



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
- (51)^{2023.01} C12N 9/10; C12P 13/12; C12P 13/08; (13) B
C12N 15/77; C12P 13/06



1-0050990

-
- (21) 1-2023-07078 (22) 10/03/2022
(86) PCT/KR2022/003359 10/03/2022 (87) WO 2022/191635 15/09/2022
(30) 10-2021-0031641 10/03/2021 KR
(45) 25/09/2025 450 (43) 27/05/2024 434
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea
(72) CHANG, Jin Sook (KR); KIM, Ju-yeon (KR); KIM, Seon Hye (KR); CHOI, Sun
Hyoung (KR); YOON, Byoung Hoon (KR); KIM, Hyung Joon (KR); CHO, Seung
Hyun (KR); LEE, Jaemin (KR); KIM, Seo-Yun (KR); LEE, Imsang (KR).
(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

-
- (54) BIẾN THỂ SYNTHAZA XITRAT, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA BIẾN THỂ
NÀY, VI SINH VẬT CHỨA BIẾN THỂ NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP VÀ CHẾ
PHẨM SẢN XUẤT L-AXIT AMIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(21) 1-2023-07078

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể synthaza xitrat mới, polynucleotit mã hóa biến thể này, vi sinh vật chứa biến thể này, và phương pháp và chế phẩm sản xuất các L-axit amin sử dụng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể synthaza xitrat mới, polynucleotit mã hóa biến thể này, vi sinh vật chứa biến thể này, và chế phẩm và phương pháp sản xuất các L-axit amin sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Để sản xuất các L-axit amin và các chất có lợi khác, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để phát triển các vi sinh vật có sản lượng và công nghệ cho quá trình lên men hiệu quả cao. Ví dụ, các phương pháp tiếp cận cụ thể đối với vật liệu đích, chẳng hạn như phương pháp tăng biểu hiện gen mã hóa enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp L-valin hoặc phương pháp loại bỏ gen không cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp, đã được sử dụng rộng rãi (patent Hoa Kỳ số US 8283152 B2, patent Hàn Quốc số KR 10-2153534 B1).

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

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

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Nhờ những nỗ lực chuyên sâu để sản xuất các L-axit amin với hiệu suất cao, các tác giả sáng chế đã hoàn thiện sáng chế bằng cách xác nhận rằng biến thể synthaza xitrat mới làm tăng khả năng sản sinh L-axit amin.

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

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

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

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất các L-axit amin sử dụng vi sinh vật theo sáng chế.

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

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Khi biến thể synthaza xitrat theo sáng chế được sử dụng, các L-axit amin có thể được sản xuất với hiệu suất cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

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

Biến thể theo sáng chế có thể là biến thể, trong đó axit amin tương ứng với vị trí 415 dựa trên trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 trong trình tự axit amin

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

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

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

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

trở thành. Thuật ngữ “biến thể” có thể được sử dụng thay thế cho các thuật ngữ như được biến đổi, polypeptit biến đổi, protein biến đổi, đột biến, mutein, phân kỳ, v.v., miễn là các thuật ngữ được sử dụng để thể hiện sự đột biến. Đối với mục đích của sáng chế, biến thể có thể là biến thể trong đó lysin (Lys, K), là axit amin tương ứng với vị trí 415 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng histidin (His, H).

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

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

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

Ví dụ, bất kỳ hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng thuật toán máy tính đã biết như thuật toán “FASTA” (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 and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình Needleman của gói Bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu (The European Molecular Biology Open Software Suite: EMBOSS) Rice et al., 2000,

Trends Genet. 16: 276-277) (tốt hơn là, phiên bản 5.0.0 hoặc cao hơn) (gói chương trình GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL., J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, and [CARILLO ET AL.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073). Ví dụ, sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng BLAST hoặc ClustalW của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI).

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa các polynucleotit hoặc polypeptit có thể, ví dụ, được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự sử dụng, ví dụ, chương trình máy tính GAP chẳng hạn như Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48: 443 như đã đưa ra bởi Smith và Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482. Tóm lại, chương trình máy tính GAP xác định sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất như giá trị thu được bằng cách chia số lượng các ký hiệu được căn chỉnh (tức là, các nucleotit hoặc axit amin) giống nhau cho tổng số ký hiệu trong 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, các trang từ 353 đến 358 (1979) (hoặc ma trận thay thế EADNFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4)); (2) hàm phạt 3,0 cho mỗi khoảng trống dịch chuyển và hàm phạt bổ sung 0,10 cho mỗi ký hiệu trong mỗi khoảng trống dịch chuyển (hoặc hàm phạt mở khoảng trống dịch chuyển 10 và hàm phạt mở rộng khoảng trống dịch chuyển 0,5); và (3) không có hàm phạt cho các khoảng trống dịch chuyển cuối cùng.

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

Ví dụ, bất kỳ trình tự axit amin được căn chỉnh theo SEQ ID NO: 1, và dựa trên sự căn chỉnh này, mỗi gốc axit amin của trình tự axit amin có thể được đánh số theo vị trí

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

Ví dụ về việc căn chỉnh có thể được xác định bởi thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình Needleman của gói Bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu (The European Molecular Biology Open Software Suite: EMBOSS, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), v.v., nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó, và các chương trình căn chỉnh trình tự, chẳng hạn như các thuật toán so sánh trình tự theo cặp, v.v., đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng thích hợp.

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

Biến thể theo sáng chế có thể có hoạt tính tăng cường khả năng sản sinh L-axit amin so với polypeptit kiểu đại.

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

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

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

X₁N HGGDATX₂FMN KVKNKEDGVR LMGFGHRVYK NYDPRAAIVK
ETAHEILEHL GGDDLLDLAI KLEEIALADD X₃FISRKLYPN VDFYTGLIYR
AMGFPTDFFT VLFAIGRLPG WIAHYREQLG AAGNH (SEQ ID NO: 51);

trong đó công thức chung nêu trên,

X₁ là asparagin hoặc serin;

X₂ là alanin hoặc axit glutamic; và

X₃ là tyrosin hoặc xystein.

Biến thể theo sáng chế có thể có sự đồng nhất trình tự nhiều hơn 90% so với trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, hoặc SEQ ID NO: 12. Ngoài ra, biến thể theo sáng chế có thể bao gồm, chỉ bao gồm, hoặc về cơ bản bao gồm trình tự axit amin có sự đồng nhất trình tự nhiều hơn 90% so với trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, hoặc SEQ ID NO: 12. Ví dụ, biến thể theo sáng chế có thể có sự đồng nhất trình tự 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, hoặc 99,7% so với trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, hoặc SEQ ID NO: 12, có thể bao gồm trình tự axit amin có sự đồng nhất trình tự, hoặc có thể chỉ bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm trình tự axit amin có sự đồng nhất trình tự.

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

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

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

amin có sự tương đồng hoặc đồng nhất và mã hóa polypeptit hoặc protein biểu hiện hiệu quả tương ứng với hiệu quả của biến thể theo sáng chế.

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

Ngoài ra, polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm đầu dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ bất kỳ trình tự có thể lai hóa với trình tự bổ sung cho toàn bộ hoặc một phần của trình tự polynucleotit theo sáng chế trong các điều kiện nghiêm ngặt mà không bị giới hạn ở đây. “Các điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện cho phép lai cụ thể giữa các polynucleotit. Các điều kiện này đã được mô tả cụ thể trong các tài liệu (J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, tái bản lần hai, ấn phẩm Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 9.50-9.51, 11.7-11.8). Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện trong đó các polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất cao hơn 70%, nhiều hơn 75%, nhiều hơn 80%, nhiều hơn 85%, nhiều hơn 90%, nhiều hơn 95%, nhiều hơn 96%, nhiều hơn 97%, nhiều hơn 98%, hoặc 99% lai với nhau và các polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất thấp hơn sự tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên không lai với nhau, hoặc các điều kiện rửa của lai Southern, tức là, rửa một lần, tốt hơn là, hai đến ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, tốt hơn là, 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, và tốt nhất là, 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS.

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

Cụ thể, các polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất với polynucleotit theo sáng chế có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai bao gồm bước lai với giá trị T_m ở nhiệt độ 55°C trong các điều kiện nêu trên. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là nhiệt độ 60°C, 63°C, hoặc 65°C, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây, và có thể được kiểm soát thích hợp bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy thuộc vào mục đích sử dụng.

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

Trong một ví dụ, polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm polynucleotit được thể hiện bởi trình tự axit nucleic ở các vị trí từ 1084 đến 1245 dựa trên trình tự axit nucleic có các mã nhận biết SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 hoặc SEQ ID NO: 13; hoặc polynucleotit được thể hiện bởi trình tự axit nucleic có các mã nhận biết SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 hoặc SEQ ID NO: 15.

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

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

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

Vector được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và bất kỳ vector đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Các ví dụ của vector thường có thể bao gồm các plasmid, 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 vectơ plasmit, những vectơ dựa trên pDZ, pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL và pET, v.v. có thể được sử dụng. Cụ thể, có thể sử dụng pDZ, pDC, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117 (Biotechnology letters tập 13, số 10, các trang. 721-726(1991), đơn patent Hàn Quốc số 10-1992-0007401), vectơ pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, v.v..

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

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

polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ ở dạng ban đầu và được liên kết chức năng đến các trình tự yêu cầu đối với sự biểu hiện trong tế bào vật chủ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đây.

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

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

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

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

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

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

Vi sinh vật theo sáng chế có thể có khả năng sản sinh L-axit amin. Cụ thể, trong vi sinh vật theo sáng chế, khả năng sản sinh L-axit amin có thể là L-valin hoặc O-axetyl-L-homoserin.

Vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật có hoạt tính sản sinh GltA hoặc L-axit amin tự nhiên, hoặc vi sinh vật được đưa biến thể theo sáng chế hoặc polynucleotit mã hóa biến thể này (hoặc vectơ chứa polynucleotit) vào chủng bố mẹ không có khả năng sản sinh GltA hoặc L-axit amin tự nhiên, và/hoặc vi sinh vật được đưa vào khả

năng sản sinh GltA hoặc L-axit amin, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Trong một ví dụ, vi sinh vật theo sáng chế là tế bào hoặc vi sinh vật được biến nạp với polynucleotit theo sáng chế hoặc vector chứa polynucleotit theo sáng chế để biểu hiện biến thể theo sáng chế, và các mục đích theo sáng chế, vi sinh vật theo sáng chế có thể bao gồm tất cả vi sinh vật có khả năng sản sinh L-axit amin chứa biến thể theo sáng chế. Ví dụ, chủng theo sáng chế có thể là chủng tái tổ hợp mà khả năng sản sinh L-axit amin tăng lên bằng cách đưa polynucleotit mã hóa biến thể theo sáng chế vào vi sinh vật kiểu dại hoặc vi sinh vật sản sinh L-axit amin. Chủng tái tổ hợp với khả năng sản sinh L-axit amin tăng cường có thể là vi sinh vật có khả năng sản sinh L-axit amin tăng cường so với vi sinh vật kiểu dại hoặc vi sinh vật không biến đổi của synthaza xitrat (tức là, vi sinh vật biểu hiện protein kiểu dại (SEQ ID NO: 1) hoặc vi sinh vật không biểu hiện biến thể theo sáng chế), nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Ví dụ, vi sinh vật không biến đổi của synthaza xitrat là chủng đích để so sánh sự tăng cường khả năng sản sinh L-axit amin, có thể là chủng ATCC14067, chủng ATCC13032, và chủng ATCC13869, chủng *Corynebacterium glutamicum* CJ7V, chủng *Corynebacterium glutamicum* CJ8V, hoặc chủng CA08-0072, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

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

Như được sử dụng tại đây, thuật ngữ “khoảng” đề cập đến phạm vi bao gồm tất cả $\pm 0,5$, $\pm 0,4$, $\pm 0,3$, $\pm 0,2$, $\pm 0,1$, v.v., và bao gồm tất cả giá trị tương đương hoặc tương tự giá trị sau đó, nhưng phạm vi không bị giới hạn ở đó.

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

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

Vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật trong đó protein NCgl2335 còn được làm suy giảm. Ngoài ra, vi sinh vật theo sáng chế có thể là vi sinh vật trong đó hoạt tính của protein được chọn từ nhóm chỉ bao gồm tiểu đơn vị nhỏ axetolactat synthaza isozym 1 (IlvN) hoặc chất vận chuyển axit amin mạch nhánh/L-methionin (YjeH) còn được tăng cường.

Cụ thể, vi sinh vật sản sinh L-valin theo sáng chế có thể là vi sinh vật trong đó hoạt tính của IlvN còn được tăng cường và/hoặc protein NCgl2335 còn được làm suy giảm. Ngoài ra, vi sinh vật sản sinh O-axetyl-L-homoserin theo sáng chế có thể là vi sinh vật trong đó hoạt tính của L-methionin/ chất vận chuyển axit amin mạch nhánh (YjeH) còn được tăng cường.

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

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

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

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

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

tự nucleotit của gen polypeptit để mã hóa polypeptit được biến đổi để loại bỏ hoặc làm suy giảm hoạt tính của polypeptit);

5) biến đổi trình tự nucleotit mã hóa codon khởi đầu hoặc 5'-UTR của phiên mã gen mã hóa polypeptit;

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

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

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

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

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

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

Biến đổi trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit theo phương pháp 3) và phương pháp 4) có thể là tạo ra biến đổi trên trình tự bằng việc xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ của trình tự axit amin của polypeptit hoặc trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit, hoặc sự kết hợp của chúng để làm suy giảm hoạt tính của polypeptit, hoặc thay thế trình tự với trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit được biến đổi để

có hoạt tính yếu hơn, hoặc trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit được biến đổi để không có hoạt tính, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Ví dụ, biểu hiện gen có thể được ức chế hoặc làm suy giảm bằng cách đưa đột biến vào trình tự polynucleotit để tạo ra codon kết thúc, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

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

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

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

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

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

hoạt tính nội sinh của nó có nghĩa là hoạt tính và/hoặc nồng độ (mức độ biểu hiện) của polypeptit được tăng cường so với hoạt tính của polypeptit cụ thể có sẵn ban đầu bởi chủng bố mẹ trước khi biến đổi hoặc vi sinh vật không biến đổi.

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

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

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

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

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

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

Cụ thể,

Việc tăng số lượng bản sao nội bào của polynucleotit mã hóa polypeptit theo phương pháp 1) có thể là đưa vectơ 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. Thay vào đó, phương pháp có thể là một bản sao hoặc hai bản sao của polynucleotit mã hóa polypeptit vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ. Việc đưa vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách đưa vectơ vào tế bào vật chủ, có thể chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Vectơ đã được mô tả ở trên.

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

Các ví dụ về vùng gen khởi động mạnh đã biết có thể bao gồm các vùng gen khởi động từ CJ1 đến CJ7 (patent Hoa Kỳ số US 7662943 B2), vùng gen khởi động lac, vùng gen khởi động trp, vùng gen khởi động trc, vùng gen khởi động tac, vùng gen khởi động lambda phage PR, vùng gen khởi động PL, vùng gen khởi động tet, vùng gen khởi động gapA, vùng gen khởi động SPL7, vùng gen khởi động SPL13 (sm3) (patent Hoa Kỳ số US 10584338 B2), vùng gen khởi động O2 (patent Hoa Kỳ số US 10273491 B2), vùng gen khởi động tkt, vùng gen khởi động yccA, v.v., nhưng vùng gen khởi động mạnh không bị giới hạn ở đó.

Biến đổi trình tự nucleotit mã hóa codon khởi đầu hoặc 5'-UTR của phiên mã gen

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

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

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

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

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

protein mạch khuôn theo mức độ tương tự trình tự, và do đó xác nhận cấu trúc dựa trên thông tin, nhờ đó chọn và biến nạp hoặc biến đổi vị trí tiếp xúc cần biến đổi hoặc biến đổi hóa học.

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

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

Cụ thể, vi sinh vật sản sinh L-valin theo sáng chế có thể là vi sinh vật chứa polypeptit được thể hiện bằng trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 27 và/hoặc polynucleotit được thể hiện bởi trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 28. Ngoài ra, vi sinh vật sản sinh O-acetyl-L-homoserin theo sáng chế có thể là vi sinh vật chứa polypeptit được thể hiện bởi trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 47 và/hoặc polynucleotit được thể hiện bởi trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 48; và có thể là vi sinh vật chứa đột biến được chọn từ nhóm chỉ bao gồm bất hoạt của polypeptit được thể hiện bởi trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 37 và/hoặc xóa polynucleotit được thể hiện bởi trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 38.

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

Khía cạnh khác nữa theo sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-axit amin,

trong đó phương pháp này bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa biến thể theo sáng chế hoặc polynucleotit theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy.

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

Ngoài ra, trong phương pháp sản xuất các L-axit amin theo sáng chế, L-axit amin có thể là L-valin, O-axetyl-L-homoserin, hoặc L-methionin.

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

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “môi trường nuôi cấy” đề cập đến hỗn hợp các nguyên liệu chứa các nguyên liệu dinh dưỡng cần thiết cho việc nuôi cấy của vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế làm thành phần chính, và môi trường nuôi cấy cung cấp các nguyên liệu dinh dưỡng và các yếu tố sinh trưởng, cùng với nước cần thiết cho sự tồn tại và phát triển. Cụ thể, môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế có thể là bất kỳ môi trường nào thường được sử dụng để nuôi cấy truyền thống các vi sinh vật mà không bị bất kỳ giới hạn cụ thể nào. Tuy nhiên, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong các điều kiện hiếu khí trong môi trường truyền thống chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, hợp chất vô cơ, axit amin và/hoặc vitamin thích hợp, v.v., trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH, v.v..

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

Theo sáng chế, nguồn cacbon có thể bao gồm các hydrat cacbon, chẳng hạn như glucoza, sacaroza, lactoza, fructoza, sucroza, maltoza, v.v.; các rượu đường như

mannitol, sorbitol, v.v.; các axit hữu cơ như axit pyruvic, axit lactic, axit xitric, v.v.; các axit amin như axit glutamic, metionin, lysin, v.v.. Ngoài ra, nguồn cacbon có thể bao gồm các chất dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên chẳng hạn như tinh bột hydrolysat, mật đường, mật đường đen, cám gạo, sắn, mật mía, và dịch chiết ngô, v.v.. Cụ thể, các hydrat cacbon chẳng hạn như glucoza và mật đường đã qua xử lý khử trùng (tức là, mật đường chuyển thành đường khử) có thể được sử dụng, và ngoài ra, lượng thích hợp các nguồn cacbon khác có thể được sử dụng mà không bị giới hạn ở đây. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp hai hoặc nhiều loại với nhau, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

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

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

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

khí, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Nhiệt độ trong quá trình nuôi cấy theo sáng chế có thể nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, tốt hơn là, từ 25°C đến 40°C, và việc nuôi cấy có thể được thực hiện trong khoảng từ 10 giờ đến 160 giờ, nhưng quá trình nuôi cấy không bị giới hạn ở đó.

Các L-axit amin được sản xuất bởi quá trình nuôi cấy theo sáng chế có thể được giải phóng vào môi trường nuôi cấy hoặc giữ lại trong các tế bào.

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

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

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

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

đó.

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

Trong phương pháp theo sáng chế, biến thể, polynucleotit, vectơ, vi sinh vật, v.v., đã được mô tả trong các khía cạnh khác ở trên.

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

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

Trong chế phẩm để sản xuất các L-axit amin theo sáng chế, L-axit amin có thể là L-valin, O-axetylhomoserin, hoặc L-methionin.

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

Ví dụ thực hiện của sáng chế

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

có hiệu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế hoặc lĩnh vực kỹ thuật tương tự.

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

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng gốc axit amin thứ 415 của GltA như vị trí liên kết axetyl-CoA, và dự đoán rằng khi axit amin được thay thế bằng một axit amin khác, hoạt tính của synthaza xitrat bị suy giảm khi giá trị Km của axetyl-CoA tăng.

Theo đó, vectơ trong đó lysin là axit amin thứ 415 của GltA được thay thế bằng axit amin khác được điều chế. Cụ thể, điều chế vectơ chứa các đột biến, trong đó lysin là axit amin thứ 415 của GltA được thay thế bằng histidin (K415H), tryptophan (K415W), và glyxin (K415G).

PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 17, và SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 18, cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 20, và SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 22, và SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 21 dựa trên gADN bộ gen *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại làm mạch khuôn. PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên hỗn hợp của hai phân đoạn trong số sáu phân đoạn thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 18 để thu được ba phân đoạn. PCR được thực hiện trong các điều kiện biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút và 30 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Vectơ pDCM2 (SEQ ID NO: 14, công bố đơn patent Hàn Quốc số 10-2020-0136813) được xử lý với SmaI, và mỗi trong ba sản phẩm PCR thu được ở trên được thực hiện nhân dòng hợp nhất. Việc nhân dòng hợp nhất được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit nhân dòng In-Fusion® HD (Clontech). Các plasmit thu được nhờ nhân dòng được đặt tên tương ứng là pDCM2-gltA(K415H), pDCM2-gltA(K415W), và pDCM2-gltA(K415G). Các trình tự của cặp mồi được sử dụng trong ví dụ này được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

SEQ ID NO:	Cặp mồi	Các trình tự

15	Đoạn mồi 1	TCGAGCTCGGTACCC CCGTTTCGTATGATCGGTTCCGCACAGGCC
16	Đoạn mồi 2	GTGCAGCAGGCAAC CAC ATCAACCGCCCACG
17	Đoạn mồi 3	CGTGGGCGGTTGAT GTG GTTGCCTGCTGCAC
18	Đoạn mồi 4	CTCTAGAGGATCCCC GCCGTAAGCAGCCTCTGGTGGGAATGGTCAGC
19	Đoạn mồi 5	GTGCAGCAGGCAAC TGG ATCAACCGCCCACG
20	Đoạn mồi 6	CGTGGGCGGTTGAT CCA GTTGCCTGCTGCAC
21	Đoạn mồi 7	GTGCAGCAGGCAAC GGC ATCAACCGCCCACG
22	Đoạn mồi 8	CGTGGGCGGTTGAT GCC GTTGCCTGCTGCAC

Ví dụ 2: Đưa biến thể GltA vào các chủng sản sinh L-valin và đánh giá khả năng sản sinh của chủng

Ví dụ 2-1. Điều chế các chủng dựa trên sản sinh L-valin và đánh giá khả năng sản sinh của chủng

Một loại đột biến [ilvN(A42V); Biotechnology and Bioprocess Engineering, tháng 6 năm 2014, tập 19, số 3, trang 456-467] (SEQ ID NO: 27) được đưa vào tiểu đơn vị nhỏ axetolactat synthaza isozyme 1 (IlvN) của *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 kiểu dại và ATCC13869 để điều chế các chủng có khả năng sản sinh L-valin tăng cường (patent Hàn Quốc số KR 10-1947945 B1).

Cụ thể, PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 31, và SEQ ID NO: 30 và SEQ ID NO: 32, dựa trên *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 gADN kiểu dại làm mạch khuôn. PCR trùng lặp được thực hiện dựa trên hỗn hợp của hai phân đoạn thu được ở trên làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 32 để thu được ba phân đoạn. Trong phần mô tả này, PCR được thực hiện trong các điều kiện biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút và 30 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút. Vectơ pDCM2 được xử lý với smaI, và mỗi trong số ba sản phẩm PCR thu được ở trên được thực hiện nhân dòng hợp nhất. Plasmid thu được nhờ nhân dòng hợp nhất được đặt tên là pDCM2-ilvN(A42V). Sau đó, pDCM2-ilvN(A42V) được biến nạp vào các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 và ATCC13869 kiểu dại 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 được đưa

vào với vectơ trên nhiễm sắc thể bằng tái tổ hợp các trình tự tương đồng đã chọn trong môi trường nuôi cấy chứa 25 mg/L kanamycin. Các phân đoạn gen được khuếch đại dựa trên các chất biến nạp *Corynebacterium glutamicum* đã chọn bằng PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 34, và sự đưa vào của đột biến được xác nhận bằng phân tích trình tự gen. Các chủng tái tổ hợp được đặt tên tương ứng là *Corynebacterium glutamicum* CJ7V và CJ8V. Các trình tự của cặp mồi trong ví dụ này được thể hiện ở bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

SEQ ID NO:	Tên các trình tự	Các trình tự
29	Đoạn mồi 11	TCGAGCTCGGTACCCC CGCGTCACCAAAGCGGA
30	Đoạn mồi 12	GTCCCTCGTGTCTGTAAAGACCGAAACACT
31	Đoạn mồi 13	AGTGTTCGGTCTTTACAGACACGAGGGAC
32	Đoạn mồi 14	CTCTAGAGGATCCCC TTAGATCTTGGCCGGAGCCA
33	Đoạn mồi 15	CCGCGTCACCAAAGCGGA
34	Đoạn mồi 16	TTAGATCTTGGCCGGAGCCA

Sau đó, thử nghiệm về độ chuẩn lên men được thực hiện dựa trên *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 và ATCC13869 kiểu dại, và các chủng CJ7V và CJ8V đã điều chế ở trên. Từng chủng được cấy chuyển trong môi trường dinh dưỡng, và sau đó được cấy vào bình tam giác 250 ml chứa 25 ml môi trường sản xuất và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 72 giờ ở tốc độ 200 vòng/phút trong điều kiện lắc. Sau đó, nồng độ của L-valin được phân tích sử dụng HPLC, và nồng độ đã phân tích của L-valin được thể hiện ở bảng 3 dưới đây.

Môi trường dinh dưỡng (độ pH 7,2)

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, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, biotin 100 µg, thiamin-HCl 1 mg, canxi-axit pantothenic 2 mg, nicotinamit 3 mg, CaCO₃ 30 g (trong 1L nước cất)

Bảng 3

Khả năng sản sinh L-valin của các chủng dựa trên sản sinh L-valin CJ7V và CJ8V

Các chủng	L-valin (g/L)
ATCC14067	1,5

CJ7V(ilvN(A42V))	2,2
ATCC13869	1,0
CJ8V(ilvN(A42V))	1,9

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

Ví dụ 2-2: Đưa các biến thể bị suy giảm GltA (K415H, K415W, K415G) vào các chủng sản sinh L-valin và đánh giá khả năng sản sinh của chủng

Khả năng sản sinh L-valin được đánh giá bằng cách đưa các biến thể GltA vào các chủng sản sinh L-valin. Các vector pDCM2-gltA(K415H), pDCM2-gltA(K415W), và pDCM2-gltA(K415G) đã điều chế trong ví dụ 1 được biến nạp thành từng chủng sản sinh L-valin CJ7V và CJ8V, và CA08-0072 (KCCM11201P, patent Hoa Kỳ số US 8465962 B2) bằng tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể. Các chủng được đưa vào với các vector trên nhiễm sắc thể bằng sự tái tổ hợp các trình tự tương đồng được chọn trong môi trường chứa 25 mg/L kanamycin.

Sau đó, các phân đoạn gen được khuếch đại dựa trên các chất biến nạp *Corynebacterium glutamicum*, trong đó sự tái tổ hợp thứ cấp được hoàn thành, bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24 (bảng 4), và sau đó các chủng đã đưa vào đột biến được xác nhận bằng phân tích giải trình tự gen. Các chủng tái tổ hợp được đặt tên dựa trên *Corynebacterium glutamicum* như thể hiện dưới đây, và đánh giá độ chuẩn được thực hiện theo cách tương tự như ví dụ 2-1. Các kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 4

SEQ ID NO:	Tên các trình tự	Các trình tự
23	Đoạn mồi 9	CCGTTCGTATGATCGGTTCCGCACAGGCC
24	Đoạn mồi 10	GCCGTAAGCAGCCTCTGGTGGAATGGTCAGC

Bảng 5

Các chủng	OD600	L-Valin (g/L)
CJ7V	77	2,2
CJ7V:gltA(K415H)	75	2,5

CJ7V:gltA(K415W)	47	1,2
CJ7V:gltA(K415G)	42	1,0
CJ8V	89	1,9
CJ8V:gltA(K415H)	89	2,1
CJ8V:gltA(K415W)	50	1,0
CJ8V:gltA(K415G)	49	1,0
CA08-0072	62	2,6
CA08-0072:gltA(K415H)	60	2,9
CA08-0072:gltA(K415W)	35	1,8
CA08-0072:gltA(K415G)	30	1,7

Như được thể hiện ở các kết quả, biến thể K415H có khả năng sản sinh L-valin tăng cường mà không làm giảm tăng trưởng.

CA08-0072:gltA(K415H) được đặt tên là CA08-1688 và được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) theo Hiệp ước Budapest vào ngày 28 tháng 9 năm 2020, với số lưu chủng KCCM12795P.

Ví dụ 3: Điều chế chủng tăng cường sản sinh O-Axetyl-L-Homoserin và đánh giá khả năng sản sinh O-Axetyl-L-Homoserin

3-1. Điều chế chủng được đưa vào với biến thể protein màng ngoại lai YjeH

Để xác định hiệu quả của biến thể YjeH, là protein màng ngoại lai và chất vận chuyển homoserin O-axetyl, được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, vector để đưa vào nhiễm sắc thể chứa gen (SEQ ID NO: 48) mã hóa biến thể YjeH (SEQ ID NO: 47) được điều chế.

Cụ thể, để điều chế vector xóa transposaza, cặp mồi để khuếch đại vùng phía trước 5' (SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 40) và cặp mồi để khuếch đại vùng phía sau 3' (SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 42) xung quanh gen mã hóa transposaza (SEQ ID NO: 38, gen số NCgl2335) được điều chế. Vị trí enzyme giới hạn XbaI được chèn ở mỗi đầu của cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 42, và cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 40 và SEQ ID NO: 41 được điều chế để lai chéo với nhau sao cho trình tự của enzyme giới hạn SmaI ở vị trí đã điều chế. Các trình tự đoạn mồi được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6

SEQ ID NO:	Tên các trình tự	Các trình tự
SEQ ID NO: 39	Tn_5 F	tgaattcgagctcggtagccCACCGACGCGCATCTGCCT
SEQ ID NO: 40	Tn_5 R	GGTGTGGTGACTTTCAGCAGTTCCCGGGGGGG AGGAGGCATGTGGTGTG
SEQ ID NO: 41	Tn_3 F	CAACACCACATGCCTCCTCCCCCGGGA GCTGAAAGTCACCACACC
SEQ ID NO: 42	Tn_3 R	gtcgactctagaggatccccCTCCCAAACCATTGAGGAA TGG

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 40, và SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 42, dựa trên nhiễm sắc thể của ATCC13032 kiểu dại làm mạch khuôn. PCR được thực hiện trong các điều kiện biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được phân đoạn ADN (851 bp) ở vùng phía trước 5' và phân đoạn ADN (847 bp) ở vùng phía sau 3' xung quanh vùng xóa gen NCgl2335.

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 42, dựa trên hai phân đoạn ADN đã khuếch đại làm mạch khuôn. PCR được thực hiện trong các điều kiện biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, phân đoạn ADN (1648 bp) bao gồm vị trí có thể xóa gen mã hóa transposaza (SEQ ID NO: 38, gen số NCgl2335) được khuếch đại.

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

Để xác định hiệu quả của chất vận chuyển O-acetyl homoserin, vector để đưa vào nhiễm sắc thể chứa gen (SEQ ID NO: 48) mã hóa biến thể YjeH có nguồn gốc từ *E. coli*

được điều chế. Đối với vấn đề này, vectơ biểu hiện gen *yjeH* được điều chế bằng cách sử dụng promotor CJ7 (patent Hoa Kỳ số US 7662943 B2). Cặp mồi (SEQ ID NO: 43 và SEQ ID NO: 44) để khuếch đại vùng promotor CJ7 và cặp mồi (SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 46) để khuếch đại vùng *yjeH* của *E. coli* được điều chế. Các trình tự đoạn mồi được thể hiện trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

SEQ ID NO:	Tên các trình tự	Các trình tự
SEQ ID NO: 43	CJ7_yjeH F	ACACCACATGCCTCCTCcccAGAAACATCCC AGCGCTAC
SEQ ID NO: 44	CJ7_yjeH R	AGTTCTTGTTTGAGTCCACTCATAGTGTTTC CTTTCGTTGGGT
SEQ ID NO: 45	yjeH F	ACCCAACGAAAGGAAACACTATGAGTGGA CTCAAACAAGAAGT
SEQ ID NO: 46	yjeH R	GACTTTCAGCAGTTcccgggTTATGTGGTTATG CCATTTTCCGG

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 43 và SEQ ID NO: 44, dựa trên pECCG117-PCJ7-gfp(US 7662943 B2, p117-Pcj7-gfp) làm mạch khuôn, và sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 46, dựa trên nhiễm sắc thể của *E. coli* kiểu dại làm mạch khuôn. PCR được thực hiện trong các điều kiện biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được phân đoạn ADN (360 bp) của vùng promotor CJ7 và phân đoạn ADN (1297 bp) của vùng gen *yjeH* của *E. coli*.

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NOS: 43 and SEQ ID NO: 46, dựa trên hai phân đoạn ADN đã khuếch đại làm mạch khuôn. PCR được thực hiện trong các điều kiện biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 90 giây, và sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. Kết quả là, phân đoạn ADN (1614 bp) bao gồm các vị trí trong đó promotor CJ7 và gen *yjeH* được đưa vào được điều chế.

Phân đoạn ADN xóa gen thu được thông qua PCR được nhân dòng thành vectơ

pDCM2- Δ NCgl2335 được xử lý với enzym giới hạn SmaI sử dụng bộ kit nhân dòng In-Fusion® HD (Clontech), và vector tái tổ hợp pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT) được điều chế.

Ngoài ra, vector tái tổ hợp để đưa vào gen đột biến *yjeH* (eco, F351L) được điều chế.

Cụ thể, phenylalanin là axit amin thứ 351 của trình tự axit amin YjeH được thay thế bằng leuxin (F351L) dựa trên plasmit pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT) làm mạch khuôn sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 49 và SEQ ID NO: 50. Plasmit chứa gen đã điều chế mã hóa đột biến được đặt tên là pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L). Các trình tự đoạn mồi được thể hiện ở bảng 8 dưới đây.

Bảng 8

SEQ ID NO:	Tên các trình tự	Các trình tự
SEQ ID NO: 49	F351L F	CAATGGCATCCTTATTATGATTT
SEQ ID NO: 50	F351L R	AAATCATAATAAGGATGCCATTG

pDCM2- Δ NCgl2335 và pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L) thu được sau đó được biến nạp vào chủng ATCC13032 bằng phương pháp điện xung. Thông qua quá trình lai chéo thứ cấp, ATCC13032 Δ NCgl2335 đã xóa NCgl2335 và ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L) thu được trên nhiễm sắc thể. Xóa gen NCgl2335 và chèn gen mã hóa biến thể YjeH cuối cùng được xác nhận bằng PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 42, và sau đó so sánh với ATCC13032.

Ví dụ 3-2. Đánh giá khả năng sản sinh O-Axetyl Homoserin

Để so sánh khả năng sản sinh O-axetyl homoserin (O-AH) của các chủng ATCC13032 Δ NCgl2335 và ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L) đã điều chế ở ví dụ 3-1, và chủng ATCC13032 kiểu dại, các chủng được nuôi cấy theo cách sau đây để phân tích O-axetyl homoserin trong dung dịch nuôi cấy.

Một vòng bạch kim của các chủng được cấy vào bình tam giác 250 ml chứa 25 ml môi trường sản xuất O-axetyl homoserin dưới đây, và sau đó được nuôi cấy trong điều

kiện lắc ở tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 33°C trong 20 giờ. Nồng độ O-axetyl homoserin được phân tích bằng HPLC, và các nồng độ đã phân tích được thể hiện ở bảng 9.

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

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

Bảng 9

Tên các chủng	O-Axetyl Homoserin (g/L)
ATCC13032	0,3
ATCC13032 Δ NCgl2335	0,3
ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)	1,0

Kết quả là, như được thể hiện ở bảng 9, khi chủng đối chứng ATCC13032 được nuôi cấy, O-axetyl-L-homoserin được tích trữ ở 0,3 g/L, và xác nhận rằng ngay cả khi gen transposaza NCgl2335 bị xóa, không bị ảnh hưởng đến việc sản sinh O-axetyl-L-homoserin. Cụ thể, xác nhận rằng khi gen đột biến *yjeH* được biểu hiện, O-axetyl-L-homoserin được tích tụ ở 1,0 g/L.

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

Khả năng sản sinh O-axetyl-L-homoserin được đánh giá bằng cách đưa biến thể GltA vào các chủng sản sinh O-axetyl-L-homoserin của ví dụ 3-2. Vectơ pDCM2-gltA(K415H) được điều chế trong ví dụ 1 được biến nạp vào các chủng ATCC13032 và ATCC13032 Δ NCgl2335 kiểu dại, và chúng sản sinh O-axetyl-L-homoserin của ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L). Các chủng được đưa vào với vectơ trên nhiễm sắc thể bởi tái tổ hợp tương đồng các trình tự được chọn trong môi trường nuôi cấy chứa 25 mg/L kanamycin.

Sau đó, các phân đoạn gen được khuếch đại dựa trên các chất biến nạp *Corynebacterium glutamicum*, trong đó việc tái tổ hợp thứ cấp được hoàn thành, bằng PCR sử dụng cặp mồi có các mã nhận biết SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24, và các chủng được đưa vào với đột biến *gltA*(K415H) được xác nhận bằng phân tích giải

trình tự gen. Các chủng tái tổ hợp được đặt tên dựa trên *Corynebacterium glutamicum* như được thể hiện dưới đây, và đánh giá độ chuẩn được thực hiện theo cách tương tự như ở ví dụ 3-2. Các kết quả được thể hiện ở bảng 10.

Bảng 10

Các chủng	O-AH (g/L)
ATCC13032	0,3
ATCC13032 <i>gltA</i> (K415H)	0,4
ATCC13032 Δ NC <i>glt2335</i>	0,3
ATCC13032 Δ NC <i>glt2335 gltA</i> (K415H)	0,4
ATCC13032 Δ NC <i>glt2335::PCJ7-yjeH</i> (eco,F351L)	1,0
ATCC13032 Δ NC <i>glt2335::PCJ7-yjeH</i> (eco,F351L) <i>gltA</i> (K415H)	1,3

Như được nhìn thấy từ các kết quả, tất cả các chủng được đưa vào với biến thể *GltA* K415H thể hiện tăng lên trong khả năng sản sinh O-axetyl-L-homoserin so với chủng bố mẹ trong đó biến thể không được đưa vào.

ATCC13032 Δ NC*glt2335::PCJ7-yjeH*(eco,F351L) *gltA*(K415H) được đặt tên là CM04-1006 và được nộp lưu chủng ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) theo Hiệp ước Budapest vào ngày 21 tháng 10 năm 2020 được cấp số lưu chủng KCCM12809P.

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

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

công thức chung 1

X₁N HGGDATX₂FMN KVKNKEDGVR LMGFGHRVYK NYDPRAAIVK
ETAHEILEHL GGDDLLDLAI KLEEIALADD X₃FISRKLYPN VDFYTGLIYR
AMGFPTDFFT VLFAIGRLPG WIAHYREQLG AAGNH (SEQ ID NO: 51);

trong đó trong công thức chung 1,

X₁ là asparagin hoặc serin;

X₂ là alanin hoặc axit glutamic; và

X₃ là tyrosin hoặc xystein.

5. Biến thể theo điểm 1, trong đó biến thể có sự tương đồng trình tự 90% hoặc nhiều hơn so với trình tự axit amin có các mã nhận biết SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, hoặc SEQ ID NO: 12.
6. Polynucleotit mã hóa biến thể theo điểm bất kỳ từ 1 đến 5.
7. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa biến thể synthaza xitrat trong đó lysin là axit amin tương ứng với vị trí 415 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng histidin, hoặc polynucleotit mã hóa biến thể.
8. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó vi sinh vật có khả năng sản sinh L-valin hoặc O-acetyl-L-homoserin.
9. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó vi sinh vật là *Corynebacterium glutamicum*.
10. Phương pháp sản xuất các L-axit amin bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi

Corynebacterium chứa biến thể synthaza xitrat trong đó lysin là axit amin tương ứng với vị trí 415 của trình tự axit amin có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng histidin, hoặc polynucleotit mã hóa biến thể trong môi trường nuôi cấy.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm thu hồi các L-axit amin từ môi trường hoặc vi sinh vật được nuôi cấy.

12. Phương pháp theo điểm 10, trong đó L-axit amin là L-valin, O-axetyl-L-homoserin, hoặc L-methionin.

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

14. Chế phẩm theo điểm 13, trong đó L-axit amin là L-valin, O-axetyl-L-homoserin, hoặc L-methionin.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> BIẾN THỂ SYNTHAZA XITRAT, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA BIẾN THỂ NÀY, VI SINH VẬT CHỨA BIẾN THỂ NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP VÀ CHẾ PHẨM SẢN XUẤT L-AXIT AMIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

<130> OPA21402

<150> KR 10-2021-0031641

<151> 2021-03-10

<160> 51

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 437

<212> PRT

<213> Chưa biết

<220>

<223> ATCC 14067 GltA AA

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

atgtttgaaa gggatatcgt ggctactgat aacaacaagg ctgtcctgca ctaccccggt 60
 ggcgagttcg aaatggacat catcgaggct tctgagggta acaacgggtg tgtcctgggc 120
 aagatgctgt ctgagactgg actgatcact tttgaccag gttatgtgag cactggctcc 180
 accgagtcga agatcaccta catcgatggc gatgcgggaa tcctgcgta cgcggtat 240
 gacatcgctg atctggctga gaatgccacc ttcaacgagg tttcttacct acttatcaac 300
 ggtgagctac caacccaga tgagcttcac aagttaacg acgagattcg ccaccacacc 360
 cttctggacg aggacttcaa gtcccagttc aacgtgttcc cacgcgacgc tcaccaatg 420
 gcaaccttgg cttcctcggg taacatthttg totacctact accaggatca gctgaaccca 480
 ctcgatgagg cacagcttga taaggcaacc gttcgcctca tggcaaagg tccaatgctg 540
 gctgcgtagc cacaccgcg acgcaagggt gtccttaca tgtaccaga caactccctc 600
 aacgcgctg agaacttct gcgcatgatg ttcgggtacc caactgagcc atacgagatc 660
 gaccaatca tggtaaggc tctggacaag ctgctcatcc tgcacgctga ccacgagcag 720
 aactgctcca cctccaccgt tcgtatgatc ggttccgcac aggccaacat gtttgtctcc 780
 atcgctggg gcatcaacgc tctgtccggc cactgcacg gtggcgcaaa ccaggctggt 840
 ctggagatgc tcgaagacat caagaacaac cacggtggcg acgcaaccgc gttcatgaac 900
 aaggtaaga acaaggaaga cggcgtccgc ctcatgggt tcggacaccg cgtttacaag 960
 aattacgatc cacgtgcagc aatcgtcaag gagaccgc acgagatcct cgagcacctc 1020
 ggtggcgacg atcttctgga tctggcaatc aagctggaag aaattgcact ggctgatgat 1080
 tacttcatct cccgcaagct ctaccgaac gtagacttct acaccggcct gatctaccgc 1140
 gcaatgggct tccaactga cttcttcacc gtattgttgg caatcggctg tctgccagga 1200
 tggatcgctc actaccgca gcagctcggg gcagcaggca acaagatcaa ccgcccacgc 1260
 caggcttaca ccggaacga atcccgcaag ttggttctc gcgaggagcg ctaa 1314

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

<220>
 <223> ATCC 14067 GlTA K415H 362~415 AA

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

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

Gly Ala Ala Gly Asn His
 50

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

<220>
 <223> ATCC 13032 GltA AA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro
 180 185 190

Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg
 195 200 205

Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met
 210 215 220

Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln
 225 230 235 240

ggtgagctac caaccccaga tgagcttcac aagtttaacg acgagattcg ccaccacacc 360
 cttctggacg aggacttcaa gtcccagttc aacgtgttcc cacgcgacgc tcacccaatg 420
 gcaaccttgg cttcctcggg taacattttg tctacctact accaggacca gctgaaccca 480
 ctcgatgagg cacagcttga taaggcaacc gttcgcctca tggcaaagggt tccaatgctg 540
 gctgcgtagc cacaccgcg cgcgaagggt gctccttaca tgtaccacaga caactccctc 600
 aatgcgcggtg agaacttcct gcgcatgatg ttcggttacc caaccgagcc atacgagatc 660
 gacccaatca tgggtcaaggc tctggacaag ctgctcatcc tgcacgctga ccacgagcag 720
 aactgctcca cctccaccgt tcgtatgatc ggttccgcac aggccaacat gtttgtctcc 780
 atcgcgtggtg gcatcaacgc tctgtccggc ccaactgcacg gtggcgcaaa ccaggctggt 840
 ctggagatgc tcgaagacat caagagcaac cacggtggcg acgcaaccga gttcatgaac 900
 aaggtcaaga acaaggaaga cggcgtccgc ctcatgggct tcggacaccg cgtttacaag 960
 aactacgatc cacgtgcagc aatcgtcaag gagaccgcac acgagatcct cgagcacctc 1020
 ggtggcgacg atcttctgga tctggcaatc aagctggaag aaattgcact ggctgatgat 1080
 tacttcatct cccgcaagct ctaccgcaac gtagacttct acaccggcct gatctaccgc 1140
 gcaatgggct tcccaactga cttcttcacc gtattgttcg caatcggtcg tctgccagga 1200
 tggatcgctc actaccgca gcagctcggg gcagcaggca acaagatcaa ccgcccacgc 1260
 caggctctaca ccggcaacga atcccgcaag ttggttctc gcgaggagcg ctaa 1314

<210> 6
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> ATCC13869 GltA AA

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

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

Pro Arg Glu Glu Arg
 435

<210> 7
 <211> 1314
 <212> ADN
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> ATCC13869 GltA NT

<400> 7
 atgtttgaaa gggatatacgt ggctactgat aacaacaagg ctgtcctgca ctaccccggg 60
 ggcgagttcg aaatggacat catcgaggct tctgagggta acaacgggtgt tgtcctgggc 120
 aagatgctgt ctgagactgg actgatcact tttgaccag gttatgtgag cactggctcc 180
 accgagtcga agatcaccta catcgatggc gatgcgggaa tcctgcgta cgcggtat 240
 gacatcgctg atctggctga gaatgccacc ttcaacgagg tttcttacct acttatcaac 300
 ggtgagctac caacccaga tgagcttcac aagttaacg acgagattcg ccaccacacc 360
 cttctggacg aggacttcaa gtcccagttc aacgtgttcc cacgcgacgc tcacccaatg 420
 gcaacottgg cttcctcggg taacattttg tctacctact accaggatca gctgaaccca 480
 ctogatgagg cacagcttga taaggcaacc gttcgcctca tggcaaagggt tccaatgctg 540
 gctgcgtacg cacaccgcg acgcaagggt gtccttaca tgtaccaga caactccctc 600
 aacgcgctg agaacttct gcgcatgatg ttcggttacc caaccgagcc atacgagatc 660
 gaccaatca tggtaaggc tctggacaag ctgctcatcc tgcacgctga ccacgagcag 720
 aactgctcca cctccaccgt tcgtatgatc ggttccgcac aggccaacat gtttgtctcc 780
 atcgtggtg gcatcaacgc tctgtccggc ccaactgcac gtggcgcaaa ccaggctggt 840
 ctggagatgc tcgaagacat caagaacaac cacggtggcg acgcaaccgc gttcatgaac 900
 aaggtaaga acaaggaaga cggcgtccgc ctcattgggt tcggacaccg cgtttacaag 960
 aactacgatc cacgtgcagc aatcgtcaag gagaccgcac acgagatcct cgagcacctc 1020
 ggtggcgacg atctttctgga tctggcaatc aagctggaag aaattgact ggctgatgat 1080
 tgcttcatct cccgcaagct ctacccgaac gtagacttct acaccggcct gatctaccgc 1140
 gcaatgggct tccaactga cttcttcacc gtattgttcg caatcggtcg tctgccagga 1200
 tggatcgctc actaccgca gcagctcggg gcagcaggca acaagatcaa ccgcccacgc 1260
 caggctctaca ccggcaagga atcccgaag ttggttcctc gcgaggagcg ctaa 1314

<210> 8
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> ATCC 14067 GltA K415H AA

 <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

ctc gatgagg cacagcttga taaggcaacc gttcgcctca tggcaaaggt tccaatgctg 540
gctgcgtacg cacaccgcg acgcaagggg gtccttaca tgtaccaga caactccctc 600
aacgcgctg agaacttct gcgcatgatg ttcggttacc caactgagcc atacgagatc 660
gacccaatca tgggtcaaggc tctggacaag ctgctcatcc tgcacgctga ccacgagcag 720
aactgctcca cctccaccgt tcgtatgatc ggttccgcac aggccaacat gtttgtctcc 780
atcgctgggtg gcatcaacgc totgtccggc ccaactgcacg gtggcgcaaa ccaggctggt 840
ctggagatgc tcgaagacat caagaacaac cacgggtggcg acgcaaccgc gttcatgaac 900
aaggtcaaga acaaggaaga cggcgtccgc ctcatgggct tcggacaccg cgtttacaag 960
aattacgatc cacgtgcagc aatcgtcaag gagaccgcac acgagatcct cgagcacctc 1020
gggtggcgacg atcttctgga tctggcaatc aagctggaag aaattgcact ggctgatgat 1080
tacttcatct cccgcaagct ctaccgaac gtagacttct acaccggcct gatctaccgc 1140
gcaatggggt tcccaactga cttcttcacc gtattgttcg caatcggtcg tctgccagga 1200
tggatcgctc actaccgca gcagctcggg gcagcaggca accacatcaa ccgcccacgc 1260
caggctctaca ccggcaacga atcccgaag ttggttcctc gcgaggagcg ctaa 1314

<210> 10
<211> 437
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ATCC13032 GluA K415H AA

<400> 10
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
 Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn
 290 295 300
 Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys
 305 310 315 320
 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 Gly Asn His 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> 11
 <211> 1314
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> ATCC13032 GltA K415H NT

<400> 11
 atgtttgaaa gggatatcgt ggctactgat aacaacaagg ctgtcctgca ctaccccggg 60
 ggcgagttcg aaatggacat catcgaggct totgagggta acaacgggtgt tgtcctgggc 120
 aagatgctgt ctgagactgg actgatcact tttgaccag gttatgtgag cactggctcc 180
 accgagtcga agatcaccta catcgatggc gatgcgggaa tcctgcgta ccgcggtat 240
 gacatcgctg atctggctga gaatgccacc ttcaacgagg tttcttacct acttatcaac 300
 ggtgagotac caacccaga tgagcttcac aagttaacg acgagattcg ccaccacacc 360
 cttctggacg aggacttcaa gtcccagttc aacgtgttcc cacgcgacgc tcacccaatg 420
 gcaaccttgg cttcctcggg taacattttg tctacctact accaggacca gctgaacca 480
 ctcgatgagg cacagcttga taaggcaacc gttcgcctca tggcaaagggt tccaatgctg 540
 gctgcgtagc cacaccgcg acgcaagggt gctccttaca tgtaccaga caactccctc 600
 aatgcgctg agaacttcct gcgcatgatg ttcggttacc caaccgagcc atacgagatc 660
 gaccaatca tggtaaggc tctggacaag ctgctcatcc tgcaogtga ccacgagcag 720
 aactgctcca cctccaccgt tcgtatgatc ggttcgcac aggccaacat gtttgtctcc 780
 atcgctggtg gcatcaacgc tctgtccggc ccaactgcac gtggcgcaaa ccaggctggt 840
 ctggagatgc tcgaagacat caagagcaac cacggtggcg acgcaaccga gttcatgaac 900
 aaggtcaaga acaaggaaga cggcgtccgc ctcatgggct tcggacaccg cgtttacaag 960
 aactacgatc cacgtgcagc aatcgtcaag gagaccgcac acgagatcct cgagcacctc 1020
 ggtggcgacg atcttctgga tctggcaatc aagctggaag aaattgcaact ggctgatgat 1080
 tacttcatct cccgcaagct ctaccogaac gtagacttct acaccggcct gatctaccgc 1140
 gcaatgggct tccaactga cttcttacc gtattgttcg caatcggtcg tctgccagga 1200
 tggatcgctc actaccgca gcagctcggg gcagcaggca accacatcaa ccgcccacgc 1260
 caggcttaca ccggcaacga atcccgaag ttggttcctc gcgaggagcg ctaa 1314

<210> 12
 <211> 437
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ATCC13869 GltA K415H AA

<400> 12

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
340 345 350

Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Cys 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 Gly Asn His Ile
405 410 415

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

Pro Arg Glu Glu Arg
435

<210> 13
<211> 1314
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ATCC13869 GltA K415H NT

<400> 13
atgtttgaaa gggatatcgt ggctactgat aacaacaagg ctgtcctgca ctaccccggg 60
ggcgagttcg aatggacat catcgaggct tctgagggta acaacgggtg tgtcctgggc 120
aagatgctgt ctgagactgg actgatcact tttgaccag gttatgtgag cactggctcc 180
accgagtcga agatcaccta catcgatggc gatgcgggaa tcttgcgtta ccgcggtat 240
gacatcgctg atctggctga gaatgccacc ttcaacgagg tttcttacct acttatcaac 300
ggtgagctac caaccccaga tgagcttcac aagtttaacg acgagattcg ccaccacacc 360
cttctggacg aggacttcaa gtcccagttc aacgtgttcc cacgcgacgc tcacccaatg 420
gcaaccttg cttcctcggg taacattttg tctacctact accaggatca gctgaacca 480
ctcgatgagg cacagcttga taaggcaacc gttcgcctca tggcaaaggt tccaatgctg 540
gctgcgtacg cacaccgcgc acgcaagggt gctccttaca tgtaccaga caactccctc 600

aacgcgcgtg agaacttccct gcgcatgatg ttcggttacc caaccgagcc atacgagatc 660
 gaccaaatca tggcgaagc tctggacaag ctgctcatcc tgcacgctga ccacgagcag 720
 aactgctcca cctccaccgt tcgtatgatc ggttccgcac aggccaacat gtttgtctcc 780
 atcgtgggtg gcatcaacgc tctgtccggc ccaactgcacg gtggcgcaaa ccaggctggt 840
 ctggagatgc tcgaagacat caagaacaac cacgggtggcg acgcaaccgc gttcatgaac 900
 aaggcgaaga acaaggaaga cggcgtccgc ctcatgggct tcggacaccg cgtttacaag 960
 aactacgatc cacgtgcagc aatcgtcaag gagaccgcac acgagatcct cgagcacctc 1020
 ggtggcgacg atcttctgga tctggcaatc aagctggaag aaattgcact ggctgatgat 1080
 tgcttcatct cccgcaagct ctaccogaac gtagacttct acaccggcct gatctaccgc 1140
 gcaatgggct tcccactga cttcttcacc gtattgttcg caatcggctg tctgccagga 1200
 tggatcgctc actaccgga gcagctcggg gcagcaggca accacatcaa ccgcccacgc 1260
 caggctctaca ccggcaagga atcccgaag ttggttcctc gcgaggagcg ctaa 1314

<210> 14
 <211> 5803
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pDCM2

<400> 14
 gttcgccttg tgtccataaa accgcccagt ctagctatcg ccatgtaagc ccaactgcaag 60
 ctacctgctt tctctttgcg cttgcgtttt cccttgtcca gatagcccag tagctgacat 120
 tcatccgggg tcagcacctg ttctgcggac tggctttcta cgtggtccgc ttcctttagc 180
 agcccttgcg ccctgagtgc ttgcggcagc gtgaagctag cttttatcgc cattcgccat 240
 tcaggctgcg caactggttg gaagggcgat cggcgcgggc ctcttogcta ttacgccagc 300
 tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggggat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt 360
 cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcgagctcgg taccggggga tcctctagag 420
 tcgacctgca ggcatgcaag cttggcgtaa tcatggatcat agctgtttcc tgtgtgaaat 480
 tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg 540
 ggtgcctaat gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag 600
 tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg 660
 ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcaactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg 720
 ctgcggcgag cggatcagc tcaactcaaag gcggaataac ggttatccac agaatcaggg 780

gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag 840
gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga 900
cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct 960
ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc 1020
tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg 1080
gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc 1140
tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaaccgga taagacacga cttatcgcca 1200
ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag 1260
ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct 1320
ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc 1380
accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga 1440
tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctcgacg ctccagtggaa cgaaaactca 1500
cgттаaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttgggg 1560
tgggogaaga actccagcat gagatccccg cgctggagga tcatccagcc ctgatagaaa 1620
cagaagccac tggagcacct caaaaacacc atcatacact aaatcagtaa gttggcagca 1680
tcacccgacg cactttgctc cgaataaata cctgtgacgg aagatcactt cgcagaataa 1740
ataaatcctg gtgtccctgt tgataccggg aagccctggg ccaacttttg gcgaaaatga 1800
gacgttgatc ggcacgtaag aggttccaac tttcaccata atgaaataag atcactaccg 1860
ggcgattttt ttgagttatc gagattttca ggagctgata gaaacagaag ccaactggagc 1920
acctcaaaaa caccatcata cactaaatca gtaagttggc agcatcaccg gacgcacttt 1980
gcgccgaata aatacctgtg acggaagatc acttgcgaga ataaataaat cctggtgtcc 2040
ctgttgatac cgggaagccc tgggccaact tttggcgaaa atgagacggt gatcggcagc 2100
taagaggttc caactttcac cataatgaaa taagatcact accgggcgta ttttttgagt 2160
tatcgagatt ttcaggagct ctttggcatc gtctctcgcc tgtcccctca gttcagtaat 2220
ttcctgcatt tgctgtttc cagtcggtag atattccaca aaacagcagg gaagcagcgc 2280
ttttccgctg cataaccctg cttcggggtc attatagcga ttttttcggt atatccatcc 2340
tttttcgcac gatatacagg attttgccaa agggttcgtg tagactttcc ttggtgtatc 2400
caacggcgtc agccgggcag gataggtgaa gtaggccac ccgcgagcgg gtgttccttc 2460
ttcactgtcc cttattcgca cctggcggtg ctcaacggga atcctgctct gcgaggctgg 2520
ccggctaccg ccggcgtaac agatgagggc aagcggatgg ctgatgaaac caagccaacc 2580
aggaagggca gccacatct caaggtgtac tgccttccag acgaacgaag agcgattgag 2640

gaaaaggcgg cggcggccgg catgagcctg tggcctacc tgctggccgt cggccagggc 2700
 tacaaaatca cgggcgtcgt ggactatgag cacgtccgcg agggcgtccc ggaaaacgat 2760
 tccgaagccc aacctttcat agaaggcggc ggtggaatcg aaatctcgtg atggcaggtt 2820
 gggcgtcgtt tggtcggtca tttcgaaaaa ggtaggaat acggtagacc atttgcctgc 2880
 ttttatatag ttcantatgg gattcacctt tatgttgata agaaataaaa gaaaatgcc 2940
 ataggatata ggcattttct tttgcgtttt tatttgtaa ctgttaattg tccttgttca 3000
 aggatgctgt ctttgacaac agatgttttc ttgcctttga tgttcagcag gaagctcggc 3060
 gcaaacgttg attgtttgtc tgcgtagaat cctctgtttg tcatatagct tgtaatcacg 3120
 acattgtttc ctttcgcttg aggtacagcg aagtgtgagt aagtaaaggt tacatcgta 3180
 ggcggatcaa gatccatttt taacacaagg ccagttttgt tcagcggctt gtatgggcca 3240
 gttaaagaat tagaaacata accaagcatg taaatatcgt tagacgtaat gccgtcaatc 3300
 gtcatttttg atccgcggga gtcagtgaac aggtaccatt tgccgttcat tttaaagacg 3360
 ttgcgcggtt caatttcac tgttactgtg ttagatgcaa tcagcggttt catcactttt 3420
 ttcagtgtgt aatcatcgtt tagctcaatc ataccgagag cgccgtttgc taactcagcc 3480
 gtgcggtttt tatcgctttg cagaagttt tgactttctt gacggaagaa tgatgtgctt 3540
 ttgccaatag atgctttgtt aaataaagat tcttcgcctt ggtagccatc ttcagttcca 3600
 gtgtttgctt caaatactaa gtatttggg cttttatctt ctacgtagtg aggatctctc 3660
 agcgtatggt tgtcgcctga gctgtagttg cttcatcga tgaactgctg tacattttga 3720
 tacgtttttc cgtcaccgtc aaagattgat ttataatcct ctacaccggt gatgttcaaa 3780
 gagctgtctg atgctgatac gtttaacttgt gcagttgtca gtgtttgttt gccgtaatgt 3840
 ttaccggaga aatcagtgtg gaataaacgg atttttccgt cagatgtaa tgtggctgaa 3900
 cctgaccatt cttgtgtttg gtcttttagg atagaatcat ttgcatcgaa tttgtcgtg 3960
 tctttaaaga cgcggccagc gtttttccag ctgtcaatag aagtttcgcc gactttttga 4020
 tagaacatgt aaatcgtatg gtcacccgca tttttaggat ctccggctaa tgcaaagacg 4080
 atgtggtagc cgtgatagtt tgcgacagtg ccgtcagcgt tttgtaatgg ccagctgtcc 4140
 caaacgtcca ggccttttgc agaagagata tttttaattg tggacgaatc aaattcagaa 4200
 acttgatatt tttcattttt ttgctgttca gggatttgca gcatatcatg gcgtgtaata 4260
 tgggaaatgc cgtatgtttc cttatatggc ttttggttcg tttctttcgc aaacgcttga 4320
 gttgcgcctc ctgccagcag tgcggtagta aaggtaata ctgttgcttg ttttgcaaac 4380
 tttttgatgt tcatcgttca tgtctccttt tttatgtact gtgttagcgg tctgcttctt 4440

ccagccctcc tgtttgaaga tggcaagtta gttacgcaca ataaaaaaag acctaaaata 4500
 tgtaaggggt gacgccaaag tatacacttt gccctttaca catttttaggt cttgcctgct 4560
 ttatcagtaa caaacccgcg cgatttactt ttogacctca ttctattaga ctctcgtttg 4620
 gattgcaact ggtctatfff cctcttttgt ttgatagaaa atcataaaag gatttgacaga 4680
 ctacgggcct aaagaactaa aaaatctatc tgtttctttt cattctctgt attttttata 4740
 gtttctggtg catgggcata aagttgcctt tttaatcaca attcagaaaa tatcataata 4800
 tctcatttca ctaaataata gtgaacggca ggtatatgtg atgggttaaa aaggatcacc 4860
 ccagagtccc gctcagaaga actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgccaatc 4920
 gggagcggcg ataccgtaaa gcacgaggaa gcggtcagcc cattcgccgc caagctcttc 4980
 agcaatatca cgggtagcca acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc 5040
 acagtcgatg aatccagaaa agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcatc 5100
 gccatgggtc acgacgagat cctcgccgtc gggcatccgc gccttgagcc tggcgaacag 5160
 ttoggtctggc gcgagcccct gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc 5220
 ttccatccga gtacgtgctc gctcgatgcg atgtttcgtc tgggtggtcga atgggcaggt 5280
 agccggatca agcgtatgca gccgccgat tgcacagcc atgatggata ctttctcggc 5340
 aggagcaagg tgagatgaca ggagatcctg ccccgccact tcgccaata gcagccagtc 5400
 ccttcccgtc tcagtgacaa cgtcgagaca gctgccaag gaacgcccgct cgtggccagc 5460
 cacgatagcc gcgctgcctc gtcttgaggt tcattcaggg caccggacag gtcggctttg 5520
 aaaaaagaa ccgggcgccc ctgcgctgac agccggaaca cggcggcatc agagcagccg 5580
 attgtctggt gtgcccagtc atagccgaat agcctctcca cccaagcggc cggagaacct 5640
 gcgtgcaatc catcttgctc aatcatgcca aacgatcctc atcctgtctc ttgatcagat 5700
 cttgatcccc tgcgccatca gatccttggc ggcaagaaag ccatccagtt tactttgcag 5760
 ggcttcccaa cttaccaga gggcgcccca gctggcaatt ccg 5803

<210> 15
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 1

<400> 15
 tcgagctcgg taccgccggt cgtatgatcg gttccgcaca ggcc

44

<210> 16

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

 <220>
 <223> đoạn mỗi 2

 <400> 16 31
 gtgcagcagg caaccacatc aaccgcccac g

 <210> 17
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 3

 <400> 17 31
 cgtggggcgt tgatgtgggt gcctgctgca c

 <210> 18
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 4

 <400> 18 46
 ctctagagga tccccgccgt aagcagcctc tgggtggaatg gtcagc

 <210> 19
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 5

 <400> 19 31
 gtgcagcagg caactggatc aaccgcccac g

 <210> 20
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 6

 <400> 20

cgtagggcggg tgatccagtt gcctgctgca c 31

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

<220>
 <223> đoạn mỗi 7

<400> 21 31
 gtgcagcagg caacggcatc aaccgcccac g

<210> 22
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 8

<400> 22 31
 cgtgggcggg tgatgccggt gcctgctgca c

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

<220>
 <223> đoạn mỗi 9

<400> 23 29
 ccgttcgtat gatcggttcc gcacaggcc

<210> 24
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 10

<400> 24 31
 gccgtaagca gcctctgggtg gaatggtcag c

<210> 25
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>

<223> IlvN AA

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

<210> 26
 <211> 520
 <212> ADN
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> IlvN NT

<400> 26
 atggctaatt ctgacgtcac ccgccacatc ctgtccgtac tcgttcagga cgtagacgga 60
 atcatttccc gcgtatcagg tatgttcacc cgacgcgcat tcaacctcgt gtcacctcgtg 120
 tctgcaaaga ccgaaacact oggcatcaac cgcatcacgg ttgttgtcga cgccgacgag 180
 ctcaacattg agcagatcac caagcagctc aacaagctga tccccgtgct caaagtcgtg 240
 cgacttgatg aagagaccac catcgcccgc gcaatcatgc tggttaaggt ctctgcggtat 300
 agcaccaacc gtccgcagat cgtcgacgcc gcgaacatct tccgcgcccc agtcgtcgac 360
 gtggctccag actctgtggt tattgaatcc acaggcaccc caggcaagct ccgcgcactg 420

cttgatgtga tgggaaccatt cggaatccgc gaactgatcc aatccggaca gattgcactc 480
 aaccgcggtc cgaagaccat ggctccggcc aagatctaaa 520

<210> 27
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IlvN A42V AA

<400> 27
 Met Ala Asn Ser Asp Val Thr Arg His Ile Leu Ser Val Leu Val Gln
 1 5 10 15
 Asp Val Asp Gly Ile Ile Ser Arg Val Ser Gly Met Phe Thr Arg Arg
 20 25 30
 Ala Phe Asn Leu Val Ser Leu Val Ser Val Lys Thr Glu Thr Leu Gly
 35 40 45
 Ile Asn Arg Ile Thr Val Val Val Asp Ala Asp Glu Leu Asn Ile Glu
 50 55 60
 Gln Ile Thr Lys Gln Leu Asn Lys Leu Ile Pro Val Leu Lys Val Val
 65 70 75 80
 Arg Leu Asp Glu Glu Thr Thr Ile Ala Arg Ala Ile Met Leu Val Lys
 85 90 95
 Val Ser Ala Asp Ser Thr Asn Arg Pro Gln Ile Val Asp Ala Ala Asn
 100 105 110
 Ile Phe Arg Ala Arg Val Val Asp Val Ala Pro Asp Ser Val Val Ile
 115 120 125
 Glu Ser Thr Gly Thr Pro Gly Lys Leu Arg Ala Leu Leu Asp Val Met
 130 135 140
 Glu Pro Phe Gly Ile Arg Glu Leu Ile Gln Ser Gly Gln Ile Ala Leu
 145 150 155 160
 Asn Arg Gly Pro Lys Thr Met Ala Pro Ala Lys Ile
 165 170

<210> 28
 <211> 519
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IlvN A42V NT

<400> 28
 atggctaatt ctgacgtcac ccgccacatc ctgtccgtac tcgttcagga cgtagacgga 60

atcatttccc gcgtatcagg tatgttcacc cgacgcgcat tcaacctcgt gtccctcgtg 120
 tctgtaaaga ccgaaacact cggcatcaac cgcatacagg ttgttgatga cgccgacgag 180
 ctcaacattg agcagatcac caagcagctc aacaagctga tccccgtgct caaagtcgtg 240
 cgacttgatg aagagaccac catcgcccgc gcaatcatgc tggtaaggt ctctgcggat 300
 agcaccaacc gtccgcagat cgtogacgcc gcgaacatct tccgcgcccg agtcgctgac 360
 gtggctccag actctgtggg tattgaatcc acaggcacc caggcaagct ccgcgactg 420
 cttgatgtga tggaaccatt cggaatccgc gaactgatcc aatccggaca gattgcactc 480
 aaccgcggtc cgaagaccat ggctccggcc aagatctaa 519

<210> 29
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 11

<400> 29 33
 tcgagctcgg taccgccg tcaccaaagc gga

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

<220>
 <223> đoạn mỗi 12

<400> 30 30
 gtccctcgtg tctgtaaaga ccgaaacact

<210> 31
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 13

<400> 31 30
 agtgtttcgg tctttacaga cacgagggac

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

<220>
 <223> đoạn mỗi 14

<400> 32 35
 ctctagagga tccccttaga tcttggccgg agcca

<210> 33
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 15

<400> 33 18
 ccgcgtcacc aaagcgga

<210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 16

<400> 34 20
 ttagatcttg gccggagcca

<210> 35
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> YjeH AA

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

Thr Thr

<210> 36
 <211> 1257
 <212> ADN
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> YjeH NT

<400> 36
 atgagtggac tcaaacaaga actggggctg gccagggca ttggcctgct atcgacgtca 60
 ttattaggca ctggcgtggt tgccgttcct gcgttagctg cgctggtagc gggcaataac 120
 agcctgtggg cgtggcccggt tttgattatc ttagtgttcc cgattgcgat tgtgtttgcg 180
 attctgggtc gccactatcc cagcgcaggc ggctgcgcgc acttcgtcgg tatggcgttt 240
 ggttcgcggc ttgagcaggt caccggctgg ctgtttttat cggtcattcc cgtgggtttg 300
 cctgccgcac taaaattgc cgccgggttc ggccaggcga tgtttggtg gcatagctgg 360
 caactgttgt tggcagaact cgttacgctg gcgctggtgt ggtatatcgg tactcgcggg 420
 gccagttcca gtgctaattc acaaaccgtt attgccggac ttatcgtcgc gctgattgct 480
 gctatctggt gggcgggcga tatcaaacct gcgaatatcc cctttccggc acctggtaat 540
 atogaactta ccgggttatt tgctgcgcta tcagtgatgt tctgggtgtt tgctcggctg 600
 gaggcatttg cccatctcgc ctccgaattt aaaaatccag agcgtgattt tctcgtgct 660
 ttgatgattg gtctgctgct ggcaggatta gtctactggg gctgtacggg agtcgtctta 720
 cacttcgacg cctatggtga aaaaatggcg gcggcagcat cgcttccaaa aattgtagtg 780
 cagttgttcg gtgtaggagc gttatggatt gcctgcgtga ttggctatct ggcctgcttt 840
 gccagtctca acatttatat acagagcttc gcccgctgg tctggctcga ggcgcaacat 900
 aatcctgacc actacctggc acgcctctct tctcgccata tcccgaataa tgccctcaat 960
 gcggtgctcg gctgctgtgt ggtgagcact ttgggtgattc atgctttaga gatcaatctg 1020
 gacgctctta ttatttatgc caatggcact tttattatga tttatctggt atgcatgctg 1080
 gcaggctgta aattattgca aggacgttat cgactactgg cgggtggttg cgggctgtta 1140
 tgcgttctgt tactggcaat ggtcggctgg aaaagtctct atgcgctgat catgctggcg 1200
 gggttatggc tgttgctgcc aaaacgaaaa acgccggaaa atggcataac cacataa 1257

<210> 37
 <211> 88
 <212> PRT

<213> Chưa biết

<220>

<223> NCg12335 AA

<400> 37

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

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

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

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

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

Glu Lys His Ser Gly Val Ser Pro
85

<210> 38

<211> 267

<212> ADN

<213> Chưa biết

<220>

<223> NCg12335 NT

<400> 38

gtggcctaca ccttcgacca cgtcgtcgcc tggcgctggt gcaccaaaga agacgcctac 60

aactacacc acctcttcga tcaactcaa ccacccttaa togtgaccac cgacggacaa 120

aaaaggcgca ctcaaagcca tcaccacgac ctggccgaca acgaaaatcc aacgctgcct 180

cgtccacgtc aaacgcaacg tccaaaaaca cgtcacccta agaccctgctc tgagctcgcc 240

gaaaagcact cgggggtctc tccttga 267

<210> 39

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tn_5 F

<400> 39

tgaattcgag ctcggtaccc caccgacgcg catctgcct

39

<210> 40

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

 <220>
 <223> Tn_5 R

 <400> 40 50
 ggtgtggtga ctttcagcag ttcccggggg ggaggaggca tgtggtgttg

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

 <220>
 <223> Tn_3 F

 <400> 41 50
 caacaccaca tgctctctcc cccccgggaa ctgctgaaag tcaccacacc

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

 <220>
 <223> Tn_3 R

 <400> 42 42
 gtcgactcta gaggatcccc ctcccaaacc attgaggaat gg

 <210> 43
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CJ7_yjeH F

 <400> 43 39
 acaccacatg cctcctcccc agaaacatcc cagcgctac

 <210> 44
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CJ7_yjeH R

 <400> 44

agttcttgggt tgagtcact catagtgttt cctttcggtg ggt 43

<210> 45
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yjeH F

<400> 45 44
 acccaacgaa aggaaacact atgagtggac tcaaacaaga actg

<210> 46
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yjeH R

<400> 46 44
 gactttcagc agttcccggg ttatgtgggt atgccatttt ccgg

<210> 47
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yjeH F351L AA

<400> 47
 Met Ser Gly Leu Lys Gln Glu Leu Gly Leu Ala Gln Gly Ile Gly Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Thr Ser Leu Leu Gly Thr Gly Val Phe Ala Val Pro Ala Leu
 20 25 30

Ala Ala Leu Val Ala Gly Asn Asn Ser Leu Trp Ala Trp Pro Val Leu
 35 40 45

Ile Ile Leu Val Phe Pro Ile Ala Ile Val Phe Ala Ile Leu Gly Arg
 50 55 60

His Tyr Pro Ser Ala Gly Gly Val Ala His Phe Val Gly Met Ala Phe
 65 70 75 80

Gly Ser Arg Leu Glu Arg Val Thr Gly Trp Leu Phe Leu Ser Val Ile
 85 90 95

Pro Val Gly Leu Pro Ala Ala Leu Gln Ile Ala Ala Gly Phe Gly Gln
 100 105 110

Ala Met Phe Gly Trp His Ser Trp Gln Leu Leu Leu Ala Glu Leu Gly

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

<210> 48

<211> 1257
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> yjeH F351L NT

<400> 48
 atgagtggac tcaaacaaga actggggctg gccagggca ttggcctgct atcgacgtca 60
 ttattaggca ctggcgtggt tgcogttcct gcgtagctg cgctggtagc gggcaataac 120
 agcctgtggg cgtggcccgt tttgattatc ttagtggtcc cgattgcgat tgtgtttgcg 180
 attctgggtc gccactatcc cagcgcaggc ggcgtcgcgc acttcgtcgg tatggcgttt 240
 ggttcgcggc ttgagcaggt caccggctgg ctgaatttat cggtcattcc cgtgggtttg 300
 cctgccgcac tacaaattgc cgccgggttc ggccaggcga tgtttggctg gcatagctgg 360
 caactgttgt tggcagaact cggtacgctg gcgctggtgt ggtatcgcg tactcgcggg 420
 gccagttcca gtgctaattc acaaaccgtt attgccggac ttatcgtcgc gctgattgtc 480
 gctatctggt gggcgggcca tatcaaacct gcgaatatcc cttttccggc acctggtaat 540
 atcgaactta ccgggttatt tgctgcgcta tcagtgatgt tctgggtgtt tgtcggctctg 600
 gaggcatttg cccatctcgc ctccgaattt aaaaatccag agcgtgattt tcctcgtgct 660
 ttgatgattg gtctgctgct ggcaggatta gtctactggg gctgtacggg agtcgtctta 720
 cacttcgacg cctatggtga aaaaatggcg gcggcagcat cgcttccaaa aattgtagtg 780
 cagttgttcg gtgtaggagc gttatggatt gcctgcgtga ttggctatct ggctgcttt 840
 gccagtctca acatttatat acagagcttc gccgcctgg tctggctgca ggcgcaacat 900
 aatcctgacc actacctggc acgctctctt tctcgccata tcccgaataa tgccctcaat 960
 gcggtgctcg gctgctgtgt ggtgagcact ttgggtgattc atgctttaga gatcaatctg 1020
 gacgctctta ttatttatgc caatggcatc cttattatga tttatctggt atgcatgctg 1080
 gcaggctgta aattattgca aggacgttat cgactactgg cgggtggttg cgggctgtta 1140
 tgcgttctgt tactggcaat ggtcggctgg aaaagtctct atgcgctgat catgctggcg 1200
 gggttatggc tgttgctgcc aaaacgaaaa acgccgaaa atggcataac cacataa 1257

<210> 49
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> F351L F

<400> 49 23
caatggcatc cttattatga ttt

<210> 50
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> F351L R

<400> 50 23
aaatcataat aaggatgccca ttg

<210> 51
<211> 127
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Công thức chung 1(GltA 289~415)

<220>
<221> ĐẶC TÍNH MISC
<222> (1)
<223> Xaa là N hoặc S.

<220>
<221> ĐẶC TÍNH MISC
<222> (9)
<223> Xaa là A hoặc E.

<220>
<221> ĐẶC TÍNH MISC
<222> (73)
<223> Xaa là Y hoặc C.

<400> 51
Xaa Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Xaa Phe Met Asn Lys Val Lys Asn
1 5 10 15
Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys
20 25 30
Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile
35 40 45
Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu
50 55 60
Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Xaa Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr
65 70 75 80
Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe

				85				90				95			
Pro	Thr	Asp	Phe	Phe	Thr	Val	Leu	Phe	Ala	Ile	Gly	Arg	Leu	Pro	Gly
		100					105				110				
Trp	Ile	Ala	His	Tyr	Arg	Glu	Gln	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Asn	His	
		115				120				125					