



(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



1-0039453

(51)^{2020.01} C12N 15/77; C12P 13/08; C12P 13/06; (13) B
C12N 9/26; C12P 13/04

(21) 1-2021-01938

(22) 09/04/2019

(86) PCT/KR2019/004228 09/04/2019

(87) WO 2020/067618 02/04/2020

(30) 10-2018-0116540 28/09/2018 KR

(45) 25/04/2024 433

(43) 26/07/2021 400

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

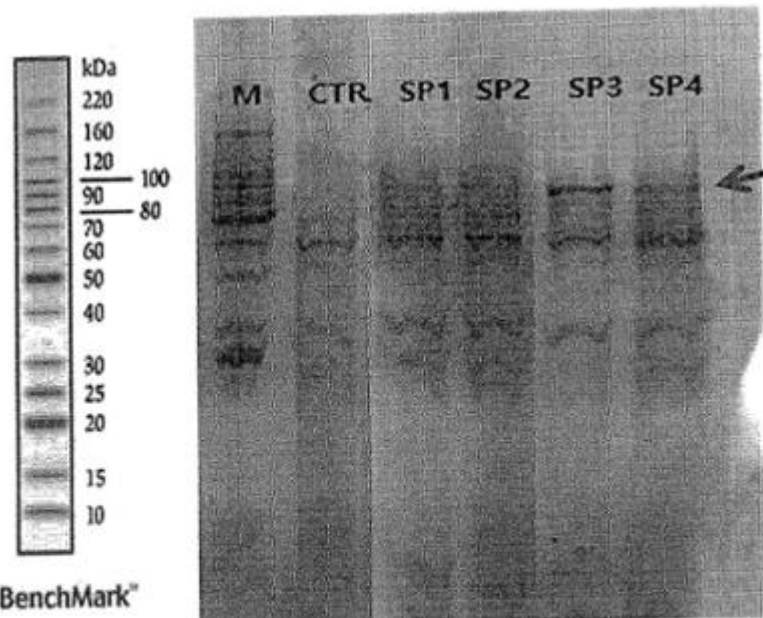
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) KIM, Kyungrim (KR); Byun Hyo Jeong (KR); LEE, Kwang Woo (KR); KIM, Hyung Joon (KR); SHIN, Yong Uk (KR); LEE, Jung Kee (KR).

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

(54) VI SINH VẬT SẢN SINH L-AXIT AMIN CÓ HOẠT TÍNH A-GLUCOSIDAZA TĂNG CƯỜNG, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-AXIT AMIN VÀ PHƯƠNG PHÁP TĂNG SẢN SINH L-AXIT AMIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản sinh L-axit amin có hoạt tính α -glucosidaza tăng cường, phương pháp sản xuất L-axit amin và phương pháp tăng sản sinh L-axit amin sử dụng vi sinh vật này. Theo sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh L-axit amin có hoạt tính α -glucosidaza tăng cường, nhờ đó cải thiện năng suất sản sinh L-axit amin. Do đó, vi sinh vật có thể được sử dụng rất hữu ích để sản sinh L-axit amin.



M	BenchMark.
CTR.	KCCM11016P
SP1	KCCM11016P::PgapA-SP1-aglA(<i>B.af</i>)
SP2	KCCM11016P::PgapA-SP2-aglA(<i>B.af</i>)
SP3	KCCM11016P::PgapA-SP3-aglA(<i>B.af</i>)
SP4	KCCM11016P::PgapA-SP4-aglA(<i>B.af</i>)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản sinh L-axit amin có hoạt tính α -glucosidaza tăng cường, phương pháp sản xuất L-axit amin, và phương pháp tăng sản sinh L-axit amin sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các L-axit amin đã được sử dụng trong các ngành công nghiệp thức ăn chăn nuôi, dược phẩm và mỹ phẩm, và chủ yếu được sản xuất bằng cách lên men sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* hoặc chi *Escherichia*. Để sản xuất các L-axit amin, nhiều nghiên cứu khác nhau chẳng hạn như phát triển các chủng sản sinh và các công nghệ quy trình lên men hiệu quả cao đã được thực hiện. Cụ thể, các phương pháp tiếp cận vật liệu đích cụ thể chủ yếu đã được sử dụng, chẳng hạn như tăng biểu hiện của các gen mã hóa các enzym liên quan đến sinh tổng hợp L-axit amin hoặc loại bỏ các gen không cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp (Patent Hàn Quốc số 10-0838038).

Trong khi đó, nhiều nghiên cứu khác nhau để tăng lượng đường sẵn có đã được thực hiện để tăng năng suất chất đích của vi sinh vật, và đồng thời, tồn tại nhu cầu liên tục về việc xem xét thành phần môi trường và sự phát triển của vi sinh vật hiệu quả. Ví dụ, patent Hàn Quốc số 10-1484108 đã bộc lộ công nghệ để điều chế vi sinh vật đột biến có khả năng làm tăng xenlobiaza sẵn có thông qua biểu hiện quá mức của gen *ascB* hoặc *chbF* và sử dụng đồng thời xenlobiaza và các loại đường khác như xyloza, mannoza và galactoza và sản xuất nhiên liệu sinh học bằng cách sử dụng chúng. Tuy nhiên, cần có những nghiên cứu tiếp tục về mối tương quan giữa lượng đường sẵn có và năng suất L-axit amin của vi sinh vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả đã hoàn thiện sáng chế bằng xác minh đáng ngạc nhiên về tác dụng cải thiện năng suất L-axit amin là chất đích mà không cần thêm vào isomaltoza và maltoza nhờ kết quả của việc đưa α -glucosidaza, đã biết để phân hủy isomaltoza và maltoza, vào chủng thuộc chi *Corynebacterium*.

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh L-axit amin có hoạt tính α -glucosidaza tăng cường.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-axit amin bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường; và thu nhận L-axit amin từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp tăng sản sinh L-axit amin, bao gồm bước tăng cường biểu hiện của α -glucosidaza ở vi sinh vật.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất việc sử dụng α -glucosidaza để tăng cường sản sinh L-axit amin.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Theo sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh L-axit amin có hoạt tính α -glucosidaza tăng cường, nhờ đó cải thiện năng suất sản sinh L-axit amin. Do đó, vi sinh vật có thể được sử dụng rất hữu ích để sản sinh L-axit amin.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 minh họa kết quả SDS-PAGE xác nhận biểu hiện của α -glucosidaza trong các chủng *Corynebacterium glutamicum*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Cụ thể, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Trong khi đó, từng phần mô tả và phương án được bộc lộ trong sáng chế cũng có thể được áp dụng cho từng phần mô tả và phương án khác. Có nghĩa là, tất cả sự kết hợp của các phần mô tả khác nhau được bộc lộ trong sáng chế đều thuộc phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phần mô tả chi tiết dưới đây có thể không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Để đạt được các mục đích nêu trên, khía cạnh của sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh L-axit amin có hoạt tính α -glucosidaza tăng cường. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế có hoạt tính α -glucosidaza tăng cường để cải thiện năng suất L-axit amin. Do đó, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế có thể được sử dụng rất hữu ích để sản sinh L-axit amin.

Theo sáng chế, thuật ngữ “ α -glucosidaza” là loại glucosidaza để phân hủy đường thành glucoza và đề cập đến enzym có đặc tính phân hủy liên kết α (1 \rightarrow 4). Theo sáng

ché, α -glucosidaza có thể là protein có hoạt tính của α -glucosidaza được mã hóa bởi gen *agLA*, nhưng miễn là α -glucosidaza có hoạt tính tương ứng với glucosidaza được tăng cường trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* để cải thiện năng suất L-axit amin, sáng chế không giới hạn cụ thể ở đây. Protein có hoạt tính của α -glucosidaza được mã hóa bởi gen *agLA* đã biết có hoạt tính phân hủy isomaltoza hoặc maltoza (Glycobiology. 11/2010; 20(11)), và thông tin trên α -glucosidaza có thể dễ dàng thu được bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật thông qua dữ liệu đã biết (ví dụ, Ngân hàng gen của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (NCBI: National Center for Biotechnology Information), Nguồn protein thông dụng (UniProt: Universal Protein Resource), v.v.). Theo sáng chế, α -glucosidaza có thể là α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*, *Erwinia amylovora*, hoặc *Saccharomyces cerevisiae*, và cụ thể là, α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis* được mô tả làm ví dụ của sáng chế không bị giới hạn ở đây, mà có thể là protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 1. α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Erwinia amylovora* không bị giới hạn ở đây, mà có thể là protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 28. α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae* không bị giới hạn ở đây, mà có thể là protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 29. Protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 1 có thể được sử dụng kết hợp với protein có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 1 và protein có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 1.

Ngoài ra, ngay cả khi “protein hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin được liệt kê với số trình tự cụ thể” được mô tả trong sáng chế, nếu protein có hoạt tính tương đồng hoặc đồng nhất có hoạt tính của polypeptit bao gồm trình tự axit amin có số trình tự tương ứng, rõ ràng là các protein chứa trình tự axit amin được xóa, sửa đổi, thay thế, thay thế bảo thủ hoặc được thêm vào một phần cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Ví dụ, nếu protein có hoạt tính tương đồng hoặc đồng nhất có hoạt tính của polypeptit bao gồm trình tự axit amin có số trình tự tương ứng, rõ ràng là không loại trừ sự thêm vào trình tự không làm thay đổi chức năng của protein trước và sau trình tự axit amin, đột biến xảy ra tự nhiên, đột biến câm của chúng, hoặc thay thế bảo thủ, và sự thêm vào và đột biến trình tự thuộc phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, nếu protein có hoạt tính tương đồng

hoặc đồng nhất có hoạt tính của polypeptit bao gồm trình tự axit amin có số trình tự tương ứng, thì trình tự axit amin có ít nhất 80% tương đồng hoặc đồng nhất, cụ thể là ít nhất 90%, tốt hơn là ít nhất 95%, và tốt nhất là ít nhất 99% với trình tự axit amin có số trình tự tương ứng có thể thuộc phạm vi của sáng chế.

Ví dụ, protein có hoạt tính của α -glucosidaza theo sáng chế có thể là protein bao gồm trình tự axit amin (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 1) của α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*, trình tự axit amin (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 28) của α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Erwinia amylovora*, hoặc trình tự axit amin (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 29) của α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae*. Nếu α -glucosidaza theo sáng chế là protein có hiệu quả tương ứng với α -glucosidaza và tăng cường hoạt tính trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* để cải thiện năng suất L-axit amin, rõ ràng là α -glucosidaza được bao gồm trong protein có hoạt tính của α -glucosidaza theo sáng chế. Cụ thể, miễn là α -glucosidaza theo sáng chế có hoạt tính của α -glucosidaza và tăng cường hoạt tính trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* để cải thiện năng suất L-axit amin, trình tự axit amin có ít nhất 80% tương đồng hoặc đồng nhất, cụ thể là ít nhất 90%, tốt hơn là ít nhất 95%, và tốt là ít nhất 99% với trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 1, được thể hiện bằng SEQ ID NO. 28, hoặc được thể hiện bằng SEQ ID NO. 29 có thể thuộc phạm vi của sáng chế.

Theo sáng chế, thuật ngữ “tương đồng hoặc đồng nhất” có nghĩa là mức độ kết hợp với hai trình tự axit amin hoặc trình tự bazơ đã nêu và có thể được biểu hiện dưới dạng phần trăm. Ngoài ra, sự tương đồng và giống nhất thường có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Sự tương đồng hoặc đồng nhất của polynucleotit hoặc polypeptit bảo tồn được xác định bằng thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn và hàm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập bởi chương trình đã sử dụng có thể được sử dụng cùng nhau. Về cơ bản, trình tự tương đồng hoặc đồng nhất thông thường có thể được lai trong các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc trung bình theo ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80% hoặc 90% của toàn bộ trình tự hoặc toàn bộ chiều dài. Trong polynucleotit đã lai hóa, polynucleotit bao gồm đơn vị mã hóa thoái biến thay vì đơn vị mã hóa cũng được xem xét.

Bất kỳ hai polynucleotit hoặc polypeptit nào có tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất hay không có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán máy tính đã biết,

chẳng hạn như chương trình “FASTA” sử dụng tham số mặc định, ví dụ, trong Pearson et al. (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444. Ngoài ra, như được thực hiện trong chương trình Needleman của Bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276–277) (phiên bản 5.0.0 hoặc phiên bản tiếp theo), sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman–Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443–453) (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, và [CARILLO ETA/.] (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073). Ví dụ, sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng BLAST hoặc ClustalW của Trung tâm Quốc gia về Cơ sở dữ liệu Thông tin Công nghệ Sinh học.

Sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất của polynucleotit hoặc polypeptit có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự bằng cách sử dụng chương trình máy tính GAP, ví dụ, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48: 443. Tóm lại, chương trình GAP được xác định là giá trị thu được bằng cách chia số lượng các dấu hiệu được căn chỉnh giống nhau (tức là, các nucleotit hoặc axit amin) cho toàn bộ số dấu hiệu trong đoạn ngắn hơn của hai trình tự. Tham số mặc định của chương trình GAP có thể bao gồm (1) ma trận so sánh đơn phân (chứa các giá trị 1 là đồng nhất và 0 là không đồng nhất) và ma trận so sánh có trọng số của Gribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745, như được bộc lộ trong Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353–358 (1979) (ngoài ra, ma trận thay thế của EDNAFULL (phiên bản EMBOSS của NCBI NUC4.4); (2) hàm phạt 3,0 cho từng khoảng trống và hàm phạt bổ sung 0,10 cho từng dấu hiệu trong từng khoảng trống (ngoài ra, hàm phạt mở khoảng trống 10, hàm phạt mở rộng khoảng trống 0,5); và (3) không có hàm phạt cho khoảng trống đầu. Theo đó, thuật ngữ “tương đồng” hoặc “đồng nhất” được sử dụng trong sáng chế thể hiện mức độ liên quan giữa các trình tự.

Theo sáng chế, thuật ngữ “thay thế bảo thủ” có nghĩa là thay thế một axit amin bằng một axit amin khác có cấu trúc và/hoặc tính chất hóa học tương tự. Ví dụ, biến thể có thể có một hoặc nhiều thay thế bảo thủ trong khi vẫn có một hoặc nhiều hoạt tính

sinh học. Sự thay thế axit amin như vậy thường có thể xảy ra dựa trên độ phân cực, điện tích, độ hòa tan và sự giống nhau về tính kỵ nước, ưa nước và/hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc. Ví dụ, các axit amin tích điện dương (có tính bazơ) bao gồm arginin, lysin và histidin; axit amin tích điện âm (có tính axit) bao gồm axit glutamic và axit aspartic; các axit amin thơm bao gồm phenylalanin, tryptophan và tyrosin; và các axit amin kỵ nước bao gồm alanin, valin, isoleuxin, lysin, methionin, phenylalanin, tyrosin và tryptophan.

Ngoài ra, trình tự polynucleotit mã hóa α -glucosidaza có thể là trình tự polynucleotit mã hóa protein có hoạt tính của α -glucosidaza và hoạt tính tăng cường trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* để cải thiện năng suất L-axit amin. Ví dụ, trình tự polynucleotit mã hóa α -glucosidaza có thể là polynucleotit mã hóa α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis* (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 1), α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Erwinia amylovora* (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 28), và α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae* (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 29). Ví dụ, trình tự polynucleotit có thể có trình tự bazơ được thể hiện bằng SEQ ID NO. 2, trình tự bazơ được thể hiện bằng SEQ ID NO. 30, và trình tự bazơ được thể hiện bằng SEQ ID NO. 31, tuy nhiên trình tự bazơ có thể được biến đổi trong vùng mã hóa nhờ sự thoái biến của đơn vị mã hóa. Ngoài ra, các biến đổi khác nhau có thể được thực hiện trong vùng mã hóa trong khoảng mà không thay đổi trình tự axit amin bằng cách xem xét đơn vị mã hóa được ưu tiên trong sinh vật để biểu hiện trình tự bazơ. Trình tự polynucleotit có thể là polynucleotit bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa protein hoặc trình tự polynucleotit có 80%, 90%, 95%, hoặc 99% tương đồng hoặc đồng nhất. Ngoài ra, nếu trình tự polynucleotit là trình tự polynucleotit mã hóa protein có sự tương đồng hoặc đồng nhất và có hiệu quả về cơ bản tương đồng hoặc đồng nhất với protein, rõ ràng là trình tự polynucleotit được xóa, biến đổi, thay đổi, thay thế, hoặc thêm vào một phần thuộc phạm vi của sáng chế.

Ngoài ra, đầu dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ, trình tự mã hóa protein có hoạt tính của α -glucosidaza theo sáng chế bằng cách lai với trình tự bổ sung với toàn bộ hoặc một phần của trình tự polynucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt có thể được bao gồm mà không giới hạn theo sáng chế. “Các điều kiện nghiêm ngặt” có nghĩa là các điều kiện có khả năng lai cụ thể giữa các polynucleotit. Các điều kiện này đã được mô tả cụ thể trong các giáo trình (ví dụ, Sambrook et al., Molecular Cloning, A

Laboratory Manual, tái bản lần hai, ấn phẩm Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Ví dụ, các điều kiện của các gen lai hóa có sự tương đồng cao, tức là các gen có ít nhất 80% tương đồng, cụ thể là ít nhất 90%, tốt hơn là ít nhất 95%, và tốt nhất là ít nhất 97%, và tốt nhất là ít nhất 99% và các gen không lai có sự tương đồng thấp hoặc các điều kiện rửa thông thường của lai Nam, tức là thực hiện rửa mỗi lần, cụ thể hai đến ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1× SSC, 0,1% SDS, tốt hơn là 60°C, 0,1× SSC, 0,1% SDS, và tốt nhất là 68°C, 0,1× SSC, 0,1% SDS có thể được bao gồm. Sự lai hóa đòi hỏi hai polynucleotit chứa trình tự bổ sung, mặc dù tùy thuộc vào mức độ nghiêm ngặt của phép lai, sự không khớp giữa các bazơ là có thể. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ của các polynucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin được bổ sung với thymine, và xytosin được bổ sung với guanin. Do đó, sáng chế cũng có thể bao gồm các đoạn nucleotit được tách chiết bổ sung với toàn bộ trình tự cũng như trình tự nucleotit giống nhau về cơ bản. Cụ thể, các polynucleotit có tương đồng sử dụng điều kiện lai bao gồm bước lai với giá trị T_m ở nhiệt độ 55°C và có thể được xóa bằng cách sử dụng các điều kiện nêu trên. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là nhiệt độ 60°C, 63°C, hoặc 65°C, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây và có thể được kiểm soát thích hợp bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy thuộc vào mục đích sử dụng. Mức độ nghiêm ngặt thích hợp để thực hiện lai các polynucleotit tùy thuộc vào độ dài và mức bổ sung polynucleotit và các biến thể là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (tham khảo Sambrook et al., supra, 9.50–9.51, 11.7–11.80).

Theo sáng chế, thuật ngữ “tăng cường hoạt tính” có nghĩa là hoạt tính được tăng cường khi vi sinh vật gốc được so sánh với hoạt tính của protein ở trạng thái tự nhiên hoặc trạng thái tiền đột biến, tức là, hoạt tính nội sinh và là khái niệm bao gồm việc đưa vào hoạt tính cung cấp hoạt tính của nó bằng cách đưa protein vào vi sinh vật mà không có hoạt tính của protein cụ thể. “Hoạt tính nội sinh” có nghĩa là trạng thái hoạt động của protein được biểu hiện ở trạng thái tự nhiên hoặc trạng thái không đột biến của vi sinh vật ban đầu.

Cụ thể, “tăng cường hoạt tính” không bị giới hạn cụ thể ở đây, mà còn có thể bao gồm tăng cường hoạt tính bằng cách tăng hoạt tính gen nội sinh, khuếch đại gen nội sinh do các yếu tố bên trong hoặc bên ngoài, đưa gen từ bên ngoài vào, thay thế hoặc biến đổi các vùng khởi động, và tăng cường hoạt tính enzym nhờ đột biến cũng như tạo ra

hiệu quả ngoài chức năng ban đầu của nó bằng cách tăng cường hoạt tính của protein tự thân. Ví dụ, “tăng cường hoạt tính” có thể được thực hiện bằng cách tăng số lượng bản sao trong các tế bào của các gen mã hóa protein, phương pháp biến đổi trình tự điều hòa biểu hiện gen mã hóa polypeptit, phương pháp biến đổi các gen mã hóa polypeptit trên nhiễm sắc thể bằng cách thay thế các gen mã hóa polypeptit trên nhiễm sắc thể bằng các gen đột biến để tăng cường hoạt tính của polypeptit hoặc giảm đột biến của các gen trên nhiễm sắc thể mã hóa polypeptit để tăng cường hoạt tính của polypeptit, và phương pháp đưa các gen từ bên ngoài hoặc chèn các gen vào nhiễm sắc thể, các phương pháp này không bị giới hạn ở đây.

Việc tăng số lượng bản sao của các gen không bị giới hạn cụ thể, mà còn có thể được thực hiện để được liên kết hoạt động với vector hoặc được chèn vào nhiễm sắc thể trong tế bào vật chủ. Cụ thể, vector được liên kết hoạt động với polynucleotit mã hóa protein theo sáng chế và được lặp lại và thực hiện chức năng bất kể vật chủ có thể được đưa vào tế bào vật chủ. Ngoài ra, vector được liên kết hoạt động với polynucleotit để chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể trong tế bào vật chủ có thể được đưa vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ. Sự chèn vào nhiễm sắc thể của polynucleotit có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, phương pháp tái tổ hợp tương đồng. Khi vector theo sáng chế có thể được chèn vào nhiễm sắc thể bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng, vector có thể còn bao gồm chất chỉ thị chọn lọc để xác nhận sự chèn nhiễm sắc thể. Chất chỉ thị chọn lọc chọn các tế bào được biến nạp bởi vector để xác nhận sự chèn polynucleotit đích, và các chất chỉ thị có thể được sử dụng để cung cấp các kiểu hình chọn lọc như kháng thuốc, trợ lực, kháng thuốc độc tế bào, hoặc biểu hiện của protein bề mặt, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây. Trong môi trường được xử lý bằng chất chỉ thị, chỉ khi các tế bào biểu hiện chỉ thị chọn lọc tồn tại hoặc đại diện cho các kiểu hình biểu hiện khác nhau, các tế bào đã biến nạp có thể được chọn.

Thuật ngữ “vector” theo sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa peptit đích được liên kết hoạt động với trình tự điều hòa biểu hiện thích hợp để biểu hiện protein đích trong vật chủ thích hợp. Trình tự điều hòa biểu hiện bao gồm vùng khởi động có khả năng bắt đầu phiên mã, bất kỳ trình tự điều khiển nào để điều hòa phiên mã này, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom mRNA thích hợp, và trình tự điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vectơ có thể được biến nạp vào tế bào vật chủ thích hợp, và sau đó có thể được lặp lại hoặc thực hiện chức năng bất kể bộ gen vật chủ hoặc tích hợp vào bộ gen của chính nó. Vectơ được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở đây, và bất kỳ vectơ đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Các ví dụ của các vectơ thông thường được sử dụng có thể bao gồm plasmit, cosmit, virut và thực khuẩn bản địa hoặc tái tổ hợp. Ví dụ, vectơ thể thực khuẩn hoặc vectơ cosmit pWE15, M13, λ MBL3, λ MBL4, λ IXII, λ ASHIII, λ APII, λ t10, λ t11, Charon4A, Charon21A, và tương tự có thể được sử dụng, và đối với vectơ plasmit, các plasmit gốc pDZ, gốc pBR, gốc pUC, gốc pBluescriptII, gốc pGEM, gốc pTZ, gốc pCL, và gốc pET có thể được sử dụng.

Ngoài ra, vectơ có thể bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa peptit tín hiệu. Theo sáng chế, thuật ngữ “peptit tín hiệu” đề cập đến protein trong đó protein đích có thể được tiết ra khỏi các tế bào và có thể được áp dụng để biểu hiện ở trạng thái tích hợp hoặc tách biệt với các gen mã hóa protein đích. Miễn là peptit tín hiệu theo sáng chế có thể được tiết ra khỏi các tế bào trong khi duy trì chức năng của protein đích, các loại peptit không bị giới hạn cụ thể ở đây. Ví dụ, theo sáng chế, CgR0949, NCgl2101, CgR1834, và ST2 (được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 14 đến SEQ ID NO. 17, tương ứng) có thể được sử dụng là các ví dụ của peptit tín hiệu. Ngoài ra, peptit tín hiệu thích hợp đã biết được lựa chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật được sử dụng để biểu hiện tiết α -glucosidaza.

Theo sáng chế, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến việc đưa vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào vật chủ theo cách sao cho protein đã mã hóa bởi polynucleotit được biểu hiện trong tế bào vật chủ. Miễn là polynucleotit đã biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ, tất cả polynucleotit đã biến nạp được bao gồm bất kể polynucleotit đã biến nạp có được chèn và định vị trí trong nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ hoặc định vị trí bên ngoài nhiễm sắc thể hay không. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào dưới dạng bất kỳ miễn là polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ và được biểu hiện. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ dưới dạng catxet biểu hiện, là cấu trúc bộ gen bao gồm tất cả các yếu tố cần thiết để tự biểu hiện. Catxet biểu hiện thông thường có thể bao gồm vùng khởi động được liên kết hoạt động với polynucleotit, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã. Catxet biểu hiện có thể là vectơ biểu hiện tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có

thể còn được đưa vào tế bào vật chủ và được liên kết hoạt động với trình tự cần thiết cho sự biểu hiện trong tế bào vật chủ.

Ngoài ra, thuật ngữ “liên kết hoạt động” có nghĩa là trình tự gen được liên kết hoạt động với trình tự vùng khởi động, khởi động và làm trung gian cho sự phiên mã của polynucleotit mã hóa peptit đích của sáng chế.

Tiếp theo, sự sửa đổi trình tự điều hòa biểu hiện để tăng biểu hiện của polynucleotit không bị giới hạn cụ thể ở đây, mà còn có thể được thực hiện bằng cách giảm đột biến trình tự bằng cách xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ, hoặc kết hợp của chúng đối với trình tự axit nucleic để tăng cường thêm hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện, hoặc có thể được thực hiện bằng cách thay thế bằng trình tự axit nucleic có hoạt động mạnh hơn. Cụ thể, sự sửa đổi có thể được thực hiện bằng cách thay thế bằng trình tự axit có hoạt tính mạnh hơn. Trình tự điều hòa biểu hiện không bị giới hạn cụ thể ở đây, mà còn có thể bao gồm vùng khởi động, trình tự điều khiển, trình tự mã hóa vị trí liên kết ribosom, kết thúc điều chỉnh trình tự của phiên mã và dịch mã, và loại tương tự.

Thay vì vùng khởi động ban đầu, vùng khởi động mạnh có thể được liên kết với phần trên của đơn vị biểu hiện polynucleotit, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Các ví dụ của các vùng khởi động mạnh đã biết có thể bao gồm các vùng khởi động từ cj1 đến cj7 (patent Hàn Quốc số 0620092), vùng khởi động spl1, spl7, hoặc spl13 (patent Hàn Quốc số 1783170), vùng khởi động PgapA, vùng khởi động lac, vùng khởi động trp, vùng khởi động trc, vùng khởi động tac, vùng khởi động PR pha λ, vùng khởi động PL, và vùng khởi động tet.

Ngoài ra, sự sửa đổi của trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể không bị giới hạn cụ thể ở đây, mà còn có thể được thực hiện bằng cách giảm đột biến trên trình tự điều hòa biểu hiện bằng xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ, hoặc kết hợp của chúng đối với trình tự axit nucleic để tăng cường thêm hoạt tính của trình tự polynucleotit, hoặc có thể được thực hiện bằng cách thay thế bằng trình tự polynucleotit được cải thiện có hoạt tính mạnh hơn. Tuy nhiên, trình tự điều hòa biểu hiện không bị giới hạn ở đây.

Trong sự tăng cường hoạt tính của protein, không có hoạt tính của protein tương ứng, hoặc hoạt tính hoặc nồng độ của chúng thông thường có thể tăng đến 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, hoặc 500%, lên đến 1000% hoặc

2000% dựa trên hoạt tính hoặc nồng độ trong protein kiểu đại hoặc chủng vi sinh vật ban đầu, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế có hoạt tính α -glucosidaza tăng cường để cải thiện năng suất L-axit amin như được mô tả nêu trên. Theo đó, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế có thể được sử dụng cho việc sản xuất L-axit amin.

Thuật ngữ “L-axit amin” theo sáng chế có nghĩa là đơn vị cấu thành cơ bản của protein hình thành cơ thể của sinh vật sống trong đó nhóm amin và nhóm cacboxyl được liên kết với cùng nguyên tử cacbon. Ví dụ, L-axit amin có thể là ít nhất một trong số được chọn từ nhóm bao gồm L-alanin, L-arginin, L-asparagin, L-axit aspartic, L-xystein, L-axit glutamic, L-glutamin, glyxin, L-histidin, L-isoleuxin, L-leuxin, L-lysin, L-methionin, L-phenylalanin, L-prolin, L-serin, L-threonin, L-tryptophan, L-tyrosin, và L-valin. Ngoài ra, ví dụ, L-axit amin có thể là L-axit amin có nguồn gốc từ axit aspartic tham gia vào con đường sinh tổng hợp vi sinh vật và có thể là L-axit amin được sinh tổng hợp bằng cách sử dụng L-axit aspartic như chất nền hoặc chất trung gian. L-axit amin có nguồn gốc từ axit aspartic có thể là ít nhất một trong số được chọn từ nhóm bao gồm L-lysin, L-threonin, và L-isoleuxin là ví dụ cụ thể hơn, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Theo sáng chế, “vi sinh vật sản sinh L-axit amin” có thể là vi sinh vật có khả năng sản xuất và tích lũy L-axit amin từ các nguồn cacbon trong môi trường. Loại vi sinh vật sản sinh L-axit amin không bị giới hạn cụ thể, mà còn có thể là các vi sinh vật thuộc chi *Enterobacter*, chi *Escherichia*, chi *Erwinia*, chi *Serratia*, chi *Pseudomonas*, chi *Providencia*, chi *Corynebacterium*, và chi *Brevibacterium*. Cụ thể hơn là, vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*. Cụ thể, “chi *Corynebacterium*” theo sáng chế có thể là *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium efficiens*, và tương tự, nhưng không nhất thiết bị giới hạn ở đây. Cụ thể hơn là, vi sinh vật sản sinh L-axit amin có thể là *Corynebacterium glutamicum*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có hoạt tính α -glucosidaza tăng cường có thể sản sinh L-axit amin với năng suất sản sinh L-axit amin cao hơn vi sinh vật trước

khi hoạt tính của protein được tăng cường, tức là, vi sinh vật không sửa đổi.

Khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-axit amin, bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh L-axit amin có hoạt tính α -glucosidaza tăng cường.

Phương pháp sản xuất L-axit amin có thể còn bao gồm bước thu nhận L-axit amin từ môi trường hoặc vi sinh vật được nuôi cấy.

Vi sinh vật có hoạt tính α -glucosidaza tăng cường và L-axit amin như được mô tả nêu trên.

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

Nguồn cacbon được bao gồm trong môi trường có thể bao gồm đường và các hydrat cacbon chẳng hạn như glucoza, sacaroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza; dầu và chất béo như là dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu thầu dầu, và dầu đậu phộng; các axit béo như là axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic; các rượu như là etanol và glyxerol; và các axit hữu cơ như là axit axetic. Các chất này có thể được sử dụng độc lập hoặc ở dạng hỗn hợp, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Nguồn nitơ chứa trong môi trường có thể bao gồm các nguồn nitơ hữu cơ, chẳng hạn như pepton, dịch chiết nấm men, cao thịt, cao mạch nha, dịch chiết ngô, và bánh đậu nành; và các nguồn nitơ vô cơ chẳng hạn như ure, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat, và các nguồn nitơ này có thể được sử dụng độc lập hoặc ở dạng hỗn hợp. Tuy nhiên, các nguồn nitơ không bị giới hạn ở đây. Nguồn phospho chứa trong môi trường có thể bao gồm kali dihydrogen phosphat hoặc đikali hydrogen phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, trong môi trường có thể bao gồm các muối kim loại chẳng hạn như magie sulfat hoặc sắt sulfat, và có thể bao gồm các axit amin, các vitamin các tiền chất thích

hợp. Môi trường hoặc các tiền chất này có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy theo mẻ hoặc liên tục, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Trong quá trình nuôi cấy, hợp chất như amoniac hydroxit, kali hydroxit, ammoniac, axit phosphoric, và axit sulfuric được bổ sung trong quá trình nuôi cấy theo phương pháp thích hợp để điều chỉnh độ pH của môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy, có thể ngăn tạo bọt bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt như axit béo polyglycol este. Ngoài ra, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bơm vào trong môi trường nuôi cấy để duy trì điều kiện hiếu khí của môi trường nuôi cấy, và khí có thể không được bơm vào, hoặc khí nitơ, hydro hoặc cacbon đioxit có thể được bơm vào để duy trì trạng thái kỵ khí và vi hiếu khí. Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy thông thường có thể là 25°C và 40°C và cụ thể là từ 27°C đến 35°C. Giai đoạn nuôi cấy có thể kéo dài cho đến khi thu được sản phẩm mong muốn của các chất hữu ích, và có thể từ 10 đến 100 giờ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Theo sáng chế, có thể thu nhận và/hoặc tinh chế bổ sung L-axit amin sản sinh trong bước nuôi cấy và thu nhận L-axit amin mong muốn từ môi trường bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo phương pháp nuôi cấy, ví dụ, phương pháp nuôi cấy theo mẻ, liên tục hoặc theo mẻ bổ sung, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây. Ví dụ, các phương pháp ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) có thể được sử dụng, và có thể thu nhận L-axit amin mong muốn từ môi trường hoặc vi sinh vật được nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp tăng sản sinh L-axit amin, bao gồm bước tăng cường hoạt tính α -glucosidaza trong vi sinh vật.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất việc sử dụng α -glucosidaza để tăng sản sinh L-axit amin.

“Tăng sản sinh L-axit amin” có thể có nghĩa là năng suất L-axit amin được tăng lên để sản sinh L-axit amin với năng suất sản xuất L-axit amin cao hơn vi sinh vật trước khi hoạt tính của protein được tăng cường, tức là, vi sinh vật không sửa đổi.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với dựa trên các ví dụ thực hiện. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ là minh họa cho sáng chế, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Điều chế vectơ để đưa vào gen α -glucosidaza

Ví dụ, để xác nhận hiệu quả của gen *agla* của α -glucosidaza, vectơ để chèn gen *agla* có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis* (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 2) vào nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* được điều chế. Để khuếch đại vùng khởi động PgapA có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, vùng khởi động (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 3) được thiết kế để chèn vị trí enzym giới hạn EcoRI và đầu 5' của vùng khởi động PgapA và đoạn mồi (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 4) được thiết kế để chèn vị trí enzym giới hạn NdeI vào đầu 3' đã được tổng hợp. Theo đó, thu được các đoạn ADN vùng khởi động PgapA bao gồm vị trí enzym giới hạn EcoRI ở đầu 5' và vị trí enzym giới hạn NdeI ở đầu 3'. Trong điều kiện PCR, sau khi biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 56°C trong 30 giây, và trùng hợp ở 72°C trong 30 giây trong 30 chu kỳ, và sau đó trùng hợp được thực hiện ở 72°C trong 7 phút.

Đoạn mồi để khuếch đại vùng khởi động PgapA

Mồi xuôi: 5'-TCAGAATTCTTGGGATTACCATTGAAGCC-3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 3)

Mồi ngược: 5'-TCACATATGGTGTCTCCTCTAAAGATTGT-3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 4)

Để khuếch đại ORF của gen *agla* có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis* dựa trên trình tự bazơ được bộc lộ, các đoạn mồi (được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 5 đến SEQ ID NO. 8) được thiết kế để chèn vị trí enzym giới hạn NdeI và peptit tín hiệu để tạo chất tiết protein vào vị trí đơn vị mã hóa ban đầu và vùng khởi động (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 9) được thiết kế sao cho vị trí enzym giới hạn SpeI được chứa ở phía cuối của đơn vị mã hóa kết thúc được tổng hợp.

Ví dụ, peptit tín hiệu là protein giúp enzym *Agla* giải phóng ra bên ngoài các tế bào, và 4 loại peptit tín hiệu (được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 14 đến SEQ ID NO.

17) được chọn và được kiểm tra. Các trình tự đoạn mồi và các trình tự axit amin của peptit tín hiệu như sau (xem Bảng 1).

Bảng 1

Đoạn mồi để khuếch đại <i>aglA</i> ORF	Bao gồm mồi xuôi SP1	5'- TCACATATGcaaataaacgcccagggttcttaaagccaccgcagg acttgccactatcggcgctgccagcatgtttatgccaaggccaacgcccttg agcaACGAATTTCAATCGTTCCA-3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 5)
	Bao gồm mồi xuôi SP2	5'- TCACATATGCATTCAAAGGAAGAGTTAACAGTG CGTAAAGGAATTTCCCGCGTCTCTCGGTAGCG GTTGCTAGTTCAATCGGATTCGGAAGTGTACTG ACAGGCACCGGCATCGCAGCAGCTCAAGACACG AATTTCAATCGTTCCA-3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 6)
	Bao gồm mồi xuôi SP3	5'- TCACATATGCGTAAGTTCCGCAATACTGCAATC GCACTGGTTTCAGCTGCTGCTATCTCCCTCGGTG GAGTTACTGCTGCAACCGCTCAGGAAGCTACGA ATTTCAATCGTTCCA-3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 7)
	Bao gồm mồi xuôi SP4	5'- TCACATATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTG CATCTATGTTTCGTTTTTTCTATTGCTACAAACGC GTACGCTACGAATTTCAATCGTTCCA-3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 8)
	Mồi ngược	5'-TCAACTAGTTCAGAGCTGAATCACGACTC-3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 9)
Đoạn mồi để khuếch đại <i>malL</i> ORF	Bao gồm mồi xuôi SP3	5'- TCACATATGCGTAAGTTCCGCAATACTGCAATC GCACTGGTTTCAGCTGCTGCTATCTCCCTCGGTG GAGTTACTGCTGCAACCGCTCAGGAAGCTTCAG GCATCAAACCTTCTTC-3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 10)
	Mồi ngược	5'-TCAACTAGTTCAATTTAGCCTATAGATAC-3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 11)
Đoạn mồi để khuếch đại <i>Ima1</i> ORF	Bao gồm mồi xuôi SP3	5'- TCACATATGCGTAAGTTCCGCAATACTGCAATC GCACTGGTTTCAGCTGCTGCTATCTCCCTCGGTG GAGTTACTGCTGCAACCGCTCAGGAAGCTACTA TTTCTTCTGCACATCC-3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 12)
	Mồi	5'-TCAACTAGTTCAATTCGCTGATATATATTCTT-3'

		ngược	(được thể hiện bằng SEQ ID NO. 13)
Peptit tín hiệu	SP1	CgR0949	MQINRRGFLKATAGLATIGAASMFMPKANALGA (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 14)
	SP2	NCgl2101	MHSKEELTVRKGISRVLSVAVASSIGFGTVLTGTGI AAAQD (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 15)
	SP3	CgR1834	MRKFRNTAIALVSAAAISLGGVTAATAQEA (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 16)
	SP4	ST2	MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYA (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 17)

Đoạn *aglA* ORF bao gồm vị trí enzym giới hạn *NdeI* và mỗi peptit tín hiệu ở đầu 5' và vị trí enzym giới hạn *SpeI* ở đầu 3' thu được bằng cách sử dụng bộ gen ADN của *Bifidobacterium adolescentis* làm mạch khuôn. Trong điều kiện PCR, sau khi biến tính ở 94°C trong 5 phút, biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 56°C trong 30 giây, và trùng hợp ở 72°C trong 2 phút trong 30 chu kỳ, và sau đó trùng hợp được thực hiện ở 72°C trong 7 phút.

Sau khi bốn sản phẩm khuếch đại PCR được xử lý với các enzym giới hạn được chứa ở cả hai đầu, vector pDZ (patent Hàn Quốc số 10-0924065) được xử lý với các enzym giới hạn *EcoRI* và *Sall* để được liên kết với đoạn ADN thu được để điều chế các vector pDZ-PgapA-SP1-*aglA(B.al)*, pDZ-PgapA-SP2-*aglA(B.al)*, pDZ-PgapA-SP3-*aglA(B.al)*, và pDZ-PgapA-SP4-*aglA(B.al)*.

Ngoài ra, để điều chế vi sinh vật khác có hoạt tính α -glucosidaza tăng cường, các gen α -glucosidaza có nguồn gốc từ chủng sau đây được tăng cường. Cụ thể, các đoạn ORF *malL* và *Ima1* bao gồm vị trí enzym giới hạn *NdeI* và mỗi peptide tín hiệu ở đầu 5' và vị trí enzym giới hạn *SpeI* ở đầu 3' thu được bằng cách sử dụng bộ gen *EAMY_1858 (malL)* của *Erwinia amylovora* CFBP1430 và bộ gen ADN *IMA1* của *Saccharomyces cerevisiae* như các mẫu. Trong điều kiện PCR, sau khi biến tính ở 94°C trong 5 phút, biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 56°C trong 30 giây, và trùng hợp ở 72°C trong 2 phút trong 30 chu kỳ, và sau đó trùng hợp được thực hiện ở 72°C trong 7 phút.

Sau khi hai sản phẩm khuếch đại PCR được xử lý với các enzym giới hạn được chứa ở cả hai đầu, vector pDZ (patent Hàn Quốc số 10-0924065) được xử lý với các enzym giới hạn *EcoRI* và *Sall* được liên kết với các đoạn ADN thu được để điều chế các vector pDZ-PgapA-SP3-*malL(E.am)* và pDZ-PgapA-SP3-*Ima1(S.ce)*.

Ví dụ 2: Điều chế vi sinh vật đưa vào α -glucosidaza

Để đưa gen mã hóa α -glucosidaza cho chủng *Corynebacterium glutamicum*, 6 vector được điều chế trong ví dụ 1 đã được biến nạp vào chủng KCCM11016P sản sinh lysin *glutamicum Corynebacterium* (vi sinh vật được bộc lộ là KFCC10881 và sau đó được ký gửi lại tại Cơ quan đăng ký Quốc tế theo hiệp ước Budapest có số ký gửi số KCCM11016P, trong patent Hàn Quốc số 10-0159812) bằng phương pháp xung điện (Van der Rest et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 52:541–545, 1999) và các khuẩn lạc trong đó từng gen được đưa vào bằng tái tổ hợp nhiễm sắc thể tương đồng đã được sàng lọc. Để sàng lọc các khuẩn lạc bằng phương pháp PCR, các đoạn mồi được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 18 và SEQ ID NO. 19 được sử dụng.

Đoạn mồi để định danh biến nạp gen *aglA*

Mồi xuôi: 5'-GACCATTTATTCGCAACTGTG-3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 18)

Mồi ngược: 5'-TCTGCAAGGCGTTCGGAATT-3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 19)

Các chủng được biến nạp được gọi là KCCM11016P::PgapA-SP1-*aglA*(*B.al*), KCCM11016P::PgapA-SP2-*aglA*(*B.al*), KCCM11016P::PgapA-SP3-*aglA*(*B.al*) KCCM11016P::PgapA-SP4-*aglA*(*B.al*), KCCM11016P::PgapA-SP3-*malL*(*E.am*), và KCCM11016P::PgapA-SP3-*Ima1*(*S.ce*).

Ví dụ 3: Xác nhận biểu hiện protein của vi sinh vật sản sinh lysin đưa vào α -glucosidaza

Chủng mẹ *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm nhóm đối chứng, và 6 loại KCCM11016P::PgapA-SP1-*aglA*(*B.al*), KCCM11016P::PgapA-SP2-*aglA*(*B.al*), KCCM11016P::PgapA-SP3-*aglA*(*B.al*) KCCM11016P::PgapA-SP4-*aglA*(*B.al*), KCCM11016P::PgapA-SP3-*malL*(*E.am*), và KCCM11016P::PgapA-SP3-*Ima1*(*S.ce*) được điều chế trong ví dụ 2 được nuôi cấy bằng phương pháp được minh họa trong ví dụ 4 sau đây và sau đó được ly tâm ở tốc độ cao để thu được chất nổi. Biểu hiện của enzym α -glucosidaza trong môi trường nuôi cấy được đo bằng phương pháp SDS-PAGE sử dụng một phần chất nổi thu được. Theo đó, xác nhận protein được biểu hiện ở vị trí 70 kDa (tham chiếu trên Fig.1).

Ví dụ 4: Đánh giá năng suất L-axit amin của vi sinh vật sản sinh lysin đưa vào α -glucosidaza

Chủng mẹ *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm nhóm đối chứng, và 6 loại KCCM11016P::PgapA-SP1-*aglA*(*B.al*), KCCM11016P::PgapA-SP2-*aglA*(*B.al*), KCCM11016P::PgapA-SP3-*aglA*(*B.al*) KCCM11016P::PgapA-SP4-*aglA*(*B.al*), KCCM11016P::PgapA-SP3-*malL*(*E.am*), và KCCM11016P::PgapA-SP3-*Ima1*(*S.ce*) được điều chế trong ví dụ 2 được nuôi cấy bằng phương pháp dưới đây trong thời gian định trước, và sau đó nồng độ lysin được đo. Các kết quả được minh họa ở bảng 2. Ban đầu, từng chủng được cấy chuyển vào trong bình tam giác 250 mL chứa 25 mL môi trường nuôi cấy giống, và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở 30°C và 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, 1 mL môi trường nuôi cấy giống được cấy chuyển vào trong bình tam giác 250 mL chứa 24 mL của môi trường sản xuất, và được nuôi cấy trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 32°C và 200 vòng/phút trong 72 giờ. Các chế phẩm của môi trường nuôi cấy giống và môi trường sản xuất như sau. Sau khi nuôi cấy được kết thúc, nồng độ của L-lysine được đo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (Waters 2478).

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

20 g glucoza, 10 g pepton, 5 g dịch chiết nấm men, 1,5 g ure, 4 g KH₂PO₄, 8 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 100 µg biotin, 1000 µg thiamin·HCl, 2000 µg canxi pantothenat, và 2000 µg nicotin (trong 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (độ pH 7,0)

100 g glucoza, 40 g (NH₄)₂SO₄, 2,5 g protein đậu nành, 5 g bột ngô ngâm, 3 g ure, 1 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 100 µg biotin, 1000 µg thiamin·HCl, 2000 µg canxi pantothenat, 3000 µg nicotinamit, và 30 g CaCO₃ (trong 1 L nước cất)

Bảng 2

Chủng	Số	Nồng độ lysin (g/L)	Nồng độ lysin trung bình (g/L)
KCCM11016P	1	36,6	36,8
	2	36,4	
	3	37,5	
KCCM11016P::PgapA-SP1- <i>aglA</i> (<i>B.al</i>)	1	40,0	39,1
	2	38,5	

	3	38,9	
KCCM11016P::PgapA-SP2- <i>agLA(B.al)</i>	1	39,0	38,7
	2	38,4	
	3	38,7	
KCCM11016P::PgapA-SP3- <i>agLA(B.al)</i>	1	39,8	40,4
	2	41,9	
	3	39,5	
KCCM11016P::PgapA-SP4- <i>agLA(B.al)</i>	1	39,3	38,8
	2	38,5	
	3	38,6	
KCCM11016P::PgapA-SP3- <i>malL(E.am)</i>	1	38,1	38,4
	2	38,5	
	3	38,6	
KCCM11016P::PgapA-SP3- <i>imal1(S.ce)</i>	1	37,9	38,0
	2	38,1	
	3	38,1	

Từ các kết quả này, có thể thấy rằng tất cả 6 loại chủng sản sinh lysin với sự đưa vào khả năng biểu hiện α -glucosidaza, năng suất lysin được tăng lên so với nhóm đối chứng. Cụ thể, trong KCCM11016P::PgapA-SP3-*agLA(B.al)*, sự tăng năng suất cao nhất được thể hiện. Trong nuôi cấy vi sinh vật, đây là kết quả quan trọng khi năng suất của lysin tăng lên ít nhất 3,2% và lên đến 9,7% nhờ sự điều chỉnh hoạt động của các gen không phải là con đường sinh tổng hợp. Ngoài ra, các hiệu quả của năng suất L-axit amin tăng cường bằng cách tăng hoạt tính của α -glucosidaza theo sáng chế được kiểm tra bằng cách xác nhận năng suất L-axit amin tăng mà không bổ sung isomaltoza và maltoza trong môi trường, dự kiến sẽ được sử dụng làm chất nền bằng α -glucosidaza. Từ các kết quả này, trong trường hợp sử dụng các peptit tín hiệu thích hợp bằng lựa chọn của những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, dự kiến là tỷ lệ tăng cao hơn sẽ được thể hiện.

KCCM11016P::PgapA-SP2-*agLA(B.al)* đã điều chế được định danh là *Corynebacterium glutamicum* CA01-7523 và được ký gửi lại tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) là cơ quan đăng ký Quốc tế theo hiệp ước Budapest với đăng ký số KCCM12228P vào ngày 5/3/2018.

Ví dụ 5: Điều chế chủng CJ3P được đưa vào với α -glucosidaza và phân tích năng

suất lysin

Để xác nhận liệu hiệu quả giống nhau có được thể hiện ngay cả trong chủng *Corynebacterium glutamicum* khác sản sinh L-lysine hay không, PgapA-SP3-*aglA(B.al)* được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* CJ3P (Binder et al. Genome Biology 2012, 13:R40) chủng có năng suất L-lysine theo cách thức tương tự trong ví dụ 2 bằng cách đưa 3 loại biến thể [pyc(P458S), *hom*(V59A), *lysC*(T311I)] vào chủng *glutamicum Corynebacterium* ATCC13032 kiểu dại để điều chế chủng được đưa vào với α -glucosidaza. Chủng được điều chế được định danh là CJ3P::PgapA-SP3-*aglA(B.al)*. Chủng CJ3P là nhóm đối chứng và CJ3P::PgapA-SP3-*aglA(B.al)* được nuôi cấy theo cách thức tương tự như trong ví dụ 4, và năng suất lysine được phân tích và minh họa trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Phân tích năng suất Lysin

Chủng	Số	Nồng độ Lysin (g/L)	Nồng độ Lysin trung bình (g/L)
CJ3P	1	8,0	8,0
	2	7,6	
	3	8,4	
CJ3P::PgapA-SP3- <i>aglA(B.al)</i>	1	8,6	8,7
	2	8,3	
	3	9,1	

Từ kết quả phân tích nồng độ lysine, xác nhận rằng năng suất lysine tăng trong chủng được đưa vào với α -glucosidaza. Ngoài ra, trong nuôi cấy các vi sinh vật, đây là kết quả quan trọng khi năng suất lysine tăng 8,8% do sự điều chỉnh hoạt tính của các gen không phải là con đường sinh tổng hợp. Ngoài ra, trong trường hợp sử dụng các peptit tín hiệu thích hợp bằng chọn lựa của những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, dự kiến là tỷ lệ tăng cao hơn sẽ được thể hiện.

Ví dụ 6: Điều chế chủng sản sinh threonine được đưa vào với α -glucosidaza và phân tích năng suất threonine

Để xác nhận rõ ràng sự thay đổi trong năng suất L-threonine bằng cách đưa vào α -glucosidaza, biến thể được đưa vào gen mã hóa homoserine dehydrogenase sản sinh homoserine, là chất trung gian phổ biến của các con đường sinh tổng hợp L-threonine và L-isoleucine, và được tăng cường. Cụ thể, biến thể *hom*(G378E) đã biết (R. Winkels, S. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 45, 612–620, 1996) được đưa vào chủng CJ3P::

PgapA-SP3-*aglA*(*B.al*) được sử dụng trong ví dụ 5 để điều chế chủng. Ngoài ra, chủng trong đó biến thể *hom*(G378E) được đưa vào đối chứng CJ3P được điều chế. Vector tái tổ hợp để đưa biến thể vào được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp như sau.

Để điều chế vector được đưa vào với *hom*(G378E), trước tiên, các đoạn môi (được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 20 và SEQ ID NO. 21) được tổng hợp trong đó vị trí nhận biết enzym giới hạn XbaI được chèn vào đoạn 5' và đoạn 3' ở các vị trí khoảng 600 bp ngược dòng và xuôi dòng tại các vị trí từ 1131 đến 1134 của gen *hom* bằng cách sử dụng bộ gen ADN được tách chiết từ chủng ATCC13032 *glutamicum Corynebacterium* kiểu dại làm mạch khuôn. Ngoài ra, các đoạn môi (được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 22 và SEQ ID NO. 23) để thay thế trình tự bazơ của gen *hom* được tổng hợp. Plasmid pDZ-*hom*(G378E) được điều chế sao cho các đoạn ADN (từng vị trí 600 bp) nằm ở các đầu 5' và 3' của gen *hom* được liên kết với vector pDZ (patent Hàn Quốc số 10-0924065).

Đoạn môi để chèn vị trí nhận biết XbaI

đoạn 5': 5'- TCCTCTAGACTGGTCGCCTGATGTTCTAC -3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 20)

đoạn 3': 5'- GACTCTAGATTAGTCCCTTTCGAGGCGGA -3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 21)

Đoạn môi để thay thế gen *hom*

5'- GCCAAAACCTCCACGCGATC -3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 22)

5'- ATCGCGTGGAGGTTTTGGCT -3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 23)

Đoạn gen đầu 5' được điều chế thông qua các đoạn môi sử dụng PCR (được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 20 và SEQ ID NO. 22) bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của chủng kiểu dại làm mạch khuôn. Trong điều kiện PCR, sau khi biến tính ở 94°C trong 2 phút, biến tính ở 94°C trong 1 phút, ủ để gắn môi ở 56°C trong 1 phút, và trùng hợp ở 72°C trong 40 giây trong 30 chu kỳ, và sau đó trùng hợp được thực hiện ở 72°C trong 10 phút. Theo cách thức tương tự, đoạn gen ở đầu 3' của gen *hom* được điều chế thông qua các đoạn môi sử dụng PCR (được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 21 và SEQ ID NO. 23). Các đoạn ADN khuếch đại được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế PCR của Tập đoàn Quiagen và sau đó được sử dụng làm các đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, vector pDZ được xử lý với enzym giới hạn XbaI và được làm nóng

ở 65°C trong 20 phút và đoạn ADN chèn đã khuếch đại thông qua PCR được liên kết với nhau bằng cách sử dụng bộ kit nhân dòng môi trường (Infusion Cloning Kit) và sau đó được biến nạp vào *E. coli* DH5 α và được cấy trên môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Các khuẩn lạc được biến nạp bởi vector được chèn với gen đích thông qua các đoạn mồi sử dụng PCR được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 20 và SEQ ID NO. 21 đã được sàng lọc, và sau đó plasmit thu được bằng cách tách chiết plasmit đã biết thông thường để điều chế vector pDZ-hom (G378E) để đưa đột biến thay thế bazơ của hom(G378E) vào nhiễm sắc thể.

Sau đó, vector pDZ-hom(G378E) đã điều chế được đưa vào các chủng CJ3P và CJ3P::*PgapA*-SP3-*aglA*(*B.al*) theo cách thức tương tự như trong ví dụ 2 để thu được các chủng CJ3P::*hom*(G378E) và CJ3P::*PgapA*-SP3-*aglA*(*B.al*)-*hom*(G378E). Hai chủng thu được được nuôi cấy theo cách thức tương tự như trong ví dụ 4, và nồng độ sản phẩm threonin được phân tích và thể hiện trong bảng 4 dưới đây.

Bảng 4: Nồng độ sản phẩm threonin

Chủng	Số	Nồng độ Thr (g/L)	Nồng độ Thr trung bình (g/L)
CJ3P:: <i>hom</i> (G378E)	1	1,1	1,23
	2	1,5	
	3	1,1	
CJ3P:: <i>PgapA</i> -SP3- <i>aglA</i> (<i>B.al</i>)- <i>hom</i> (G378E)	1	1,4	1,60
	2	1,8	
	3	1,6	

Từ kết quả phân tích nồng độ threonin, xác nhận rằng nồng độ threonin tăng trong chủng được đưa vào với α -glucosidaza. Trong nuôi cấy các vi sinh vật, đây là kết quả quan trọng khi năng suất threonin tăng 30% nhờ điều chỉnh hoạt tính của các gen không phải là con đường sinh tổng hợp. Ngoài ra, trong trường hợp sử dụng các peptit tín hiệu thích hợp bằng chọn lựa của những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, dự kiến là tỷ lệ tăng cao hơn sẽ được thể hiện.

Ví dụ 7: Điều chế chủng sản phẩm isoleuxin được đưa vào với α -glucosidaza và phân tích năng suất isoleuxin

Để xác nhận hiệu quả của năng suất L-isoleuxin bằng cách đưa vào α -glucosidaza, biến thể được đưa vào gen mã hóa dehydrataza L-threonin đã biết và được tăng cường. Cụ thể, biến thể *ilvA*(V323A) đã biết (S. Morbach et al., Appl. Environ. Microbiol.,

62(12): 4345–4351, 1996) được đưa vào chủng CJ3P::PgapA-SP3-*aglA(B.al)-hom*(G378E) được sử dụng trong ví dụ 6 để điều chế chủng. Ngoài ra, chủng trong đó biến thể *ilvA*(V323A) được đưa vào đối chủng CJ3P::*hom*(G378E) được điều chế. Vector tái tổ hợp để đưa vào biến thể được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp dưới đây.

Để điều chế vector được đưa vào với *ilvA*(V323A), trước tiên, các đoạn mồi được tổng hợp (được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 24 và SEQ ID NO. 25) trong đó vị trí nhận biết enzym giới hạn XbaI được chèn vào đoạn 5' và đoạn 3' ở các vị trí khoảng 600 bp ngược dòng và xuôi dòng tại các vị trí từ 966 đến 969 của gen *hom* bằng cách sử dụng bộ gen ADN được tách chiết từ chủng kiểu dại ATCC13032 *glutamicum Corynebacterium* làm mạch khuôn. Ngoài ra, các đoạn mồi (được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 26 và SEQ ID NO. 27) để thay thế trình tự bazơ của gen *ilvA* được tổng hợp. Plasmid pDZ-*ilvA*(V323A) được điều chế sao cho các đoạn ADN (từng vị trí 600 bp) nằm ở các đầu 5' và 3' của gen *ilvA* được liên kết với pDZ vector (patent Hàn Quốc số 10-0924065).

Đoạn mồi để chèn vị trí nhận biết XbaI

đoạn 5': 5'- ACGGATCCCAGACTCCAAAGCAAAGCG -3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 24)

đoạn 3': 5'- ACGGATCCAACCAAACTTGCTCACACTC -3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 25)

Đoạn mồi để thay thế gen *ilvA*

5'- ACACCACGGCAGAACCAGGTGCAAAGGACA -3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 26)

5'- CTGGTTCTGCCGTGGTGTGCATCATCTCTG -3' (được thể hiện bằng SEQ ID NO. 27)

Đoạn gen đầu 5' được điều chế thông qua các đoạn mồi sử dụng PCR (được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 24 và SEQ ID NO. 26) bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của chủng kiểu dại làm mạch khuôn. Trong điều kiện PCR, sau khi biến tính ở 94°C trong 2 phút, biến tính ở 94°C trong 1 phút, ủ để gắn mồi ở 56°C trong 1 phút, và trùng hợp ở 72°C trong 40 giây trong 30 chu kỳ, và sau đó trùng hợp được thực hiện ở 72°C trong 10 phút. Theo cách thức tương tự, đoạn gen ở đầu 3' của gen *ilvA* được điều chế thông

qua các đoạn môi sử dụng PCR (được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 25 và SEQ ID NO. 27). Các đoạn ADN khuếch đại được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế của Tập đoàn Quiagen và sau đó được sử dụng làm các đoạn ADN chèn để điều chế vectơ. Trong khi đó, vectơ pDZ được xử lý với enzym giới hạn XbaI và được làm nóng ở 65°C trong 20 phút và đoạn ADN chèn đã khuếch đại thông qua PCR được liên kết với nhau bằng cách sử dụng bộ kit nhân dòng môi trường và sau đó được biến nạp vào *E. coli* DH5 α và được cấy trên môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Các khuẩn lạc được biến nạp bằng vectơ được chèn với gen đích thông qua PCR sử dụng các đoạn môi được thể hiện bằng các SEQ ID NO. 24 và SEQ ID NO. 25 được sàng lọc, và sau đó plasmit thu được bằng phương pháp tách chiết plasmit đã biết thông thường để điều chế vectơ pDZ-*ilvA*(V323A) để đưa đột biến thay thế bazơ của *ilvA*(V323A) vào nhiễm sắc thể.

Sau đó, vectơ pDZ-*ilvA*(V323A) đã điều chế được đưa vào các chủng CJ3P::*hom*(G378E) và CJ3P::PgapA-SP3-*aglA*(*B.al*)-*hom*(G378E) theo cách thức tương tự như trong ví dụ 2 để thu được các chủng CJ3P::*hom*(G378E)-*ilvA*(V323A) and CJ3P::PgapA-SP3-*aglA*(*B.al*)-*hom*(G378E)-*ilvA*(V323A). Hai chủng thu được nuôi cấy theo cách thức tương tự như trong ví dụ 4, và nồng độ sản sinh isoleuxin được phân tích và thể hiện trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5-Nồng độ sản sinh Isoleuxin

Chủng	Số	Nồng độ Ile (g/L)	Nồng độ Ile trung bình (g/L)
CJ3P:: <i>hom</i> (G378E)- <i>ilvA</i> (V323A)	1	0,12	0,10
	2	0,10	
	3	0,09	
CJ3P::PgapA-SP3- <i>aglA</i> (<i>B.al</i>)- <i>hom</i> (G378E)- <i>ilvA</i> (V323A)	1	0,15	0,13
	2	0,11	
	3	0,13	

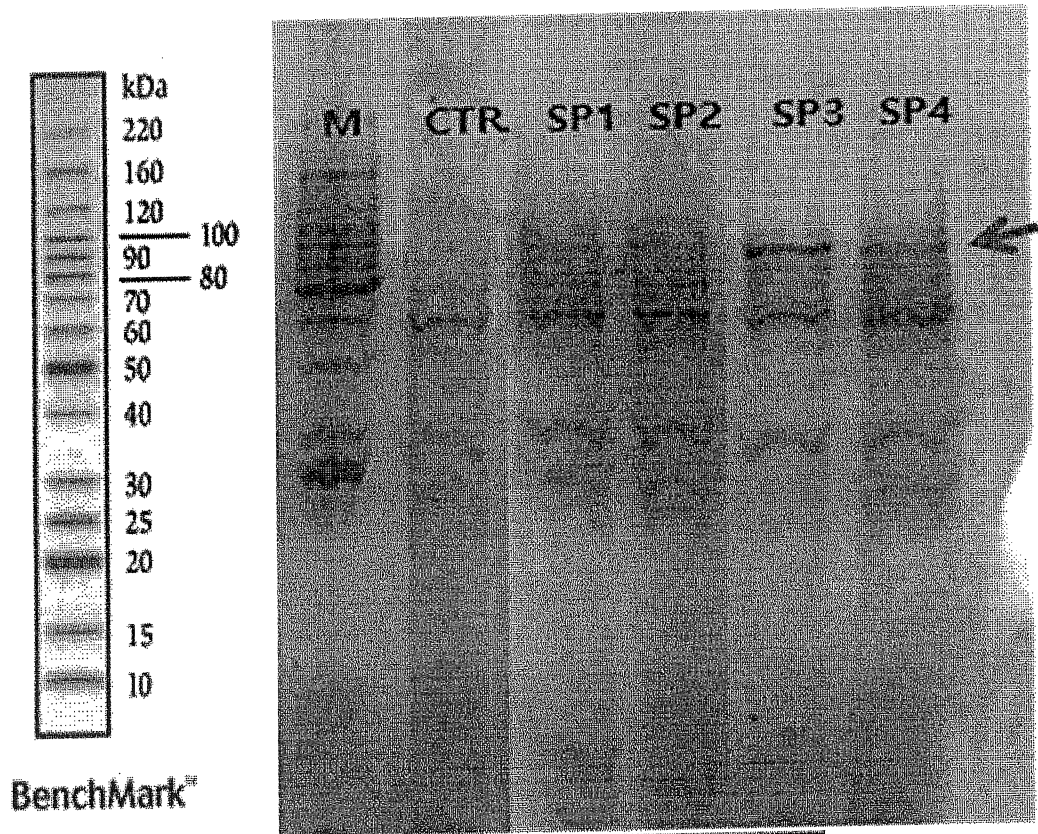
Như được thể hiện trong các kết quả của bảng 5, xác nhận là nồng độ isoleuxin tăng trong chủng được đưa vào với α -glucosidaza. Trong nuôi cấy các vi sinh vật, đây là kết quả quan trọng khi năng suất isoleuxin tăng 30% nhờ sự điều chỉnh hoạt tính của các gen không phải là con đường sinh tổng hợp. Ngoài ra, trong trường hợp sử dụng các peptit tín hiệu thích hợp bằng chọn lựa của những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, dự kiến là tỷ lệ tăng cao hơn sẽ được thể hiện.

Rõ ràng rằng sáng chế được mô tả bên trên có thể được thực hiện các thay đổi dưới các dạng cụ thể khác nhau bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật mà không vượt khỏi nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm của sáng chế. Do đó, các phương án được mô tả nêu trên nhằm minh họa cho sáng chế, và không nhằm giới hạn sáng chế. Phạm vi của sáng chế được thể hiện bằng phân yêu cầu bảo hộ được mô tả dưới đây thay cho phần mô tả chi tiết, và được hiểu rằng ý nghĩa và phạm vi của yêu cầu bảo hộ và tất cả thay đổi hoặc biến đổi tương đương của các phương án thực hiện đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh L-axit amin có hoạt tính tăng cường của α -glucosidaza trong đó α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*, *Erwinia amylovora*, hoặc *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*.
3. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó α -glucosidaza được mã hóa bởi gen *aglA*.
4. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó α -glucosidaza chứa protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 28, hoặc SEQ ID NO. 29.
5. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó L-axit amin là ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm L-lysin, L-threonin, và L-isoleuxin.
6. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.
7. Phương pháp sản xuất L-axit amin, trong đó phương pháp bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh L-axit amin có hoạt tính tăng cường của α -glucosidaza trong môi trường, trong đó α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*, *Erwinia amylovora*, hoặc *Saccharomyces cerevisiae*.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm:
bước thu nhận L-axit amin từ môi trường hoặc vi sinh vật nuôi cấy.
9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó α -glucosidaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*.
10. Phương pháp theo điểm 7, trong đó α -glucosidaza được mã hóa bởi gen *aglA*.
11. Phương pháp theo điểm 7, trong đó α -glucosidaza là protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 28, hoặc SEQ ID NO. 29.
12. Phương pháp theo điểm 7, trong đó L-axit amin là ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm L-lysin, L-threonin, và L-isoleuxin.
13. Phương pháp tăng sản sinh L-axit amin, trong đó phương pháp bao gồm tăng cường biểu hiện của α -glucosidaza trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, trong đó α -

glucosidaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*, *Erwinia amylovora*, hoặc *Saccharomyces cerevisiae*.



M	BenchMark.
CTR.	KCCM11016P
SP1	KCCM11016P::PgapA-SP1-aglA(<i>B.a</i>)
SP2	KCCM11016P::PgapA-SP2-aglA(<i>B.a</i>)
SP3	KCCM11016P::PgapA-SP3-aglA(<i>B.a</i>)
SP4	KCCM11016P::PgapA-SP4-aglA(<i>B.a</i>)

Fig.1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> VI SINH VẬT SẢN SINH L-AXIT AMIN CÓ HOẠT TÍNH α -GLUCOSIDAZA TĂNG CƯỜNG, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-AXIT AMIN, VÀ PHƯƠNG PHÁP TĂNG SẢN SINH L-AXIT AMIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

<130> OPA19088

<150> KR 10-2018-0116540

<151> 2018-09-28

<160> 31

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 606

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> aglA từ Bifidobacterium adolescentis

<400> 1

Met Thr Asn Phe Asn Arg Ser Thr Leu Ser Asp Thr Val Arg Ser Asn
1 5 10 15

Gly Ala Thr Pro Asn Pro Trp Trp Ala Asn Ala Val Val Tyr Gln Ile
20 25 30

Tyr Pro Arg Ser Phe Gln Asp Ser Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu
35 40 45

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

Val Leu Trp Leu Ser Pro Val Phe Lys Ser Pro Gln Asp Asp Asn Gly
65 70 75 80

Tyr Asp Ile Ser Asp Tyr Gln Asp Ile Asp Pro Leu Phe Gly Thr Met
85 90 95

Ala Asp Met Asp Glu Leu Leu Ala Glu Ala His Lys Arg Gly Leu Lys
100 105 110

Val Ile Met Asp Leu Val Val Asn His Thr Ser Asp Glu His Ala Trp
115 120 125

Phe Gln Ala Ser Arg Asp Lys Asn Asp Pro His Ala Asp Trp Tyr Trp
130 135 140

Trp Arg Pro Ala Lys Pro Gly His Glu Pro Gly Thr Pro Gly Ala Glu
145 150 155 160

Pro Asn Gln Trp Gly Ser Tyr Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu Tyr Asp

39453

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

Trp Ile Ser Val Asn Pro Asn His Val Glu Ile Asn Ala Ala Glu Glu
485 490 495

Phe Asp Asp Pro Asp Ser Val Tyr Thr Phe Tyr Lys Lys Leu Ile Ala
500 505 510

Met Arg His Asn Ser Ala Thr Ile Ser Thr Gly Glu Trp His Leu Leu
515 520 525

Ala Ala Asp Ser Asp Gln Val Tyr Ala Phe Thr Arg Thr Asn Gly Asp
530 535 540

Asp Thr Ile Leu Val Val Val Asn Leu Thr Asp Arg Ser Ala Ala Leu
545 550 555 560

Pro Ser Asp Val Ala Glu Leu Leu Ser Asp Gly Val Ser Asp Pro Gln
565 570 575

Val Leu Leu Ser Thr Tyr Asp Ala Met His Ser Val Lys Ser Ile Ala
580 585 590

Arg Gly Glu Leu Ala Arg Trp Glu Gly Val Val Ile Gln Leu
595 600 605

<210> 2

<211> 1821

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> aglA từ *Bifidobacterium adolescentis*

<400> 2

atgacgaatt tcaatcgttc cactctttct gacaccgtcc gttcgaatgg cgccaccccg 60

aatccgtggt gggcgaacgc ggtggtctac cagatctatc cccgttcctt ccaggattcc 120

aatggc gatg gcatcggcga tctgaagggc atcaccagcc ggctcgacta tctcgcagat 180

ctcggcgtgg acgtgctatg gctgtccccg gtcttcaagt ccccgagga cgacaacggc 240

tacgacatct ccgactacca ggacatcgat ccgctgttcg gcacaatggc cgatatggac 300

gagctgcttg ccgaagcgca caagcgcggc ctgaaggtca tcatggacct ggtcgtgaac 360

cacacgtccg acgagcatgc ctggttccag gcttccccgc acaagaacga tcctcatgcg 420

gattggtatt ggtggcgtcc ggccaagccg ggccatgagc cgggcacgcc cggtgccgag 480

ccgaaccagt ggggctccta tttcggcggc tccgcatggg agtacgatcc gaagcgcggt 540

gaatacttct ttcaccagta ttccaagaag cagcccgacc tcaactggga gaatcccgag 600

gtgcgcaagg ccgtctaaa gatgatgaac tgggtgatgg atcgcgcat cgacggcttc 660

cgcattggacg tgatcaccca gatttccaag gtcattcgaca agaacggcaa gttgccgggg 720
 gaggcaggat ccgaaatcgc cgataatccg gttggagagg aaggttattc cagcccgtat 780
 ccgttctgct ccgacggccc gcgcatcgac gagttcctcg ccgaaatgcg ccgtgaggta 840
 ttcgaaggcc gtgaaggcta catgaatgtc ggcgaggctc cgggcatcac cccggcccgt 900
 aacgagcacg tcaccgatcc ggccaacaag gaacttgaca tgctattcct gtttgaccat 960
 gtcggcatcg accaggaagg ctccaagtgg aataccgtgc cgttcgaggc caaaaacctg 1020
 cgcgaccgta tgaccgagca gcaggaggcc gtgaggaagg ccggttgggc cagcctgttc 1080
 ttctgcaatc atgaccagcc gcgctggtc tcccgttggg gcaacgactc cgaccgcat 1140
 tcgctgcaac tgagcgccaa ggcgttcggc atggtgctgc acatgcaccg cggcaccocg 1200
 tacatttacg aaggcgagga actgggtatg accaacgccc acttcaccaa gctggaacaa 1260
 taccgcatc tggaagccct caacggctat cgccagcgcg tggaggaagc caagtgccag 1320
 tcgtccgaat ccatgatggc cgccctcgcc ctcatcggcc gcgacaacgc gcgcaccccc 1380
 atgcagtggg acgcctcaa gtatgccgtt ttacccccg cggacgcggc agccgaaccg 1440
 tggatcagcg tcaaccgaa tcatgtgaa atcaacgcgg ccgaggaatt cgacgatccg 1500
 gattccgtgt acacgttcta caagaagctc atcgccatgc ggcacaacag cgccaccatc 1560
 tccactggcg aatggcatct gctcgccgcc gacagcgcac aggtgtatgc tttcacgcgc 1620
 accaatggcg acgacacgat tcttgcgtg gtcaacctca ccgacaggtc cgcggcgctg 1680
 ccttcggacg tggcggagct gctttccgac ggcgtgtccg atccgcaagt actgctcagc 1740
 acctatgatg ctatgcatag tgtaaatac atcgctcgtg gcgagctcgc tcgctgggag 1800
 ggagtcgtga ttcagctctg a 1821

<210> 3
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PgapA-F

<400> 3 29
 tcagaattct tgggattacc attgaagcc

<210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PgapA-R

<400> 4 29
 tcacatatgg tgtctcctct aaagattgt

<210> 5
 <211> 124
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> aglA ORF SP1-F để khuếch đại

<400> 5 60
 tcacatatgc aaataaacg cggaggcttc ttaaaagcca cgcaggact tgccactatc
 ggcgctgcca gcatgtttat gccaaaggcc aacgcccttg gagcaacgaa tttcaatcgt 120
 tcca 124

<210> 6
 <211> 148
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> aglA ORF SP2-F để khuếch đại

<400> 6 60
 tcacatatgc attcaaagga agagttaaca gtgctgtaaag gaatttcccg cgtcctctcg
 gtagcggttg ctagtccaat cggattcggga actgtactga caggcaccgg catcgcagca 120
 gctcaagaca cgaatttcaa tcgttcca 148

<210> 7
 <211> 115
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> aglA ORF SP3-F để khuếch đại

<400> 7 60
 tcacatatgc gtaagttccg caatactgca atcgactgg tttcagctgc tgctatctcc
 ctcggtggag ttactgctgc aaccgctcag gaagctacga atttcaatcg ttcca 115

<210> 8
 <211> 94
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> aglA ORF SP4-F để khuếch đại

 <400> 8
 tcacatatga aaaagaatat cgcatttcctt cttgcatcta tgttcgTTTT ttctattgct 60
 acaaacgcgt acgctacgaa tttcaatcgt tcca 94

 <210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> aglA ORF-R để khuếch đại

 <400> 9 29
 tcaactagtt cagagctgaa tcacgactc

 <210> 10
 <211> 116
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mall ORF SP3-F để khuếch đại

 <400> 10
 tcacatatgc gtaagttccg caatactgca atcgcactgg tttcagctgc tgctatctcc 60
 ctcggtggag ttactgctgc aaccgctcag gaagcttcag gcatcaaact ttcttc 116

 <210> 11
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mall ORF-R để khuếch đại

 <400> 11 29
 tcaactagtt caatttagcc tatagatac

 <210> 12
 <211> 116

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Ima1 ORF SP3-F để khuếch đại

 <400> 12
 tcacatatgc gtaagttccg caatactgca atcgcaactgg tttcagctgc tgctatctcc 60
 ctcgggtggag ttactgctgc aaccgctcag gaagctacta tttcttctgc acatcc 116

 <210> 13
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Ima1 ORF-R để khuếch đại

 <400> 13
 tcaactagtt cattcgctga tatatattct t 31

 <210> 14
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> SP1 (CgR0949)

 <400> 14
 Met Gln Ile Asn Arg Arg Gly Phe Leu Lys Ala Thr Ala Gly Leu Ala
 1 5 10 15
 Thr Ile Gly Ala Ala Ser Met Phe Met Pro Lys Ala Asn Ala Leu Gly
 20 25 30
 Ala

 <210> 15
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> SP2 (NCgl2101)

 <400> 15
 Met His Ser Lys Glu Glu Leu Thr Val Arg Lys Gly Ile Ser Arg Val
 1 5 10 15

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

Gly Thr Gly Ile Ala Ala Ala Gln Asp
 35 40

<210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SP3 (CgR1834)

<400> 16
 Met Arg Lys Phe Arg Asn Thr Ala Ile Ala Leu Val Ser Ala Ala Ala
 1 5 10 15

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

<210> 17
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SP4 (ST2)

<400> 17
 Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
 1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala
 20

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

<220>
 <223> aglA-F để xác nhận

<400> 18
 gaccatttat tcgcaactgt g

21

<210> 19
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> aglA-R để xác nhận

 <400> 19 20
 tctgcaaggc gttcggatt

 <210> 20
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> XbaI-F để chèn

 <400> 20 29
 tcctctagac tggtcgcctg atggttctac

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

 <220>
 <223> XbaI-R để chèn

 <400> 21 29
 gactctagat tagtcccttt cgaggcgga

 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hom-F để thay thế

 <400> 22 20
 gccaaaacct ccacgcatc

 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hom-R để thay thế

<400>	23		20
		atcgcgtgga ggttttggct	
<210>	24		
<211>	28		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	XbaI-F để chèn (2)		
<400>	24		28
		acggatccca gactccaaag caaaagcg	
<210>	25		
<211>	28		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	XbaI-R để chèn (2)		
<400>	25		28
		acggatccaa ccaaacttgc tcacactc	
<210>	26		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	ilvA-F để thay thế		
<400>	26		30
		acaccacggc agaaccaggt gcaaaggaca	
<210>	27		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	ilvA-R để thay thế		
<400>	27		30
		ctggttctgc cgtggtgtgc atcatctctg	
<210>	28		
<211>	599		

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> aglA từ *Erwinia amylovora*

 <400> 28
 Met Ser Gly Ile Lys Leu Ser Ser Val Met Ala Leu Phe Phe Ala Pro
 1 5 10 15
 Phe Leu Ala Val Ser Ser Gly Gln Val Leu Ala Gly Lys Thr Asp Ile
 20 25 30
 Ala Thr Thr Gln Val Val His Lys Ser Asp Asp Phe Pro Ala Trp Trp
 35 40 45
 Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60
 Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
 65 70 75 80
 Tyr Leu Asn Asn Leu Gly Val Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95
 Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
 100 105 110
 Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ala
 115 120 125
 Glu Met Asn Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn
 130 135 140
 His Thr Ser Asp Gln His Arg Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Ser Lys
 145 150 155 160
 Asp Asn Pro Tyr Arg Glu Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asn Gly
 165 170 175
 Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu
 180 185 190
 Lys Glu Asp His Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
 195 200 205
 Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr
 210 215 220
 Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ala Gly Leu Arg Phe
 225 230 235 240
 Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ala Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Thr
 245 250 255
 Pro Ser Gln Arg Gln Asn Phe Ala Arg Thr Tyr Thr Glu Gly Pro Ser
 260 265 270

Ile His Arg Tyr Ile Lys Glu Met Asn Arg Gln Val Phe Ser His Tyr
 275 280 285
 Asn Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Glu Lys Ser
 290 300
 Ile Asn Tyr Phe Asp Arg Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
 305 310 315 320
 Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asn Val Glu Glu Arg Trp Arg Glu
 325 330 335
 Lys Ala Trp Ser Leu Val Asp Phe Arg Gln Thr Ile Gly Lys Val Asp
 340 345 350
 Arg Ala Ala Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380
 Arg Gln Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Ile Ile Thr Gln Arg
 385 390 395 400
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Phe Lys Thr Ile Ala Asp Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp Gln Asp Tyr Val Ser Ser Gly Arg Val Asp Pro Glu Asp Phe Met
 435 440 445
 Arg Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460
 Trp Asp Glu Ser Ala His Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Phe
 465 470 475 480
 Lys Val Asn Pro Asn Tyr Lys Leu Ile Asn Ala Ser Asp Gln Met Lys
 485 490 495
 Asp Ser Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Arg Leu Arg
 500 505 510
 His Ala Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Glu Tyr Lys Asp Leu Asp Pro
 515 520 525
 Tyr Asn Asp Thr Val Tyr Ala Phe Thr Arg Thr His Gly Asp Lys Arg
 530 535 540
 Tyr Leu Val Val Ile Asn Phe Lys Glu Asn Lys Val Asn Tyr Arg Leu
 545 550 555 560
 Pro Gly Gln Leu Ser Ile Arg Gln Thr Leu Ser Glu Ser Ser Ala Ser
 565 570 575

39453

Gln Arg Val Ala Asp Asn Ala His Glu Leu Leu Leu Gln Pro Trp Gln
 580 585 590

Ser Gly Ile Tyr Arg Leu Asn
 595

<210> 29

<211> 589

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> aglA từ *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 29

Met Thr Ile Ser Ser Ala His Pro Glu Thr Glu Pro Lys Trp Trp Lys
 1 5 10 15

Glu Ala Thr Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Ala Ser Phe Lys Asp Ser Asn
 20 25 30

Asp Asp Gly Trp Gly Asp Met Lys Gly Ile Ala Ser Lys Leu Glu Tyr
 35 40 45

Ile Lys Glu Leu Gly Ala Asp Ala Ile Trp Ile Ser Pro Phe Tyr Asp
 50 55 60

Ser Pro Gln Asp Asp Met Gly Tyr Asp Ile Ala Asn Tyr Glu Lys Val
 65 70 75 80

Trp Pro Thr Tyr Gly Thr Asn Glu Asp Cys Phe Ala Leu Ile Glu Lys
 85 90 95

Thr His Lys Leu Gly Met Lys Phe Ile Thr Asp Leu Val Ile Asn His
 100 105 110

Cys Ser Ser Glu His Glu Trp Phe Lys Glu Ser Arg Ser Ser Lys Thr
 115 120 125

Asn Pro Lys Arg Asp Trp Phe Phe Trp Arg Pro Pro Lys Gly Tyr Asp
 130 135 140

Ala Glu Gly Lys Pro Ile Pro Pro Asn Asn Trp Lys Ser Tyr Phe Gly
 145 150 155 160

Gly Ser Ala Trp Thr Phe Asp Glu Lys Thr Gln Glu Phe Tyr Leu Arg
 165 170 175

Leu Phe Cys Ser Thr Gln Pro Asp Leu Asn Trp Glu Asn Glu Asp Cys
 180 185 190

Arg Lys Ala Ile Tyr Glu Ser Ala Val Gly Tyr Trp Leu Asp His Gly
 195 200 205

Val Asp Gly Phe Arg Ile Asp Val Gly Ser Leu Tyr Ser Lys Val Val
 210 215 220

Gly Leu Pro Asp Ala Pro Val Val Asp Lys Asn Ser Thr Trp Gln Ser
 225 230 235 240

Ser Asp Pro Tyr Thr Leu Asn Gly Pro Arg Ile His Glu Phe His Gln
 245 250 255

Glu Met Asn Gln Phe Ile Arg Asn Arg Val Lys Asp Gly Arg Glu Ile
 260 265 270

Met Thr Val Gly Glu Met Gln His Ala Ser Asp Glu Thr Lys Arg Leu
 275 280 285

Tyr Thr Ser Ala Ser Arg His Glu Leu Ser Glu Leu Phe Asn Phe Ser
 290 295 300

His Thr Asp Val Gly Thr Ser Pro Leu Phe Arg Tyr Asn Leu Val Pro
 305 310 315 320

Phe Glu Leu Lys Asp Trp Lys Ile Ala Leu Ala Glu Leu Phe Arg Tyr
 325 330 335

Ile Asn Gly Thr Asp Cys Trp Ser Thr Ile Tyr Leu Glu Asn His Asp
 340 345 350

Gln Pro Arg Ser Ile Thr Arg Phe Gly Asp Asp Ser Pro Lys Asn Arg
 355 360 365

Val Ile Ser Gly Lys Leu Leu Ser Val Leu Leu Ser Ala Leu Thr Gly
 370 375 380

Thr Leu Tyr Val Tyr Gln Gly Gln Glu Leu Gly Gln Ile Asn Phe Lys
 385 390 395 400

Asn Trp Pro Val Glu Lys Tyr Glu Asp Val Glu Ile Arg Asn Asn Tyr
 405 410 415

Asn Ala Ile Lys Glu Glu His Gly Glu Asn Ser Glu Glu Met Lys Lys
 420 425 430

Phe Leu Glu Ala Ile Ala Leu Ile Ser Arg Asp His Ala Arg Thr Pro
 435 440 445

Met Gln Trp Ser Arg Glu Glu Pro Asn Ala Gly Phe Ser Gly Pro Ser
 450 455 460

Ala Lys Pro Trp Phe Tyr Leu Asn Asp Ser Phe Arg Glu Gly Ile Asn
 465 470 475 480

Val Glu Asp Glu Ile Lys Asp Pro Asn Ser Val Leu Asn Phe Trp Lys
 485 490 495

Glu Ala Leu Lys Phe Arg Lys Ala His Lys Asp Ile Thr Val Tyr Gly
 500 505 510

Tyr Asp Phe Glu Phe Ile Asp Leu Asp Asn Lys Lys Leu Phe Ser Phe
 515 520 525

39453

Thr Lys Lys Tyr Asn Asn Lys Thr Leu Phe Ala Ala Leu Asn Phe Ser
 530 535 540
 Ser Asp Ala Thr Asp Phe Lys Ile Pro Asn Asp Asp Ser Ser Phe Lys
 545 550 555 560
 Leu Glu Phe Gly Asn Tyr Pro Lys Lys Glu Val Asp Ala Ser Ser Arg
 565 570 575
 Thr Leu Lys Pro Trp Glu Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Glu
 580 585

<210> 30
 <211> 1800
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> aglA từ *Erwinia amylovora*

<400> 30
 atgtcaggca tcaaactttc ttcagtcacg gcactcttct tcgccccatt tcttgctggt 60
 agttcaggtc aggtgctcgc aggaaagacg gatatcgcta ccacccaagt ggtgcataag 120
 tccgatgact tcccggcatg gtggaagcaa gcggtgtttt accaggttta tccacgcagc 180
 ttcaaagaca cgaacggtga tggatttggg gacattaagg gaatcatcga gaagctcgat 240
 taccttaaca accttggcgt agatgacgatt tggattaacc cacactacga tagcccaaat 300
 actgacaacg gctacgatat tcgtgattac cgcaagatca tgaaagagta cggaaccatg 360
 gaagatttcg atcgtttgat cgcagaaatg aataagcgtg acatgacgct catgatcgac 420
 atcgttatca accacacttc tgaccagcac cgctggttcg tgcagagcaa gtcgtctaag 480
 gataaccggt atcgcaata ctacttttgg cgcgatggaa agaacggcca accacctaac 540
 aactatccgt ccttcttcgg tggttctgcg tgggaaaaag aggaccattc cgggcagtat 600
 tatctacatt acttcgctaa acaacagcca gacctgaatt gggataacc taaggttcgc 660
 gaagatttgt acgcatgct cccggttctgg ctgcacaaag gcgtcgtggt actgacggtc 720
 gacaccgtag ccacctacgc taagatcccg aacttcctg acctcacgcc ctgcacacga 780
 cagaattttg cccgaactta taccgaaggt cccagtatte atcggtacat caaagaaatg 840
 aacaggcaag tgttttctca ctacaatata gctacagctg gggagatctt cggcgtcccg 900
 ctggaaaagt cgattaacta tttcgaccgt cgacgcaatg aacttaacat tgcatttaca 960
 tttgatctga ttcgtttggg tcgtaatgct gaggaacgct ggcgtgaaaa agcctggtcc 1020
 ctggttgatt ttcgccagac gatcggcaag gtagatcgtg cagccggaaa atacggctgg 1080

aacgcattct ttttgacaa ccacgacaac ccacgagctg tctcccactt cggcgcgatgac 1140
 cggcctcaat ggcgccaggc gtctgcaaag gccctggcca ccttgattat caccagagg 1200
 ggcaccccgt ttatctacca gggctccgag ctgggcatga ctaattacc tttcaagact 1260
 atcgcggatt tcgatgacat tgaagtgaag ggtttttggc aggattatgt gagcagcggg 1320
 cgagttgacc cagaggattt catgcgcaac gttcgtctaa ccagtcgca caactcccgc 1380
 acacccttcc aatgggacga atcggcccat gctggcttca cctccggcac gccctggtt 1440
 aaggtgaacc ctaactataa gctcatcaat gcgtccgatc agatgaagga ttcagattcc 1500
 gttttcaact actaccgcaa actcatccgc cttcgccacg ctattcctgc gttgacctac 1560
 ggggagtata aagatctgga tccatacaat gacaccgtct acgcatttac ccgcaccac 1620
 ggtgacaagc gatacctggt cgtgatcaac tttaaagaga acaaagtcaa ctatcgtttg 1680
 cccggtcagc ttagcattcg ccagactctg tccgagtcac cggcatcca acgtgtagcc 1740
 gacaatgctc acgagttgct cctgcaacca tggcaatccg gtatctatag gctaaattga 1800

<210> 31
 <211> 1770
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> *aglA* từ *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 31
 atgactatth cttctgcaca tccagagaca gaaccaaagt ggtggaaaga ggccacggtc 60
 tatcaaattt acccagcaag tttcaaagac tctaattgacg atggctgggg tgacatgaaa 120
 gggattgcct ccaagctgga gtacatcaaa gagcttgggtg ccgatgccat ttggatctca 180
 ccattctacg actcgccaca agatgatatg ggttacgata ttgccaacta cgaaaaggtc 240
 tggccaacat atggtacgaa tgaagactgc tttgccttga tcgaaaagac acataagctt 300
 ggtatgaaat ttatcaccga cttgggtcatc aatcactggt ccagcgaaca tgaatgggtc 360
 aaagagagca gatcctcgaa gactaatcca aagcgtgact ggttcttctg gagacctcct 420
 aaaggttatg acgccgaagg caagccaatt cctccaaaca attggaaatc ctatthttggt 480
 ggttccgcat ggaccttcga tgaaaagaca caagaattct acttgcgttt gttttgctcc 540
 actcaacctg atthtgaattg ggagaatgaa gactgtagaa aggcaatcta cgaaagtgcc 600
 gttggatact ggttagacca tgggtgtagac ggctthtagaa ttgatgtcgg aagthttgtac 660

tccaaagttg taggtttacc agatgctcct gttgttgaca aaaactcgac ttggcaatcc 720
agtgatccat acacattgaa tggaccacgt attcacgagt tccatcaaga aatgaatcaa 780
ttcatcagaa acagagtgaa ggatggcagg gagattatga cagttggtga aatgcaacat 840
gcctccgacg aaactaagag actttatacg agtgcttcaa gacacgaact tagtgagtta 900
tttaactttt cccacactga tgtggggact tcacctttgt tccgttacaa cttggtccca 960
tttgaactga aggattggaa gattgccctt gctgagctgt tcaggtacat taatggtaca 1020
gattgttggt caacaatcta tctggaaaat cacgaccaac ctcgttcaat tacgagattt 1080
ggtgacgatt ctccaagaa ccgtgttatt tctggtaagt tactctctgt gttgctaagt 1140
gccttgaccg gtactctata tgtgtatcag ggacaagagc ttggccaaat caatttcaag 1200
aactggcctg ttgaaaagta cgaggatgtc gaaatcagaa acaactacaa tgccattaa 1260
gaagagcatg gggaaaactc agaggagatg aaaaagtttt tagaagccat tgcccttatc 1320
tccagggacc atgctagaac acctatgcaa tggctctcgtg aggagccaaa tgctggtttt 1380
tctggtccta gtgctaaacc atggttttac ttgaacgact ctttcagaga aggcattaac 1440
gtcgaagatg aatcaagga tcccaactcg gttttgaact tctggaagga ggccttgaag 1500
tttagaaagg cgcataaaga cttactgtg tacggatacg atttcgagtt tattgattta 1560
gacaataaga agttgtttag cttcaciaag aagtacaaca ataaaacatt gtttgccggct 1620
ttgaacttta gctctgatgc gacagatttc aagattccaa atgatgattc atcgttcaag 1680
ttagagtttg gaaactatcc aaagaaggag gtagatgcct cttccagaac attgaagcca 1740
tgggaaggaa gaatatatat cagcgaatga 1770