



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0052912
(51)^{2020.01} C12N 9/04; C12N 15/77; C12P 13/12; (13) B
C12P 13/06; C12P 13/08; C12N 15/52
-

- (21) 1-2020-04050 (22) 21/05/2019
(86) PCT/KR2019/006083 21/05/2019 (87) WO2019/231159 05/12/2019
(30) 10-2018-0060445 28/05/2018 KR
(45) 25/11/2025 452 (43) 25/06/2021 399A
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea
(72) KIM, Hyo Jin (KR); HUH, Lan (KR); LIM, Sang Jo (KR); KIM, Hyun Ah (KR);
KIM, Hyung Joon (KR); SEO, Chang Il (KR); LEE, Seung Bin (KR); LEE, Ji Sun
(KR).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

- (54) HOMOSERIN DEHYDROGENAZA ĐƯỢC CẢI BIẾN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN
XUẤT HOMOSERIN HOẶC L-AXIT AMIN THU ĐƯỢC TỪ HOMOSERIN
BẰNG CÁCH SỬ DỤNG NÓ

(21) 1-2020-04050

(57) Sáng chế đề cập tới homoserin dehydrogenaza được cải biến và phương pháp sản xuất L-axit amin thu được từ homoserin bằng cách sử dụng enzym này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới homoserin dehydrogenaza được cải biến. Cụ thể là, sáng chế đề cập tới homoserin dehydrogenaza được cải biến có polypeptit bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza, trong đó thay thế axit amin này được thực hiện bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 285 bằng isoloxin; axit amin ở vị trí 398 bằng glutamin; hoặc axit amin ở cả hai vị trí tương ứng bằng cả isoloxin và glutamin. Ngoài ra, sáng chế đề cập tới phương pháp sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin bằng cách sử dụng homoserin dehydrogenaza được cải biến, chế phẩm để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, phương pháp làm gia tăng khả năng sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, hoặc ứng dụng của homoserin dehydrogenaza được cải biến.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong số các L-axit amin, L-threonin, L-isoloxin, và L-methionin thông thường sử dụng homoserin được sản xuất bằng homoserin dehydrogenaza (trong bản mô tả này được gọi là “Hom”; EC:1.1.1.3) từ aspartat-semialdehyt (trong bản mô tả này được gọi là “ASA”). Do đó, để sản xuất các axit amin này bằng phương pháp lên men, cần thiết phải duy trì hoạt tính của các enzym được sử dụng trong con đường sinh tổng hợp này ở nồng độ nhất định hoặc cao hơn, và đã có nghiên cứu tích cực về vấn đề này.

Cụ thể là, hoạt tính của homoserin dehydrogenaza tác động ở điểm phân nhánh của các con đường sinh tổng hợp của L-lysin và L-threonin là đã biết được điều tiết bởi L-threonin và L-isoloxin. Gần đây, đã có một vài báo cáo về Hom được khử miễn cảm đối với sự ức chế hồi dưỡng bởi L-threonin và phương pháp sản xuất L-threonin bằng cách này. Năm 1991, Eikmann *et al.* ở Đức đã báo cáo Hom được khử miễn cảm bằng cách thay thế glyxin, đây là gốc axit amin ở vị trí 378 của Hom, bằng glutamat (Eikmanns BJ *et al.*, Appl. Microbial Biotechnol. 34: 617-622, 1991); và năm 1991, Archer *et al.* đã báo cáo là việc làm mất tính nhạy cảm diễn ra khi đầu tận cùng-C của Hom bị làm hư hại do đột biến chuyển-khung (Archer JA *et al.*, Gene 107: 53-59, 1991).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu về việc làm mất tính nhạy cảm đối với sự ức chế hồi dưỡng bằng threonin, và từ đó, các tác giả đã xác định được là một gen mới mã hoá Hom được cải biến được phân lập, và là khả năng sản xuất-L-axit amin được cải thiện ở vi sinh vật mà ở đó gen mới này được tải nạp, nhờ đó hoàn thành sáng chế này.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất homoserin dehydrogenaza được cải biến có polypeptit bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza, trong đó thay thế axit amin này được thực hiện bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 285 bằng một axit amin khác; axit amin ở vị trí 398 bằng axit amin khác; hoặc axit amin ở cả hai vị trí bằng các axit amin khác.

Một mục đích khác của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hoá dehydrogenaza được cải biến.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật này trong môi trường; và thu hồi homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin từ vi sinh vật hoặc môi trường này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, mà bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến hoặc vi sinh vật bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp làm gia tăng khả năng sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, mà bao gồm biểu hiện homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế ở vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất việc sử dụng homoserin dehydrogenaza được cải biến để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ

homoserin của bản mô tả này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất việc sử dụng polynucleotit để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin của bản mô tả này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất việc sử dụng vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin của bản mô tả này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất việc sử dụng chế phẩm để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin của bản mô tả này.

Hiệu quả có lợi

Homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế có thể được sử dụng rộng rãi để sản xuất khối lượng lớn homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin hữu hiệu, bởi vì sự ức chế hồi dưỡng bởi sản phẩm cuối cùng được khử miễn cảm so với kiểu tự nhiên hoặc kiểu hoang.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Trong khi từng giải thích và phương án minh họa trong bản mô tả này có thể áp dụng cho các giải thích và phương án minh họa khác. Nghĩa là, tất cả các tổ hợp của nhiều yếu tố được đề cập trong bản mô tả này là thuộc phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế không nên bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể dưới đây.

Để đạt được các mục đích nêu trên, một khía cạnh của sáng chế là đề xuất homoserin dehydrogenaza được cải biến có polypeptit bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza, trong đó thay thế axit amin này được thực hiện bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 285 hoặc axit amin ở vị trí 398 bằng axit amin khác, hoặc bằng tổ hợp của chúng.

Cụ thể là, sáng chế đề xuất biến thể homoserin dehydrogenaza có polypeptit bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza, trong đó thay thế axit amin này được thực hiện bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 285 bằng isoloxin; axit amin ở vị trí 398 bằng glutamin; hoặc axit amin ở cả hai vị trí tương ứng bằng isoloxin và glutamin. Cụ thể hơn là, sáng chế đề xuất

homoserin dehydrogenaza được cải biến, trong đó trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, axit amin ở vị trí 285 được thay thế bằng isoloxin; axit amin ở vị trí 398 được thay thế bằng glutamin; hoặc axit amin ở cả hai vị trí được thay thế tương ứng bằng isoloxin và glutamin.

Trong bản mô tả này, homoserin dehydrogenaza (EC:1.1.1.3) chỉ enzym xúc tác tổng hợp homoserin, chất trung gian hay gấp để sinh tổng hợp methionin, threonin, và isoloxin ở thực vật và vi sinh vật. Trong bản mô tả này, homoserin dehydrogenaza có thể được đề cập đến bất kể nguồn gốc miễn là có hoạt tính chuyển đổi nêu trên, và enzym thu được từ sinh vật bất kỳ (thực vật, vi sinh vật, v.v.) có thể được sử dụng làm homoserin dehydrogenaza. Cụ thể là, homoserin dehydrogenaza có thể thu được từ vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, và cụ thể hơn là có thể thu được từ *Corynebacterium glutamicum*. Ví dụ, homoserin dehydrogenaza có thể là protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1. Protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 có thể được sử dụng hoán đổi cho thuật ngữ “protein có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1” hoặc “protein gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1”.

Trong bản mô tả này, nhiều phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này có thể được sử dụng cho phương pháp thu được homoserin dehydrogenaza. Ví dụ về phương pháp này bao gồm kỹ thuật tổng hợp gen bao gồm tối ưu hoá các codon sao cho thu được protein với hiệu suất cao ở vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, vi sinh vật này thường được sử dụng để biểu hiện protein, và phương pháp sàng lọc nguồn enzym hữu ích bằng cách sử dụng tin sinh học dựa vào bộ gen di truyền học sinh thái của vi sinh vật, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Trong bản mô tả này, protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza không loại trừ đột biến có thể xảy ra do có bổ sung trình tự không có nghĩa phía trước hoặc phía sau trình tự axit amin của protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza, ví dụ, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, hoặc đột biến có trong tự nhiên, hoặc đột biến câm của chúng. Ngoài ra, protein có cùng hoạt tính hoặc hoạt tính tương ứng với protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 tương ứng với protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza của bản mô tả này. Ví dụ cụ thể là, protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza của bản mô tả này có thể là protein gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin có mức tương đồng với nó ít nhất là 80%, 90%, 95%, hoặc

97%.

Ngoài ra, mặc dù được mô tả là “protein hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO cụ thể” trong bản mô tả này, hiển nhiên là protein bất kỳ có trình tự axit amin với khuyết đoạn, cải biến, thay thế hoặc bổ sung một phần của trình tự này cũng thuộc phạm vi của sáng chế miễn là protein này có trình tự axit amin với mức tương đồng bất kỳ trong số các mức tương đồng nêu trên và thể hiện tác dụng tương ứng với protein nêu trên. Ví dụ, trong bản mô tả này, protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza có thể là homoserin dehydrogenaza thu được từ *Corynebacterium glutamicum*. Cụ thể hơn là, protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza có thể là trình tự axit amin (SEQ ID NO: 1) của homoserin dehydrogenaza thu được từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, trình tự axit amin (SEQ ID NO: 49) của homoserin dehydrogenaza thu được từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067, hoặc trình tự axit amin (SEQ ID NO: 50) của homoserin dehydrogenaza thu được từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869. Do homoserin dehydrogenaza có trình tự nêu trên thể hiện tương đồng với nhau ở mức 80%, 90%, 95%, hoặc 97% hoặc lớn hơn, và do homoserin dehydrogenaza thể hiện tác dụng tương ứng với tác dụng của homoserin dehydrogenaza, hiển nhiên là chúng được bao gồm trong protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza của bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “mức tương đồng” chỉ % tương đồng giữa hai polynucleotit hoặc polypeptit. Mức tương đồng chỉ mức độ so khớp với trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit đã cho, và có thể được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm. Trong bản mô tả này, trình tự có mức tương đồng có hoạt tính giống hoặc tương tự với trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit đã cho được biểu thị là “% tương đồng”. Mức tương đồng giữa các trình tự từ một nhóm này so với một nhóm khác có thể được xác định bằng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, mức tương đồng có thể được xác nhận bằng cách sử dụng phần mềm tiêu chuẩn, nghĩa là, BLAST 2.0, để tính toán các tham số, như điểm, mức tương đồng, và mức tương tự hoặc bằng cách so sánh các trình tự thông qua các thử nghiệm lai hoá Southern, và điều kiện lai hoá thích hợp cần xác định có thể xác định được bằng phương pháp thuộc hiểu biết của người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.,

New York).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “cải biến”, “được cải biến”, hoặc “biến thể” chỉ thể nuôi cấy hoặc cá thể thể hiện biến đổi có thể di truyền hoặc không thể di truyền ở một kiểu hình ổn định. Cụ thể là, thuật ngữ “biến thể” có thể nhằm để chỉ biến thể, trong đó hoạt tính của biến thể được gia tăng một cách hiệu quả bởi vì một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin tương ứng với protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza được cải biến so với kiểu hoang, kiểu nguyên thủy hoặc kiểu không được cải biến, hoặc biến thể, trong đó sự ức chế hồi dưỡng bởi isoloxin, threonin, hoặc dẫn xuất của chúng, được huỷ bỏ, hoặc biến thể trong đó gia tăng hoạt tính và ức chế hồi dưỡng đều được huỷ bỏ.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “homoserin dehydrogenaza được cải biến” có thể được sử dụng hoán đổi với “biến thể homoserin dehydrogenaza”. Mặt khác, biến thể này có thể không có trong tự nhiên.

Cụ thể là, homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế có thể là protein được cải biến có polypeptit bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza, trong đó thay thế axit amin này được thực hiện bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 285 bằng isoloxin, axit amin ở vị trí 398 bằng glutamin, hoặc tổ hợp của chúng. Trình tự axit amin của protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza là như được mô tả ở trên, và có thể là, ví dụ, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, axit amin ở vị trí 285 có thể là trường hợp trong đó threonin được thay thế bằng isoloxin, và axit amin ở vị trí 398 có thể là trường hợp trong đó arginin được thay thế bằng glutamin.

Ngoài ra, homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế có thể là protein được cải biến có polypeptit bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza, trong đó thay thế axit amin này được thực hiện bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 378 bằng tryptophan. Ngoài ra, homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế có thể là protein được cải biến có polypeptit bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza, trong đó thay thế axit amin này được thực hiện bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 285 bằng isoloxin, axit amin ở vị trí 398 bằng glutamin, hoặc tổ hợp của chúng; trong homoserin dehydrogenaza được cải biến này, axit amin ở vị

trí 378 có thể được thay thế tiếp bằng tryptophan. Cụ thể hơn là, axit amin ở vị trí 378 có thể là trường hợp trong đó glyxin được thay thế bằng tryptophan.

Cụ thể hơn nữa là, homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế là protein được cải biến có polypeptit bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, trong đó thay thế axit amin này được thực hiện bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 285 bằng isoloxin, axit amin ở vị trí 398 bằng glutamin, hoặc tổ hợp của chúng. Ví dụ, homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế có thể là protein bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, hoặc SEQ ID NO: 13. Ngoài ra, đột biến có thể xảy ra do bổ sung trình tự không có nghĩa phía trước hoặc phía sau trình tự axit amin, đột biến có trong tự nhiên, hoặc đột biến câm của chúng là không bị loại trừ. Ngoài ra, protein có cùng hoạt tính hoặc hoạt tính tương ứng với homoserin dehydrogenaza được cải biến tương ứng với protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza của bản mô tả này. Ví dụ cụ thể là, homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế có thể là protein gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, hoặc SEQ ID NO: 13, hoặc protein có mức tương đồng với trình tự axit amin nêu trên ít nhất là 80%, 90%, 95%, hoặc 97%. Ngoài ra, mặc dù được mô tả là “protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin của SEQ ID NO cụ thể” trong bản mô tả này, hiển nhiên là protein bất kỳ có trình tự axit amin với khuyết đoạn, cải biến, thay thế hoặc bổ sung một phần của trình tự này có thể cũng thuộc phạm vi của sáng chế miễn là protein này có trình tự axit amin với mức tương đồng bất kỳ trong số các mức tương đồng nêu trên và thể hiện tác dụng tương ứng với protein nêu trên.

Ngoài ra, homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế là homoserin dehydrogenaza được cải biến có polypeptit bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza. Hiển nhiên là protein bất kỳ mà bao gồm cải biến, trong đó axit amin ở vị trí 285 hoặc 398 được thay thế bằng axit amin khác, và thể hiện tác dụng tương ứng với homoserin dehydrogenaza, là thuộc phạm vi của sáng chế.

Ngoài ra, khác với protein kiểu hoang hoặc nguyên thủy, hoặc không phải protein được cải biến có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza, homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế có thể là trường hợp trong đó ức chế hồi dưỡng bởi sản phẩm cuối cùng, *nghĩa là*, isoloxin, threonin, methionin, hoặc homoserin, dẫn xuất hoặc chất tương

tự của chúng được huỷ bỏ hoặc được khử mất cảm. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ức chế hồi dưỡng” nghĩa là sản phẩm chuyển hoá cuối cùng ngăn chặn phản ứng của giai đoạn trước đó. Do đó, khi sự ức chế hồi dưỡng của homoserin dehydrogenaza được huỷ bỏ hoặc được khử mất cảm, hiệu suất của homoserin và hiệu suất của L-axit amin thu được từ homoserin có thể được cải thiện so với khi sự ức chế hồi dưỡng không được huỷ bỏ hoặc được khử mất cảm.

L-axit amin thu được từ homoserin chỉ L-axit amin mà có thể được sinh tổng hợp bằng cách sử dụng L-homoserin làm tiền chất, và không bị giới hạn miễn là chất có thể sinh tổng hợp từ L-homoserin. L-axit amin thu được từ homoserin có thể bao gồm không chỉ L-axit amin thu được từ homoserin mà còn dẫn xuất của nó. Ví dụ, L-axit amin thu được từ homoserin có thể là L-threonin, L-isoloxin, *O*-axetyl homoserin, *O*-succinyl-L-homoserin, *O*-phospho-L-homoserin, L-methionin, và/hoặc L-glyxin, nhưng không chỉ giới hạn ở những axit amin này. Cụ thể hơn là, L-axit amin thu được từ homoserin có thể là L-threonin, L-isoloxin, *O*-axetyl homoserin, *O*-succinyl-L-homoserin, và/hoặc L-methionin, nhưng không chỉ giới hạn ở những axit amin này.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hoá homoserin dehydrogenaza được cải biến.

Homoserin dehydrogenaza và biến thể là như được mô tả ở trên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “polynucleotit” là polyme nucleotit bao gồm các monome nucleotit được liên kết theo cách có điều khiển cộng hoá trị thành chuỗi, và ví dụ về chúng là sợi ADN hoặc ARN có độ dài định trước hoặc dài hơn, và cụ thể hơn là, chỉ mảnh polynucleotit mã hoá homoserin dehydrogenaza được cải biến. Polynucleotit mã hoá protein được cải biến của sáng chế có thể được bao gồm không hạn chế miễn là có trình tự polynucleotit mã hoá protein được cải biến có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza của sáng chế.

Trong bản mô tả này, polynucleotit mã hoá trình tự axit amin của biến thể homoserin dehydrogenaza có thể thu được cụ thể từ vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, và cụ thể hơn là thu được từ *Corynebacterium glutamicum*, nhưng không chỉ giới hạn ở những vi sinh vật này.

Ngoài ra, trong polynucleotit mã hoá protein, nhiều cải biến có thể được thực hiện

ở vùng mã hoá mà không thay đổi trình tự axit amin của protein, do thoái hoá codon hoặc xét đến các codon được ưu tiên ở sinh vật mà đó protein này sẽ biểu hiện. Cụ thể là, polynucleotit có thể là polynucleotit bao gồm trình tự polynucleotit mã hoá protein hoặc trình tự polynucleotit có mức tương đồng với trình tự polynucleotit nêu trên ít nhất là 80%, 90%, 95%, hoặc 97%. Ngoài ra, hiển nhiên là trình tự polynucleotit với khuyết đoạn, cải biến, thay thế hoặc bổ sung một phần của trình tự có thể cũng thuộc phạm vi của sáng chế miễn là trình tự polynucleotit mã hoá protein có mức tương đồng nêu trên và thể hiện tác dụng về cơ bản giống với hoặc tương ứng với protein nêu trên. Polynucleotit mã hoá protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza của bản mô tả này có thể có trình tự polynucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1. Ví dụ, polynucleotit có thể có trình tự polynucleotit của SEQ ID NO: 48, nhưng không chỉ giới hạn ở những axit amin này. Ngoài ra, polynucleotit mã hoá homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế có thể có trình tự polynucleotit mã hoá polypeptit bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, và cụ thể là có thể có trình tự polynucleotit mã hoá SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, hoặc SEQ ID NO: 13. Ví dụ, polynucleotit có thể có trình tự polynucleotit của SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, hoặc SEQ ID NO: 9, nhưng không chỉ giới hạn ở những trình tự này.

Ngoài ra, đoạn dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự bất kỳ mà lai hoá với trình tự bổ trợ cho tất cả hoặc một phần của trình tự polynucleotit trong điều kiện nghiêm ngặt để mã hoá protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza của bản mô tả này, cũng có thể được bao gồm mà không có giới hạn. “Điều kiện nghiêm ngặt” nghĩa là các điều kiện mà ở đó cho phép lai hoá đặc hiệu giữa các polynucleotit. Các điều kiện này được mô tả cụ thể trong tài liệu (ví dụ, J. Sambrook *et al.*, *infra*). Điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm, ví dụ, điều kiện trong đó, các gen mức tương đồng cao, mức tương đồng 80% hoặc cao hơn, cụ thể là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 95% hoặc cao hơn, đặc biệt cụ thể hơn là 97% hoặc cao hơn, cụ thể hơn nữa là 99% hoặc cao hơn được lai hoá với nhau và các gen có mức tương đồng thấp hơn mức tương đồng nêu trên không được lai với nhau, hoặc điều kiện rửa thông thường của quá trình lai hoá Southern, *nghĩa là*, rửa một lần, cụ thể là, hai hoặc ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, cụ thể là, 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, và cụ thể hơn là 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS. Quá trình lai hoá đòi hỏi là hai polynucleotit có chứa trình tự bổ trợ, mặc dù tùy thuộc vào mức độ nghiêm ngặt của sự lai hoá, sự ghép cặp không phù hợp giữa các bazơ là có thể.

Thuật ngữ “bổ trợ” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ nucleotit mà có thể lai hoá với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin là bổ trợ cho thymin và xytosin là bổ trợ cho guanin. Do đó, sáng chế có thể bao gồm mảnh nucleotit được phân lập bổ trợ cho toàn bộ trình tự cũng như trình tự nucleotit về cơ bản tương tự với nó. Cụ thể là, polynucleotit có mức tương đồng có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai hoá bao gồm bước lai hoá ở giá trị T_m là 55°C trong điều kiện nêu trên. Hơn nữa, giá trị T_m có thể là 60°C, 63°C, hoặc 65°C, nhưng không chỉ giới hạn ở các nhiệt độ này, và có thể được kiểm soát thích hợp bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tùy thuộc vào mục đích lai hoá. Mức độ nghiêm ngặt thích hợp để lai hoá các polynucleotit tùy thuộc vào độ dài của polynucleotit và mức độ bổ trợ, và các biến số này là đã biết rõ trong lĩnh vực này (Sambrook *et al.*, *supra*, 9.50-9.51, 11.7-11.8).

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vi sinh vật bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến. Cụ thể là, sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến. Ngoài ra, sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất L-alanin, bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở các vi sinh vật này.

Homoserin dehydrogenaza và biến thể là như được mô tả ở trên.

Cụ thể là, vi sinh vật bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế chỉ vi sinh vật mà vốn có khả năng sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, hoặc vi sinh vật mà khả năng sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin được mang lại cho chủng gốc không có khả năng sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin. Cụ thể là, vi sinh vật bao gồm homoserin dehydrogenaza có thể là vi sinh vật biểu hiện homoserin dehydrogenaza được cải biến, trong đó trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, axit amin ở vị trí 285 được thay thế bằng isoloxin; axit amin ở vị trí 398 được thay thế bằng glutamin; hoặc axit amin ở cả hai vị trí được thay thế tương ứng bằng isoloxin và glutamin, như không chỉ giới hạn ở vi sinh vật này. Vi sinh vật có thể là tế bào hoặc vi sinh vật mà bao gồm polynucleotit mã hoá homoserin dehydrogenaza được cải biến hoặc mà có khả năng biểu hiện polypeptit được cải biến bằng cách biến nạp vào vật truyền bao gồm polynucleotit mã hoá homoserin dehydrogenaza được cải biến. Cho các mục đích của sáng chế, tế bào vật chủ hoặc vi sinh vật có thể là vi

sinh vật bất kỳ có khả năng sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, mà bao gồm polypeptit được cải biến.

Vì sinh vật bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế có khả năng sản xuất homoserin, L-axit amin thu được từ homoserin, hoặc L-alanin được cải thiện so với vi sinh vật kiểu hoang hoặc vi sinh vật bao gồm protein có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza được cải biến. Do đó, homoserin, L-axit amin thu được từ homoserin, hoặc L-alanin có thể thu được với hiệu suất cao từ vi sinh vật này.

Trong bản mô tả này, loại vi sinh vật bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến không bị giới hạn cụ thể ở, mà có thể là *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., *Providencia* sp., *Corynebacterium* sp., hoặc *Brevibacterium* sp. Cụ thể hơn là, vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*.

Trong bản mô tả này, “vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*” cụ thể có thể là *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium efficiens*, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở những vi sinh vật này. Cụ thể hơn là, trong bản mô tả này, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium glutamicum*.

Trong khi đó, vi sinh vật bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến có thể là vi sinh vật mà vật truyền bao gồm polynucleotit mã hoá biến thể homoserin dehydrogenaza được đưa vào, nhưng không chỉ giới hạn ở vi sinh vật này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vật truyền” chỉ cấu trúc ADN bao gồm trình tự nucleotit của polynucleotit mã hoá protein đích, ở đó trình tự nucleotit đích này được liên kết theo cách có điều với trình tự đối chứng thích hợp sao cho nó có thể được biểu hiện ở vật chủ thích hợp. Trình tự đối chứng bao gồm đoạn khởi đầu có khả năng khởi đầu quá trình phiên mã, trình tự điều hành để kiểm soát phiên mã, trình tự mã hoá miền gắn kết-ribosom ARNt thích hợp, và trình tự kiểm soát việc kết thúc quá trình phiên mã và dịch mã. Vật truyền, sau khi được biến nạp với tế bào vật chủ thích hợp, có thể được sao chép hoặc hoạt động bất kể bộ gen của vật chủ, hoặc có thể được tích hợp vào bản thân bộ gen của vật chủ.

Vật truyền được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, miễn là có thể sao chép trong tế bào vật chủ, và có thể sử dụng vật truyền bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về vật truyền quy ước có thể bao gồm plasmid, cosmit, virus, và thể thực khuẩn tự nhiên hoặc tái tổ hợp. Ví dụ, có thể sử dụng *pWE15*, *M13*, *MBL3*, *MBL4*, *IXII*, *ASHII*, *APII*, *t10*, *t11*, *Charon4A*, và *Charon21A* làm vật truyền thực khuẩn thể hoặc vật truyền cosmit; và có thể sử dụng loại *pBR*, loại *pUC*, loại *pBluescriptII*, loại *pGEM*, loại *pTZ*, loại *pCL*, và loại *pET* làm vật truyền plasmid. Cụ thể là, có thể sử dụng vật truyền *pACYC177*, *pACYC184*, *pCL*, *pECCG117*, *pUC19*, *pBR322*, *pMW118*, và *pCC1BAC*, nhưng không chỉ giới hạn ở vật truyền này.

Vật truyền có thể sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và có thể sử dụng vật truyền biểu hiện bất kỳ đã biết. Ngoài ra, polynucleotit mã hoá protein đích trong nhiễm sắc thể có thể được cài xen thông qua vật truyền để cài xen nhiễm sắc thể. Việc cài xen polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, tái tổ hợp tương đồng), nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp này. Có thể bao gồm bổ sung chất đánh dấu chọn lọc để xác nhận có cài xen gen thành công vào nhiễm sắc thể. Chất đánh dấu chọn lọc là để sàng lọc các tế bào mà được biến nạp với vật truyền, nói theo cách khác, là để xác định xem liệu phân tử polynucleotit đích có được cài xen hay không. Chất đánh dấu mà cung cấp kiểu hình có thể chọn lọc như, tính kháng thuốc, hiện tượng dinh dưỡng thụ động, tính kháng các chất độc tế bào, hoặc biểu hiện các protein bề mặt có thể được sử dụng. Trong môi trường được xử lý với chất chọn lọc, chỉ các tế bào biểu hiện chất đánh dấu chọn lọc có thể sống sót, hoặc các tế bào thể hiện kiểu hình khác, và do đó các tế bào được biến nạp thành công có thể được chọn lọc thông qua phương pháp này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến nạp” chỉ việc đưa vật truyền bao gồm polynucleotit mã hoá protein đích vào tế bào vật chủ theo cách sao cho protein này được mã hoá bởi polynucleotit này được biểu hiện ở tế bào vật chủ. Miễn là polynucleotit được biến nạp có thể được biểu hiện ở tế bào vật chủ, nó có thể được tích hợp hoặc đưa vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ, hoặc có thể tồn tại ngoài nhiễm sắc thể. Hơn nữa, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hoá protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào ở dạng bất kỳ, miễn là có thể được đưa vào tế bào vật chủ và được biểu hiện ở đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ ở dạng cat-xet biểu hiện,

mà là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết cho biểu hiện tự sinh của nó. Cat-xet biểu hiện có thể bao gồm đoạn khởi đầu được liên kết theo cách có điều khiển với polynucleotit, yếu tố kết thúc phiên mã, vị trí gắn kết ribosom, hoặc yếu tố kết thúc dịch mã. Cat-xet biểu hiện có thể ở dạng vật truyền biểu hiện có thể tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ ở dạng như vậy và được liên kết theo cách có điều khiển với các trình tự cần thiết để biểu hiện ở tế bào vật chủ, nhưng không chỉ giới hạn ở những trình tự này. Phương pháp biến nạp bao gồm phương pháp bất kỳ đưa polynucleotit vào tế bào, và có thể được thực hiện bằng cách chọn lọc một kỹ thuật chuẩn thích hợp đã biết trong lĩnh vực này, tùy thuộc vào tế bào vật chủ. Ví dụ về phương pháp này bao gồm, đục lỗ điện, kết tủa bằng canxi phosphat ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , hoặc $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), canxi clorua (CaCl_2), vi tiêm, kỹ thuật polyetylglycol (PEG), kỹ thuật DEAE-dextran, kỹ thuật cation liposom, kỹ thuật lithi axetat-DMSO, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các kỹ thuật này.

Ngoài ra, thuật ngữ “liên kết theo cách có điều khiển” nghĩa là trình tự polynucleotit được liên kết về mặt chức năng với trình tự khởi đầu mà khởi đầu và điều tiết quá trình phiên mã của polynucleotit mã hoá protein đích của sáng chế. Liên kết theo cách có điều khiển có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết trong lĩnh vực này, phân cắt và liên kết ADN đặc hiệu-vị trí có thể được thực hiện bằng cách sử dụng lyaza và ligaza đã biết, nhưng không chỉ giới hạn ở các enzym này.

Vi sinh vật bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến có thể là vi sinh vật mà đã được biến nạp để bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến ở vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*. Ví dụ, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có thể bao gồm chủng kháng với 2-amino-3-hydroxy-valerat (AHV); chủng sản xuất L-threonin bằng cách thay thế loxin, mà là axit amin ở vị trí 377 của aspartat kinaza (LysC), bằng lysin để làm mất sự ức chế hồi dưỡng của LysC, đây là enzym quan trọng đầu tiên có vai trò trong con đường sinh tổng hợp threonin; chủng sản xuất L-isoloxin bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 323 của gen *ilvA*, mà mã hoá L-threonin dehydrataza (enzym đầu tiên có vai trò trong con đường sinh tổng hợp của isoloxin) ở chủng sản xuất L-threonin, bằng alanin (*Appl. Enviro. Microbiol.*, Dec. 1996, p.4345-4351); chủng sản xuất O-axetyl homoserin bằng cách làm bất hoạt O-axetylhomoserin (thiol)-lyaze, mà tham gia vào con đường phân huỷ của O-axetyl homoserin, và xystathionin gamma-synthaza; hoặc chủng sản xuất

methionin bằng cách làm bất hoạt các yếu tố điều hoà phiên mã của methionin và xystein, nhưng không chỉ giới hạn ở những chủng này.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật này trong môi trường; và thu hồi homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin từ vi sinh vật hoặc môi trường này.

Như mô tả ở trên, vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, bao gồm homoserin dehydrogenaza biến thể của bản mô tả này, và cụ thể hơn là *Corynebacterium glutamicum*. Ngoài ra, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* hoặc *Corynebacterium glutamicum* có thể là vi sinh vật sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin. L-axit amin thu được từ homoserin không chỉ bao gồm L-axit amin thu được từ homoserin mà còn dẫn xuất của nó. Ví dụ, L-axit amin thu được từ homoserin có thể là L-threonin, L-isoloxin, O-axetyl homoserin, O-sucxinyl-L-homoserin, O-phospho-L-homoserin, L-methionin, và/hoặc L-glyxin, nhưng không chỉ giới hạn ở những axit amin này. Cụ thể hơn là, L-axit amin thu được từ homoserin có thể là L-threonin, L-isoloxin, O-axetyl homoserin, O-sucxinyl-L-homoserin, và/hoặc L-methionin, nhưng không chỉ giới hạn ở những axit amin này. Ngoài ra, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* hoặc *Corynebacterium glutamicum* có thể là vi sinh vật sản xuất L-alanin.

Homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin có thể là môi trường nuôi cấy chứa homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, mà được sản xuất bởi vi sinh vật được mô tả trong bản mô tả này, dịch nổi của dịch nuôi cấy này, sản phẩm được chế biến của chúng, hoặc dạng được tinh chế của chúng. Sẽ là thuộc hiểu biết của người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin không chỉ bao gồm dạng trung tính của chúng, mà còn cả dạng muối của chúng.

Phương pháp sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin có thể dễ dàng xác định được bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này trong điều kiện nuôi cấy được tối ưu hoá và điều kiện hoạt tính enzym đã biết trong lĩnh vực này.

Theo phương pháp nêu trên, nuôi cấy vi sinh vật có thể được thực hiện theo quy trình phân mẻ, quy trình liên tục, quy trình nuôi cấy nạp chất dinh dưỡng một lần phân mẻ,

v.v. đã biết trong lĩnh vực này, nhưng không chỉ giới hạn ở quy trình nuôi cấy này v.v. Cụ thể là, đối với điều kiện nuôi cấy, độ pH của dịch nuôi cấy có thể được điều chỉnh đến độ pH thích hợp (ví dụ, từ pH 5 đến pH 9, cụ thể là từ pH 6 đến pH 8, và cụ thể nhất là với hợp chất bazơ thích hợp (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sulfuric), và điều kiện hiếu khí của môi trường nuôi cấy được duy trì bằng cách đưa oxy hoặc hỗn hợp khí có chứa-oxy vào môi trường này. Nhiệt độ nuôi cấy nói chung có thể nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, và cụ thể là từ 25°C đến 40°C trong khoảng từ 10 đến 160 giờ, nhưng không chỉ giới hạn ở các điều kiện nuôi cấy này. Threonin, isoleuxin, hoặc axetyl homoserin được sản xuất bằng cách nuôi cấy nêu trên có thể được bài tiết vào môi trường nuôi cấy hoặc có thể được giữ lại trong các tế bào.

Ngoài ra, ví dụ về nguồn cacbon sẽ sử dụng trong môi trường nuôi cấy có thể bao gồm đường và hydrat cacbon (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, mật đường, tinh bột, và xenluloza); dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu lạc, và dầu dừa); axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic); alcol (ví dụ, glyxerol và etanol); và axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic), nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng đơn độc hoặc kết hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở các nguồn này. Ví dụ về nguồn nitơ sẽ sử dụng trong môi trường nuôi cấy có thể bao gồm các hợp chất hữu cơ có chứa-nitơ (ví dụ, pepton, chiết xuất nấm men, nước thịt, chiết xuất mạch nha, ngô dầm rượu, bột đậu nành, và ure) hoặc hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat), v.v.. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng đơn độc hoặc kết hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở các nguồn này. Ví dụ về nguồn phospho sẽ sử dụng trong môi trường nuôi cấy có thể bao gồm kali dihydro phosphat, di kali hydro phosphat, muối có chứa-natri tương ứng, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các nguồn này. Ngoài ra, muối kim loại (ví dụ, magie sulfat hoặc sắt sulfat), axit amin, vitamin, v.v., mà là các chất thúc đẩy-sinh trưởng thiết yếu, có thể có trong môi trường này.

Trong bản mô tả này, phương pháp để thu hồi homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin được sản xuất trong bước nuôi cấy có thể thực hiện bằng cách thu gom sản phẩm đích từ dịch nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, phương pháp như ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi ion, kết tinh, HPLC, v.v. có

thể được sử dụng, và chất mong muốn mà là homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, có thể được thu hồi từ dịch nuôi cấy hoặc vi sinh vật được nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này. Hơn nữa, việc thu hồi có thể bao gồm quy trình tinh chế bổ sung và có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này. Quy trình bổ sung có thể được đưa vào để gia tăng việc thu hồi sản phẩm đích trước/sau bước nuôi cấy hoặc bước thu hồi.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chế phẩm để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, mà bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến hoặc vi sinh vật bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến của sáng chế.

Chế phẩm để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin chỉ chế phẩm có khả năng sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, trong đó chế phẩm bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến, trong đó trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, axit amin ở vị trí 285 được thay thế bằng isoloxin, axit amin ở vị trí 398 được thay thế bằng glutamin, hoặc axit amin ở cả hai vị trí được thay thế tương ứng bằng isoloxin và glutamin; polynucleotit mã hoá homoserin dehydrogenaza được cải biến; hoặc vi sinh vật bao gồm polynucleotit. Ví dụ, polynucleotit có thể bao gồm thành phần bổ sung có khả năng điều khiển polynucleotit không bị giới hạn. Ví dụ, polynucleotit có thể ở dạng được bao gồm trong vật truyền sao cho gen được liên kết theo cách có thể điều khiển được có thể được biểu hiện ở tế bào vật chủ được đưa vào này.

Ngoài ra, chế phẩm có thể còn bao gồm tá dược thích hợp bất kỳ thường được sử dụng trong chế phẩm để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin. Tá dược có thể, ví dụ, chất bảo quản, chất làm ẩm, chất phân tán, chất tạo hỗn dịch, chất đệm, chất ổn định, chất đẳng trương, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở những chất này.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp làm gia tăng khả năng sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin in vi sinh vật, mà bao gồm thay thế axit amin ở vị trí 285 bằng isoloxin; axit amin ở vị trí 398 bằng glutamin; hoặc axit amin ở cả hai vị trí tương ứng bằng isoloxin và glutamin, trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 có hoạt tính của homoserin dehydrogenaza.

Thuật ngữ “homoserin dehydrogenaza”, và “homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin” là như được mô tả ở trên.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng homoserin dehydrogenaza được cải biến để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng polynucleotit mã hoá homoserin dehydrogenaza được cải biến để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, mà bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến, để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng chế phẩm để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, để sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây sáng chế sẽ được mô tả chi tiết kèm theo các phương án minh hoạ. Tuy nhiên, các phương án minh hoạ đề cập trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh hoạ và không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Sàng lọc vi sinh vật kháng-AHV thông qua cải biến nhân tạo

Trong ví dụ này, tiến hành thí nghiệm mang lại tính kháng 2-amino-3-hydroxy-valerat (trong bản mô tả này được gọi là “AHV”), là một chất tương tự L-threonin, bằng cách sử dụng *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 (Patent Hàn Quốc số 0159812) làm chủng gốc, để huỷ bỏ sự ức chế hồi dưỡng bởi L-threonin của homoserin dehydrogenaza (trong bản mô tả này được gọi là “Hom”, EC:1.1.1.3).

Gây cảm ứng cải biến bằng phương pháp cải biến nhân tạo sử dụng *N*-metyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (trong bản mô tả này được gọi là “NTG”). Chủng KFCC10881, được nuôi cấy trong môi trường giống trong 18 giờ, được chủng nhiễm vào 4 mL môi trường giống, và tiếp đó nuôi cấy cho đến khi OD₆₆₀ đạt khoảng 1,0. Ly tâm môi trường nuôi cấy để thu hồi tế bào, và tiếp đó các tế bào được rửa hai lần bằng 50 mM đệm Tris-malat (pH 6,5) và tạo hỗn dịch trong 4 mL cuối cùng của đệm này. Thêm dung dịch NTG (2 mg/mL trong 0,05 M đệm Tris-malat (pH 6,5)) vào hỗn dịch tế bào để có nồng độ cuối cùng là 150 mg/L, và tiếp đó để yên ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Sau đó, thu hồi tế bào

bằng cách ly tâm, và rửa hai lần bằng cùng đệm này để loại bỏ NTG. Tạo hỗn dịch tế bào rửa xong trong 4 mL dung dịch 20% glyxerol và tiếp đó bảo quản ở -70°C cho đến khi sử dụng. Dàn cấy chủng được xử lý-NTG lên môi trường tối thiểu có chứa 3 g/L AHV, và sau đó thu được 155 chủng KFCC10881 kháng-AHV bằng quy trình trên.

Môi trường giống (pH 7,0)

glucoza 20 g, pepton 10 g, chiết xuất nấm men 5 g, ure 1,5 g, KH_2PO_4 4 g, K_2HPO_4 8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, biotin 100 μg , thiamin HCl 1000 μg , canxi pantothenat 2000 μg , nicotinamit 2000 μg (tính cho 1 L nước cất)

Môi trường tối thiểu (pH 7,2)

Glucosa 5 g, KH_2PO_4 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g, NaCl 0,5 g, biotin 200 μg , thiamin HCl 100 μg , canxi pantothenat 100 μg , nicotinamit 0,03 g, ure 2 g, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,09 mg, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{27} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,04 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,01 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, CaCl_2 0,01 mg (tính cho 1 L nước cất)

Ví dụ 2: thử nghiệm sản xuất L-threonin đối với chủng KFCC10881 kháng-AHV

Tiến hành thử nghiệm khả năng sản xuất-L-threonin trên 155 chủng kháng-AHV thu được trong Ví dụ 1. 155 chủng thu được trong Ví dụ 1 được chủng nhiễm vào bình nón nuôi cấy (250 mL) có chứa môi trường giống (25 mL), và tiếp đó nuôi cấy kèm theo lắc ở 30°C ở 200 vòng/phút trong 20 giờ. Chủng nhiễm môi trường nuôi cấy giống (1 mL) vào bình nón nuôi cấy (250 mL) có chứa môi trường sản xuất L-threonin dưới đây (24 mL), và tiếp đó nuôi cấy kèm theo lắc ở 30°C ở 200 vòng/phút trong 48 giờ.

Môi trường sản xuất L-threonin (pH 7,2)

Glucosa 30 g, KH_2PO_4 2 g, ure 3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 g, pepton 2,5 g, CSL (Sigma) 5 g (10 mL), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, loxin 400 mg, CaCO_3 20 g (tính cho 1 L nước cất)

Sau khi nuôi cấy, đo xác định lượng axit amin đã sản xuất bằng cách sử dụng HPLC. Nồng độ của môi trường nuôi cấy có chứa axit amin cho 22 chủng, mà đã chứng tỏ có khả năng sản xuất -L-threonin rất tốt trong số 155 chủng đã thử nghiệm, được thể hiện trong Bảng 1. Chủng ứng cử cho 22 chủng được xác nhận thông qua trình trên được ký hiệu từ KFCC10881-1 đến KFCC10881-22.

Bảng 1

Thử nghiệm về khả năng sản xuất L-threonin của chủng kháng-AHV

	OD	Thr	Hse	Gly	Ala	Ile	Lys	Thr+Hse +Gly+Ile
KFCC10881	58,5	0,0	0,1	0,3	0,1	0,0	13,3	0,4
KFCC10881-1	60,1	2,0	1,5	2,8	1,6	2,7	5,7	7,7
KFCC10881-2	57,1	3,0	2,2	0,8	3,1	1,3	12,5	7,3
KFCC10881-3	47,3	2,8	2,3	0,8	3,4	1,4	10,5	7,3
KFCC10881-4	51,7	3,2	2,1	0,8	3,2	1,3	13,4	7,4
KFCC10881-5	58,4	3,1	2,2	0,8	3,3	1,3	12,4	7,4
KFCC10881-6	52,6	3,4	2,5	0,7	3,4	1,0	12,8	7,6
KFCC10881-7	14,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,6	11,1	1,5
KFCC10881-8	55,8	3,0	2,0	0,8	3,3	1,3	13,0	7,1
KFCC10881-9	44,3	3,2	2,8	0,6	3,1	0,9	12,6	7,5
KFCC10881-10	47,5	3,7	3,0	0,7	3,4	0,8	12,6	8,2
KFCC10881-11	57,0	2,7	1,8	0,7	3,4	1,2	11,6	6,4
KFCC10881-12	51,8	3,3	3,5	0,6	3,2	0,9	12,4	8,3
KFCC10881-13	49,8	3,0	2,3	0,7	3,4	1,3	12,8	7,3
KFCC10881-14	62,7	2,4	2,1	2,5	3,2	3,0	3,3	10,0
KFCC10881-15	62,4	2,9	2,7	0,7	3,2	1,1	12,3	7,4
KFCC10881-16	59,6	2,8	2,5	0,8	3,3	1,3	11,4	7,4
KFCC10881-17	24,1	0,1	0,2	0,2	1,6	0,2	10,4	0,7

KFCC10881-18	60,5	2,6	2,5	0,7	3,2	1,0	12,3	6,8
KFCC10881-19	60,0	3,0	1,9	2,8	2,7	3,0	5,4	9,3
KFCC10881-20	65,8	2,7	2,0	0,8	3,4	1,4	13,0	6,9
KFCC10881-21	17,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,6	11,1	1,5
KFCC10881-22	60,1	3,5	1,9	2,0	2,5	2,8	2,7	10,2

Như thể hiện trong Bảng 1, lượng L-threonin, L-homoserin, L-glyxin, L-alanin, và L-isoloxin, mà được sản xuất bởi 22 chủng có tính kháng với AHV, gia tăng so với nhóm đối chứng, trong khi đó lượng L-lysin giảm đi.

Con đường sinh tổng hợp L-threonin và L-lysin được phân tách từ điểm bắt đầu từ aspartat-semialdehyt (trong bản mô tả này được gọi là “ASA”). Nghĩa là, lượng L-lysin được sản xuất giảm đi khi lượng L-threonin được sản xuất tăng lên. Do đó, lượng homoserin (Hse), L-glyxin (Gly), và L-isoloxin (Ile), mà có thể là sản phẩm phụ trong con đường sinh tổng hợp L-threonin, có thể gia tăng khi lượng L-threonin được sản xuất gia tăng, và do đó lượng tổng cộng của các axit amin này được sản xuất (Thr + Hse + Gly + Ile) cũng được xác nhận.

Do đó, trong số các chủng kháng-AHV nêu trên, 4 chủng (KFCC10881-1, KFCC10881-14, KFCC10881-19, và KFCC10881-22), mà đã có lượng L-lysin sản xuất giảm đi, lượng L-threonin sản xuất gia tăng, và lượng tổng cộng của Thr+Hse+Gly+Ile sản xuất gia tăng, được lựa chọn là các chủng kháng-AHV tốt nhất.

Ví dụ 3: Phân tích trình tự nucleotit của chủng có khả năng sản xuất threonin rất tốt thu được từ KFCC10881

Để phân tích trình tự nucleotit của các enzym sinh tổng hợp L-threonin của các chủng được chọn lọc trong Ví dụ 1 nêu trên, tiến hành thử nghiệm dưới đây. Dựa vào thông tin gen theo Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), thu được lần lượt trình tự nucleotit của *hom* (SEQ ID NO: 1, NCg11136), mà mã hoá homoserin dehydrogenaza

của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, và trình tự nucleotit của *thrB* (SEQ ID NO: 2, Gene No. NCg11137), mã mã hoá homoserin kinase. *hom* và *thrB* đã biết gồm có cấu trúc operon (Peoples *et al.*, Mol. Biol. 2(1):63-72, 1988).

Để thu được mảnh ADN có chứa *hom-thrB* operon của chủng đã lựa chọn, tiến hành PCR bằng cách sử dụng ADN bộ gen của chủng làm khuôn mẫu và tổ hợp các đoạn môi có trình tự của SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4. Sử dụng ADN polymeraza độ trung thực cao *PfuUltra*TM (Stratagene) làm polymeraza cho phản ứng PCR. Điều kiện PCR như sau: làm biến tính ở 96°C trong 30 giây; ủ ở 52°C trong 30 giây; và polyme hoá ở 72°C trong 3 phút, và lặp lại tổng cộng 30 chu trình. Do đó, có thể khuếch đại mảnh gen (2778 cặp bazơ; SEQ ID NO: 5), mà bao gồm trình tự nucleotit (300 cặp bazơ) có chứa vị trí đoạn khởi đầu phía trước codon khởi đầu của SEQ ID NO: 1 để bao gồm 200 cặp bazơ phía sau codon kết thúc của SEQ ID NO: 2.

Xác định trình tự nucleotit bằng cách sử dụng đoạn môi được điều chế ở trên bằng ABI PRISM 3730XL Analyzer (loại mao quản 96; Applied Biosystems). Trong trình tự nucleotit tương ứng với *hom* trong số *hom-thrB* operon ở KFCC10881-1, xytosin, đây là nucleotit ở vị trí 854 của SEQ ID NO: 1, được đột biến thành thiamin, và do đó codon ACT mã hoá gốc threonin được đột biến thành codon ATT mã hoá gốc isoleuxin (trong bản mô tả này được gọi là “cải biến T285I”; SEQ ID NO: 6). Ngoài ra, trong trình tự nucleotit tương ứng với *hom-thrB* operon ở KFCC10881-14, guanin, đây là nucleotit ở vị trí 1193 of SEQ ID NO: 1, được đột biến thành adenin, và do đó codon CGA mã hoá gốc arginin được đột biến thành codon CAA mã hoá gốc glutamin (trong bản mô tả này được gọi là “cải biến R398Q”; SEQ ID NO: 7). Ngoài ra, trong trình tự nucleotit tương ứng với *hom-thrB* operon ở KFCC10881-19, guanin, đây là nucleotit ở vị trí 1132 của SEQ ID NO: 1, được đột biến thành xytosin, và do đó codon GGG mã hoá gốc glyxin được đột biến thành codon TGG mã hoá gốc tryptophan (trong bản mô tả này được gọi là “cải biến G378W”; SEQ ID NO: 8). Ngoài ra, trong trình tự nucleotit tương ứng với *hom-thrB* operon ở KFCC10881-22, guanin, đây là nucleotit ở vị trí 1132 của SEQ ID NO: 1, được đột biến thành adenin, và guanin, đây là nucleotit ở vị trí 1134, được đột biến thành xytosin, và do đó codon GGG mã hoá gốc glyxin được đột biến thành codon AGC mã hoá gốc serin (trong bản mô tả này được gọi là “cải biến G378S”; SEQ ID NO: 9). Đồng thời, không phát hiện có cải biến nào ở *thrB*, tương ứng với SEQ ID NO: 2.

Theo phân tích trình tự nucleotit nêu trên, có thể từ đó xác nhận là sự ức chế hồi dưỡng bởi L-threonin được khử mất cảm như trong Hom (SEQ ID NO: 10) được biểu hiện ở KFCC10881-1, threonin, đây là gốc axit amin ở vị trí 285, được đột biến thành isoloxin (cải biến T285I); trong Hom (SEQ ID NO: 11) được biểu hiện ở KFCC10881-14, arginin, đây là gốc axit amin ở vị trí 398, được đột biến thành glutamin (cải biến R398Q); trong Hom (SEQ ID NO: 12) được biểu hiện ở KFCC10881-19, glyxin, đây là gốc axit amin ở vị trí 378, được đột biến thành tryptophan (cải biến G378W); và trong Hom (SEQ ID NO: 13) được biểu hiện ở KFCC10881-22, glyxin, đây là gốc axit amin ở vị trí 378, được đột biến thành serin (cải biến G378S).

Ví dụ 4: Điều chế chủng mới mà homoserin dehydrogenaza được đưa vào

Có đoạn môi của SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15 được điều chế để điều chế chủng trong đó các biến thể (T285I, R398Q, G378W, và G378S) được xác định trong Ví dụ 2 được đưa vào chủng kiểu hoang.

Để điều chế chủng mà lần lượt cải biến ở *hom* T285I, R398Q, G378W, và G378S được đưa vào, tiến hành PCR bằng cách sử dụng ADN của bộ gen được chiết xuất lần lượt từ chủng KFCC10811-1, KFCC10811-14, KFCC10811-19, và KFCC10811-22 làm khuôn mẫu và sử dụng đoạn môi của SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15. Sử dụng ADN polymeraza độ trung thực-cao *PfuUltra*TM (Stratagene) làm polymeraza cho phản ứng PCR. Điều kiện PCR như sau: làm biến tính ở 95°C trong 30 giây; ủ ở 55°C trong 30 giây; và polyme hoá ở 72°C trong 2 phút, và lặp lại tổng cộng 28 chu trình. Từ đó, thu được mảnh gen (1668 cặp bazơ) bao gồm vị trí đoạn khởi đầu (khoảng 300 cặp bazơ) của gen *hom* (1338 cặp bazơ). Tinh chế sản phẩm đã khuếch đại bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế PCR (QUIAGEN), và tiếp đó sử dụng làm mảnh ADN cài xen để điều chế vật truyền. Đồng thời, sau khi xử lý bằng enzym giới hạn *sma*I, tỷ lệ nồng độ mol (M) của vật truyền pDZ được xử lý gia nhiệt ở 65°C trong 20 phút so với mảnh ADN cài xen được khuếch đại bởi PCR nêu trên được đặt ở 1:2, và tiếp đó tách dòng bằng cách sử dụng Infusion Cloning Kit (TaKaRa) theo hướng dẫn sử dụng. Sau đó, điều chế các vật truyền, *nghĩa là*, pDZ-T285I, pDZ-R398Q, pDZ-G378W, và pDZ-G378S, để đưa các cải biến T285I, R398Q, G378W, và G378S vào nhiễm sắc thể.

Corynebacterium glutamicum ATCC13032 được biến nạp với lần lượt vật truyền trong số các vật truyền đã điều chế bằng cách đục lỗ điện. Sau khi lai chéo cấp hai, thu

được các chủng được thay thế với lần lượt nucleotit trong số các nucleotit đã cải biến trên nhiễm sắc thể. Bằng cách sử dụng tổ hợp các đoạn môi liệt kê bên dưới và sử dụng kỹ thuật PCR MASA (khuếch đại đặc hiệu alen đột biến - Mutant Allele Specific Amplification) (Takeda *et al.*, Hum. Mutation, 2, 112-117 (1993)), trước tiên xác định sự phù hợp của thay thế bằng cách chọn lọc chủng đã khuếch đại trong tổ hợp các đoạn môi tương ứng với trình tự lần lượt trong số các trình tự đã cải biến (CTR-T285I: SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17; CTR-R398Q: SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 18; CTR-G378W: SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 19; và CTR-G378S: SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 20). Ngoài ra, phân tích trình tự *hom* của các chủng đã chọn để xác nhận tiếp tính phù hợp của thay thế bằng cách sử dụng SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 21 và bằng cách phân tích trình tự được cải biến theo cách tương tự như trong Ví dụ 2. Chủng được thay thế với lần lượt nucleotit được cải biến tương ứng được gọi là CTR-T285I, CTR-R398Q, CTR-G378W, và CTR-G378S.

Ví dụ 5: Đo xác định hoạt tính của homoserin dehydrogenaza

Đo xác định hoạt tính của enzym Hom ở các chủng đã điều chế. Chủng kiểu hoang ATCC13032 trong nhóm đối chứng và CTR-T285I, CTR-R398Q, CTR-G378W, và CTR-G378S được điều chế trong Ví dụ 4 được chủng nhiễm vào 25 mL môi trường giống, và tiếp đó nuôi cấy cho đến khi đạt đến pha log muộn. Thu hồi các tế bào bằng cách ly tâm, rửa hai lần bằng đệm 0,1 M kali phosphat (pH 7,6), và cuối cùng tạo hỗn dịch trong 2 mL đệm này có chứa glycerol ở nồng độ 30%. Phá vỡ hỗn dịch tế bào bằng cách vật lý bằng hạt thủy tinh thông thường phương pháp tạo xoáy trong 10 phút, và tiếp đó thu hồi dịch nổi qua hai lần ly tâm (13.000 vòng/phút, 4°C, 30 phút) và sử dụng làm dịch chiết thô để đo xác định hoạt tính của enzym Hom. Để đo xác định hoạt tính của Hom, thêm dung dịch coenzym (0,1 mL) vào dung dịch phản ứng để đo xác định hoạt tính enzym (đệm kali phosphat (pH 7,0), 25 mM NADPH, 5 mM aspartat semi-aldehyt), và sau đó để phản ứng ở 30°C. Hoạt tính của Hom U được xác định là số μmol NADPH đã tiêu thụ/phút theo nồng độ của L-threonin (0 mM, 10 mM), và kết quả hoạt tính enzym được trình bày trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Đo xác định hoạt tính Hom (U) và sự khử mẫn cảm bằng L-threonin

	Hoạt tính enzym (U) theo lượng L-threonin đã thêm
--	---

Chủng	vào (mM)	
	0 mM	10 mM
ATCC13032	0,92	0,02
CTR-T285I	1,11	0,82
CTR-R398Q	1,31	1,12
CTR-G378W	1,39	1,21
CTR-G378S	1,38	1,22

Từ thí nghiệm này, đã xác nhận là trong Hom có chứa lần lượt cải biến trong số các cải biến T285I, R398Q, G378W, và G378S, có giảm ức chế hoạt tính trong điều kiện có chứa 10 mM L-threonin, khác với Hom kiểu hoang, và do đó có xảy ra sự khử mất cảm với L-threonin.

Ví dụ 6: Điều chế và đánh giá chủng vi sinh vật giống *Corynebacterium* có tính năng sản xuất L-threonin

Phát triển các chủng sản xuất L-threonin từ *Corynebacterium glutamicum* kiểu hoang ATCC13032. Cụ thể là, để phân giải ức chế hồi dưỡng của aspartate kinaza (LysC), đây là enzym quan trọng hoạt động trước tiên trong con đường sinh tổng hợp threonin, loxin, đây là axit amin ở vị trí 377 của LysC, được thay thế bằng lysin (SEQ ID NO: 22).

Cụ thể hơn là, để điều chế các chủng, trong đó cải biến LysC (L377K) được đưa vào, thực hiện PCR bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của ATCC13032 làm khuôn mẫu và sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24 hoặc SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26. Sử dụng ADN polymeraza độ trung thực cao *PfuUltra*TM (Stratagene) làm polymeraza cho phản ứng PCR. Điều kiện PCR như sau: làm biến tính ở 95°C trong 30 giây; ủ ở 55°C trong 30 giây; và polyme hoá ở 72°C trong 1 phút, và lặp lại tổng cộng 28 chu trình. Từ đó, mảnh ADN (515 cặp bazơ) ở vùng ngược chiều 5' và mảnh AND (538 cặp bazơ) ở vùng xuôi chiều 3' lần lượt thu được với vị trí cải biến của gen *lysC* làm trung tâm. Thực hiện PCR với hai mảnh ADN đã khuếch đại làm khuôn mẫu bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 26. Sau khi làm biến tính ở 95°C trong 5 phút, thực hiện PCR tổng cộng 28 chu trình trong điều kiện sau: làm biến tính ở 95°C

trong 30 giây; ủ ở 55°C trong 30 giây; và polyme hoá ở 72°C trong 2 phút. Sau đó, thực hiện phản ứng polyme hoá ở 72°C trong 5 phút. Từ đó, mảnh ADN (1023 cặp bazơ) bao gồm cải biến của gen *LysC*, mà mã hoá biến thể aspartokinaza trong đó loxin ở vị trí 377 được thay thế bằng lysin, được khuếch đại. Tinh chế sản phẩm đã khuếch đại bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế PCR (QUIAGEN) và sử dụng làm mảnh ADN cài xen để điều chế vật truyền. Đồng thời, sau khi xử lý bằng enzym giới hạn *SmaI*, tỷ lệ nồng độ mol của (M) vật truyền pDZ được xử lý gia nhiệt ở 65°C trong 20 phút so với mảnh ADN cài xen được khuếch đại bằng PCR ở trên được đặt là 1:2, và tiếp đó tách dòng bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng dung hợp (Infusion Cloning Kit) (TaKaRa) theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit. Sau đó, điều chế vật truyền pDZ-L377K để đưa cải biến L377K vào nhiễm sắc thể.

ATCC13032 được biến nạp với vật truyền đã điều chế bằng cách đục lỗ điện. Sau khi lai chéo cấp hai, thu được chủng trong đó lần lượt cải biến nucleotit trong số các cải biến nucleotit được thay thế bằng nucleotit được cải biến, và chủng này được gọi là CJP1.

Để xác nhận một cách rõ ràng sự thay đổi khả năng sản xuất L-threonin của chủng này, lần lượt cải biến trong số các cải biến được nhận diện trong Ví dụ 4 được đưa vào gen mã hoá homoserin dehydrogenaza. Cụ thể là, để đưa lần lượt cải biến trong số các cải biến T285I, R398Q, G378W, và G378S vào chủng CTR-L377K, CJP1 được biến nạp với lần lượt vật truyền trong số các vật truyền pDZ-T285I, pDZ-R398Q, pDZ-G378W, và pDZ-G378S đã điều chế trong Ví dụ 4 bằng cách đục lỗ điện, và sau đó thu được các chủng trong đó lần lượt cải biến nucleotit được thay thế bằng nucleotit được cải biến trên nhiễm sắc thể bằng cách lai chéo cấp hai theo cách tương tự như trong Ví dụ 4. Chủng được thay thế bằng lần lượt nucleotit được cải biến trong số các nucleotit được cải biến này được gọi là CJP1-T285I, CJP1-R398Q, CJP1-G378W, và CJP1-G378S.

Các chủng CJP1-T285I và CJP1-R398Q được nộp lưu tại Korean Culture Center of Microorganism (KCCM), đây là Cơ quan có thẩm quyền lưu giữ quốc tế theo Hiệp ước Budapest, ngày 26/9/2017, tương ứng với số truy cập là KCCM12119P và KCCM12120P.

Bảng 3

Xác nhận khả năng sản xuất-L-threonin của 4 chủng đã điều chế

Chủng	Axit amin (g/L)
-------	-----------------

	Thr	Lys
CJP1	0,40	3,60
CJP1-T285I	1,10	3,00
CJP1-R398Q	1,21	2,75
CJP1-G378W	1,30	2,68
CJP1-G378S	1,25	2,78

Từ đó, ở các chủng mà đó lần lượt cải biến được đưa vào, lượng L-lysine đã sản xuất giảm đi ở mức từ 0,7 g/L đến 0,9 g/L, so với chủng CJP1.

Đồng thời, để thu được chủng đồng thời bao gồm các cải biến T285I và R398Q, chủng CJP1-T285I được biến nạp với vật truyền pDZ-R398Q, và tiếp đó thu được chủng (CJP1-T285I, R398Q) theo cách tương tự như nêu trên. Ngoài ra, để thu được chủng đồng thời bao gồm các cải biến G378W và R398Q, chủng CJP1-G378W được biến nạp với vật truyền pDZ-R398Q, và tiếp đó thu được chủng (CJP1-G378W, R398Q) theo cách tương tự như nêu trên. Ngoài ra, để thu được chủng đồng thời bao gồm các cải biến T285I và G378W, chủng CJP1-T285I được biến nạp với vật truyền pDZ-G378W, và tiếp đó thu được chủng (CJP1-T285I, G378W) theo cách tương tự như nêu trên. Thực hiện thử nghiệm về khả năng sản xuất L-threonine theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 2, và kết quả được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Xác nhận khả năng sản xuất-L-threonine của 3 chủng đã điều chế

Chủng	Axit amin (g/L)	
	Thr	Lys
CJP1	0,41	3,55
CJP1-G378W	1,30	2,68
CJP1-T285I,R398Q	1,41	2,65
CJP1-G378W,R398Q	2,12	1,92
CJP1-T285I,G378W	1,92	2,15

Từ đó, khả năng sản xuất-threonin được xác nhận là cao hơn khi hai kiểu cải biến của sáng chế được đưa vào, so với chủng CJP1-G378W thể hiện khả năng sản xuất-threonin cao nhất trong các Ví dụ. Ở các chủng trong đó hai cải biến được đưa vào, lượng threonin sản xuất tăng ở mức từ 1,1 g/L đến 1,7 g/L so với chủng CJP1, đây là nhóm đối chứng, và do đó, khẳng định là tác dụng khử mẫn cảm Hom đã được cải thiện đáng kể.

Ví dụ 7: Điều chế và đánh giá chủng vi sinh vật giống *Corynebacterium* sản xuất L-isoloxin

Để sản xuất chủng sản xuất isoloxin, điều chế vật truyền để tăng cường biểu hiện của gen *ilvA* được cải biến (V323A) (*Appl. Environ. Microbiol.*, Dec. 1996, p.4345-4351), mà mã hoá L-threonin dehydratase đã biết (enzym đầu tiên trong con đường sinh tổng hợp isoloxin) ở chủng được điều chế trong Ví dụ 6.

Cụ thể là, để điều chế vật truyền để đưa cải biến vào, mà nhằm đích gen *ilvA*, cặp đoạn mồi (SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28) để khuếch đại vùng ngược chiều 5' và cặp đoạn mồi (SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30) để khuếch đại vùng xuôi chiều 3' được thiết kế với vị trí cải biến làm trung tâm. Cài xen các vị trí enzym giới hạn BamHI (được gạch chân) ở mỗi đầu tận cùng của các đoạn mồi của SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 30, và các đoạn mồi của SEQ ID NO: 28 và SEQ ID NO: 29 được thiết kế sao cho cải biến được thay thế-nucleotit (được gạch chân) là ở vị trí ở vùng mà ở đó sẽ gây cảm ứng lai chéo.

Bảng 5

SEQ ID NO:	Trình tự nucleotit
27	ACGGATCCCAGACTCCAAAGCAAAAGCG
28	ACACCACGgCAGAACCAGGTGCAAAGGACA
29	CTGGTTCTGcCGTGGTGTGCATCATCTCTG
30	ACGGATCCAACCAAACTTGCTCACACTC

Thực hiện PCR với nhiễm sắc thể của kiểu hoang làm khuôn mẫu bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, và SEQ ID NO: 30. Sau khi làm biến tính ở 95°C trong 5 phút, thực hiện PCR tổng cộng 30 chu trình trong

điều kiện sau: làm biến tính ở 95°C trong 30 giây; ủ ở 55°C trong 30 giây; và polyme hoá ở 72°C trong 30 giây. Sau đó, thực hiện phản ứng polyme hoá ở 72°C trong 7 phút. Từ đó, thu được mảnh ADN (627 cặp bazơ) ở vùng ngược chiều 5' và mảnh ADN (608 cặp bazơ) ở vùng xuôi chiều 3' với vị trí cải biến của gen *ilvA* làm trung tâm.

Thực hiện PCR với hai mảnh ADN đã khuếch đại làm khuôn mẫu bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 30. Sau khi làm biến tính ở 95°C trong 5 phút, thực hiện PCR tổng cộng 30 chu trình trong điều kiện sau: làm biến tính ở 95°C trong 30 giây; ủ ở 55°C trong 30 giây, và polyme hoá ở 72°C trong 60 giây. Sau đó, thực hiện phản ứng polyme hoá ở 72°C trong 7 phút. Từ đó, mảnh ADN (1217 cặp bazơ) được khuếch đại, bao gồm cải biến gen *ilvA* mã hoá biến thể IlvA trong đó valin ở vị trí 323 được thay thế bằng alanin. Vật truyền pECCG117 (Patent Hàn Quốc số 10-0057684) và mảnh ADN (1011 cặp bazơ) được xử lý với enzym giới hạn BamHI, được nối bằng cách sử dụng ADN ligaza, và tiếp đó tách dòng để thu được plasmit. Plasmit thu được như vậy được gọi là pECCG117-*ilvA*(V323A).

Vật truyền pECCG117-*ilvA*(V323A) được đưa vào lần lượt chủng trong số các chủng CJP1-T285I,R398Q, CJP1-G378W,R398Q, và CJP1-T285I,G378W được điều chế trong Ví dụ 6 bằng cách đục lỗ điện và cấy vào môi trường chọn lọc có chứa kanamycin (25 mg/L) để thu được chủng được biến nạp. Nuôi cấy chủng được biến nạp như vậy bằng phương pháp nuôi cấy bình nón như của Ví dụ 2, và phân tích nồng độ của L-isoloxin trong môi trường nuôi cấy. Kết quả được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

Đánh giá các chủng đã điều chế

Chủng	L-isoloxin (g/L)
CJP1/pECCG117- <i>ilvA</i> (V323A)	0,7
CJP1-G378W/pECCG117- <i>ilvA</i> (V323A)	0,9
CJP1-T285I,R398Q/pECCG117- <i>ilvA</i> (V323A)	1,1
CJP1-G378W,R398Q/pECCG117- <i>ilvA</i> (V323A)	1,2
CJP1-T285I,G378W/pECCG117- <i>ilvA</i> (V323A)	1,0

Từ đó, khẳng định được là ở chủng bao gồm cải biến *hom*(G378W), nồng độ của L-isoloxin được cải thiện ở mức 0,2 g/L so với chủng đối chứng. Ngoài ra, ở chủng bao gồm cải biến *hom*, trong đó hai cải biến được đưa vào đồng thời, khả năng sản xuất L-isoloxin được cải thiện hơn nữa ở mức từ 0,3 g/L đến 0,5 g/L so với chủng đối chứng. Hơn nữa, trong số các chủng đã điều chế, 1,1 g/L L-isoloxin được sản xuất ở chủng CJP1-T285I,R398Q/pECCG117-*ihvA*(V323A) bao gồm cả hai cải biến T285I và R398Q.

Ví dụ 8: Điều chế và đánh giá chủng sản xuất-O-axetyl-homoserin (OAH) được thay thế với Hom được cải biến

8-1. Điều chế chủng ATCC13032 được thay thế bằng Hom được cải biến

Hai kiểu cải biến (T285I và R398Q) được đưa vào chủng ATCC13032 theo cách tương tự như trong Ví dụ 7, và chủng đã điều chế như vậy được gọi là ATCC13032::Hom^{FBR}.

8-2. Khuyết đoạn gen *metB*

Trong ví dụ này, thu được gen *metB* mã hoá xystathionin gamma-synthaza trong con đường phân huỷ O-axetyl-homoserin thông qua PCR bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn mẫu. Dựa trên GenBank of the National Institutes of Health (NIH GenBank), thu được thông tin về trình tự nucleotit của *metB* (NCBI Registration No. Ncgl2360; SEQ ID NO: 31). Ngoài ra, dựa trên thông tin này, tổng hợp các đoạn mồi (SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33) có chứa đầu tận cùng-N và trình tự liên kết của gen *metB* và các đoạn mồi (SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 35) có chứa đầu tận cùng-N và trình tự liên kết của gen *metB*. Thực hiện PCR với ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn mẫu bằng cách sử dụng oligonucleotit của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 35 làm đoạn mồi. Sử dụng ADN polymeraza độ trung thực cao *PfuUltra*TM (Stratagene) làm polymeraza. Điều kiện PCR như sau: làm biến tính ở 96°C trong 30 giây; ủ ở 53°C trong 30 giây; và polyme hoá ở 72°C trong 1 phút, và lặp lại tổng cộng 30 chu trình. Từ đó, thu được gen được khuếch đại (500 cặp bazơ) có chứa đầu tận cùng-N và liên kết của gen *metB* và gen được khuếch đại (500 cặp bazơ) có chứa đầu tận cùng-C và liên kết của gen *metB*.

Thực hiện PCR bằng cách sử dụng hai gen được khuếch đại thu được ở trên làm

khuôn mẫu cho tổng cộng 10 chu trình trong điều kiện sau: làm biến tính ở 96°C trong 60 giây; ủ ở 50°C trong 60 giây; và polyme hoá ở 72°C trong 1 phút. Sau đó, thêm vào đó trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 35, và tiếp đó lặp lại tổng cộng 20 chu trình. Từ đó, thu được gen *ΔmetB* được khuếch đại (1000 cặp bazơ), đây là cat-xet làm bất hoạt *metB* có chứa đầu tận cùng N-liên kết-đầu tận cùng-C của gen *metB*. Gen *metB* thu được thông qua PCR được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI và SalI được bao gồm ở đầu tận cùng, và tiếp đó tách dòng vào vật truyền pDZ(KR 0924065), trong đó enzym giới hạn XbaI và SalI được xử lý, bằng cách nối. Sau đó, điều chế vật truyền pDZ-*ΔmetB* tái tổ hợp trong đó, cat-xet làm bất hoạt *metB* được tách dòng cuối cùng.

Corynebacterium glutamicum ATCC13032 và ATCC13032::Hom^{FBR} được biến nạp với vật truyền pDZ-*ΔmetB* được điều chế ở trên. Sau khi lai chéo cấp hai, thu được *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 *ΔmetB* và ATCC13032::Hom^{FBR} *ΔmetB*, trong đó gen *metB* được làm bất hoạt trên nhiễm sắc thể. Kháng định gen *metB* được bất hoạt bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NOS: 32 và 25, và tiếp đó so sánh với ATCC13032 trong đó gen *metB* không được làm bất hoạt.

8-3. Khuyết đoạn gen *metY*

Trong ví dụ này, thu được gen *metY* mã hoá *O*-axetyl homoserin (thiol)-lyaza trong con đường phân huỷ *O*-axetyl-homoserin thông qua PCR bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn mẫu. Dựa trên GenBank of the National Institutes of Health (NIH GenBank), thu được thông tin về trình tự nucleotit của gen *metY* (NCBI Registration No. Ncgl0625; SEQ ID NO: 36). Ngoài ra, dựa vào thông tin này, tổng hợp được các đoạn mồi (SEQ ID NO: 37 và SEQ ID NO:38) có chứa đầu tận cùng-N và trình tự liên kết của gen *metY* và các đoạn mồi (SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 40) có chứa đầu tận cùng-C và trình tự liên kết của gen *metY*.

Thực hiện PCR với ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn mẫu bằng cách sử dụng oligonucleotit của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 40 làm đoạn mồi. Sử dụng ADN polymeraza độ trung thực cao *PfuUltra*TM (Stratagene) làm polymeraza. Điều kiện PCR như sau: làm biến tính ở 96°C trong 30 giây; ủ ở 53°C trong 30 giây; và polyme hoá ở 72°C trong 1 phút, và lặp lại tổng cộng 30 chu trình. Từ đó, thu được gen được khuếch đại (500 cặp bazơ) có chứa đầu tận cùng-N và liên kết của gen *metY* và gen được khuếch đại (500 cặp bazơ) có chứa

đầu tận cùng-C và liên kết của gen *metY*. Thực hiện PCR bằng cách sử dụng hai gen được khuếch đại thu được này làm khuôn mẫu cho tổng cộng 10 chu trình trong điều kiện sau: làm biến tính ở 96°C trong 60 giây; ủ ở 50°C trong 60 giây; và polyme hoá ở 72°C trong 1 phút. Sau đó, trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 37 và SEQ ID NO: 40 được thêm vào đó, và tiếp đó lặp lại tổng cộng 20 chu trình. Từ đó, thu được gen $\Delta metY$ được khuếch đại (1000 cặp bazơ), mà là cat-xet làm bất hoạt *metB* có chứa đầu tận cùng-N-liên kết-đầu tận cùng-C của gen *metY*.

Gen *metY* thu được thông qua PCR được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI và SalI được bao gồm ở đầu tận cùng, và tiếp đó tách dòng vào vật truyền pDZ(KR2008-0025355), trong đó enzym giới hạn XbaI và SalI được xử lý, bằng cách nối. Sau đó, điều chế vật truyền pDZ- $\Delta metY$ tái tổ hợp trong đó cat-xet làm bất hoạt *metY* được tách dòng cuối cùng.

Các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, ATCC13032::Hom^{FBR}, ATCC13032 $\Delta metB$, và ATCC13032::Hom^{FBR} $\Delta metB$ được biến nạp với vật truyền pDZ- $\Delta metY$ được điều chế ở trên. Sau khi lai chéo cấp hai, thu được *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 $\Delta metY$, ATCC13032::Hom^{FBR} $\Delta metY$, ATCC13032 $\Delta metB$ $\Delta metY$, và ATCC13032::Hom^{FBR} $\Delta metB$ $\Delta metY$, trong đó gen *metY* được làm bất hoạt trên nhiễm sắc thể. Gen *metY* đã được làm bất hoạt cuối cùng được khẳng định bằng cách thực hiện PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 37 và SEQ ID NO: 40, và sau đó so sánh với ATCC13032 trong đó gen *metY* không được làm bất hoạt.

8-4. Điều chế và đánh giá chủng sản xuất *O*-axetyl-homoserin

Tiến hành so sánh giữa khả năng sản xuất-*O*-axetyl-homoserin của các chủng ATCC13032, ATCC13032 $\Delta metB$, ATCC13032 $\Delta metY$, ATCC13032 $\Delta metB$ $\Delta metY$, ATCC13032::Hom^{FBR}, ATCC13032::Hom^{FBR} $\Delta metB$, ATCC13032::Hom^{FBR} $\Delta metY$, và ATCC13032::Hom^{FBR} $\Delta metB$ $\Delta metY$ được điều chế từ Ví dụ 8-1 đến Ví dụ 8-3, trong đó gen *metB*, *metY*, *metBY* được làm khuyết đoạn và gen *hom* được cải biến được thay thế vào.

Cụ thể là, nuôi cấy các khuẩn lạc đơn nhất trong môi trường rắn LB trong tủ ấm 32°C, và cấy một vòng đầu que cấy lần lượt từng khuẩn lạc đơn nhất được chủng nhiễm vào môi trường hiệu chuẩn *O*-axetyl-homoserin (25 mL), và nuôi cấy tiếp ở 32°C ở 250 vòng/phút trong từ 42 đến 64 giờ. Phân tích *O*-axetyl-homoserin từ lần lượt sản phẩm

được nuôi cấy bằng HPLC, và kết quả được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây.

Môi trường sản xuất L-*O*-Axetylhomoserin (pH 7,2)

glucoza 30 g, KH₂PO₄ 2 g, ure 3 g, (NH₄)₂SO₄ 40 g, pepton 2,5 g, CSL (Sigma) 5 g (10 mL), MgSO₄·7H₂O 0,5 g, methionin 400 mg, loxin 400 mg, CaCO₃ 20 g (tính cho 1 L nước cất)

Bảng 7

Đánh giá khả năng sản xuất *O*-Axetyl-homoserin

Chủng		Sản xuất <i>O</i> -AH (g/L)
ATCC13032	-	0,0
	metB	0,3
	metY	0,3
	metBY	0,5
ATCC13032::Hom ^{FBR} (T285I + R398Q)	-	0,0
	metB	1,2
	metY	1,4
	metBY	3,5

Từ đó, như thể hiện trong Bảng 7 ở trên, *O*-axetyl homoserin không có tích lũy khi nuôi cấy chủng đối chứng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, trong khi đó có lần lượt 0,3 g/L, 0,3 g/L, và 0,5 g/L *O*-axetyl homoserin tích lũy ở chủng ATCC13032 Δ metB, ATCC13032 Δ metY, và ATCC13032 Δ metB Δ metY tương ứng có gen *metB*, gen *metY*, và gen *metBY* được làm bất hoạt.

Ngoài ra, trong trường hợp chủng ATCC13032::Hom^{FBR} trong đó gen *hom* được thay thế ở dạng đột biến, và các chủng ATCC13032::Hom^{FBR} Δ metB, ATCC13032::Hom^{FBR} Δ metY, và ATCC13032::Hom^{FBR} Δ metB Δ metY trong đó gen *metB*, gen *metY*, và gen *metBY* tương ứng được làm bất hoạt, khẳng định được là *O*-axetyl homoserin có tích lũy với lượng 1,2 g/L, 1,4 g/L, và 3,5 g/L tương ứng cho mỗi chủng trong số các chủng này.

Do đó, từ kết quả trên, khẳng định được là lượng axit amin đích sản xuất, mà sử dụng homoserin làm tiền chất bằng cách sử dụng *hom* được cải biến của sáng chế có thể được gia tăng đáng kể.

Ví dụ 9: Điều chế và đánh giá chủng sản xuất methionin (Met)

Ví dụ 9-1: Điều chế vật truyền tái tổ hợp để khuyết đoạn gen *mcbR*

Trong ví dụ này, để điều chế chủng sản xuất methionin, điều chế vật truyền làm bất hoạt gen *mcbR* (J. Biotechnol. 103:51-65, 2003), mà mã hoá protein điều hoà phiên mã methionin và xystein đã biết ở chủng được điều chế trong Ví dụ 6.

Cụ thể là, điều chế vật truyền plasmit tái tổ hợp bằng cách sử dụng phương pháp dưới đây để loại bỏ gen *mcbR* trên nhiễm sắc thể của *Corynebacterium* ATCC13032. Dựa trên trình tự nucleotit được ghi nhận tại Genbank of the National Institutes of Health (NIH GenBank), thu được gen *mcbR* và trình tự xung quanh gen này (SEQ ID NO: 41) của *Corynebacterium glutamicum*.

Để thu được gen được khuyết đoạn-*mcbR*, thực hiện PCR với ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 làm khuôn mẫu bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 42 và SEQ ID NO: 43 và SEQ ID NO: 44 và SEQ ID NO: 45. Sau khi làm biến tính ở 95°C trong 5 phút. Thực hiện PCR tổng cộng 30 chu trình trong điều kiện sau: làm biến tính ở 95°C trong 30 giây; ủ ở 53°C trong 30 giây; và polyme hoá ở 72°C trong 30 giây. Từ đó, thu được các mảnh ADN (700 cặp bazơ).

Vật truyền pDZ (Patent Hàn quốc số 10-0924065), mà không thể tách dòng ở *Corynebacterium glutamicum*, và xử lý các mảnh gen *mcbR* được khuếch đại bằng enzym giới hạn *smaI* để đưa vào nhiễm sắc thể. Sau đó, nối các mảnh này bằng cách sử dụng ADN ligaza, và tiếp đó biến nạp với *E. coli* *DH5α*, rồi phết cấy vào môi trường rắn LB có chứa kanamycin (25 mg/L). Chọn lọc các khuẩn lạc được biến nạp với vật truyền, trong đó các mảnh được khuyết đoạn của gen đích được cài xen thông qua PCR, và thu được plasmit bằng cách sử dụng phương pháp chiết xuất plasmit. Plasmit thu được như vậy được gọi là pDZ-Δ*mcbR*.

Ví dụ 9-2: Điều chế và đánh giá chủng vi sinh vật giống *Corynebacterium* sản xuất L-methionin

Lần lượt chủng trong số các chủng CJP1-G378W, CJP1-T285I,R398Q, CJP1-

G378W,R398Q, CJP1-T285I,G378W, và CJP1 mà được điều chế trong Ví dụ 6 bằng cách tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể, được biến nạp với vật truyền pDZ- Δ mcbR được điều chế trong Ví dụ 9 bằng cách sử dụng phương pháp đục lỗ điện (van der Rest *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52:541-545, 1999). Sau đó, thực hiện tái tổ hợp cấp hai trên môi trường rắn có chứa X-gal. Chủng trong đó gen *mcbR* được làm khuyết đoạn được khẳng định bằng phương pháp PCR với chủng *Corynebacterium glutamicum* được biến nạp, trong đó hoàn thành tái tổ hợp cấp hai bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO: 46 và SEQ ID NO: 47. Các chủng tái tổ hợp này tương ứng được gọi là *Corynebacterium glutamicum* CJP1-G378W/ Δ mcbR, CJP1-T285I,R398Q/ Δ mcbR, CJP1-G378W,R398Q/ Δ mcbR, CJP1-T285I,G378W/ Δ mcbR, và CJP1/ Δ mcbR.

Để phân tích khả năng sản xuất-L-methionin của các chủng CJP1-G378W/ Δ mcbR, CJP1-T285I,R398Q/ Δ mcbR, CJP1-G378W,R398Q/ Δ mcbR, và CJP1-T285I,G378W/ Δ mcbR đã điều chế, nuôi cấy các chủng cùng với chủng gốc của chúng, *Corynebacterium glutamicum* CJP1/ Δ mcbR, theo cách dưới đây.

Corynebacterium glutamicum CJP1/ Δ mcbR và các chủng của sáng chế (*Corynebacterium glutamicum* CJP1-G378W/ Δ mcbR, CJP1-T285I,R398Q/ Δ mcbR, CJP1-G378W,R398Q/ Δ mcbR, và CJP1-T285I,G378W/ Δ mcbR) được chủng nhiễm vào bình nón nuôi cấy (250 mL) có chứa môi trường giống bên dưới (25 mL), và tiếp đó nuôi cấy kèm theo lắc ở 30°C ở 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, chủng nhiễm môi trường nuôi cấy giống (1 mL) vào bình nón nuôi cấy (250 mL) có chứa môi trường sản xuất bên dưới (24 mL), và tiếp đó nuôi cấy kèm theo lắc 30°C ở 200 vòng/phút trong 48 giờ. Thành phần của môi trường giống và môi trường sản xuất như dưới đây.

Môi trường giống (pH 7.0)

glucoza 20 g, pepton 10 g, chiết xuất nấm men 5 g, ure 1,5 g, KH_2PO_4 4 g, K_2HPO_4 8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, biotin 100 μg , thiamin HCl 1.000 μg , canxi pantothenat 2.000 μg , nicotinamit 2.000 μg (tính cho 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (pH 8,0)

glucoza 50 g, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ 12 g, chiết xuất nấm men 5 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g, biotin 100 μg , thiamin HCl 1.000 μg , canxi pantothenat 2.000 μg , nicotinamit 3000 μg , CaCO_3 30 g (tính cho 1 L nước cất)

Sau khi nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy nêu trên, phân tích nồng độ của L-methionin trong từng môi trường nuôi cấy, và kết quả được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8

Đánh giá chủng đã điều chế

Chủng	L-methionin (g/L)
CJP1/ Δ mcbR	0,01
CJP1-G378W/ Δ mcbR	0,13
CJP1-T285I,R398Q/ Δ mcbR	0,18
CJP1-G378W,R398Q/ Δ mcbR	0,20
CJP1-T285I,G378W/ Δ mcbR	0,17

Từ đó, khẳng định được là ở chủng bao gồm cải biến G378W *hom*, khả năng sản xuất-L-methionin được cải thiện ở mức 0,12 g/L so với chủng đối chứng. Ngoài ra, khẳng định được là ở chủng bao gồm cải biến *hom*, trong đó hai cải biến được đưa vào đồng thời, khả năng sản xuất-L-methionin được cải thiện ở mức từ 0,16 g/L đến 0,19 g/L so với chủng đối chứng.

Căn cứ trên các kết quả này, khẳng định được là lượng L-methionin được sản xuất có thể gia tăng đáng kể bằng cách sử dụng *hom* được cải biến của bản mô tả này.

Trong khi sáng chế được mô tả có dẫn chiếu đến các phương án minh họa cụ thể, nên hiểu là người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế có thể thực hiện phương án này ở dạng cụ thể khác mà không tách rời với bản chất hoặc đặc tính cơ bản của sáng chế. Do đó, các phương án nêu trên được xem là để minh họa ở mọi khía cạnh và không mang tính giới hạn. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế được xác định bằng các yêu cầu bảo hộ kèm theo, chứ không phải bởi bản mô tả chi tiết, và nên hiểu là mọi cải biến hoặc biến thể thu được từ ý nghĩa và phạm vi của sáng chế và phương án tương đương của nó là bao gồm trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

[Số truy cập]

Tên cơ quan lưu giữ: Korean Culture Center of Microorganism (International Depositary Authority)

Số nộp lưu: KCCM12119P

Ngày nộp lưu: 26/9/2017

Tên cơ quan lưu giữ: Korean Culture Center of Microorganism (International
Depositary Authority)

Số nộp lưu: KCCM12120P

Ngày nộp lưu: 26/9/2017



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

INTERNATIONAL FORM

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

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

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Corynebacterium glutamicum</i> CJP1-T285I	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12119P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on September. 26. 2017 (date of the original deposit). ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjenae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 120-861 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: September. 26. 2017.

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

Form BP/4 (sole page)



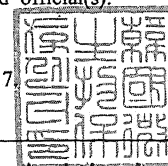
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

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

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

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Corynebacterium glutamicum</i> CJP1-R398Q	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12120P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on September. 26. 2017 (date of the original deposit). ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjeonae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 120-861 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: September. 26. 2017.



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

Form BP/4 (sole page)

Yêu cầu bảo hộ

1. Homoserin dehydrogenaza được cải biến, trong đó trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, axit amin ở vị trí 285 được thay thế bằng isoloxin; axit amin ở vị trí 398 được thay thế bằng glutamin; hoặc axit amin ở cả hai vị trí lần lượt được thay thế bằng isoloxin và glutamin.
2. Homoserin dehydrogenaza được cải biến theo điểm 1, trong đó trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, axit amin ở vị trí 378 còn được thay thế bằng tryptophan.
3. Polynucleotit mã hoá homoserin dehydrogenaza được cải biến được chọn từ homoserin dehydrogenaza bất kỳ theo các điểm 1 và 2.
4. Vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, bao gồm homoserin dehydrogenaza được cải biến được chọn từ homoserin dehydrogenaza bất kỳ theo các điểm 1 và 2.
5. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* là vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin.
6. Vi sinh vật theo điểm 5, trong đó L-axit amin thu được từ homoserin là ít nhất một loại được chọn từ nhóm gồm có L-threonin, L-isoloxin, O-axetyl homoserin, và L-methionin.
7. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất L-alanin.
8. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.
9. Phương pháp sản xuất homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin, bao gồm:
 nuôi cấy vi sinh vật theo điểm 4 trong môi trường; và
 thu hồi homoserin hoặc L-axit amin thu được từ homoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy này.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó L-axit amin thu được từ homoserin là ít nhất một loại được chọn từ nhóm gồm có L-threonin, L-isoloxin, O-axetyl homoserin, và L-methionin.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> HOMOSERIN DEHYDROGENAZA ĐƯỢC CẢI BIẾN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
 HOMOSERIN HOẶC L-AXIT AMIN THU ĐƯỢC TỪ HOMOSERIN BẰNG CÁCH SỬ
 DỤNG NÓ
 <130> OPA18570
 <150> KR 10-2018-0060445
 <151> 2018-05-28
 <160> 50
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> homoserin dehydrogenaza
 <400> 1
 Met Thr Ser Ala Ser Ala Pro Ser Phe Asn Pro Gly Lys Gly Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Val Gly Ile Ala Leu Leu Gly Phe Gly Thr Val Gly Thr Glu
 20 25 30
 Val Met Arg Leu Met Thr Glu Tyr Gly Asp Glu Leu Ala His Arg Ile
 35 40 45
 Gly Gly Pro Leu Glu Val Arg Gly Ile Ala Val Ser Asp Ile Ser Lys
 50 55 60
 Pro Arg Glu Gly Val Ala Pro Glu Leu Leu Thr Glu Asp Ala Phe Ala
 65 70 75 80
 Leu Ile Glu Arg Glu Asp Val Asp Ile Val Val Glu Val Ile Gly Gly
 85 90 95
 Ile Glu Tyr Pro Arg Glu Val Val Leu Ala Ala Leu Lys Ala Gly Lys
 100 105 110
 Ser Val Val Thr Ala Asn Lys Ala Leu Val Ala Ala His Ser Ala Glu
 115 120 125
 Leu Ala Asp Ala Ala Glu Ala Ala Asn Val Asp Leu Tyr Phe Glu Ala
 130 135 140
 Ala Val Ala Gly Ala Ile Pro Val Val Gly Pro Leu Arg Arg Ser Leu
 145 150 155 160
 Ala Gly Asp Gln Ile Gln Ser Val Met Gly Ile Val Asn Gly Thr Thr
 165 170 175

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Asn Leu Pro Ile Ala Asp Phe Gly Glu Thr Thr Thr Arg Tyr His
    355                      360                      365

Leu Asp Met Asp Val Glu Asp Arg Val Gly Val Leu Ala Glu Leu Ala
    370                      375                      380

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

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

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

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

```

```

<210>      2
<211>      930
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223>      gen thrB

```

<400> 2
 atggcaattg aactgaacgt cggtcgtaag gttaccgtca cggtagctgg atcttctgca
 60
 aacctcggac ctggctttga cacttttaggt ttggcactgt cggtagctga cactgtcgaa
 120
 gtggaaatta ttccatctgg cttggaagtga gaagtttttg gcgaaggcca aggcgaagtc
 180
 cctcttgatg gctccacact ggttggttaa gctattcgtg ctggcctgaa ggcagctgac
 240
 gctgaagtgc ctggattgag agtggtgtgc cacaacaaca ttccgcagtc tcgtggtctt
 300
 ggctcctctg ctgcagcggc ggttgctggt gttgctgcag ctaatgggtt ggccgatttc
 360
 ccgctgactc aagagcagat tgttcagttg tcctctgcct ttgaaggcca ccagataat
 420
 gctgcggctt ctgtgctggg tggagcagtg gtgtcgtgga caaatctgtc tatcgacggc
 480
 aagagccagc cacagtatgc tgctgtacca cttgaggtgc aggacaatat tcgtgcgact
 540
 gcgctgggtc ctaatttcca cgcattccacc gaagctgtgc gccgagtcct tcccactgaa
 600
 gtcactcaca tcgatgcgag atttaacgtg tcccgcggtg cagtgatgat cggtgcgttg
 660
 cagcagcgtc ctgatttgct gtgggagggg actcgtgacc gtctgcacca gccttatcgt
 720
 gcagaagtgt tgcctattac ctctgagtgg gtaaaccgcc tgcgcaaccg tggctacgag
 780
 gcataccttt ccggtgccgg cccaaccgcc atggtgctgt ccactgagcc aattccagac
 840
 aagggttttg aagatgctcg tgagtctggc attaaggtgc ttgagcttga ggttgccgga
 900
 ccagtcaagg ttgaagttaa ccaaccttag
 930

<210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 3
ctgcgacagc atggaact
18

<210> 4
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 4
caacgacaaa cgcccatc
18

<210> 5
<211> 2778
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mảnh gen

<400> 5
ctgcgacagc atggaactca gtgcaatggc tgtaaggcct gcaccaacaa tgattgagcg
60

aagctccaaa atgtcctccc cgggttgata ttagatttca taaatatact aaaaatcttg
120

agagtttttc cgttgaaaac taaaaagctg ggaaggtgaa tcgaatttcg gggctttaaa
180

gcaaaaatga acagcttggt ctatagtggc taggtaccct tttgttttg gacacatgta
240

gggtggccga aacaaagtaa taggacaaca acgctcgacc gcgattatct ttggagaatc
300

atgacctcag catctgcccc aagctttaac cccggcaagg gtcccggctc agcagtcgga
360

attgcccttt taggattcgg aacagtcggc actgaggtga tgcgtctgat gaccgagtac
420

ggtgatgaac ttgcgaccg cattggtggc cactggagg ttcgtggcat tgctgtttct
480

gatattctaa agccacgtga aggcgttgca cctgagctgc tactgagga cgcttttgca
540

ctcatcgagc gcgaggatgt tgacatcgct gttgaggtta tcggcggcat tgagtaccca
600

cgtgaggtag ttctcgagc tctgaaggcc ggcaagtctg ttgttaccgc caataaggct
660

cttgttgcag ctactctgc tgagcttgct gatgcagcgg aagccgcaaa cgttgacctg
720

tacttcgagg ctgctgttgc aggcgcaatt ccagtggttg gccactgcg tcgctccctg
780

gctggcgatc agatccagtc tgtgatggc atcgттаacg gcaccaccaa cttcatcttg
840

gacgccatgg attccaccgg cgctgactat gcagattctt tggctgaggc aactcgtttg
900

ggttacgccg aagctgatcc aactgcagac gtcgaaggcc atgacgccgc atccaaggct
960

gcaattttgg catccatcgc tttccacacc cgtgттaccg cggatgatgt gtactgcgaa
1020

ggtatcagca acatcagcgc tgccgacatt gaggcagcac agcaggcagg ccacaccatc
1080

aagttgttgg ccatctgtga gaagttcacc aacaaggaag gaaagtcggc tatttctgct
1140

cgctgcacc cgactctatt acctgtgtcc caccactgg cgtcggtaaa caagtccttt
1200

aatgcaatct ttgttgaagc agaagcagct ggtcgctga tgttctacgg aaacggtgca
1260

ggtggcgcg ccaaccgcgc tgctgtgctt ggcgacgtcg ttggtgccgc acgaaacaag
1320

gtgcacggtg gccgtgctcc aggtgagtc acctacgcta acctgccgat cgctgatttc
1380

ggtgagacca cactcgтта ccacctgcac atggatgtgg aagatcgctg gggggttttg
1440

gctgaattgg ctagcctgтт ctctgagcaa ggaatctccc tgcgtacaat ccgacaggaa
1500

gagcgcgatg atgatgcag tctgatcgtg gtcacccact ctgcgctgga atctgatctt
1560

tcccgaccg ttgaactgct gaaggctaag cctgттgtta aggcaatcaa cagtgtgatc
1620

cgcctcgaaa gggactaatt ttactgacat ggcaattgaa ctgaacgtcg gtcgтаaggт
1680

taccgtcacg gtacctggat cttctgcaaa cctcgгacct ggctttgaca ctttaggttt
1740

ggcactgtcg gtatacgaca ctgtcgaagt ggaaattatt ccatctggct tggaagtgga
1800

agtttttggc gaaggccaag gcgaagtccc tcttgatggc tcccacctgg tggttaaagc
1860

tattcgtgct ggcctgaagg cagctgacgc tgaagttcct ggattgagag tgggtgtgcca
1920

caacaacatt ccgcagtctc gtggtcttgg ctccctctgct gcagcggcgg ttgctgggtgt
1980

tgctgcagct aatggtttgg cggatttccc gctgactcaa gagcagattg ttcagttgtc
2040

ctctgccttt gaaggccacc cagataatgc tgcggcttct gtgctgggtg gagcagtggt
2100

gtcgtggaca aatctgtcta tcgacggcaa gagccagcca cagtatgctg ctgtaccact
2160

tgaggtgcag gacaatatc gtgcgactgc gctggttcct aatttccacg catccaccga
2220

agctgtgcgc cgagtccttc ccaactgaagt cactcacatc gatgcgcgat ttaacgtgtc
2280

ccgcgttgca gtgatgatcg ttgcgttgca gcagcgtcct gatttgctgt gggagggtag
2340

tcgtgaccgt ctgcaccagc cttatcgtgc agaagtgttg cctattacct ctgagtgggt
2400

aaaccgcctg cgcaaccgtg gctacgcggc atacctttcc ggtgccggcc caaccgcat
2460

ggtgctgtcc actgagccaa ttccagacaa ggttttggaa gatgctcgtg agtctggcat
2520

taaggtgctt gagcttgagg ttgcgggacc agtcaagggt gaagttaacc aaccttaggc
2580

ccaacaagga aggccccctt cgaatcaaga agggggcctt attagtgcag caattattcg
2640

ctgaacacgt gaaccttaca ggtgcccggc gcgttgagtg gtttgagttc cagctggatg
2700

cggttgtttt caccgaggct ttcttgatg aatccggcgt ggatggcgca gacgaaggct
2760

gatgggcggt tgcgttg
2778

<210> 6
<211> 1338
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> T285I

<400> 6
atgacctcag catctgcccc aagctttaac cccggcaagg gtcccggctc agcagtcgga
60
attgcccttt taggattcgg aacagtcggc actgaggtga tgcgtctgat gaccgagtac
120
ggtgatgaac ttgcgacccg cattggtggc cactggagg ttcgtggcat tgctgtttct
180
gatatctcaa agccacgtga aggcgttgca cctgagctgc tactgagga cgcttttgca
240
ctcatcgagc gcgaggatgt tgacatcgtc gttgaggtta tcggcggcat tgagtaccca
300
cgtgaggtag ttctcgagc tctgaaggcc ggcaagtctg ttgttaccgc caataaggct
360
cttgttgcag ctactctgc tgagcttgct gatgcagcgg aagccgcaa cgttgacctg
420
tacttcgagg ctgctgttgc aggcgcaatt ccagtggttg gccactgcg tcgctccctg
480
gctggcgatc agatccagtc tgtgatggc atcgttaacg gcaccaccaa cttcatcttg
540
gacgccatgg attccaccgg cgtgactat gcagattctt tggctgagge aactcgtttg
600
ggttacgcgc aagctgatcc aactgcagac gtcgaaggcc atgacgccgc atccaaggct
660
gcaattttgg catccatcgc tttccacacc cgtgttaccg cggatgatgt gtactgcgaa
720
ggtatcagca acatcagcgc tgccgacatt gaggcagcac agcaggcagg ccacaccatc
780
aagttgttgg ccatctgtga gaagttcacc aacaaggaag gaaagtcggc tatttctgct
840
cgctgcacc cgattctatt acctgtgtcc caccactgg cgtcggtaaa caagtccttt
900
aatgcaatct ttgttgaagc agaagcagct ggtcgctga tgttctacgg aaacggtgca
960
ggtggcgcgc caaccgcgtc tgctgtgctt ggcgacgtcg ttggtgccgc acgaaacaag
1020
gtgcacggtg gccgtgctcc aggtgagtc acctacgcta acctgccgat cgctgatttc
1080
ggtgagacca cactcgta ccacctgcac atggatgtgg aagatcgct gggggttttg
1140

gctgaattgg ctagcctgtt ctctgagcaa ggaatctccc tgcgtacaat ccgacaggaa
1200

gagcgcgatg atgatgcacg tctgatcgtg gtcaccact ctgcgctgga atctgatctt
1260

tcccgacaccg ttgaactgct gaaggctaag cctgttggtta aggcaatcaa cagtgtgatc
1320

cgcctcgaaa gggactaa
1338

<210> 7
<211> 1338
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R398Q

<400> 7
atgacctcag catctgcccc aagctttaac cccggcaagg gtcccggctc agcagtcgga
60

attgcccttt taggattcgg aacagtcggc actgaggtga tgcgtctgat gaccgagtac
120

ggtgatgaac ttgcgcaccg cattggtggc cactggagg ttctgtggcat tgctgtttct
180

gatatctcaa agccacgtga aggcgttgca cctgagctgc tctactgagga cgcttttgca
240

ctcatcgagc gcgaggatgt tgacatcgtc gttgaggtta tcggcggcat tgagtaccca
300

cgtgaggtag ttctcgcagc tctgaaggcc ggcaagtctg ttgttaccgc caataaggct
360

cttgttgcag ctactctgc tgagcttgct gatgcagcgg aagccgcaaa cgttgacctg
420

tacttcgagg ctgctgttgc aggcgcaatt ccagtgggtg gccactgcg tcgctccctg
480

gctggcgatc agatccagtc tgtgatgggc atcgttaacg gcaccaccaa cttcatcttg
540

gacgccatgg attccaccgg cgctgactat gcagattctt tggctgaggc aactcgtttg
600

ggttacgccg aagctgatcc aactgcagac gtcgaaggcc atgacgccgc atccaaggct
660

gcaattttgg catccatcgc tttccacacc cgtgttaccg cggatgatgt gtactgcgaa
720

ggtatcagca acatcagcgc tgccgacatt gaggcagcac agcaggcagg ccacaccatc
780

aagttgttgg ccatctgtga gaagttcacc aacaaggaag gaaagtcggc tattttctgct
840

cgcgtgcacc cgactctatt acctgtgtcc caccactgg cgtcggtaaa caagtccttt
900

aatgcaatct ttgttgaagc agaagcagct ggtcgcctga tgttctacgg aaacggtgca
960

ggtggcgcgc caaccgcgc tgctgtgctt ggcgacgtcg ttggtgccgc acgaaacaag
1020

gtgcacggtg gccgtgctcc aggtgagtc acctacgcta acctgccgat cgtgatattc
1080

ggtgagacca cactcgtta ccacctcgac atggatgtgg aagatcgcgt gggggttttg
1140

gctgaattgg ctagcctgtt ctctgagcaa ggaatctccc tgcgtacaat ccaacaggaa
1200

gagcgcgatg atgatgcacg tctgatcgtg gtcacccact ctgcgctgga atctgatctt
1260

tcccgaccg ttgaactgct gaaggctaag cctgtttgta aggcaatcaa cagtgtgatc
1320

cgcctcgaaa gggactaa
1338

<210> 8
<211> 1338
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> G378W

<400> 8
atgacctcag catctgcccc aagctttaac cccggcaagg gtcccggtc agcagtcgga
60

attgcccttt taggattcgg aacagtcggc actgaggtga tgcgtctgat gaccgagtac
120

ggtgatgaac ttgcgcaccg cattggtggc cactggagg ttcgtggcat tgctgtttct
180

gatatctcaa agccacgtga aggcgttgca cctgagctgc tctactgagga cgcttttgca
240

ctcatcgagc gcgaggatgt tgacatcgtc gttgaggtta tcggcggcat tgagtaccca
300

cgtgaggtag ttctcgcagc tctgaaggcc ggcaagtctg ttgttacgc caataaggct
360

cttgttgcag ctcaactctgc tgagcttgct gatgcagcgg aagccgcaaa cgttgacctg
420

tacttcgagg ctgctgttgc aggcgcaatt ccagtgggtg gccactgcg tcgctccctg
480

gctggcgatc agatccagtc tgtgatggc atcgttaacg gcaccaccaa cttcatcttg
540

gacgccatgg attccaccgg cgctgactat gcagattctt tggctgaggc aactcgtttg
600

ggttacgccg aagctgatcc aactgcagac gtcgaaggcc atgacgccgc atccaaggct
660

gcaattttgg catccatcgc tttccacacc cgtgttacgc cggatgatgt gtactgcgaa
720

ggtatcagca acatcagcgc tgccgacatt gaggcagcac agcaggcagg ccacaccatc
780

aagttgttgg ccatctgtga gaagttcacc aacaaggaag gaaagtcggc tatttctgct
840

cgctgcacc cgactctatt acctgtgtcc caccactgg cgtcggtaaa caagtccttt
900

aatgcaatct ttgttgaagc agaagcagct ggtcgcctga tgttctacgg aaacggtgca
960

ggtggcgcgc caaccgcgc tgctgtgctt ggcgacgtcg ttggtgccgc acgaaacaag
1020

gtgcacggtg gccgtgctcc aggtgagtc acctacgcta acctgccgat cgctgatttc
1080

ggtgagacca ccaactcgta ccacctcgac atggatgtgg aagatcgct gtgggttttg
1140

gctgaattgg ctagcctgtt ctctgagcaa ggaatctccc tgcgtacaat ccgacaggaa
1200

gagcgcgatg atgatgcacg tctgatcgtg gtcacccact ctgcgctgga atctgatctt
1260

tccgcaccg ttgaactgct gaaggctaag cctgttggtta aggcaatcaa cagtgtgatc
1320

cgcctcgaaa gggactaa
1338

<210> 9
<211> 1338
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> G378S

<400> 9

atgacctcag catctgcccc aagctttaac cccggcaagg gtcccggctc agcagtcgga
60

attgcccttt taggattcgg aacagtcggc actgaggtga tgcgtctgat gaccgagtac
120

ggtgatgaac ttgcgcaccc cattggtggc cactggagg ttcgtggcat tgctgtttct
180

gatattctca agccacgtga aggcgttgca cctgagctgc tctactgagga cgcttttgca
240

ctcatcgagc gcgaggatgt tgacatcgtc gttgaggtta tcggcggcat tgagtaccca
300

cgtgaggtag ttctcgagc tctgaaggcc ggcaagtctg ttgttaccgc caataaggct
360

cttgttgcag ctactctgc tgagcttgct gatgcagcgg aagccgcaaa cgttgacctg
420

tacttcgagg ctgctgttgc aggcgcaatt ccagtggttg gccactgcg tcgctccctg
480

gctggcgatc agatccagtc tgtgatgggc atcgttaacg gcaccaccaa cttcatcttg
540

gacgccatgg attccaccgg cgctgactat gcagattctt tggctgaggc aactcgtttg
600

ggttacgccg aagctgatcc aactgcagac gtcgaaggcc atgacgccgc atccaaggct
660

gcaattttgg catccatcgc tttccacacc cgtgttaccg cggatgatgt gtactgcgaa
720

ggtatcagca acatcagcgc tgccgacatt gaggcagcac agcaggcagg ccacaccatc
780

aagttgttgg ccatctgtga gaagttcacc aacaaggaag gaaagtcggc tatttctgct
840

cgctgcacc cgactctatt acctgtgtcc caccactgg cgtcggtaaa caagtccttt
900

aatgcaatct ttgttgaagc agaagcagct ggtcgcctga tgttctacgg aaacggtgca
960

ggtggcgcgc caaccgcgtc tgctgtgctt ggcgacgtcg ttggtgccgc acgaaacaag
1020

gtgcacggtg gccgtgctcc aggtgagtc acctacgcta acctgccgat cgctgatttc
1080

ggtgagacca ccactcgta ccacctcgac atggatgtgg aagatcgct gagcgttttg
1140

gctgaattgg ctagcctgtt ctctgagcaa ggaatctccc tgcgtacaat ccgacaggaa
1200

gagcgcgatg atgatgcacg tctgatcgtg gtcacccact ctgcgctgga atctgatctt
1260

tcccgacaccg ttgaactgct gaaggctaag cctgttggtta aggcaatcaa cagtgtgatc
1320

cgctctgaaa gggactaa
1338

<210> 10
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hom (KFCC10881-1)

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

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

<210> 11
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Hom (KFCC10881-14)

```

<400>      11
Met Thr Ser Ala Ser Ala Pro Ser Phe Asn Pro Gly Lys Gly Pro Gly
  1              5              10              15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Gly Gly Ala Pro Thr Ala Ser Ala Val Leu Gly Asp Val Val Gly Ala
 325 330 335
 Ala Arg Asn Lys Val His Gly Gly Arg Ala Pro Gly Glu Ser Thr Tyr
 340 345 350
 Ala Asn Leu Pro Ile Ala Asp Phe Gly Glu Thr Thr Thr Arg Tyr His
 355 360 365
 Leu Asp Met Asp Val Glu Asp Arg Val Gly Val Leu Ala Glu Leu Ala
 370 375 380
 Ser Leu Phe Ser Glu Gln Gly Ile Ser Leu Arg Thr Ile Gln Gln Glu
 385 390 395 400
 Glu Arg Asp Asp Asp Ala Arg Leu Ile Val Val Thr His Ser Ala Leu
 405 410 415
 Glu Ser Asp Leu Ser Arg Thr Val Glu Leu Leu Lys Ala Lys Pro Val
 420 425 430
 Val Lys Ala Ile Asn Ser Val Ile Arg Leu Glu Arg Asp
 435 440 445

<210> 12
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Hom (KFCC10881-19)

<400> 12
 Met Thr Ser Ala Ser Ala Pro Ser Phe Asn Pro Gly Lys Gly Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Val Gly Ile Ala Leu Leu Gly Phe Gly Thr Val Gly Thr Glu
 20 25 30
 Val Met Arg Leu Met Thr Glu Tyr Gly Asp Glu Leu Ala His Arg Ile
 35 40 45
 Gly Gly Pro Leu Glu Val Arg Gly Ile Ala Val Ser Asp Ile Ser Lys
 50 55 60
 Pro Arg Glu Gly Val Ala Pro Glu Leu Leu Thr Glu Asp Ala Phe Ala
 65 70 75 80
 Leu Ile Glu Arg Glu Asp Val Asp Ile Val Val Glu Val Ile Gly Gly
 85 90 95
 Ile Glu Tyr Pro Arg Glu Val Val Leu Ala Ala Leu Lys Ala Gly Lys
 100 105 110
 Ser Val Val Thr Ala Asn Lys Ala Leu Val Ala Ala His Ser Ala Glu
 115 120 125

Leu	Ala	Asp	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Asn	Val	Asp	Leu	Tyr	Phe	Glu	Ala	130	135	140
Ala	Val	Ala	Gly	Ala	Ile	Pro	Val	Val	Gly	Pro	Leu	Arg	Arg	Ser	Leu	145	150	155
Ala	Gly	Asp	Gln	Ile	Gln	Ser	Val	Met	Gly	Ile	Val	Asn	Gly	Thr	Thr	165	170	175
Asn	Phe	Ile	Leu	Asp	Ala	Met	Asp	Ser	Thr	Gly	Ala	Asp	Tyr	Ala	Asp	180	185	190
Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	Thr	Arg	Leu	Gly	Tyr	Ala	Glu	Ala	Asp	Pro	Thr	195	200	205
Ala	Asp	Val	Glu	Gly	His	Asp	Ala	Ala	Ser	Lys	Ala	Ala	Ile	Leu	Ala	210	215	220
Ser	Ile	Ala	Phe	His	Thr	Arg	Val	Thr	Ala	Asp	Asp	Val	Tyr	Cys	Glu	225	230	235
Gly	Ile	Ser	Asn	Ile	Ser	Ala	Ala	Asp	Ile	Glu	Ala	Ala	Gln	Gln	Ala	245	250	255
Gly	His	Thr	Ile	Lys	Leu	Leu	Ala	Ile	Cys	Glu	Lys	Phe	Thr	Asn	Lys	260	265	270
Glu	Gly	Lys	Ser	Ala	Ile	Ser	Ala	Arg	Val	His	Pro	Thr	Leu	Leu	Pro	275	280	285
Val	Ser	His	Pro	Leu	Ala	Ser	Val	Asn	Lys	Ser	Phe	Asn	Ala	Ile	Phe	290	295	300
Val	Glu	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	Arg	Leu	Met	Phe	Tyr	Gly	Asn	Gly	Ala	305	310	315
Gly	Gly	Ala	Pro	Thr	Ala	Ser	Ala	Val	Leu	Gly	Asp	Val	Val	Gly	Ala	325	330	335
Ala	Arg	Asn	Lys	Val	His	Gly	Gly	Arg	Ala	Pro	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	340	345	350
Ala	Asn	Leu	Pro	Ile	Ala	Asp	Phe	Gly	Glu	Thr	Thr	Thr	Arg	Tyr	His	355	360	365
Leu	Asp	Met	Asp	Val	Glu	Asp	Arg	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	370	375	380
Ser	Leu	Phe	Ser	Glu	Gln	Gly	Ile	Ser	Leu	Arg	Thr	Ile	Arg	Gln	Glu	385	390	395
Glu	Arg	Asp	Asp	Asp	Ala	Arg	Leu	Ile	Val	Val	Thr	His	Ser	Ala	Leu	405	410	415
Glu	Ser	Asp	Leu	Ser	Arg	Thr	Val	Glu	Leu	Leu	Lys	Ala	Lys	Pro	Val	420	425	430
Val	Lys	Ala	Ile	Asn	Ser	Val	Ile	Arg	Leu	Glu	Arg	Asp				435	440	445

<210> 13
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Hom (KFCC10881-22)

<400> 13

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly His Thr Ile Lys Leu Leu Ala Ile Cys Glu Lys Phe Thr Asn Lys

```

260							265							270															
Glu	Gly	Lys	Ser	Ala	Ile	Ser	Ala	Arg	Val	His	Pro	Thr	Leu	Leu	Pro														
		275						280					285																
Val	Ser	His	Pro	Leu	Ala	Ser	Val	Asn	Lys	Ser	Phe	Asn	Ala	Ile	Phe														
	290						295				300																		
Val	Glu	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	Arg	Leu	Met	Phe	Tyr	Gly	Asn	Gly	Ala														
305					310					315					320														
Gly	Gly	Ala	Pro	Thr	Ala	Ser	Ala	Val	Leu	Gly	Asp	Val	Val	Gly	Ala														
				325					330					335															
Ala	Arg	Asn	Lys	Val	His	Gly	Gly	Arg	Ala	Pro	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr														
			340					345					350																
Ala	Asn	Leu	Pro	Ile	Ala	Asp	Phe	Gly	Glu	Thr	Thr	Thr	Arg	Tyr	His														
		355					360					365																	
Leu	Asp	Met	Asp	Val	Glu	Asp	Arg	Val	Ser	Val	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala														
	370					375					380																		
Ser	Leu	Phe	Ser	Glu	Gln	Gly	Ile	Ser	Leu	Arg	Thr	Ile	Arg	Gln	Glu														
385					390					395					400														
Glu	Arg	Asp	Asp	Asp	Ala	Arg	Leu	Ile	Val	Val	Thr	His	Ser	Ala	Leu														
				405					410					415															
Glu	Ser	Asp	Leu	Ser	Arg	Thr	Val	Glu	Leu	Leu	Lys	Ala	Lys	Pro	Val														
			420					425					430																
Val	Lys	Ala	Ile	Asn	Ser	Val	Ile	Arg	Leu	Glu	Arg	Asp																	
		435					440					445																	

<210> 14
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 14
 tcgagctcgg taccctgcg acagcatgga actc
 34

<210> 15
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 15

ctctagagga tccccttagt ccctttcgag gcgg
34

<210> 16
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 16
caccggcgct gactatgc
18

<210> 17
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 17
aatcgggtgc acgcgagc
18

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

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 18
ttggattgta cgcaggga
18

<210> 19
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 19
ccacacgcga tcttccac
18

<210> 20
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 20
 gctcacgcga tcttccac
 18

<210> 21
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 21
 ttagtccctt tcgaggcg
 18

<210> 22
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC(L377K)

<400> 22
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly

115					120					125					
Lys	Ile	Cys	Ile	Val	Ala	Gly	Phe	Gln	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg
130						135					140				
Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Val	Ala
145					150					155					160
Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Ala	Asp	Val	Cys	Glu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Val
				165					170					175	
Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala	Asp	Pro	Arg	Ile	Val	Pro	Asn	Ala	Gln	Lys
			180					185					190		
Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly
	195						200					205			
Ser	Lys	Ile	Leu	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Ala	Phe	Asn
	210					215					220				
Val	Pro	Leu	Arg	Val	Arg	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Leu
225					230					235					240
Ile	Ala	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Thr
				245					250					255	
Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile
			260					265					270		
Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Lys	Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp
	275						280					285			
Ala	Glu	Ile	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu
	290					295					300				
Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr	Cys	Pro	Arg	Ser	Asp	Gly	Arg
305					310					315					320
Arg	Ala	Met	Glu	Ile	Leu	Lys	Lys	Leu	Gln	Val	Gln	Gly	Asn	Trp	Thr
				325					330					335	
Asn	Val	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Val	Gly	Lys	Val	Ser	Leu	Val	Gly	Ala
			340					345					350		
Gly	Met	Lys	Ser	His	Pro	Gly	Val	Thr	Ala	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Leu
	355						360					365			
Arg	Asp	Val	Asn	Val	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Glu	Ile	Arg
	370					375					380				
Ile	Ser	Val	Leu	Ile	Arg	Glu	Asp	Asp	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala
385					390					395					400
Leu	His	Glu	Gln	Phe	Gln	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Glu	Ala	Val	Val	Tyr
				405					410					415	
Ala	Gly	Thr	Gly	Arg											
			420												

<210> 23
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 23
 tcgagctcgg tacccgctgc gcagtgttga atac
 34

<210> 24
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 24
 tggaaatctt ttcgatgttc acgttgacat
 30

<210> 25
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 25
 atgtcaacgt gaacatcgaa aagatttcca
 30

<210> 26
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 26
 ctctagagga tccccgttca cctcagagac gatt
 34

<210> 27
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 27

acggatccca gactccaaag caaaagcg
28

<210> 28

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 28

acaccacggc agaaccaggt gcaaaggaca
30

<210> 29

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 29

ctgggttctgc cgtggtgtgc atcatctctg
30

<210> 30

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 30

acggatccaa ccaaacttgc tcacactc
28

<210> 31

<211> 1161

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> gen metB

<400> 31
ttgtcttttg acccaaacac ccagggtttc tccactgcat cgattcacgc tgggtatgag
60
ccagacgact actacggttc gattaacacc ccaatctatg cctccaccac cttcgcgcag
120
aacgctccaa acgaactgcg caaaggctac gagtacaccc gtgtgggcaa ccccaccatc
180
gtggcattag agcagaccgt cgcagcactc gaaggcgcaa agtatggccg cgcattctcc
240
tccggcatgg ctgcaaccga catcctgttc cgcacatcc tcaagccggg cgatcacatc
300
gtcctcggca acgatgctta cggcgggaacc taccgcctga tcgacaccgt attcaccgca
360
tggggcgctc aatacaccgt tgttgatacc tccgtcgtgg aagaggtaa ggcagcgatc
420
aaggacaaca ccaagctgat ctgggtggaa accccaacca acccagcact tggcatcacc
480
gacatcgaag cagtagcaaa gctcaccgaa ggcaccaacg ccaagctggt tgttgacaac
540
accttcgcat ccccatacct gcagcagcca ctaaaactcg gcgcacacgc agtcctgcac
600
tccaccacca agtacatcgg aggacactcc gacgttggtg gcggccttgt gggtaccaac
660
gaccaggaaa tggacgaaga actgctgttc atgcagggcg gcatcggacc gatcccatca
720
gttttcgatg catacctgac cgcccgtggc ctcaagaccc ttgcagtgcg catggatcgc
780
cactgcgaca acgcagaaaa gatcgcgga ttcttgact cccgccaga ggtctccacc
840
gtgctctacc caggcttgaa gaaccacca ggccacgaag tcgcagcgaa gcagatgaag
900
cgcttcggcg gcatgatctc cgtccgtttc gcaggcggcg aagaagcagc taagaagttc
960
tgtacctcca ccaaactgat ctgtctggcc gagtccctcg gtggcgtgga atccctcctg
1020
gagcaccag caaccatgac ccaccagtca gctgccggct ctgagctcga ggttccccgc
1080
gacctcgtgc gcatctccat tggattgaa gacattgaag acctgctcgc agatgtcgag
1140

caggccctca ataaccttta g
1161

<210> 32
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mới

<400> 32
tctagacgcc cgcataactgg cttc
24

<210> 33
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mới

<400> 33
cccattccact aaacttaaac agatgtgatc gcccggc
37

<210> 34
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mới

<400> 34
tgtttaagtt tagtggatgg ggaagaacca cccaggcc
38

<210> 35
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mới

<400> 35
gtcgaccaat cgtccagagg gcg
23

<210> 36
 <211> 1314
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> gen metY

<400> 36
 atgccaaagt acgacaattc caatgctgac cagtgggggt ttgaaaccg ctccattcac
 60
 gcaggccagt cagtagacgc acagaccagc gcacgaaacc ttccgatcta ccaatccacc
 120
 gctttcgtgt tcgactccgc tgagcacgcc aagcagcggt tcgcacttga ggatctaggc
 180
 cctgtttact cccgcctcac caaccaacc gttgagggtt tgaaaaaccg catcgcttcc
 240
 ctggaaggtg gcgtccacgc tgtagcggtc tcctccggac aggccgcaac caccaacgcc
 300
 attttgaacc tggcaggagc gggcgaccac atcgtcacct cccacgcct ctacggtggc
 360
 accgagactc tattccttat cactcttaac cgcctgggta tcgatgtttc cttcgtggaa
 420
 aaccccgacg accctgagtc ctggcaggca gccgttcagc caaacaccaa agcattcttc
 480
 ggcgagactt tcgccaaccc acaggcagac gtcttgata ttctgcggt ggctgaagtt
 540
 gcgcaccgca acagcggtcc actgatcatc gacaacacca tcgctaccgc agcgctcgtg
 600
 cgcccgctcg agctcggcgc agacgttgct gtcgcttccc tcaccaagtt ctacaccggc
 660
 aacggctccg gactgggcgc cgtgcttata gacggcgga agttcgattg gactgtcgaa
 720
 aaggatggaa agccagtatt cccctacttc gtcactccag atgctgctta ccacggattg
 780
 aagtacgcag accttgggtc accagccttc ggcctcaagg ttcgcgttgg ccttctacgc
 840
 gacaccggct ccaccctctc cgcattcaac gcatgggctg cagtccaggc catcgacacc
 900
 ctttccctgc gcctggagcg ccacaacgaa aacgccatca aggttgaga attcctcaac
 960
 aaccacgaga aggtggaaaa ggttaacttc gcaggcctga aggattcccc ttggtacgca
 1020

accaaggaaa agcttggcct gaagtacacc ggctccgttc tcaccttcga gatcaagggc
1080

ggcaaggatg aggcttgggc atttatcgac gccctgaagc tacactccaa ccttgcaaac
1140

atcggcgatg ttcgctccct cgttgttcac ccagcaacca ccacccattc acagtccgac
1200

gaagctggcc tggcacgcgc gggcggtacc cagtccaccg tccgctgtc cgttggcatc
1260

gagaccattg atgatatcat cgctgacctc gaaggcggct ttgctgcaat ctag
1314

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

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 37
tctagaccat cctgcaccat ttag
24

<210> 38
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 38
cccatccact aaacttaaac acgctcctgc caggttc
37

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

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 39
tgtttaagtt tagtgatgg gcttggtacg caaccaagg
39

<210> 40

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

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 40
 gtcgacgatt gctccggctt cgg
 23

<210> 41
 <211> 2213
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> gen mcbR

<400> 41
 aatctggatt tccgccaggt tttggcacgc ccgtctgggt taggcaatga gataccgaac
 60

acacgtgccaa aaagttcggc tttttcgccg atcttgtcac gcctgcctgg tttgtcttgt
 120

aaagagtgat ttcatggccg agactcctaa aagtttgacc tcacaggatt gcttctaagg
 180

gcctctccaa tctccactga ggtacttaat ctttccgggg aattcgggcg cttaaatacga
 240

gaaattaggc catcaccttt taataacaat acaatgaata attggaatag gtcgacacct
 300

ttggagcgga gccggttaaa attggcagca ttcaccgaaa gaaaaggaga accacatgct
 360

tgccctaggt tggattacat ggatcattat tgggtggtcta gctggttgga ttgcctccaa
 420

gattaaaggc actgatgctc agcaaggaat tttgctgaac atagtcgtcg gtattatcgg
 480

tggtttggtta ggcggctggc tgcttggaat cttcggagtg gatgttgccg gtggcggctt
 540

gatcttcagc ttcatcacat gtctgattgg tgctgtcatt ttgctgacga tcgtgcagtt
 600

cttcactcgg aagaagtaat ctgctttaaa tccgtagggc ctgttgatat ttcgatatca
 660

acaggccttt tggtcatttt ggggtggaaa aagcgctaga cttgcctgtg gattaaaact
 720

atacgaaccg gtttgtctat attggtgtta gacagttcgt cgtatcttga aacagaccaa
780

cccgaaagga cgtggccgaa cgtggctgct agcgcttcag gcaagagtaa aacaagtgcc
840

ggggcaaacc gtcgtcgcaa tcgaccaagc ccccgacagc gtctcctcga tagcgcaacc
900

aaccttttca ccacagaagg tattcgcgtc atcggatttg atcgtatcct ccgtgaagct
960

gacgtggcga aggcgagcct ctattccctt ttcggatcga aggacgcctt ggttattgca
1020

tacctggaga acctcgatca gctgtggcgt gaagcgtggc gtgagcgcac cgtcggtatg
1080

aaggatccgg aagataaaat catcgcgctt tttgatcagt gcattgagga agaaccagaa
1140

aaagatttcc gcggctcgca ctttcagaat gcggctagtg agtaccctcg ccccgaaact
1200

gatagcgaag agggcattgt tgcagcagtg ttagagcacc gcgagtgggtg tcataagact
1260

ctgactgatt tgctcactga gaagaacggc taccagggca ccaccaggc gaatcagctg
1320

ttggtgttcc ttgatgggtg acttgctgga tctcgattgg tccacaacat cagtcctctt
1380

gagacggctc gcgatttggc tcggcagttg ttgtcggctc cacctgcgga ctactcaatt
1440

tagtttcttc attttccgaa ggggtatctt cgttggggga ggcgtcgata agccccctct
1500

tttagctttt aacctcagcg cgacgctgct ttaagcgctg catggcggcg cggttcattt
1560

cacgttgctt ttgcgcctc ttgttcgcga tttctttgcg ggctgtttt gcttcgttga
1620

tttcggcagt acgggttttg gtgagttcca cgtttgttgc gtgaagcgtt gaggcgttcc
1680

atggggtgag aatcatcagg gcgcgggttt tgcgctcgtg ccacaggaag atgcgctttt
1740

ctttttgttt tgcgcggtag atgtcgcgct gctctagggtg gtgcactttg aaatcgtcgg
1800

taagtgggta tttgcgttcc aaaatgacca tcatgatgat tgtttggagg agcgtccaca
1860

ggttggttgc gacccaatag agtgcgattg ctgtggggaa tggctcgtg aggccaaagg
1920

acagtgggaa gatcggcgcg aggatcgaca tcacgatcat gaacttcagc atgccgttag
1980

agaatccgga tgcgtaatcg ttggtttgga agctgcggta catggacatc gccatgttga
2040

ttgcggtgag gattgcggct gtgatgaaca gtggcaaaac gaaactaaga acttccgcct
2100

gcgtggtgct caaatatattt agctgctcag tgggcatcga aacataagcg ggcagaggca
2160

cattgctcac gcgaccagcg aggaaagatt ccacttcctc aggagttagg aag
2213

<210> 42
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 42
ggcccgggccc tgcctggttt gtcttgta
28

<210> 43
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 43
cgaaaaatga agaaagttcg gccacgtcct ttcgg
35

<210> 44
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 44
aggacgtggc cgaactttct tcattttccg aaggg
35

<210> 45
<211> 28

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 45
 atcccggggg ttcgatgccc actgagca
 28

<210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 46
 aatctggatt tccgccaggt
 20

<210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 47
 cttcctaact cctgaggaag
 20

<210> 48
 <211> 1338
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> gen hom kiểu đại

<400> 48
 atgacctcag catctgcccc aagctttaac cccggcaagg gtcccggctc agcagtcgga
 60

attgcccttt taggattcgg aacagtcggc actgaggtga tgcgtctgat gaccgagtac
 120

ggatgatgaac ttgcgaccg cattggtggc cactggagg ttcgtggcat tgctgtttct
 180

gatatctcaa agccacgtga aggcgttgca cctgagctgc tctactgagga cgctttttgca
240

ctcatcgagc gcgaggatgt tgacatcgtc gttgagggtta tcggcgggcat tgagtaccca
300

cgtgaggtag ttctcgcagc tctgaaggcc ggcaagtctg ttgttaccgc caataaggct
360

cttgttgcag ctcaactctgc tgagcttgct gatgcagcgg aagccgcaaa cgttgacctg
420

tacttcgagg ctgctgttgc aggcgcaatt ccagtgggtg gccactgcg tcgctccctg
480

gctggcgatc agatccagtc tgtgatgggc atcgttaacg gcaccaccaa cttcatcttg
540

gacgccatgg attccaccgg cgctgactat gcagattctt tggctgaggc aactcgtttg
600

ggttacgccg aagctgatcc aactgcagac gtcgaaggcc atgacgccgc atccaaggct
660

gcaatttttg catccatcgc tttccacacc cgtgttaccg cggatgatgt gtactgcgaa
720

ggtatcagca acatcagcgc tgccgacatt gaggcagcac agcaggcagg ccacaccatc
780

aagttgttgg ccatctgtga gaagttcacc aacaaggaag gaaagtcggc tatttctgct
840

cgcgtgcacc cgactctatt acctgtgtcc caccactgg cgtcggtaaa caagtccttt
900

aatgcaatct ttgttgaagc agaagcagct ggtcgcctga tgttctacgg aaacggtgca
960

ggtggcgcgc caaccgcgc tgctgtgctt ggcgacgtcg ttggtgccgc acgaaacaag
1020

gtgcacggtg gccgtgctcc aggtgagtcc acctacgcta acctgccgat cgctgatttc
1080

ggtgagacca ccaactcgta ccacctcgac atggatgtgg aagatcgctg ggggggtttg
1140

gctgaattgg ctagcctgtt ctctgagcaa ggaatctccc tgcgtacaat ccgacaggaa
1200

gagcgcgatg atgatgcacg tctgatcgtg gtcaccact ctgcgctgga atctgatctt
1260

tcccgaccg ttgaactgct gaaggctaag cctgttggtta aggcaatcaa cagtgtgatc
1320

cgcctcgaaa gggactaa
1338

<210> 49
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ATCC14067 hom (NCgl11136)

<400> 49

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly His Thr Ile Lys Leu Leu Ala Ile Cys Glu Lys Phe Thr Asn Lys

```

<210>      50
<211>      445
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

<220>
<223>      ATCC13869 hom

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

```

Leu Ile Glu Arg Glu Asp Val Asp Ile Val Val Glu Val Ile Gly Gly
 85 90 95
 Ile Glu Tyr Pro Arg Glu Val Val Leu Ala Ala Leu Lys Ala Gly Lys
 100 105 110
 Ser Val⁶ Val Thr Ala Asn Lys Ala Leu Val Ala Ala His Ser Ala Glu
 115 120 125
 Leu Ala Asp Ala Ala Glu Ala Ala Asn Val Asp Leu Tyr Phe Glu Ala
 130 135 140
 Ala Val Ala Ala Ala Ile Pro Val Val Gly Pro Leu Arg Arg Ser Leu
 145 150 155 160
 Ala Gly Asp Gln Ile Gln Ser Val Met Gly Ile Val Asn Gly Thr Thr
 165 170 175
 Asn Phe Ile Leu Asp Ala Met Asp Ser Thr Gly Ala Asp Tyr Ala Asp
 180 185 190
 Ser Leu Ala Glu Ala Thr Arg Leu Gly Tyr Ala Glu Ala Asp Pro Thr
 195 200 205
 Ala Asp Val Glu Gly His Asp Ala Ala Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala
 210 215 220
 Ser Ile Ala Phe His Thr Arg Val Thr Ala Asp Asp Val Tyr Cys Glu
 225 230 235 240
 Gly Ile Ser Asn Ile Ser Ala Ala Asp Ile Glu Ala Ala Gln Gln Ala
 245 250 255
 Gly His Thr Ile Lys Leu Leu Ala Ile Cys Glu Lys Phe Thr Asn Lys
 260 265 270
 Glu Gly Lys Ser Ala Ile Ser Ala Arg Val His Pro Thr Leu Leu Pro
 275 280 285
 Val Ser His Pro Leu Ala Ser Val Asn Lys Ser Phe Asn Ala Ile Phe
 290 295 300
 Val Glu Ala Glu Ala Ala Gly Arg Leu Met Phe Tyr Gly Asn Gly Ala
 305 310 315 320
 Gly Gly Ala Pro Thr Ala Ser Ala Val Leu Gly Asp Val Val Gly Ala
 325 330 335
 Ala Arg Asn Lys Val His Gly Gly Arg Ala Pro Gly Glu Ser Thr Tyr
 340 345 350
 Ala Asn Leu Pro Ile Ala Asp Phe Gly Glu Thr Thr Thr Arg Tyr His
 355 360 365
 Leu Asp Met Asp Val Glu Asp Arg Val Gly Val Leu Ala Glu Leu Ala
 370 375 380
 Ser Leu Phe Ser Glu Gln Gly Ile Ser Leu Arg Thr Ile Arg Gln Glu
 385 390 395 400

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

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

Val Lys⁸ Ala Ile Asn Ser Val Ile Arg Leu Glu Arg Asp
435 440 445