln Gly His Ala Ser Pro Gly Met Tyr Ala Arg Ala Phe Met Glu
 165 170 175
 Gly Arg Leu Ser Glu Asp Asp Leu Asp Gly Phe Arg Gln Glu Val Ser
 180 185 190
 Arg Glu Gln Gly Gly Ile Pro Ser Tyr Pro His Pro His Gly Met Lys
 195 200 205
 Asp Phe Trp Glu Phe Pro Thr Val Ser Met Gly Leu Gly Pro Met Asp
 210 215 220
 Ala Ile Tyr Gln Ala Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Glu Asn Arg Gly Ile
 225 230 235 240
 Lys Asp Thr Ser Asp Gln His Val Trp Ala Phe Leu Gly Asp Gly Glu
 245 250 255
 Met Asp Glu Pro Glu Ser Arg Gly Leu Ile Gln Gln Ala Ala Leu Asn
 260 265 270
 Asn Leu Asp Asn Leu Thr Phe Val Val Asn Cys Asn Leu Gln Arg Leu
 275 280 285
 Asp Gly Pro Val Arg Gly Asn Thr Lys Ile Ile Gln Glu Leu Glu Ser
 290 295 300
 Phe Phe Arg Gly Ala Gly Trp Ser Val Ile Lys Val Val Trp Gly Arg
 305 310 315 320
 Glu Trp Asp Glu Leu Leu Glu Lys Asp Gln Asp Gly Ala Leu Val Glu
 325 330 335
 Ile Met Asn Asn Thr Ser Asp Gly Asp Tyr Gln Thr Phe Lys Ala Asn
 340 345 350
 Asp Gly Ala Tyr Val Arg Glu His Phe Phe Gly Arg Asp Pro Arg Thr
 355 360 365
 Ala Lys Leu Val Glu Asn Met Thr Asp Glu Glu Ile Trp Lys Leu Pro
 370 375 380
 Arg Gly Gly His Asp Tyr Arg Lys Val Tyr Ala Ala Tyr Lys Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu Glu Thr Lys Asp Arg Pro Thr Val Ile Leu Ala His Thr Ile Lys
 405 410 415
 Gly Tyr Gly Leu Gly His Asn Phe Glu Gly Arg Asn Ala Thr His Gln
 420 425 430
 Met Lys Ala Leu Thr Leu Asp Asp Leu Lys Leu Phe Arg Asp Lys Gln
 435 440 445
 Gly Ile Pro Ile Thr Asp Glu Gln Leu Glu Lys Asp Pro Tyr Leu Pro
 450 455 460

Pro Tyr Tyr His Pro Gly Glu Asp Ala Pro Glu Ile Lys Tyr Met Lys
 465 470 475 480
 Glu Arg Arg Ala Ala Leu Gly Gly Tyr Leu Pro Glu Arg Arg Glu Asn
 485 490 495
 Tyr Asp Pro Ile Gln Val Pro Pro Leu Asp Lys Leu Arg Ser Val Arg
 500 505 510
 Lys Gly Ser Gly Lys Gln Gln Ile Ala Thr Thr Met Ala Thr Val Arg
 515 520 525
 Thr Phe Lys Glu Leu Met Arg Asp Lys Gly Leu Ala Asp Arg Leu Val
 530 535 540
 Pro Ile Ile Pro Asp Glu Ala Arg Thr Phe Gly Leu Asp Ser Trp Phe
 545 550 555 560
 Pro Thr Leu Lys Ile Tyr Asn Pro His Gly Gln Asn Tyr Val Pro Val
 565 570 575
 Asp His Asp Leu Met Leu Ser Tyr Arg Glu Ala Pro Glu Gly Gln Ile
 580 585 590
 Leu His Glu Gly Ile Asn Glu Ala Gly Ser Met Ala Ser Phe Ile Ala
 595 600 605
 Ala Gly Thr Ser Tyr Ala Thr His Gly Lys Ala Met Ile Pro Leu Tyr
 610 615 620
 Ile Phe Tyr Ser Met Phe Gly Phe Gln Arg Thr Gly Asp Ser Ile Trp
 625 630 635 640
 Ala Ala Ala Asp Gln Met Ala Arg Gly Phe Leu Leu Gly Ala Thr Ala
 645 650 655
 Gly Arg Thr Thr Leu Thr Gly Glu Gly Leu Gln His Met Asp Gly His
 660 665 670
 Ser Pro Val Leu Ala Ser Thr Asn Glu Gly Val Glu Thr Tyr Asp Pro
 675 680 685
 Ser Phe Ala Tyr Glu Ile Ala His Leu Val His Arg Gly Ile Asp Arg
 690 695 700
 Met Tyr Gly Pro Gly Lys Gly Glu Asp Val Ile Tyr Tyr Ile Thr Ile
 705 710 715 720
 Tyr Asn Glu Pro Thr Pro Gln Pro Ala Glu Pro Glu Gly Leu Asp Val
 725 730 735
 Glu Gly Leu His Lys Gly Ile Tyr Leu Tyr Ser Arg Gly Glu Gly Thr
 740 745 750
 Gly His Glu Ala Asn Ile Leu Ala Ser Gly Val Gly Met Gln Trp Ala
 755 760 765
 Leu Lys Ala Ala Ser Ile Leu Glu Ala Asp Tyr Gly Val Arg Ala Asn
 770 775 780
 Ile Tyr Ser Ala Thr Ser Trp Val Asn Leu Ala Arg Asp Gly Ala Ala

785 790 795 800
 Arg Asn Lys Ala Gln Leu Arg Asn Pro Gly Ala Asp Ala Gly Glu Ala
 805 810 815
 Phe Val Thr Thr Gln Leu Lys Gln Thr Ser Gly Pro Tyr Val Ala Val
 820 825 830
 Ser Asp Phe Ser Thr Asp Leu Pro Asn Gln Ile Arg Glu Trp Val Pro
 835 840 845
 Gly Asp Tyr Thr Val Leu Gly Ala Asp Gly Phe Gly Phe Ser Asp Thr
 850 855 860
 Arg Pro Ala Ala Arg Arg Phe Phe Asn Ile Asp Ala Glu Ser Ile Val
 865 870 875 880
 Val Ala Val Leu Asn Ser Leu Ala Arg Glu Gly Lys Ile Asp Val Ser
 885 890 895
 Val Ala Ala Gln Ala Ala Glu Lys Phe Lys Leu Asp Asp Pro Thr Ser
 900 905 910
 Val Ser Val Asp Pro Asn Ala Pro Glu Glu
 915 920

 <210> 8
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

 <220>
 <223> biến thể *Corynebacterium* sp. xitrat synthaza

 <400> 8
 Met Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu
 1 5 10 15
 His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu
 20 25 30
 Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu
 35 40 45
 Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys
 50 55 60
 Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr
 65 70 75 80
 Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr
 85 90 95
 Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe
 100 105 110
 Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser
 115 120 125

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

<210> 9
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 9
 aatttctaga ggcagaccct attctatgaa gg 32

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 10
 agtgtttcgg tctttacaga cacgagggac 30

<210> 11
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 11
 gtcctcgtg tctgtaaaga ccgaaacact 30

<210> 12
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 12
 aatttctaga cgtgggagtg tcactcgctt gg 32

<210> 13
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 13
 ttcgagctcg gtacccggtc tagagcactt tcgctcgac c 41

<210> 14
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 14
 gatttgaaaa gcgcatacaga aacatcccag cgctac 36

<210> 15
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 15
 gtacgcgtgg gatgtttctg atgcgctttt caaatc 36

<210> 16
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 16
 gaaacactat gatccactt cgttcaaaag tcaccaccgt c 41

<210> 17
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 17
 gacgggtggtg acttttgaac gaagtgggat catagtgttt c 41

<210> 18
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 18

gcatgcctgc aggtcgactc tagagcgtgt gcaacgccgt c

41

<210> 19

<211> 50

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 19

gctcgggtacc cggggatcct ctagaccgct tccttggtg cctgaagatg

50

<210> 20

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 20

tgcttggtt cacaagagac aagcct

26

<210> 21

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 21

aggcttgtct cttgtgaagc caagca

26

<210> 22

<211> 50

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 22

gcctgcaggt cgacctagat ctagacctca tcagagataa gaacagcatc

50

<210> 23

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 23
 gctcggtacc cggggatcct ctagatactc cggtctgctt tatgcaggta 50

<210> 24
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 24
 aactaaccta gtcgcttaag agacaagcct atctgc 36

<210> 25
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 25
 gcagataggc ttgtctctta agcgactagg ttagtt 36

<210> 26
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 26
 gcctgcaggt cgacctagat ctagaaagtg ccacgagcat ttcacagct 50

<210> 27
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 27

gctcgggtacc cggggatcct ctagataccg tccaaccggt actttgaacc

50

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 28
 ttgatcggcc acttccacac

20

<210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 29
 ggtgtggaag tggccgatca a

21

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 30
 gcctgcaggt cgacctagat ctagagatcg tcttcagaaa ggcgaccctc

50

<210> 31
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 31
 gctcgggtacc cggggatcct ctagaaccgt ggcataagg acacctctga

50

<210> 32
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 32
agcttcttca ttgcgtgggt tg 22

<210> 33
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 33
caaccacgc aatgaagaag ct 22

<210> 34
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 34
aagcgtcagt gccttcatct g 21

<210> 35
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 35
ccagatgaag gcactgacgc tt 22

<210> 36
<211> 50
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 36
gcctgcaggt cgacctagat ctagaagatg gagtcaccgg tgcgctggaa 50

<210> 37
<211> 50

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 37
 gctcgggtacc cggggatcct ctagaacctt tccctggaat tttttccttt 50

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 38
 tgtcccttga ggtgatttcc acacctcctg ttggaatg 38

<210> 39
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 39
 tccaacagga ggtgtggaaa tcacctcaag ggacaga 37

<210> 40
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 40
 gcctgcaggt cgacctagat ctagatgctg cgcggcaagc gccgtggatt 50

<210> 41
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 41
 gctcgggtacc cggggatcct ctagaacctt gaagctgtca gttcctagca 50

<210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 42
 ccctttcaaa cacatttggt c 21

<210> 43
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 43
 cgaacaaatg tgtttgaaag gg 22

<210> 44
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 44
 gcctgcaggt cgacctagat ctagatgcgc ggtgtgcgta cgcagccagc 50

<210> 45
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 45
 gctcgggtacc cggggatcct ctagatatgt gagcactggc tctaccgagt 50

<210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 46
aggtggagca ggtctgctcg tg 22

<210> 47
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 47
cacgagcaga cctgctccac ct 22

<210> 48
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 48
tgtccgaagc cgatgaggcg gac 23

<210> 49
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 49
cgtccgcctc atcggcttcg gaca 24

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

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 50
gcctgcaggt cgacctagat ctagagtcag agattacgag atcttccggt 50