



(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



1-0039469

(51)^{2020.01} C12N 9/04; C12N 15/77; C12P 13/08; (13) B
C12P 13/06; C12N 15/52

(21) 1-2021-04268

(22) 10/04/2019

(86) PCT/KR2019/004250 10/04/2019

(87) WO2020/130236 25/06/2020

(30) 10-2018-0167599 21/12/2018 KR

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/10/2021 403

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) KWON, Su Yon (KR); LEE, Kwang Woo (KR); HUH, Lan (KR); KIM, Kyungrim (KR); BAEK, Mina (KR); SON, Seung-ju (KR); LEE, Jaemin (KR).

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

(54) HOMOSERIN DEHYDROGENAZA BIẾN ĐỔI, POLYNUCLEOTIT, VI SINH VẬT, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT, VÀ PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN SẢN XUẤT HOMOSERIN HOẶC L-AXIT AMIN NGUỒN GỐC TỪ HOMOSERIN

(57) Sáng chế đề cập đến homoserin dehydrogenaza biến đổi, polynucleotit, vi sinh vật, phương pháp sản xuất, và phương pháp cải thiện sản xuất homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin sử dụng homoserin dehydrogenaza biến đổi.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến homoserin dehydrogenaza biến đổi, và cụ thể là, đến homoserin dehydrogenaza biến đổi có polypeptit chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza, trong đó sự thay thế axit amin bao gồm thay thế axit amin tại vị trí thứ 407 của trình tự axit amin bằng histidin; polynucleotit mã hóa polypeptit, vi sinh vật chứa polypeptit, và phương pháp sản xuất homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin sử dụng homoserin dehydrogenaza biến đổi, và phương pháp cải thiện sản xuất homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin sử dụng homoserin dehydrogenaza biến đổi.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong số các L-axit amin, L-threonin, L-isoleuxin, và L-metionin thường sử dụng homoserin được sản xuất bởi homoserin dehydrogenaza (sau đây gọi là “Hom”; EC:1.1.1.3) từ aspartat-semialdehyt (sau đây gọi là “ASA”). Do đó, để sản xuất các axit amin bằng phương pháp lên men, điều cần thiết là phải duy trì các hoạt tính của các enzym được sử dụng trong con đường sinh tổng hợp ở mức độ nhất định hoặc cao hơn, nghiên cứu chuyên sâu được thực hiện trên đó.

Cụ thể, hoạt tính của homoserin dehydrogenaza hoạt động tại điểm phân nhánh của các con đường sinh tổng hợp của L-lysin và L-threonin đã biết được điều hòa bởi L-threonin và L-isoleuxin. Hiện nay, các báo cáo về Hom giải miễn cảm với ức chế ngược bởi L-threonin và phương pháp sản xuất L-threonin bằng cách sử dụng Hom giải miễn cảm. Năm 1991, Eikmann *et al.* ở Đức đã báo cáo Hom được giải miễn cảm bằng cách thay thế glyxin, là gốc axit amin ở vị trí 378 của Hom bằng glutamat (Eikmanns BJ *et al.*, Appl. Microbial Biotechnol. 34: 617–622, 1991); và trong năm 1991, Archer *et al.* đã báo cáo rằng sự giải miễn cảm xảy ra khi đầu C (C-terminus) của Hom bị hư hỏng do đột biến dịch khung (Archer JA *et al.*, Gen 107: 53–59, 1991).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả đã tiến hành nghiên cứu sự giải miễn cảm với ức chế ngược bởi threonin,

và kết quả là, họ đã phân lập được gen mới mã hóa Hom biến đổi và xác nhận rằng khả năng sản sinh L-axit amin được cải thiện trong vi sinh vật mà trong đó gen mới được chuyển nạp, từ đó hoàn thành sáng chế.

Mục đích của sáng chế là đề xuất homoserin dehydrogenaza biến đổi, trong đó trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza, axit amin tại vị trí thứ 407 của trình tự axit amin được thay thế bằng histidin.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa dehydrogenaza biến đổi.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa homoserin dehydrogenaza biến đổi.

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

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp để tăng sản xuất homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin trong vi sinh vật, phương pháp bao gồm tăng cường hoạt tính của homoserin dehydrogenaza biến đổi.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất sử dụng homoserin dehydrogenaza biến đổi để cải thiện sản xuất homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Homoserin dehydrogenaza biến đổi của sáng chế có thể được sử dụng rộng rãi để sản xuất hàng loạt một cách hiệu quả homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin do ức chế ngược bởi sản phẩm cuối cùng được giải miễn cảm so với chủng tự nhiên hoặc chủng hoang dại.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Trong khi đó, mỗi phương án minh họa và ví dụ được bộc lộ trong đó có thể được sử dụng với các phương án minh họa và ví dụ khác. Tức là, tất cả các kết hợp của các yếu tố được bộc lộ đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi mô tả cụ thể được cung cấp dưới đây.

Để đạt được các mục đích bên trên, khía cạnh của sáng chế đề xuất homoserin dehydrogenaza biến đổi có polypeptit chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza, trong đó sự thay thế axit amin bao gồm sự thay thế axit amin tại vị trí thứ 407 của trình tự axit amin bằng axit amin khác.

Cụ thể là, sáng chế đề xuất homoserin dehydrogenaza biến đổi có polypeptit bao gồm một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza, trong đó sự thay thế axit amin bao gồm sự thay thế axit amin tại vị trí thứ 407 của trình tự axit amin bằng histidin. Cụ thể hơn là, sáng chế đề xuất homoserin dehydrogenaza biến đổi, trong đó axit amin tại vị trí thứ 407 của trình tự axit amin SEQ ID NO. 1 được thay thế bằng histidin.

Theo sáng chế, homoserin dehydrogenaza (EC:1.1.1.3) đề cập đến enzym để xúc tác sự tổng hợp homoserin, là chất trung gian phổ biến để sinh tổng hợp metionin, threonin, và isoleuxin trong thực vật và vi sinh vật. Theo sáng chế, homoserin dehydrogenaza có thể bao gồm không loại trừ nguồn gốc của chúng miễn là chúng có hoạt tính chuyển đổi nêu trên, và enzym có nguồn gốc từ bất kỳ sinh vật nào (thực vật, vi sinh vật, v.v.) có thể được sử dụng làm homoserin dehydrogenaza. Cụ thể là homoserin dehydrogenaza có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, và cụ thể hơn là có thể nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*. Ví dụ, homoserin dehydrogenaza có thể là protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO. 1. Protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO. 1 có thể được sử dụng thay thế bằng thuật ngữ “protein có trình tự axit amin SEQ ID NO. 1” hoặc “protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO. 1”.

Theo sáng chế, các phương pháp khác đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng làm phương pháp để thu được homoserin dehydrogenaza. Ví dụ các phương pháp này có thể bao gồm các kỹ thuật tổng hợp gen bao gồm tối ưu hóa các codon để thu được các protein hiệu quả cao trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, được sử dụng rộng rãi để biểu hiện các protein, và các phương pháp để sàng lọc các nguồn enzym hữu ích sử dụng các phương pháp tin sinh học dựa trên thông tin phân tích ADN đa hệ gen của các vi sinh vật, nhưng các phương pháp không giới hạn tại đây.

Theo sáng chế, protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza không loại trừ đột

biến có thể xảy ra do thêm trình tự vô nghĩa ngược dòng (upstream) hoặc xuôi dòng (downstream) của các trình tự axit amin của protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza (ví dụ, trình tự axit amin SEQ ID NO. 1), hoặc đột biến xảy ra tự nhiên, hoặc đột biến cảm tại đó. Ngoài ra, do protein có hoạt tính giống hoặc tương ứng với protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO. 1, protein cũng tương ứng với protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza của sáng chế. Như ví dụ cụ thể, protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza của sáng chế có thể là protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO. 1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng tối thiểu là 80%, tối thiểu là 90%, tối thiểu là 90%, hoặc tối thiểu là 97%.

Ngoài ra, mặc dù được mô tả là “protein hoặc polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO cụ thể” theo sáng chế, rõ ràng là bất kỳ protein có trình tự axit amin bị xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm một phần của trình tự cũng có thể thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế miễn là protein có trình tự với bất kỳ độ tương đồng nêu trên và thể hiện hiệu quả tương ứng với protein nêu trên. Ví dụ, theo sáng chế, protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza có thể là homoserin dehydrogenaza nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*. Cụ thể hơn là, protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza có thể là trình tự axit amin (SEQ ID NO. 1) của homoserin dehydrogenaza nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, trình tự axit amin (SEQ ID NO. 40) của homoserin dehydrogenaza nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067, hoặc trình tự axit amin (SEQ ID NO. 41) của homoserin dehydrogenaza nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869. Do homoserin dehydrogenaza có các trình tự nêu trên thể hiện độ tương đồng tối thiểu 80%, tối thiểu 90%, tối thiểu 95%, hoặc tối thiểu 97% hoặc tương đồng với nhau, và do các homoserin dehydrogenaza này thể hiện các hiệu quả tương ứng với các hiệu quả của homoserin dehydrogenaza, rõ ràng là chúng được bao gồm trong protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza của sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương đồng” đề cập đến phần trăm giống nhau giữa hai polynucleotit hoặc các nửa polypeptit. Tương đồng đề cập đến mức độ phù hợp với trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit đã cho, và có thể được thể hiện dưới dạng phần trăm. Theo sáng chế, trình tự tương đồng có hoạt tính giống nhau hoặc tương tự với trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit được thể hiện dưới dạng “% tương đồng”. Tương đồng giữa các trình tự từ một nửa với trình tự khác có thể được xác định bởi các

kỹ thuật đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, tương đồng có thể được xác định sử dụng phần mềm tiêu chuẩn (tức là, BLAST 2.0) để tính các thông số (ví dụ, số điểm, đồng nhất, và tương tự) hoặc so sánh các trình tự thông qua các thí nghiệm lai hóa Southern. Các điều kiện lai hóa phù hợp cần xác định có thể được xác định bởi phương pháp đã biết với người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (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 ở đây, thuật ngữ “sự biến đổi”, “được biến đổi”, hoặc “biến thể” đề cập đến nuôi cấy hoặc cá thể thể hiện sự thay thế di truyền hoặc không di truyền trong một kiểu hình ổn định. Cụ thể là, các thuật ngữ có thể đề cập đến biến thể trong đó hoạt tính của biến thể được cải thiện đáng kể do một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin tương ứng với protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza được sửa đổi so với hoạt tính của chủng hoang dại, chủng nguyên thể, hoặc chủng không sửa đổi; biến thể trong đó ức chế ngược bởi isoleuxin, threonin, hoặc các đồng phân hoặc dẫn xuất của chúng được giải phóng; hoặc biến thể trong đó sự cải thiện trong hoạt tính và giải phóng ức chế ngược đều được đạt được.

Theo sáng chế, thuật ngữ “homoserin dehydrogenaza biến đổi” có thể được sử dụng thay thế bằng “biến thể homoserin dehydrogenaza”. Trong khi đó, các biến thể này có thể không tự nhiên xảy ra.

Cụ thể là, homoserin dehydrogenaza biến đổi của sáng chế có thể là protein được biến đổi có polypeptit chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong trình tự axit amin của protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza, trong đó sự thay thế axit amin bao gồm sự thay thế axit amin tại vị trí thứ 407 của trình tự axit amin bằng histidin. Trình tự axit amin của protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza được mô tả bên trên, và có thể, ví dụ là trình tự axit amin SEQ ID NO. 1. Ngoài ra, “axit amin tại vị trí thứ 407” có thể là axit amin tại vị trí tương ứng với axit amin thứ 407 từ đầu N của trình tự axit amin SEQ ID NO. 1, và cụ thể là, có thể đề cập đến axit amin thứ 407 từ đầu N (N-terminus) của trình tự axit amin SEQ ID NO. 1. Axit amin tại vị trí thứ 407 có thể là axit amin trong đó arginin được thay thế bằng histidin. Cụ thể hơn là, homoserin dehydrogenaza biến đổi của sáng chế có thể là protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO. 8. Ngoài ra, protein không ngoại trừ đột biến xảy ra do sự bổ sung trình tự vô nghĩa ngược dòng

(upstream) hoặc xuôi dòng (downstream) của trình tự axit amin, đột biến xảy ra tự nhiên, hoặc đột biến cam tại đó, và bất kỳ protein có hoạt tính tương đồng hoặc tương ứng với hoạt tính homoserin dehydrogenaza biến đổi tương ứng với protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza biến đổi của sáng chế. Như ví dụ cụ thể, homoserin dehydrogenaza biến đổi của sáng chế có thể là protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO. 8, hoặc protein chứa trình tự axit amin có sự tương đồng với trình tự axit amin nêu trên tối thiểu 80%, tối thiểu 90%, tối thiểu 95%, hoặc tối thiểu 97% trong khi axit amin thứ 407 từ đầu N của trình tự axit amin SEQ ID NO. 1 được cố định.

Ngoài ra, không giống với protein chủng hoang dại hoặc nguyên thể, hoặc protein không sửa đổi có hoạt tính homoserin dehydrogenaza, homoserin dehydrogenaza biến đổi của sáng chế có thể là một trong đó ức chế ngược bởi sản phẩm cuối cùng (tức là, isoleuxin, threonin, metionin, homoserin, hoặc dẫn xuất hoặc đồng phân của chúng) được giải phóng hoặc giải miễn cảm. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ức chế ngược” nghĩa là sản phẩm cuối cùng của chuyển hóa ngăn chặn phản ứng ở giai đoạn sớm. Do đó, khi ức chế ngược của homoserin dehydrogenaza được giải phóng hoặc giải miễn cảm, năng suất của homoserin và năng suất của L-axit amin nguồn gốc homoserin có thể được cải thiện so với khi ức chế ngược không được giải phóng hoặc giải miễn cảm.

L-axit amin nguồn gốc homoserin đề cập đến L-axit amin có thể được sinh tổng hợp sử dụng L-homoserin làm tiền chất, và không bị giới hạn miễn là chúng là nguyên liệu có thể sinh tổng hợp từ L-homoserin. L-axit amin nguồn gốc homoserin có thể bao gồm không chỉ L-axit amin nguồn gốc homoserin mà còn bao gồm dẫn xuất của chúng. Ví dụ, L-axit amin nguồn gốc homoserin có thể là L-threonin, L-isoleuxin, *O*-axetyl-L-homoserin, *O*-sucxinyl-L-homoserin, *O*-phospho-L-homoserin, L-metionin, và/hoặc glyxin, nhưng L-axit amin nguồn gốc homoserin không bị giới hạn tại đây. Cụ thể là, L-axit amin nguồn gốc homoserin có thể là L-threonin, L-isoleuxin, *O*-axetyl-L-homoserin, *O*-sucxinyl-L-homoserin, và/hoặc L-metionin, nhưng L-axit amin nguồn gốc homoserin không bị giới hạn tại đây.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa homoserin dehydrogenaza biến đổi.

Homoserin dehydrogenaza và biến thể (homoserin dehydrogenaza biến đổi) như mô tả bên trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit” đề cập đến polyme nucleotit bao gồm các monome nucleotit được liên kết đồng hóa trị trong chuỗi dài (ví dụ, các sợi ADN hoặc ARN có độ dài xác định hoặc dài hơn), và cụ thể là, chúng đề cập đến đoạn polynucleotit mã hóa homoserin dehydrogenaza biến đổi. Polynucleotit mã hóa protein được sửa đổi của sáng chế có thể được bao gồm không hạn chế miễn là chúng có trình tự polynucleotit mã hóa protein được sửa đổi có hoạt tính homoserin dehydrogenaza của sáng chế.

Theo sáng chế, polynucleotit mã hóa trình tự axit amin biến thể homoserin dehydrogenaza có thể nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, và cụ thể hơn là nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*. Tuy nhiên, vi sinh vật không bị giới hạn tại đây.

Ngoài ra, do codon thoái hóa hoặc khi xét đến các codon được ưu tiên trong sinh vật trong đó protein cần được biểu hiện, các sửa đổi khác nhau có thể được thực hiện trong vùng mã hóa mà không thay đổi trình tự axit amin của protein. Cụ thể là, polynucleotit có thể là polynucleotit bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa protein hoặc trình tự polynucleotit có tương đồng với trình tự polynucleotit bên trên tối thiểu 80%, tối thiểu 90%, tối thiểu 95%, hoặc tối thiểu 97%. Ngoài ra, rõ ràng là trình tự polynucleotit có xóa, sửa đổi, thay thế hoặc bổ sung một phần trình tự có thể cũng thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế miễn là trình tự polynucleotit mã hóa protein có độ tương đồng nêu trên và biểu hiện hiệu quả về cơ bản giống hoặc tương đồng với protein bên trên. Polynucleotit mã hóa protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza của sáng chế có thể là trình tự polynucleotit mã hóa trình tự axit amin SEQ ID NO. 1. Ví dụ, polynucleotit có thể là trình tự polynucleotit SEQ ID NO. 2, nhưng sáng chế không bị giới hạn tại đây. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa homoserin dehydrogenaza biến đổi của sáng chế có thể là trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong trình tự axit amin SEQ ID NO. 1, và cụ thể là, có thể là trình tự polynucleotit mã hóa SEQ ID NO. 8. Ví dụ, polynucleotit có thể là trình tự polynucleotit SEQ ID NO. 7, nhưng sáng chế không bị giới hạn tại đây.

Ngoài ra, mẫu dò có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết, ví dụ bất kỳ trình tự mà lai với trình tự bổ sung với toàn bộ hoặc một phần trình tự polynucleotit trong các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza của sáng chế, cũng có thể bao gồm không giới hạn. “Các điều kiện nghiêm ngặt” nghĩa là

các điều kiện cho phép lai cụ thể giữa các polynucleotit. Các điều kiện này được mô tả cụ thể trong tài liệu tham khảo (ví dụ J. Sambrook *et al.*, *supra*). Các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm, ví dụ, các điều kiện trong đó các gen có độ tương đồng cao, tối thiểu 80%, tốt hơn là tương đồng tối thiểu 90%, tốt hơn nữa là tương đồng tối thiểu 95%, tốt hơn nữa là tương đồng tối thiểu 97%, tốt nhất là tương đồng tối thiểu 99% được lai với nhau và các gen có độ tương đồng thấp hơn độ tương đồng nêu trên không được lai với nhau, hoặc các điều kiện rửa thông thường của phép lai Southern (tức là, rửa một lần, tốt hơn là, rửa hai hoặc ba lần tại nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfat: SDS), tốt hơn là, 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS, và tốt hơn nữa là 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS). Phép lai yêu cầu hai polynucleotit chứa các trình tự bổ sung, mặc dù không khớp có thể xảy ra phụ thuộc độ nghiêm ngặt của phép lai. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ nucleotit có thể lai với nhau. Ví dụ, với ADN, adenosin bổ sung với thymin và xytosin bổ sung với guanin. Do đó, sáng chế có thể cũng bao gồm đoạn nucleotit đã phân lập bổ sung với toàn bộ trình tự cũng như trình tự tương đồng giống nhau tại đó. Cụ thể là, polynucleotit có tương đồng có thể được phát hiện sử dụng các điều kiện lai hóa bao gồm bước lai hóa tại giá trị T_m là 55°C trong các điều kiện đã mô tả bên trên. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là 60°C, 63°C, hoặc 65°C, nhưng giá trị T_m không bị giới hạn tại đây, và có thể được điều chỉnh phù hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật dựa trên mục đích của phép lai. Độ nghiêm ngặt phù hợp để lai các polynucleotit phụ thuộc và độ dài của các polynucleotit và mức độ bổ sung, và các biến thể này đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (tham khảo Sambrook *et al.*, *supra*, 9.50–9.51, 11.7–11.8).

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vi sinh vật có homoserin dehydrogenaza biến đổi. Cụ thể là, sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin, bao gồm homoserin dehydrogenaza biến đổi.

Homoserin dehydrogenaza và biến thể được mô tả bên trên.

Cụ thể là, vi sinh vật có homoserin dehydrogenaza biến đổi của sáng chế đề cập đến vi sinh vật có sẵn khả năng sản xuất homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin, hoặc vi sinh vật có khả năng sản xuất homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin được truyền từ chủng bố mẹ của chúng thiếu hụt khả năng sản xuất homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin. Cụ thể là, vi sinh vật bao gồm

homoserin dehydrogenaza có thể là vi sinh vật có khả năng biểu hiện homoserin dehydrogenaza biến đổi, trong đó axit amin tại vị trí thứ 407 của trình tự axit amin SEQ ID NO. 1 được thay thế bằng histidin, nhưng vi sinh vật không bị giới hạn tại đây. Vi sinh vật có thể là tế bào hoặc vi sinh vật có chứa polynucleotit mã hóa homoserin dehydrogenaza biến đổi hoặc có khả năng biểu hiện polypeptit đã biến đổi bằng cách biến nạp với vectơ có chứa polynucleotit mã hóa homoserin dehydrogenaza biến đổi. Với các mục đích của sáng chế, tế bào chủ hoặc vi sinh vật có thể là bất kỳ vi sinh vật có khả năng sản sinh homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin, có chứa polypeptit đã sửa đổi.

Vi sinh vật bao gồm homoserin dehydrogenaza biến đổi của sáng chế cải thiện khả năng sản sinh homoserin và L-axit amin nguồn gốc homoserin so với chủng hoang dại hoặc vi sinh vật có chứa protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza không biến đổi. Theo đó, có thể thu được homoserin và L-axit amin nguồn gốc homoserin với năng suất cao từ vi sinh vật có chứa homoserin dehydrogenaza biến đổi của sáng chế.

Theo sáng chế, loài vi sinh vật có chứa homoserin dehydrogenaza biến đổi không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là vi sinh vật thuộc chi *Enterobacter*, vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, vi sinh vật thuộc chi *Erwinia*, vi sinh vật thuộc chi *Serratia*, vi sinh vật thuộc chi *Pseudomonas*, vi sinh vật thuộc chi *Providencia*, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, hoặc vi sinh vật thuộc chi *Brevibacterium*. Cụ thể hơn là, vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Theo sáng chế, “vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*” có thể cụ thể là *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium thermoamingenes*, *Corynebacterium efficiens*, v.v., nhưng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* không bị giới hạn tại đây. Cụ thể hơn là, theo sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium glutamicum*.

Trong khi đó, vi sinh vật bao gồm homoserin dehydrogenaza biến đổi có thể là vi sinh vật trong đó được đưa vào vectơ có chứa polynucleotit mã hóa biến thể homoserin dehydrogenaza. Cụ thể là, việc đưa vào có thể được thực hiện bằng biến nạp, nhưng phương pháp đưa vào không bị giới hạn tại đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vectơ” đề cập đến cấu trúc ADN có chứa trình

tự nucleotit của polynucleotit mã hóa protein đích, trong đó protein đích được liên kết hoạt động với trình tự điều khiển phù hợp sao cho protein đích có thể được biểu hiện trong tế bào chủ thích hợp. Trình tự điều khiển có thể bao gồm promoter có khả năng khởi đầu phiên mã, bất kỳ trình tự operator để điều khiển phiên mã, trình tự mã hóa vùng liên kết mRNA ribosom thích hợp, và trình tự điều khiển kết thúc phiên mã và dịch mã. Vector, sau khi biến nạp vào tế bào chủ phù hợp, có thể được sao chép hoặc chức năng không tương ứng của hệ gen vật chủ, hoặc có thể được tích hợp – chèn vào chính hệ gen vật chủ.

Vector được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, miễn là chúng có thể sao chép trong tế bào chủ, và bất kỳ vector đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Các ví dụ về các vector thông thường có thể bao gồm plasmid, cosmid, virus, và bacteriophage tự nhiên hay tái tổ hợp. Ví dụ, pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, v.v. có thể được sử dụng là vector phage hoặc vector cosmid; và tuýp pBR, tuýp pUC, tuýp pBluescriptII, tuýp pGEM, tuýp pTZ, tuýp pCL, tuýp pET, v.v. có thể được sử dụng như vector plasmid. Cụ thể là, các vector pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, v.v. có thể được sử dụng nhưng vector không bị giới hạn tại đây.

Vector có thể sử dụng được theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và bất kỳ vector biểu hiện đã biết có thể được sử dụng. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa protein đích có thể được chèn vào nhiễm sắc thể thông qua vector để chèn vào nhiễm sắc thể. Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, tái tổ hợp tương đồng), nhưng phương pháp không bị giới hạn ở đây. Vector có thể còn bao gồm chỉ thị chọn lọc để xác nhận việc chèn của polynucleotit vào nhiễm sắc thể. Chỉ thị chọn lọc để sàng lọc các tế bào được biến nạp với vector, tức là, để xác nhận xem phân tử polynucleotit có được chèn vào hay không. Các chỉ thị cung cấp các kiểu hình có thể chọn lọc (ví dụ, kháng thuốc, tự dưỡng, kháng với các tác nhân gây độc tế bào, hoặc việc biểu hiện của các protein bề mặt) có thể được sử dụng. Trong môi trường được xử lý với tác nhân chọn lọc, chỉ các tế bào biểu hiện các chỉ thị chọn lọc có thể sống sót, hoặc các tế bào có thể thể hiện các kiểu hình khác nhau, và do đó các tế bào đã biến nạp có thể được chọn lọc qua phương pháp này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến việc đưa vector có chứa polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào chủ theo con đường này có protein được

mã hóa bởi polynucleotit được biểu hiện trong tế bào chủ. Miễn là polynucleotit đã được biến nạp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ, không quan trọng là polynucleotit đã được biến nạp được tích hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và nằm trong đó hoặc nằm bên ngoài nhiễm sắc thể. Ngoài ra, polynucleotit chứa ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được đưa vào theo dạng bất kỳ, miễn là chúng có thể được đưa vào tế bào chủ và được biểu hiện trong đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ dưới dạng catxet biểu hiện, là cấu trúc gen có chứa tất cả các yếu tố cần thiết để chúng tự biểu hiện. Catxet biểu hiện có thể bao gồm promotơ liên kết hoạt động với polynucleotit, điểm kết thúc phiên mã, vị trí bám ribosom, hoặc tín hiệu bắt đầu dịch mã. Catxet biểu hiện có thể là dạng vectơ biểu hiện có khả năng tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ như vậy và liên kết hoạt động với các trình tự cần thiết để biểu hiện trong tế bào chủ, nhưng phương pháp đưa vào của polynucleotit không bị giới hạn tại đây. Phương pháp biến nạp bao gồm bất kỳ phương pháp của polynucleotit không bị giới hạn tại đây. Phương pháp biến nạp bao gồm bất kỳ phương pháp để đưa polynucleotit vào tế bào, và có thể được thực hiện bằng cách lựa chọn kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật dựa vào tế bào chủ. Các ví dụ của phương pháp biến nạp bao gồm điện biến nạp, kết tủa canxi phosphat ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , hoặc $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), vi tiêm, phương pháp polyetylen glycol (PEG), phương pháp DEAE-dextran, phương pháp liposom cation, phương pháp axetat-DMSO lithi, v.v. nhưng các phương pháp biến nạp không bị giới hạn tại đây.

Ngoài ra, thuật ngữ “liên kết hoạt động” nghĩa là trình tự promotơ bắt đầu và làm trung gian phiên mã của polynucleotit mã hóa protein đích của sáng chế được liên kết chức năng với trình tự polynucleotit. Liên kết hoạt động có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, và vị trí cắt và nối ADN đặc hiệu có thể được điều chế bằng cách sử dụng các enzym giới hạn và enzym nối ligaza đã biết, nhưng các phương pháp để liên kết hoạt động không bị giới hạn tại đây.

Vi sinh vật chứa homoserin dehydrogenaza biến đổi có thể là vi sinh vật đã được biến nạp để chứa homoserin dehydrogenaza biến đổi trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*. Ví dụ, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể bao gồm chủng kháng với 2-amin-3-hydroxy-valerat (AHV); chủng sản sinh L-threonin bằng cách thay

thể leuxin (tức là, axit amin tại vị trí 377 của aspartat kinaza (lysC)), bằng lysin để giải sự ức chế ngược lysC (tức là, enzym quan trọng đầu tiên hoạt động trong con đường sinh tổng hợp threonin); chủng sản sinh L-isoleuxin bằng cách thay thế axit amin tại vị trí 323 của gen *ilvA*, mã hóa L-threonin dehydrataza (tức là, enzym thứ nhất hoạt động trong con đường sinh tổng hợp isoleuxin) trong chủng sản sinh L-threonin, bằng alanin (Appl. Environ. Microbiol., Tháng 12 - 1996, p. 4345–4351); chủng sản sinh *O*-axetylhomoserin bằng cách bất hoạt *O*-axetylhomoserin (thiol)-lyaza, liên quan đến con đường thoái hóa của *O*-axetyl homoserin, và xystathionin *gamma*-synthaza; hoặc chủng sản sinh metionin bằng cách bất hoạt các yếu tố điều hòa phiên mã của metionin và xystein, nhưng các chủng của vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* không bị giới hạn tại đây.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin, phương pháp bao gồm: nuôi cấy vi sinh vật đã mô tả bên trên trong môi trường nuôi cấy.

Phương pháp sản xuất L-axit amin có thể bao gồm thu hồi homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin từ vi sinh vật đã nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.

Như đã mô tả bên trên, vi sinh vật có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, chứa biến thể homoserin dehydrogenaza của sáng chế, và cụ thể hơn là có thể là *Corynebacterium glutamicum*. Ngoài ra, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* hoặc *Corynebacterium glutamicum* có thể là vi sinh vật sản sinh homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin. L-axit amin nguồn gốc homoserin có thể bao gồm không chỉ L-axit amin nguồn gốc homoserin mà còn dẫn xuất của chúng. Ví dụ, L-axit amin nguồn gốc homoserin có thể L-threonin, L-isoleuxin, *O*-axetyl-L-homoserin, *O*-suxinyl-L-homoserin, *O*-phospho-L-homoserin, L-metionin, và/hoặc glyxin, nhưng L-axit amin nguồn gốc homoserin không bị giới hạn tại đây. Cụ thể hơn là, L-axit amin nguồn gốc homoserin có thể L-threonin, L-isoleuxin, *O*-axetyl-L-homoserin, *O*-suxinyl-L-homoserin, và/hoặc L-metionin, nhưng L-axit amin nguồn gốc homoserin không bị giới hạn tại đây.

Homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin có thể là môi trường nuôi cấy homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin, được sản xuất bởi vi sinh vật được mô tả theo sáng chế, hoặc có thể ở dạng đã tinh sạch. Rõ ràng là người có hiểu biết trung

bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể hiểu rằng homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin bao gồm không chỉ chính nó mà còn bao gồm muối của chúng.

Phương pháp sản xuất homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật trong các điều kiện nuôi cấy tối ưu và các điều kiện hoạt động enzym đã biết trong cùng lĩnh vực.

Theo phương pháp nêu trên, vi sinh vật có thể được nuôi cấy theo quy trình mẻ, quy trình liên tục, quy trình theo mẻ bổ sung, v.v. đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật nhưng quá trình nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể tại đây. Ngoài ra, với các điều kiện nuôi cấy, độ pH nuôi cấy có thể được điều chỉnh đến độ pH phù hợp (ví dụ, độ pH từ 5-7, tốt hơn là độ pH từ 6-8, và tốt nhất là độ pH là 6,8) với các thành phần bazơ thích hợp (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoni) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sunfuric), và các điều kiện hiếu khí của nuôi cấy có thể được duy trì bằng cách đưa oxy hoặc hỗn hợp khí có chứa oxy vào môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ nuôi cấy thông thường có thể trong khoảng từ 20°C đến 45°C, và tốt hơn là trong khoảng từ 25°C đến 40°C trong khoảng từ 10 đến 160 giờ, nhưng các điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn tại đây. Threonin, isoleuxin, hoặc axetyl homoserin được sinh ra bởi quá trình nuôi cấy có thể được tiết vào môi trường hoặc có thể được giữ trong các tế bào.

Ngoài ra, trong môi trường nuôi cấy, nguồn cacbon như là đường và hydrat cacbon (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, ri đường, tinh bột và xenluloza), dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hạt hướng dương, dầu đậu phộng và dầu dừa), axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic và axit linoleic), rượu (ví dụ, glyxerol và etanol), và axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic) có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp nhưng nguồn cacbon không bị giới hạn ở các chất này. Nguồn nitơ như hợp chất hữu cơ chứa nitơ (ví dụ, pepton, dịch chiết nấm men, nước thịt, chiết xuất mạch nha, rượu ngô, bột đậu nành và ure) hoặc hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat hoặc amoni cacbonat và amoni nitrat), v.v. có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp, nhưng nguồn nitơ không bị giới hạn ở các chất này. Nguồn phospho, kali đihydrogen phosphat, đikali hydrogên phosphat, muối có chứa natri tương ứng, v.v. có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp, nhưng nguồn phospho không bị giới hạn ở đây. Ngoài ra, các nguyên liệu kích thích tăng trưởng cần thiết khác bao gồm các muối kim loại (ví dụ, magie sufat hoặc sắt sufat), các axit amin hoặc các vitamin có thể có trong môi trường.

Theo sáng chế, phương pháp thu hồi homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin được sản xuất trong quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện bằng các thu các sản phẩm đích từ canh nuôi cấy sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, các phương pháp như ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi ion, kết tinh, sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography-HPLC), v.v. có thể được sử dụng và sản phẩm đích là homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin, có thể được thu hồi từ môi trường đã nuôi cấy hoặc vi sinh vật đã nuôi cấy sử dụng phương pháp phù hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Ngoài ra, quá trình thu hồi có thể bao gồm quá trình tinh sạch bổ sung và có thể được thực hiện sử dụng phương pháp phù hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất sử dụng homoserin dehydrogenaza biến đổi để cải thiện sản sinh homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sản sinh homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin trong vi sinh vật, bao gồm tăng cường hoạt tính của homoserin dehydrogenaza biến đổi.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biểu hiện/được biểu hiện” đề cập đến trạng thái trong đó protein đích được đưa vào vi sinh vật hoặc, trong trường hợp protein có trong vi sinh vật, hoạt tính của protein được tăng cường so với hoạt tính của protein nội sinh hoặc hoạt tính của protein trước khi sửa đổi.

Cụ thể là, thuật ngữ “đưa vào protein” nghĩa là vi sinh vật biểu hiện hoạt tính của protein cụ thể không được sở hữu ban đầu ở vi sinh vật hoặc vi sinh vật biểu hiện hoạt tính được tăng cường so với hoạt tính nội sinh hoặc hoạt tính của protein trước khi sửa đổi. Ví dụ, thuật ngữ “đưa vào protein” nghĩa là polynucleotit mã hóa protein cụ thể được đưa vào nhiễm sắc thể của vi sinh vật hoặc vectơ chứa polynucleotit mã hóa protein cụ thể được đưa vào vi sinh vật và từ đó biểu hiện hoạt tính của protein. Ngoài ra, thuật ngữ “tăng cường hoạt tính” nghĩa là hoạt tính của protein cụ thể được cải thiện so với hoạt tính nội sinh của protein hoặc hoạt tính trước khi sửa đổi. Thuật ngữ “protein nội sinh” đề cập đến hoạt tính của protein cụ thể có sẵn bởi chủng bố mẹ của vi sinh vật, trong trường hợp đặc tính của vi sinh vật bị thay đổi do đột biến gen gây ra bởi yếu tố nhân tạo hoặc tự nhiên.

Cụ thể là, theo sáng chế, tăng cường hoạt tính có thể được thực hiện bởi một hoặc

nhiều phương pháp từ các phương pháp sau đây: phương pháp để tăng số lượng bản sao nội bào của gen mã hóa biến thể protein; phương pháp đưa đột biến vào trình tự kiểm soát biểu hiện của gen mã hóa biến thể protein; phương pháp để thay thế trình tự kiểm soát biểu hiện của gen mã hóa biến thể protein với trình tự có hoạt tính mạnh; phương pháp thay thế gen mã hóa protein nguyên thể trên nhiễm sắc thể có hoạt tính homoserin dehydrogenaza với gen mã hóa biến thể protein; phương pháp để đưa thêm đột biến vào gen mã hóa biến thể có hoạt tính homoserin dehydrogenaza sao cho hoạt tính của biến thể protein được tăng cường, nhưng các phương pháp không bị giới hạn tại đây.

Như mô tả bên trên, số lượng bản sao của gen có thể được tăng dưới dạng tại đó gen được liên kết hoạt động với vectơ hoặc bằng cách chèn gen vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ, nhưng phương pháp không bị giới hạn cụ thể tại đây. Cụ thể là, số lượng bản sao của gen có thể tăng bằng cách đưa vectơ vào tế bào chủ, tại đó vectơ được liên kết hoạt động với polynucleotit mã hóa protein của sáng chế và có thể sao chép và hoạt động không phụ thuộc vào vật chủ. Ngoài ra, số lượng bản sao của gen có thể tăng bằng cách đưa vectơ, mà polynucleotit được liên kết hoạt động, vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, tái tổ hợp tương đồng).

Sau đó, để tăng sự biểu hiện của polynucleotit, trình tự kiểm soát biểu hiện có thể được sửa đổi bằng cách gây ra đột biến tại đó bằng cách xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ, hoặc kết hợp của chúng để tăng cường thêm hoạt tính của trình tự kiểm soát biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế trình tự kiểm soát biểu hiện với trình tự axit nucleic với hoạt tính mạnh, nhưng phương pháp đột biến không bị giới hạn cụ thể tại đây. Trình tự kiểm soát biểu hiện có thể bao gồm promotơ, trình tự điều khiển, trình tự mã hóa vị trí bám ribosom, các trình tự kiểm soát kết thúc phiên mã và dịch mã, v.v., nhưng trình tự kiểm soát biểu hiện không bị giới hạn cụ thể tại đây.

Promotơ mạnh có thể được liên kết với vùng ngược dòng của đơn vị biểu hiện của polynucleotit thay vì promotơ ban đầu, nhưng phương pháp không bị giới hạn tại đây. Ví dụ, các promotơ mạnh đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể bao gồm các promotơ *cj1* đến *cj7* (patent Hàn Quốc số 10-0620092), promotơ *lac*, promotơ *trp*, promotơ *trc*, promotơ *tac*, promotơ PR thực khuẩn thể hệ lamda, promotơ PL, promotơ tet, promotơ *gapA*, promotơ SPL7, promotơ SPL13 (sm3) (patent Hàn Quốc số 10-1783170), promotơ O2 (patent Hàn Quốc số 10-1632642), promotơ *tkt*, promotơ *yccA*,

v.v., nhưng các promotor không bị giới hạn tại đây.

Hơn nữa, việc sửa đổi trình tự polynucleotit trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách tạo ra sửa đổi trên trình tự kiểm soát biểu hiện bằng cách xóa, chèn, thay thế không bảo thủ hoặc bảo thủ, hoặc tổng hợp của chúng để tăng thêm hoạt tính của trình tự polynucleotit; hoặc bằng cách thay thế trình tự polynucleotit với trình tự polynucleotit đã sửa đổi có hoạt tính mạnh, nhưng phương pháp sửa đổi không bị giới hạn cụ thể tại đây.

Việc đưa vào và tăng cường hoạt tính protein như đã mô tả bên trên thông thường có thể tăng hoạt tính hoặc nồng độ của protein tương ứng tối thiểu 1%, tối thiểu 10%, tối thiểu 25%, tối thiểu 50%, tối thiểu 75%, tối thiểu 100%, tối thiểu 150%, tối thiểu 200%, tối thiểu 300%, tối thiểu 400%, hoặc tối thiểu 500%, và tối đa là 1.000% hoặc 2.000%, dựa vào hoạt tính hoặc nồng độ của protein trong chủng vi sinh vật hoang dại hoặc không sửa đổi, nhưng tỷ lệ không bị giới hạn tại đây.

Trình tự axit amin protein có hoạt tính homoserin dehydrogenaza, axit amin tại vị trí thứ 407, và vi sinh vật như đã mô tả bên trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ thực hiện. Tuy nhiên, các ví dụ được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở những ví dụ này.

Ví dụ 1: Sàng lọc các vi sinh vật kháng AHV thông qua gây sửa đổi nhân tạo

Trong ví dụ này, thí nghiệm để truyền tính kháng 2-amin-3-hydroxy-valerat (sau đây gọi là "AHV") là đồng phân của L-threonin, được thực hiện sử dụng *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 (patent Hàn Quốc số 10-0159812) làm chủng bố mẹ, để giải phóng tính ức chế ngược bởi L-threonin của homoserin dehydrogenaza (sau đây gọi là "Hom", EC:1.1.1.3).

Sửa đổi được tạo ra bằng phương pháp sửa đổi nhân tạo sử dụng *N*-metyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (sau đây gọi là "NTG"). Chủng KFCC10881 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy giống trong 18 giờ, được cấy vào 4 ml môi trường nuôi cấy giống, và sau đó được nuôi cấy đến khi mật độ quang học OD₆₆₀ (Optical Density: OD) đạt đến khoảng 1,0. Môi trường nuôi cấy được ly tâm để thu hồi các tế bào, và sau đó được rửa

hai lần với dung dịch đệm 50 mM Tris-malat (độ pH 6,5) và được tạo huyền phù trong 4 ml cuối cùng của cùng dung dịch đệm. Dung dịch NTG (2 mg/mL trong dung dịch đệm 0,05 M Tris-malat (độ pH 6,5)) được thêm vào huyền phù tế bào có nồng độ cuối cùng là 150 mg/L, và sau đó cho phép giữ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Sau đó, các tế bào được thu hồi bằng ly tâm, và được rửa hai lần với cùng dung dịch đệm để loại bỏ dung dịch NTG. Các tế bào đã rửa cuối cùng được tạo huyền phù trong 4 ml dung dịch glyxerol 20% và sau đó được bảo quản ở -70°C đến khi sử dụng. Các chủng NTG đã xử lý được cấy trải trên môi trường tối thiểu chứa 3 g/L AHV, và sau đó thu được chủng kháng 126 AHV nguồn gốc từ KFCC10881 thông qua quy trình bên trên.

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

glucoza 20 g, pepton 10 g, cao 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 (trong 1 L nước cất)

Môi trường tối thiểu (độ pH 7,2)

glucoza 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 (trong 1 L nước cất)

Ví dụ 2: Thử nghiệm sản sinh L-threonin với chủng kháng AHV nguồn gốc từ KFCC10881

Thử nghiệm khả năng sản sinh L-threonin được thực hiện trên các chủng kháng 126 AHV thu được trong ví dụ 1. 126 chủng thu được trong ví dụ 1 được cấy vào mỗi bình tam giác (250 ml) chứa môi trường nuôi cấy giống (25 ml), và sau đó được nuôi cấy lắc tại 30°C ở 200 vòng/phút trong 20 giờ. Môi trường nuôi cấy giống (1 ml) được cấy vào từng bình tam giác (250 ml) chứa môi trường sản xuất L-threonin (24 ml) bên trên, và sau đó được nuôi cấy lắc tại 30°C ở 200 vòng/phút trong 48 giờ.

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

glucoza 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, leuxin 400 mg, CaCO_3 20 g (trong 1 L nước cất)

Sau khi nuôi cấy, hàm lượng các axit amin khác nhau được sản sinh được đo sử

dụng HPLC. Nồng độ của các axit amin trong môi trường nuôi cấy với 5 chủng đứng đầu, như thể hiện trong bảng 1 cho thấy khả năng sản sinh L-threonin vượt trội trong số 126 chủng thử nghiệm trên đó. 5 chủng đã chọn được xác nhận thông qua quy trình bên trên được đặt tên là KFCC10881-1 đến KFCC10881-5.

Bảng 1: Các thí nghiệm sản sinh L-threonin của các chủng kháng AHV vượt trội

	OD	Thr	Hse	Gly	Ile	Lys	Thr+Hse+Gly+Ile
KFCC10881	60,1	0,0	0,1	0,2	0,0	12,3	0,3
KFCC10881-1	53,6	4,1	1,3	1,4	1,2	2,0	8,0
KFCC10881-2	53,3	2,2	0,9	1,0	1,1	8,3	5,2
KFCC10881-3	68,5	1,5	1,2	1,1	0,2	10,8	4,0
KFCC10881-4	59,1	1,2	0,9	1,0	0,7	1,9	3,8
KFCC10881-5	49,6	2,4	1,1	1,2	0,9	5,4	5,6

Như thể hiện trong bảng 1, hàm lượng L-threonin, L-homoserin, L-glyxin, và L-isoleuxin, được sản sinh bởi 5 loại chủng có tính kháng với AHV, được tăng so với nhóm đối chứng, trong khi hàm lượng L-lysin được sản xuất bị giảm.

Các con đường sinh tổng hợp L-threonin và L-lysin được tách ra từ aspartat-semialdehyt (sau đây gọi là “ASA”) là điểm phân nhánh. Tức là, hàm lượng L-lysin được sản sinh bị giảm do hàm lượng L-threonin được sản sinh tăng lên. Theo đó, hàm lượng của homoserin (Hse), glyxin (Gly), và L-isoleuxin (Ile) có thể là các sản phẩm phụ trong con đường sinh tổng hợp L-threonin có thể được tăng do hàm lượng L-threonin được sản sinh bị giảm xuống, và do đó hàm lượng tổng của chúng được sản sinh (Thr+Hse+Gly+Ile) cũng được xác nhận.

Theo đó, trong số các chủng kháng AHV bên trên, chủng KFCC10881-1 thể hiện hàm lượng L-lysin bị giảm xuống, hàm lượng sản sinh L-threonin cao, và hàm lượng tổng sản sinh (Thr+Hse+Gly+Ile) cao, được lựa chọn là chủng kháng AHV vượt trội nhất.

Ví dụ 3: Phân tích trình tự của các chủng có khả năng sản sinh vượt trội threonin nguồn gốc từ KFCC10881

Để phân tích trình tự nucleotit của các enzym sinh tổng hợp L-threonin của chủng được lựa chọn trong ví dụ 2 bên trên, các thí nghiệm sau đây được thực hiện. Dựa trên thông tin gen được cung cấp bởi Bách khoa toàn thư gen và hệ gen Kyoto (Kyoto

Encyclopedia of Genes và Genomes: KEGG), thu được từng trình tự nucleotit của gen *hom* (SEQ ID NO. 2, NCgl1136), mã hóa cho homoserin dehydrogenaza của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, và trình tự nucleotit của gen *thrB* (SEQ ID NO. 3, Gen No. NCgl1137), mã hóa cho homoserin kinaza. Cả gen *hom* và *thrB* đã biết có cấu trúc operon (Peoples *et al.*, *Mol. Biol.* 2(1):63–72, 1988).

Để thu được đoạn ADN chứa operon *hom-thrB* của chủng được lựa chọn, PCR được thực hiện sử dụng ADN hệ gen của chủng là mạch khuôn và cặp mồi SEQ ID NO. 4 và SEQ ID NO. 5. Enzym ADN polymeraza độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. Các điều kiện PCR như sau: 30 chu kỳ bao gồm biến tính ở 96°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 52°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 3 phút. Kết quả là, có thể khuếch đại đoạn gen (2.778 bp; SEQ ID NO. 6), bao gồm trình tự nucleotit (300 bp) chứa vùng ngược dòng của promotor của codon khởi đầu của SEQ ID NO. 2 với 200 bp vùng xuôi dòng của codon kết thúc SEQ ID NO. 3.

Trình tự nucleotit được xác định sử dụng các đoạn mồi đã điều chế bởi máy giải trình tự ABI PRISM 3730XL Analyzer (96 mao quản; Applied Biosystems). Trong trình tự nucleotit tương ứng với gen *hom* của operon *hom-thrB* trong chủng KFCC10881-1, guanin (tức là, nucleotit tại vị trí 1.220 của SEQ ID NO. 2) được sửa đổi thành adenin, và do đó codon gen CAT mã hóa gốc arginin được sửa đổi thành codon gen CAT mã hóa gốc histidin (sau đây gọi là “sửa đổi R407H”; SEQ ID NO. 7). Trong khi đó, không có đột biến được phát hiện trong gen *thrB* tương ứng với SEQ ID NO. 3.

Từ các phân tích trình tự nucleotit bên trên, có thể kết luận rằng sự ức chế ngược bởi L-threonin được giải mã cảm bởi sự đột biến của arginin (tức là, gốc axit amin thứ 407) của gen *Hom* (SEQ ID NO. 8) trong chủng KFCC10881-1 thành histidin (sau đây gọi là “sửa đổi R407H”).

Ví dụ 4: Điều chế các chủng trong đó được đưa vào homoserin dehydrogenaza

Cặp mồi SEQ ID NO. 9 và SEQ ID NO. 10 được điều chế để điều chế các chủng trong đó biến thể (R407H) được xác định trong ví dụ 2 được đưa vào các chủng hoang dại của chúng.

Để điều chế các chủng trong đó mỗi sửa đổi *hom* R407H được đưa vào, PCR được thực hiện sử dụng ADN hệ gen được tách chiết từ chủng KFCC10811-1 làm khuôn mẫu

và cặp mồi SEQ ID NO. 9 và SEQ ID NO. 10. Enzym ADN polymeraza có độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. Các điều kiện PCR như sau: 28 chu kỳ bao gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút. Kết quả là, thu được đoạn gen (1.668 bp) có chứa vùng promotor (khoảng 300 bp) của gen *hom* (1.338 bp). Sản phẩm đã khuếch đại được tinh sạch sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, sau khi xử lý với enzym giới hạn SmaI, tỷ lệ nồng độ mol (M) của vector pDZ (patent Hàn Quốc số 10-0924065) xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút để đoạn ADN chèn đã khuếch đại bởi phản ứng PCR bên trên được thiết đặt là 1:2, và vector được tách dòng sử dụng bộ Kit Infusion Cloning (TaKaRa) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và do đó điều chế được vector pDZ-R407H để đưa sửa đổi R407H vào nhiễm sắc thể.

Vector pDZ-R407H được biến nạp vào *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 bằng điện biến nạp và thực hiện trao đổi chéo thứ cấp, và do đó thu được chủng trong đó sự thay thế nucleotit đã biến đổi được đưa vào nhiễm sắc thể. Sử dụng các cặp mồi được liệt kê bên dưới và kỹ thuật PCR khuếch đại alen cụ thể đột biến (Mutant Allele Specific Amplification: MASA) (Takeda *et al.*, Hum. Mutation, 2, 112–117 (1993)), mức độ phù hợp của sự thay thế được xác định chủ yếu bằng cách lựa chọn chủng được khuếch đại sử dụng cặp mồi tương ứng với trình tự đã sửa đổi (SEQ ID NO. 11 và SEQ ID NO. 12). Ngoài ra, phân tích trình tự gen *hom* của chủng đã lựa chọn được thực hiện để xác nhận thứ cấp mức độ phù hợp của thay thế sử dụng cặp mồi SEQ ID NO. 11 và SEQ ID NO. 13 và bằng cách phân tích trình tự đã sửa đổi theo cùng phương thức như trong ví dụ 2. Chủng được thay thế với nucleotit đã sửa đổi được đặt tên là CA09-0900.

Chủng CA09-0900 được ký gửi ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM), cơ quan đăng ký Quốc tế, vào ngày 14 tháng 12 năm 2018 và đăng ký số KCCM12418P.

Ví dụ 5: Đo hoạt tính của homoserin dehydrogenaza

Hoạt tính của enzym Hom được đo trong chủng điều chế. Chủng hoang dại ATCC13032 (nhóm đối chứng) và chủng điều chế CA09-0900 trong ví dụ 4 được cấy vào 25 ml môi trường nuôi cấy giống và được nuôi cấy đến khi các chủng đạt đến nửa sau giai đoạn tăng trưởng. Các tế bào của mỗi chủng được thu hồi bằng cách ly tâm, rửa

hai lần với 0,1 M dung dịch đệm kali phosphate (độ pH 7,6), và được tạo huyền phù cuối cùng với cùng dung dịch đệm chứa glyxerol tại nồng độ 30%. Mỗi huyền phù tế bào được nghiền nhỏ vật lý bằng phương pháp xoáy hạt thủy tinh thông thường trong 10 phút, và mỗi huyền phù được thu hồi qua hai lần ly tâm (13.000 vòng/phút, 4°C, 30 phút) và được sử dụng làm dịch chiết thô để đo hoạt tính của enzym Hom. Để đo hoạt tính của enzym Hom, dung dịch coenzym (0,1 mL) được bổ sung vào 0,9 ml dung dịch phản ứng để đo hoạt tính enzym (dung dịch đệm kali phosphat (độ pH 7,0), 25 mM NADPH, 5 mM aspartat semi-aldehyt) và được phản ứng ở 30°C. Hoạt tính enzym Hom (đơn vị hoạt độ enzym: U) được xác định là số μmol NADPH đã tiêu thụ trên phút theo sự có mặt của L-threonin (0 mM, 10 mM), và các kết quả đo hoạt tính enzym được thể hiện trong bảng 2 bên dưới.

Bảng 2: Đo hoạt tính của Hom (U) và sự giảm nhạy bởi L-threonin

Chủng	Hoạt tính enzym (U) theo lượng L-threonin được bổ sung (mM)	
	0 mM	10 mM
ATCC13032	0,91	0,02
CA09-0900	1,37	1,23

Như kết quả của thí nghiệm, xác nhận rằng enzym Hom bao gồm sửa đổi R407H, sự ức chế hoạt tính được giảm xuống trong điều kiện tại đó có chứa 10 mM L-threonin, không giống như Hom chủng hoang dại, do đó xác nhận việc xuất hiện của sự giảm nhạy cảm với L-threonin.

Ví dụ 6: Điều chế và đánh giá các chủng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản sinh L-threonin

Các chủng sản sinh L-threonin được phát triển từ chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 hoang dại. Cụ thể là, để giải quyết ức chế ngược bởi aspartat kinaza (lysC) (tức là, enzym quan trọng trong đó hoạt động đầu tiên trong con đường sinh tổng hợp threonin), leuxin (tức là, axit amin tại vị trí 377 của lysC) được thay thế bằng lysin (SEQ ID NO. 14).

Cụ thể hơn là, để điều chế các chủng trong đó lysC (L377K) sửa đổi được đưa vào, phản ứng PCR được thực hiện sử dụng nhiễm sắc thể của ATCC13032 làm mạch khuôn và các cặp mồi SEQ ID NO. 15 và SEQ ID NO. 16 hoặc cặp mồi SEQ ID NO. 17 và SEQ ID NO. 18. Enzym ADN polymeraza độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene)

được sử dụng làm polymeraza cho phản ứng PCR. Các điều kiện PCR như sau: 28 chu kỳ bao gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút. Kết quả là, thu được từng đoạn ADN (515 bp) trong vùng 5' ngược dòng và đoạn ADN (538 bp) trong vùng 3' xuôi dòng, với vị trí sửa đổi của gen *lysC* là trung tâm, được thu lần lượt. PCR được thực hiện với hai đoạn ADN đã khuếch làm mạch khuôn và cặp mồi SEQ ID NO. 15 và SEQ ID NO. 18. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 28 chu kỳ bao gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút; và kéo dài ở 72°C trong 5 phút. Kết quả là, đoạn ADN (1.023 bp) chứa sửa đổi của gen *lysC*, mã hóa biến thể aspartokinaza trong đó leuxin tại vị trí 377 được thay thế bằng lysin, được khuếch đại. Sản phẩm khuếch đại được tinh sạch sử dụng bộ kit tinh sạch PCR (QIAGEN) và được sử dụng làm đoạn ADN chèn để điều chế vector. Trong khi đó, sau khi xử lý với enzym giới hạn, tỷ lệ nồng độ mol (M) của vector pDZ (patent Hàn Quốc số 10-0924065) được xử lý nhiệt ở 65°C trong 20 phút để đoạn chèn ADN đã khuếch đại bởi phản ứng PCR bên trên được thiết đặt là 1:2, và vector được tách dòng sử dụng kit tách dòng Infusion Cloning Kit (TaKaRa) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và từ đó điều chế được vector để đưa L377K sửa đổi vào nhiễm sắc thể, pDZ-L377K.

Vector pDZ-L377K đã điều chế được biến nạp vào chủng ATCC13032 và thực hiện trao đổi chéo thứ cấp, và theo đó thu được chủng trong đó sự thay thế nucleotit đã sửa đổi được đưa vào nhiễm sắc thể. Chủng được đặt tên là CJP1. Chủng CJP1 được đặt tên lại là CA01-2307, được ký gửi ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM), cơ quan đăng ký Quốc tế vào ngày 29 tháng 3 năm 2017 và số đăng KCCM12000P.

Để xác nhận chắc chắn sự thay đổi trong sản sinh L-threonin của chủng bên trên, sửa đổi được xác nhận trong ví dụ 4 được đưa vào gen mã hóa homoserin dehydrogenaza. Cụ thể là, để đưa sửa đổi R407H vào chủng CJP1, vector pDZ-R407H đã điều chế trong ví dụ 4 được biến nạp vào chủng CJP1 bằng điện biến nạp và thực hiện trao đổi chéo thứ cấp, và từ đó thu được chủng trong đó nucleotit đã sửa đổi được đưa vào nhiễm sắc thể. Chủng được thay thế với nucleotit đã sửa đổi được đặt tên là CJP1-R407H.

Bảng 3: Xác nhận khả năng sản sinh L-threonin của các chủng được điều chế

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

	Thr	Lys
CJP1	0,36	3,62
CJP1-R407H	1,50	2,47

Kết quả là, trong chủng tại đó sửa đổi được đưa vào, lượng L-lysine sản sinh bị giảm xuống và lượng L-threonine sản sinh được tăng khoảng 1,14 g/L, so với chủng CJP1 (nhóm đối chứng), do đó xác nhận sự cải thiện đáng kể trong hiệu quả giảm nhay.

Ví dụ 7: Điều chế và đánh giá các chủng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh L-isoleuxin

Để điều chế các chủng sản sinh isoleuxin, vector được điều chế để tăng cường biểu hiện của gen đã sửa đổi *ilvA*(V323A) (*Appl. Environ. Microbiol.*, tháng 12/1996, p. 4345–4351), mã hóa L-threonine dehydratase đã biết (enzym thứ nhất trong con đường sinh tổng hợp isoleuxin), trong các chủng được điều chế trong ví dụ 6.

Cụ thể là, để điều chế vector để đưa sửa đổi, nhắm đến gen *ilvA*, cặp mồi (SEQ ID NO. 19 và SEQ ID NO. 20) để khuếch đại vùng 5' ngược dòng và cặp mồi (SEQ ID NO. 21 và SEQ ID NO. 22) để khuếch đại vùng 3' xuôi dòng được đưa ra với vị trí sửa đổi là trung tâm. Enzym giới hạn BamHI được chèn vào ở mỗi đầu của cặp mồi SEQ ID NO. 19 và SEQ ID NO. 22, và cặp mồi SEQ ID NO. 20 và SEQ ID NO. 21 được thiết kế sao cho sự sửa đổi thay thế nucleotit có thể được định vị trong vùng tại đó trao đổi chéo xảy ra.

PCR được thực hiện với nhiễm sắc thể của chủng hoang dại làm mạch khuôn sử dụng các mồi SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21, và SEQ ID NO. 22. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ bao gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 30 giây; và kéo dài ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được đoạn ADN (627 bp) trong vùng 5' ngược dòng và đoạn ADN (608 bp) trong vùng 3' xuôi dòng với vị trí sửa đổi của gen *ilvA* là trung tâm.

PCR được thực hiện sử dụng hai đoạn ADN đã khuếch đại làm mạch khuôn và cặp mồi SEQ ID NO. 19 và SEQ ID NO. 22. PCR được thực hiện như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ bao gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 60 giây; và kéo dài ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, đoạn ADN (1.217 bp) được khuếch đại, trong đó đoạn ADN chứa sửa đổi của gen

ilvA mã hóa biến thể IlvA tại đó valin tại vị trí 323 được thay thế bằng alanin. Vectors pECCG117 (patent Hàn Quốc số 10-0057684) và đoạn ADN (1.217 bp) được xử lý với enzym giới hạn BamHI, nối sử dụng enzym ADN ligaza, và sau đó tách dòng để thu được plasmit. Plasmit thu được sau đó được đặt tên là pECCG117-*ilvA*(V323A).

Vector pECCG117-*ilvA*(V323A) được đưa vào chủng CJP1-R407H được điều chế trong ví dụ 6 bằng điện biến nạp và được cấy trên môi trường chọn lọc có chứa kanamycin (25 mg/L) để thu được các chủng biến nạp. Các chủng biến nạp thu được sau đó được nuôi cấy theo phương pháp nuôi cấy trong bình tam giác giống nhau theo ví dụ 2, và các nồng độ của L-isoleuxin trong môi trường nuôi cấy được phân tích. Các kết quả được thể hiện trong bảng 4 bên dưới.

Bảng 4: Xác nhận khả năng sản sinh L-isoleuxin của các chủng điều chế

Chủng	L-Isoleuxin (g/L)
CJP1/pECCG117- <i>ilvA</i> (V323A)	0,7
CJP1-R407H/pECCG117- <i>ilvA</i> (V323A)	1,4

Kết quả là, xác nhận rằng chủng chứa sửa đổi *hom*(R407H), khả năng sản sinh L-isoleuxin cải thiện 0,7 g/L so với chủng đối chứng.

Ví dụ 8: Điều chế và đánh giá chủng sản sinh *O*-axetyl-homoserin (OAH)-được thay thế với Hom đã sửa đổi

8-1. Điều chế chủng ATCC13032 được thay thế với Hom đã sửa đổi

Sửa đổi R407H được đưa vào gen *hom* của chủng ATCC13032 theo cùng cách thức như trong ví dụ 4, và chủng được điều chế sau đó được đặt tên là ATCC13032::Hom^{FBR}.

8-2. Xóa gen *metB*

Trong ví dụ này, gen *metB* mã hóa xystathionin *gamma*-synthaza trong con đường thoái hóa *O*-axetyl-homoserin thu được qua PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn. Dựa trên Ngân hàng gen của Viện Sức khỏe Quốc gia (National Institutes of Health: NIH), thu được thông tin trình tự nucleotit của *metB* (NCBI số đăng ký: Ncgl2360; SEQ ID NO. 23). Ngoài ra, dựa trên Ngân hàng gen, cặp môi (SEQ ID NO. 24 và SEQ ID NO. 25) bao gồm đầu N và trình tự liên kết của gen *metB* và cặp môi (SEQ ID NO. 26 và SEQ ID NO. 27) chứa đầu N và trình tự liên kết của gen *metB* được tổng hợp. PCR được thực hiện sử dụng

ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn và các oligonucleotit của các trình tự nucleotit SEQ ID NO. 24 và SEQ ID NO. 25 và SEQ ID NO. 26 và SEQ ID NO. 27 làm mồi thiết đặt. Enzym ADN polymeraza độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza. PCR được thực hiện như sau: 30 chu kỳ bao gồm biến tính ở 96°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút; và kéo dài ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được gen đã khuếch đại (500 bp) chứa đầu N và nhân tố liên kết của gen *metB* và gen đã khuếch đại (500 bp) chứa đầu C và nhân tố liên kết của gen *metB*.

PCR được thực hiện sử dụng hai gen đã khuếch đại thu được sau đó làm mạch khuôn và cặp mồi SEQ ID NO. 24 và SEQ ID NO. 27 trong các điều kiện như sau: 30 chu kỳ bao gồm biến tính ở 96°C trong 60 giây, ủ để gắn mồi ở 50°C trong 60 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút; và kéo dài ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được gen đã khuếch đại $\Delta metB$ (1.000 bp), là catxet bất hoạt gen *metB* chứa đầu C liên kết đầu N của gen *metB*. Gen *metB* thu được thông qua PCR được xử lý với các enzym giới hạn XbaI và SalI được chứa ở cuối, và sau đó tách dòng thành vectơ pDZ, được xử lý thông thường với các enzym giới hạn XbaI và SalI, thông qua quá trình nối. Sau đó, điều chế được vectơ tái tổ hợp pDZ- $\Delta metB$ trong đó catxet bất hoạt *metB* được tách dòng cuối cùng.

Vectơ pDZ- $\Delta metB$ đã điều chế được biến nạp vào các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 và ATCC13032::Hom^{FBR}. Sau khi trao đổi chéo thứ cấp, thu được các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 $\Delta metB$ và ATCC13032::Hom^{FBR} $\Delta metB$, trong đó thu được gen *metB* bị bất hoạt trên nhiễm sắc thể. Gen bất hoạt *metB* được xác nhận lần cuối bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi SEQ ID NO. 24 và SEQ ID NO. 27, sau đó bằng cách so sánh trình tự với chủng ATCC13032 trong đó gen *metB* không bị bất hoạt.

8-3. Xóa gen *metY*

Trong ví dụ này, gen *metY* mã hóa *O*-axetylhomoserin (thiol)-lyaza trong con đường thoái hóa *O*-axetyl-homoserin thu được thông qua PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn. Dựa trên Ngân hàng gen của Viện Sức khỏe Quốc gia (National Institutes of Health: NIH), thu được thông tin trình tự nucleotit của gen *metY* (NCBI số đăng ký Ncgl0625; SEQ ID NO. 28).

Ngoài ra, dựa vào đó, tổng hợp được cặp mồi (SEQ ID NO. 29 và SEQ ID NO. 30) chứa đầu N và trình tự liên kết của gen *metY* và cặp mồi (SEQ ID NO. 31 và SEQ ID NO. 32) chứa đầu N và trình tự liên kết của gen *metY*.

PCR được thực hiện với ADN nhiễm sắc thể *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn sử dụng các oligonucleotit của các trình tự nucleotit của SEQ ID NO. 29 và SEQ ID NO. 30 và SEQ ID NO. 31 và SEQ ID NO. 32 làm mồi thiết đặt. Enzym ADN polymeraza độ chính xác cao PfuUltra™ (Stratagene) được sử dụng làm polymeraza. PCR được thực hiện như sau: 30 chu kỳ bao gồm biến tính ở 96°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút; và kéo dài ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được gen đã khuếch đại (500 bp) chứa đầu N và nhân tố liên kết của gen *metY* và gen đã khuếch đại (500 bp) chứa đầu C và nhân tố liên kết của gen *metY*. PCR được thực hiện sử dụng hai gen đã khuếch đại thu được sau đó làm mạch khuôn và cặp mồi SEQ ID NO. 29 và SEQ ID NO. 32 trong các điều kiện như sau: 10 chu kỳ bao gồm biến tính ở 96°C trong 60 giây, ủ để gắn mồi ở 50°C trong 60 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút; và kéo dài ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được gen đã khuếch đại $\Delta metY$ (1.000 bp) là catxet bất hoạt *metY* chứa đầu C liên kết đầu N của gen *metY*.

Gen *metY* thu được thông qua PCR được xử lý với các enzym giới hạn XbaI và Sall được chứa ở cuối, và sau đó được tách dòng thành vectơ pDZ, được xử lý thông thường với các enzym giới hạn XbaI và Sall, thông qua nối. Sau đó, điều chế được vectơ tái tổ pDZ- $\Delta metY$ catxet bất hoạt *metY* được tách dòng cuối cùng.

Vectơ đã điều chế pDZ- $\Delta metY$ được biến nạp vào các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, ATCC13032::Hom^{FBR}, ATCC13032 $\Delta metB$, và ATCC13032::Hom^{FBR} $\Delta metB$. Sau khi thực hiện trao đổi chéo thứ cấp, 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* bị bất hoạt trên nhiễm sắc thể. Gen bất hoạt *metY* được xác nhận lần cuối bằng cách thực hiện PCR sử dụng cặp mồi SEQ ID NO. 29 và SEQ ID NO. 32, sau đó so sánh trình tự với ATCC13032 trong đó gen *metY* không bị bất hoạt.

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

So sánh được thực hiện giữa khả năng sản sinh *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 trong các ví dụ 8-1 đến 8-3, trong đó các gen *metB*, *metY*, và *metBY* bị xóa bỏ và gen sửa đổi *hom* được thay thế tại đó.

Cụ thể là, các dòng đơn được nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB rắn trong tủ ủ ấm 32°C, và một khuẩn lạc của từng dòng đơn lẻ được cấy vào môi trường hiệu giá *O*-axetyl-homoserin (25 mL), và sau đó các môi trường đã cấy khuẩn lạc được nuôi cấy lắc tại 32°C ở 250 vòng/phút trong khoảng từ 42 đến 64 giờ. *O*-axetyl-homoserin từ mỗi môi trường nuôi cấy được phân tích bởi HPLC, và các kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 5 dưới đây.

Môi trường sản sinh *O*-Axetyl-L-homoserin (độ 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, metionin 400 mg, leuxin 400 mg, CaCO₃ 20 g (trong 1 L nước cất)

Bảng 5: Đánh giá sản sinh *O*-axetyl-homoserin

Các chủng		Sản sinh <i>O</i> -AH (g/L)
ATCC13032	-	0,0
	<i>metB</i>	0,3
	<i>metY</i>	0,3
	<i>metBY</i>	0,5
ATCC13032::Hom ^{FBR} (R407H)	-	0,0
	<i>metB</i>	1,3
	<i>metY</i>	1,5
	<i>metBY</i>	3,7

Kết quả là, như thể hiện trong bảng 5 bên trên, *O*-axetyl-L-homoserin không tích lũy, khi *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, chủng đối chứng, được nuôi cấy; trong đó *O*-axetyl-L-homoserin được tích lũy với hàm lượng 0,3 g/L, 0,3 g/L, và 0,5 g/L đối với từng chủng ATCC13032 $\Delta metB$, ATCC13032 $\Delta metY$, và ATCC13032 $\Delta metB\Delta metY$, tương ứng, trong đó các gen *metB*, *metY*, và *metBY* bị bất hoạt.

Ngoài ra, trong trường hợp chủng ATCC13032::Hom^{FBR} trong đó gen *hom* được thay thế dưới dạng R407H, và các chủng ATCC13032::Hom^{FBR} $\Delta metB$, ATCC13032::Hom^{FBR} $\Delta metY$, và ATCC13032::Hom^{FBR} $\Delta metB\Delta metY$ trong đó các gen

metB, *metY*, và *metBY* bị bất hoạt, tương ứng, đã xác nhận rằng *O*-axetyl-L-homoserin được tích lũy với hàm lượng 1,3 g/L, 1,5 g/L, và 3,7 g/L đối với mỗi chủng này.

Từ đó, xác nhận rằng từ các kết quả bên trên cho thấy lượng sản sinh của axit amin đích của homoserin là tiền chất có thể được tăng đáng kể sử dụng *hom* đã sửa đổi của sáng chế.

Ví dụ 9: Điều chế và đánh giá các chủng sản sinh L-metionin

Ví dụ 9-1: Điều chế vectơ tái tổ hợp để xóa gen *mcbR*

Trong ví dụ này, để điều chế các chủng sản sinh metionin, điều chế vectơ để bất hoạt gen *mcbR* (*J. Biotechnol.* 103:51–65, 2003), mã hóa các protein điều hòa phiên mã metionin và xystein trong các chủng được điều chế trong ví dụ 6.

Cụ thể là, vectơ plasmit tái tổ hợp được điều chế sử dụng phương pháp bên dưới để xóa gen *mcbR* trên nhiễm sắc thể của *Corynebacterium* ATCC13032. Dựa vào các trình tự nucleotit được báo cáo trong Ngân hàng gen của Viện Sức khỏe Quốc gia (National Institutes of Health: NIH), thu được gen *mcbR* và trình tự xung quanh gen (SEQ ID NO. 33) của *Corynebacterium glutamicum*.

Với mục đích xóa gen *mcbR*, PCR được thực hiện sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm mạch khuôn và các cặp mồi SEQ ID NO. 34 và SEQ ID NO. 35 và SEQ ID NO. 36 và SEQ ID NO. 37 trong các điều kiện sau đây: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ bao gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây; ủ để gắn mồi ở 53°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 30 giây; và kéo dài ở 72°C trong 7 phút. Kết quả là, thu được các đoạn ADN (700 bp).

Vectơ pDZ không thể sao chép trong *Corynebacterium glutamicum*, và các đoạn gen đã khuếch đại *mcbR* được xử lý với enzym giới hạn *Sma*I để chèn vào nhiễm sắc thể. Sau đó, chúng được nối sử dụng ADN ligaza, được biến nạp vào *E. coli* DH5 α , và được cấy trên cùng môi trường LB rắn chứa kanamycin (25 mg/L). Các khuẩn lạc được biến nạp với vectơ, trong đó được xóa các đoạn của gen đích được chèn vào thông qua PCR, được lựa chọn, và plasmit được thu sử dụng phương pháp tách chiết plasmit. Plasmit thu được sau đó được đặt tên là pDZ- Δ *mcbR*.

Ví dụ 9-2: Điều chế và đánh giá các chủng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh L-metionin

Vecto pDZ- Δ mcbR được điều chế trong ví dụ 9-1 bằng cách tái tổ hợp tương đồng trên nhiễm sắc thể được biến nạp vào từng chủng CJP1-R407H và CJP1, đã được điều chế trong ví dụ 6, bằng điện biến nạp (van der Rest *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:541–545, 1999). Sau đó, tái tổ hợp thứ cấp được thực hiện trên môi trường rắn chứa X-gal. Các chủng trong đó gen *mcbR* bị xóa được xác nhận bằng phương pháp PCR với các chủng biến nạp *Corynebacterium glutamicum*, trong đó tái tổ hợp thứ cấp được hoàn thành, sử dụng cặp mồi SEQ ID NO. 38 và SEQ ID NO. 39. Các chủng tái tổ hợp được đặt tên là “CJP1-R407H Δ mcbR” và “CJP1 Δ mcbR”, tương ứng.

Để phân tích khả năng sản sinh L-metionin của chủng điều chế CJP1-R407H Δ mcbR, chủng được nuôi cấy cùng với chủng CJP1 Δ mcbR theo phương thức sau đây.

Corynebacterium glutamicum CJP1 Δ mcbR và chủng theo sáng chế (*Corynebacterium glutamicum* CJP1-R407H Δ mcbR) được cấy vào 250 mL bình tam giác chứa môi trường nuôi cấy giống dưới đây (25 mL), và sau đó được nuôi cấy lắc tại 30°C, ở 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy giống (1 mL) được cấy vào 250 mL bình tam giác chứa môi trường sản xuất dưới đây (24 mL), và sau đó được nuôi cấy lắc tại 30°C, ở 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các thành phần của môi trường nuôi cấy giống và môi trường sản xuất như sau:

Môi trường nuôi cấy giống (độ pH 7,0)

glucoza 20 g, pepton 10 g, cao nấm men 5 g, ure 1,5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, biotin 100 µg, thiamin HCl 1.000 µg, canxi pantothenat 2.000 µg, nicotinamit 2.000 µg (trong 1 L nước cất)

Môi trường sản xuất (độ pH 8,0)

glucoza 50 g, (NH₄)₂S₂O₃ 12 g, cao nấm men 5 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 1,2 g, biotin 100 µg, thiamin HCl 1.000 µg, canxi pantothenat 2.000 µg, nicotinamit 3.000 µg, CaCO₃ 30 g (trong 1 L nước cất)

Sau khi nuôi cấy sử dụng phương pháp nuôi cấy bên trên, nồng độ L-metionin trong từng môi trường nuôi cấy được phân tích, và các kết quả được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6: Đánh giá khả năng sản sinh L-metionin của các chủng điều chế

Chủng	L-Metionin (g/L)
CJP1 Δ <i>mcbR</i>	0,01
CJP1-R407H Δ <i>mcbR</i>	0,19

Kết quả là, xác nhận rằng trong chủng có chứa sửa đổi R407H *hom*, khả năng sản sinh L-metionin được cải thiện 0,18 g/L so với chủng đối chứng.

Dựa vào các kết quả bên trên, xác nhận rằng hàm lượng L-metionin sản sinh có thể tăng đáng kể sử dụng *hom* sửa đổi của sáng chế.

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 xác định bằng phần yêu cầu bảo hộ dưới đây thay vì 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. Homoserin dehydrogenaza biến đổi, trong đó trong trình tự axit amin SEQ ID NO. 1, axit amin tại vị trí thứ 407 được thay thế bằng histidin.
2. Polynucleotit mã hóa homoserin dehydrogenaza biến đổi theo điểm 1.
3. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa homoserin dehydrogenaza biến đổi theo điểm 1.
4. Vi sinh vật theo điểm 3, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin.
5. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó L-axit amin nguồn gốc homoserin là ít nhất một loại được lựa chọn từ nhóm bao gồm L-threonin, L-isoleuxin, O-axetyl homoserin, và L-metionin.
6. Vi sinh vật theo điểm 3, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.
7. Phương pháp sản xuất homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin, phương pháp bao gồm nuôi cấy trong môi trường vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa homoserin dehydrogenaza biến đổi theo điểm 1.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp còn bao gồm thu hồi homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin từ vi sinh vật được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy.
9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó L-axit amin nguồn gốc homoserin là ít nhất một loại được lựa chọn từ nhóm bao gồm L-threonin, L-isoleuxin, O-axetyl homoserin, và L-metionin.
10. Phương pháp theo điểm 7, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.
11. Phương pháp cải thiện sản xuất homoserin hoặc L-axit amin nguồn gốc homoserin trong vi sinh vật, phương pháp bao gồm tăng cường hoạt tính của homoserin dehydrogenaza biến đổi theo điểm 1.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> HOMOSERIN DEHYDROGENAZA BIẾN ĐỔI, POLYNUCLEOTIT, VI SINH VẬT, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT, VÀ PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN SẢN XUẤT HOMOSERIN HOẶC L-AXIT AMIN NGUỒN GỐC TỪ HOMOSERIN

<130> OPA19096

<150> KR 10-2018-0167599

<151> 2018-12-21

<160> 41

<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

gatatctcaa agccacgtga aggcggtgca cctgagctgc treactgagga cgcttttgca 240
ctcatcgagc gcgaggatgt tgacatcgtc gttgagggtta tcggcggcat tgagtacca 300
cgtgaggtag ttctcgcagc tctgaaggcc ggcaagtctg ttggtaccgc caataaggct 360
cttgttgtag ctcaactctgc tgagcttgct gatgcagcgg aagccgcaaa cgttgacctg 420
tacttcgagg ctgctggtgc aggcgcaatt ccagtgggtg gccactgcg tcgctccctg 480
gctggcgatc agatccagtc tgtgatgggc atcgttaacg gcaccaccaa cttcatcttg 540
gacgccatgg attccaccgg cgctgactat gcagattctt tggctgaggc aactcgtttg 600
ggttacgccc aagctgatcc aactgcagac gtcgaaggcc atgacgccgc atccaaggct 660
gcaattttgg catccatcgc tttccacacc cgtggtaccg cggatgatgt gtactgcgaa 720
ggtatcagca acatcagcgc tgccgacatt gaggcagcac agcaggcagg ccacaccatc 780
aagttggttg ccatctgtga gaagttcacc aacaaggaag gaaagtcggc tatttctgct 840
cgcgtgcacc cgactctatt acctgtgtcc caccactgg cgtcggtaaa caagtccttt 900
aatgcaatct ttggtgaagc agaagcagct ggtcgcctga tgttctacgg aaacggtgca 960
ggtggcgcgc caaccgcgtc tgctgtgctt ggcgacgctg ttggtgccgc acgaaacaag 1020
gtgcacggtg gccgtgctcc aggtgagtcc acctacgcta acctgccgat cgctgatttc 1080
ggtgagacca ccaactgta ccacctcgac atggatgtgg aagatcgcgt gggggttttg 1140
gctgaattgg ctagcctggt ctctgagcaa ggaatctccc tgcgtacaat ccgacaggaa 1200
gagcgcgatg atgatgcagc tctgatcgtg gtcaccact ctgcgctgga atctgatctt 1260
tcccgaccg ttgaactgct gaaggctaag cctgttgta aggcaatcaa cagtgtgatc 1320
cgctcgtaaa gggactaa 1338

<210> 3
<211> 930
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> gen thrB

<400> 3
atggcaattg aactgaacgt cggcgtgtaag gttaccgtca cggtaacctgg atcttctgca 60
aacctcggac ctggctttga cacttttaggt ttggcactgt cggatatacga cactgtcgaa 120
gtggaaatta ttccatctgg cttggaagtg gaagtttttg gcgaaggcca aggcgaagtc 180
cctcttgatg gctcccacct ggtgggttaaa gctattcgtg ctggcctgaa ggcagctgac 240
gctgaagttc ctggattgcg agtgggtgtc cacaacaaca ttccgcagtc tcgtggctctt 300
ggctcctctg ctgcagcggc ggttgctggt gttgctgcag ctaatggttt ggcggatttc 360
ccgctgactc aagagcagat tgttcagttg tcctctgcct ttgaaggcca ccagataat 420

gctgcggtt ctgtgctggg tggagcagtg gtgtcgtgga caaatctgtc tatcgacggc 480
 aagagccagc cacagtatgc tgctgtacca cttgaggtgc aggacaatat tcgtgcgact 540
 gcgctggttc ctaatttcca cgcattccacc gaagctgtgc gccgagtcct tcccactgaa 600
 gtcactcaca tcgatgcgcg atttaacgtg tcccgcgttg cagtgatgat cgttgcggtg 660
 cagcagcgtc ctgatttgct gtgggagggg actcgtgacc gtctgcacca gccttatcgt 720
 gcagaagtgt tgcctattac ctctgagtgg gtaaaccgcc tgcgcaaccg tggctacgcy 780
 gcataccttt ccggtgccgg cccaaccgcc atgggtcgtg cactgagcc aattccagac 840
 aaggtttttg aagatgctcg tgagtctggc attaaggtgc ttgagcttga ggttgccggga 900
 ccagtcaagg ttgaagttaa ccaaccttag 930

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 4
 ctgcgacagc atggaact 18

<210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 5
 caacgacaaa cgcccatc 18

<210> 6
 <211> 2778
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn gen

<400> 6
 ctgcgacagc atggaactca gtgcaatggc tgtaaggcct gcaccaacaa tgattgagcg 60
 aagctccaaa atgtcctccc cgggttgata ttgattttca taaatatact aaaaatcttg 120
 agagtttttc cgttgaaaac taaaaagctg ggaagggtgaa tcgaatttgc gggctttaa 180
 gcaaaaatga acagcttggc ctatagtggc taggtaccct ttttgtttg gacacatgta 240

gggtggccga aacaaagtaa taggacaaca acgctogacc gcgattatth ttggagaatc	300
atgacctcag catctgcccc aagctttaa cccggcaagg gtcccggctc agcagtcgga	360
attgcccttt taggattcgg aacagtcggc actgaggtga tgcgtctgat gaccgagtac	420
ggtgatgaac ttgcgaccgc cattggtggc cactggagg ttcgtggcat tgctgtttct	480
gatatctcaa agccacgtga aggcgttgca cctgagctgc tccactgagga cgcttttgca	540
ctcatcgagc gcgaggatgt tgacatcgtc gttgaggtta tggcggcgat tgagtacca	600
cgtgaggtag ttctcgcagc tctgaaggcc ggcaagtctg ttgttaccgc caataaggct	660
cttgttgag ctcactctgc tgagcttgc gatgcagcgg aagccgaaa cgttgacctg	720
tacttcgagg ctgctgttgc aggcgcaatt ccagtggttg gccactgcg tcgctccctg	780
gctggcgatc agatccagtc tgtgatgggc atcgtaaac gcaccaccaa ctcatcttg	840
gacgccatgg attccaccgg cgctgactat gcagattctt tggctgaggc aactcgtttg	900
ggttacgccg aagctgatcc aactgcagac gtcgaaggcc atgacgccgc atccaaggct	960
gcaatthtg catccatcgc thccacacc cgtgttaccg cggatgatgt gtactcggaa	1020
ggtatcagca acatcagcgc tgccgacatt gaggcagcac agcaggcagg ccacaccatc	1080
aagttgttg ccatctgtga gaagtcacc aacaaggaag gaaagtcggc tathctgct	1140
cgctgcacc cgactctatt acctgtgtcc caccactgg cgtcggtaaa caagtccttt	1200
aatgcaatct ttgttgaagc agaagcagct ggtcgcctga tgttctacgg aaacggtgca	1260
ggtggcgcgc caaccgcgc tgctgtgctt ggcgacgtc ttggtgccgc acgaaacaag	1320
gtgcacggtg gccgtgctcc aggtgagtcc acctacgta acctgccgat cgctgatttc	1380
ggtgagacca cactcgtta ccacctgac atggatgtgg aagatcgcgt ggggttttg	1440
gctgaattgg ctagcctgtt ctctgagcaa ggaatctccc tgcgtacaat ccgacaggaa	1500
gagcgcgatg atgatgcag tctgatcgtg gtcaccact ctgcgctgga atctgatctt	1560
tcccgaccg ttgaactgct gaaggctaag cctgttgta aggcaatcaa cagtgtgatc	1620
cgctcgaag gggactaatt ttactgacat ggcaattgaa ctgaacgtc gtcgtaagg	1680
taccgtcacg gtacctggat cttctgcaaa cctcggacct ggctttgaca ctttaggttt	1740
ggcactgtcg gtatacgaca ctgtcgaagt ggaaattatt ccatctggct tggagtgga	1800
agthtttggc gaaggccaag gcgaagtccc tcttgatggc tcccacctgg tggtaaaagc	1860
tattcgtgct ggcctgaagg cagctgacgc tgaagttcct ggattcgcag tgggtgcca	1920
caacaacatt ccgcagctc gtggtcttg ctcctctgct gcagcggcg ttgctggtgt	1980
tgctgcagct aatggtttg cggatttccc gctgactcaa gagcagattg ttcagttgtc	2040
ctctgccttt gaaggccacc cagataatgc tgcggcttct gtgctgggtg gagcagtggt	2100
gtcgtggaca aatctgtcta tcgacggcaa gagccagcca cagtatgctg ctgtaccact	2160

tgagggtgcag gacaatattc gtgcgactgc gctggttcct aatttccacg catccaccga 2220
 agctgtgcgc cgagtccttc ccaactgaagt cactcacatc gatgcgcgat ttaacgtgtc 2280
 ccgcggttgcg gtgatgatcg ttgcggttgcg gcagcgtcct gatttgctgt gggaggggtac 2340
 tcgtgaccgt ctgcaccagc cttatcgtgc agaagtgttg cctattacct ctgagtggtg 2400
 aaaccgcctg cgcaaccgtg gctacgcggc atacctttcc ggtgccggcc caaccgcat 2460
 ggtgctgtcc actgagccaa ttccagacaa ggttttgaa gatgctcgtg agtctggcat 2520
 taagggtgctt gagcttgagg ttgcgggacc agtcaaggtt gaagttaacc aaccttaggc 2580
 ccaacaagga aggcccccctt cgaatcaaga agggggcctt attagtgcag caattattcg 2640
 ctgaacacgt gaaccttaca ggtgccggc gcggtgagtg gtttgagttc cagctggatg 2700
 cggttgtttt caccgaggct ttcttgatg aatccggcgt ggatggcgca gacgaaggct 2760
 gatgggcgctt tgcgcttg 2778

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

<220>
 <223> R407H

<400> 7
 atgacctcag catctgcccc aagctttaac cccggcaagg gtcccggctc agcagtcgga 60
 attgcccttt taggattcgg aacagtcggc actgaggtga tgcgtctgat gaccgagtac 120
 ggtgatgaac ttgcgcaccg cattggtggc ccaactggagg ttcgtggcat tgctgtttct 180
 gatatactcaa agccacgtga aggcggttgc cctgagctgc tcaactgagga cgcttttgca 240
 ctcatcgagc gcgaggatgt tgacatcgtc gttgaggtta tcggcggcat tgagtaccca 300
 cgtgaggtag ttctcgcagc tctgaaggcc ggcaagtctg ttgttaccgc caataaggct 360
 cttgttgacg ctcaactctgc tgagcttgct gatgcagcgg aagccgaaa cgttgacctg 420
 tacttcgagg ctgctgttgc aggcgcaatt ccagtggttg gcccaactgcg tcgctccctg 480
 gctggcgatc agatccagtc tgtgatgggc atcgttaacg gcaccaccaa ctcatcttg 540
 gacgccatgg attccaccgg cgctgactat gcagattctt tggctgaggc aactcgtttg 600
 ggttacgccg aagctgatcc aactgcagac gtogaaggcc atgacgccgc atccaaggct 660
 gcaattttg catccatcgc tttccacacc cgtgttaccg cggatgatgt gtaactgcgaa 720
 ggtatcagca acatcagcgc tgccgacatt gaggcagcac agcaggcagg ccacaccatc 780
 aagttgttg ccactctgga gaagttcacc aacaaggaag gaaagtcggc tatttctgct 840
 cgcgtagcacc cgactctatt acctgtgtcc caccactgg cgtcggtaaa caagtccttt 900
 aatgcaatct ttgttgaagc agaagcagct ggtcgcctga tgttctacgg aaacggtgca 960

```

ggtggcgcgc caaccgcgtc tgctgtgctt ggcgacgtcg ttggtgccgc acgaaacaag      1020
gtgcacgggtg gccgtgctcc aggtgagtcc acctacgcta acctgccgat cgctgatttc      1080
ggtgagacca ccaactcgta ccacctcgac atggatgtgg aagatcgcgt ggggggttttg      1140
gctgaattgg ctagcctggt ctctgagcaa ggaatctccc tgcgtacaat cgcacaggaa      1200
gagcgcgatg atgatgcaca tctgatcgtg gtcaccact ctgcgctgga atctgatctt      1260
tcccgcaccg ttgaactgct gaaggctaag cctgttggtta aggcaatcaa cagtgtgatc      1320
cgcctcgaaa gggactaa                                     1338

```

```

<210>      8
<211>     445
<212>     PRT
<213>     Trình tự nhân tạo

<220>
<223>     homoserin dehydrogenaza R407H

```

```

<400>      8
Met Thr Ser Ala Ser Ala Pro Ser Phe Asn Pro Gly Lys Gly Pro Gly
  1           5           10           15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 9
 tcgagctcgg taccctcgcg acagcatgga actc

34

<210> 10
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 10
 ctctagagga tccccttagt ccctttcgag gcgg 34

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 11
 caccggcgct gactatgc 18

<210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 12
 tgggtgacca cgatcagat 19

<210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 13
 ttagtcctt tcgaggcg 18

<210> 14
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> lysC(L377K)

<400> 14
 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>	15		
<211>	34		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mỗi		
<400>	15		
tcgagctcgg tacccgctgc gcagtgttga atac			34
<210>	16		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mỗi		
<400>	16		
tggaaatcctt ttcgatgttc acgttgacat			30
<210>	17		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mỗi		
<400>	17		
atgtcaacgt gaacatcgaa aagatttcca			30
<210>	18		
<211>	34		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mỗi		
<400>	18		
ctctagagga tccccgttca cctcagagac gatt			34

<210> 19
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mở

 <400> 19
 acggatccca gactccaaag caaaagcg 28

 <210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mở

 <400> 20
 acaccacggc agaaccaggt gcaaaggaca 30

 <210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mở

 <400> 21
 ctggttctgc cgtggtgtgc atcatctctg 30

 <210> 22
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mở

 <400> 22
 acggatccaa ccaaacttgc tcacactc 28

 <210> 23
 <211> 1161
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> gen metB

 <400> 23
 ttgtcttttg acccaaacac ccagggtttc tccactgcat cgattcacgc tgggtatgag 60

ccagacgact actacggttc gattaacacc ccaatctatg cctccaccac cttcgcgcag 120
 aacgctccaa acgaactgcg caaaggctac gactacaccc gtgtgggcaa ccccaccatc 180
 gtggcattag agcagaccgt cgcagcactc gaaggcgcaa agtatggccg cgcattctcc 240
 tccggcatgg ctgcaaccga catcctgttc cgcacatcc tcaagccggg cgcacacatc 300
 gtccctcggca acgatgctta cggcgggaacc taccgcctga togacaccgt attcaccgca 360
 tggggcgtcg aatacaccgt tgttgatacc tccgtcgtgg aagaggtcaa ggcagcgcac 420
 aaggacaaca ccaagctgat ctgggtggaa accccaacca acccagcact tggcatcacc 480
 gacatcgaag cagtagcaaa gctcaccgaa ggcaccaacg ccaagctggt tgttgacaac 540
 acctcgcac cccatacct gcagcagcca ctaaaactcg gcgcacacgc agtcctgcac 600
 tccaccacca agtacatcgg aggacactcc gacgttgttg gcggccttgt ggttaccaac 660
 gaccaggaaa tggacgaaga actgctgttc atgcagggcg gcacccgacc gatcccatca 720
 gttttogatg catacctgac cgcctgtggc ctcaagacc ttgcagtgcg catggatcgc 780
 cactcgcgaca acgcagaaaa gatcgcggaa ttctcggact cccgcccaga ggtctccacc 840
 gtgctctacc caggtctgaa gaaccacca gccacgaag tcgcagcga gcatgaag 900
 cgttcggcg gcacgatctc cgtccgtttc gcaggcggcg aagaagcagc taagaagttc 960
 tgtacctcca ccaactgat ctgtctggcc gagtcctcgt gtggcgtgga atccctcctg 1020
 gagcaccag caacatgac ccaccagtca gctgccggct ctcagctoga ggtccccgc 1080
 gacctcgtgc gcacatccat tggattgaa gacattgaag acctgctcgc agatgtcgag 1140
 caggccctca ataacttta g 1161

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 24
 tctagacgcc cgcatactgg cttc 24

<210> 25
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 25
 cccatccact aaacttaaac agatgtgatc gcccgcc 37

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 26
 tgtttaagtt tagtggatgg ggaagaacca cccaggcc

38

<210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 27
 gtcgaccaat cgtccagagg gcg

23

<210> 28
 <211> 1314
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> gen metY

<400> 28
 atgccaaagt acgacaattc caatgctgac cagtggggct ttgaaaccg ctccattcac 60
 gcaggccagt cagtagacgc acagaccagc gcacgaaacc ttccgatcta ccaatocacc 120
 gctttcgtgt tcgactcgc tgagcacgcc aagcagcgtt tcgcaactga ggatctaggtc 180
 cctgtttact cccgcctcac caaccaacc gttgaggctt tggaaaaccg catcgcttcc 240
 ctcgaaggtg gcgtccacgc tgtagcgttc tcctccggac aggccgcaac caccaacgcc 300
 attttgaacc tggcaggagc gggcgaccac atcgtcacct cccacgcct ctacggtggc 360
 accgagactc tattccttat cactcttaac cgcctgggta tcgatgttcc cttcgtggaa 420
 aaccccgacg accctgagtc ctggcaggca gcggttcagc caaacaccaa agcattcttc 480
 ggcgagactt tcgccaacc acaggcagac gtccctggata ttccctgcggt ggetgaagtt 540
 gcgcaccgca acagcgttcc actgatcadc gacaacacca tcgctaccgc agcgtctgtg 600
 cgcccgcctc agctcggcgc agacgttgtc gtcgcttccc tcaccaagtt ctacaccggc 660
 aacggctccg gactgggcgg cgtgcttacc gacggcgaa agttcgattg gactgtcgaa 720
 aaggatggaa agccagtatt cccctacttc gtcactccag atgctgctta ccacggattg 780
 aagtacgcag accttgggtgc accagccttc ggccctcaagg ttcgcgttgg ccttctacgc 840

gacaccggct ccaccctctc cgcattcaac gcatgggctg cagtccaggg catcgacacc 900
 ctttcctgc gcttggagcg ccacaacgaa aacgccatca aggttgaga attcctcaac 960
 aaccacgaga aggtggaaaa ggttaacttc gcaggcctga aggattcccc ttggtacgca 1020
 accaaggaaa agcttggcct gaagtacacc ggctccgttc tcaccttga gatcaagggc 1080
 ggcaaggatg aggttgggc atttatcgac gcctgaagc tacactcaa ccttgcaaac 1140
 atcggcgatg ttcgctccct cgttggtcac ccagcaacca ccaccattc acagtccgac 1200
 gaagctggcc tggcacgcgc gggcgttacc cagtccaccg tccgctgtc cgttggcatc 1260
 gagaccattg atgatatcat cgtgaccto gaaggcggct ttgctgcaat ctag 1314

<210> 29
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 29
 tctagaccat cctgcacat ttag 24

<210> 30
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 30
 cccatccact aaacttaaac acgctcctgc caggttc 37

<210> 31
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 31
 tgtttaagtt tagtggatgg gcttggtagc caaccaagg 39

<210> 32
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 32
gtcgcagcatt gctccggcctt cgg

23

<210> 33
<211> 2213
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> gen mcbR

<400> 33
aatctggatt tccgccaggt tttggcacgc ccgtctggtt taggcaatga gataccgaac 60
acacgtgccaa aaagttcggc tttttcgccg atcttgtcac gcctgcctgg tttgtcttgt 120
aaagagtgat ttcattggcg agactoctaa aagtttgacc tcacaggatt gcttctaagg 180
gcctctccaa tctccactga ggtacttaat ccttccgggg aattcggggc cttaaatcga 240
gaaattaggc catcaccttt taataacaat acaatgaata attggaatag gtcgcacacct 300
ttggagcggg gccgggtaaa attggcagca ttcaccgaaa gaaaaggaga accacatgct 360
tgccctaggt tggattacat ggatcattat tgggtgctta gctggttggg ttgcctccaa 420
gattaaaggc actgatgctc agcaaggaat tttgctgaac atagtcgctg gtattatcgg 480
tggtttggtt ggcggctggc tgcttggaaat cttcggagtg gatggtgccg gtggcggcct 540
gatcttcagc ttcattacat gtctgattgg tgctgtcatt ttgctgacga tcgtgcagtt 600
cttccactcg aagaagtaat ctgctttaa tccgtagggc ctggtgatat ttcgatatca 660
acaggccttt tggtcatttt ggggtggaaa aagcgtaga cttgcctgtg gattaaact 720
atacgaaccg gtttgtctat attggtgta gacagttcgt cgtatcttga aacagaccaa 780
cccgaagga cgtggccgaa cgtggctgct agcgcctcag gcaagagtaa aacaagtgcc 840
ggggcaaacc gtcgtcgcaa tcgaccaagc cccgcacagc gtctcctcga tagcgcaacc 900
aaccttttca ccacagaagg tattcgcgctc atcggatttg atcgtatcct ccgtgaagct 960
gacgtggcga aggcgagcct ctattcctt ttcggatoga aggacgcctt ggttattgca 1020
tacctggaga acctcgatca gctgtggcgt gaagcgtggc gtgagcgcac cgtcgggatg 1080
aaggatccg aagataaaat catcgcgctt tttgatcagt gcattgagga agaaccagaa 1140
aaagatttcc gcggctcgca ctttcagaat gcggctagt agtaccctcg ccccgaaact 1200
gatagcgaaa agggcattgt tgcagcagtg ttagagcacc gcgagtggtg tcataagact 1260
ctgactgatt tgctcactga gaagaacggc taccaggca ccaccaggc gaatcagctg 1320
ttggtgttcc ttgatggtg acttgctgga tctcgattgg tccacaacat cagtcctcct 1380
gagacggctc gcgatttggc tcggcagttg ttgtcggctc cacctgcgga ctactcaatt 1440

tagtttcttc attttccgaa ggggtatcctt cgttggggga ggcgtogata agccccttct 1500
 ttttagcttt aacctcagcg cgacgctgct ttaagcgtg catggcgcg cggttcattt 1560
 cacgttgcg ttcgcgctc ttgttcgca tttctttgcy ggcctgttt gcttcgttga 1620
 tttcggcagt acgggttttg gtgagttcca cgtttgttgc gtgaagcgtt gaggcgttcc 1680
 atggggtag aatcatcagg gcgcggtttt tgcgctggtt ccacaggaag atgcgctttt 1740
 ctttttgttt tgcgcggtag atgtcgcgct gctctaggty gtgcactttg aaatcgtcgg 1800
 taagtgggta tttgcttcc aaaatgacca tcatgatgat tgtttggagg agcgtccaca 1860
 ggttggtgct gacccaatag agtgcgattg ctgtggggaa tggctctgtg aggccaaggg 1920
 acagtgggaa gatcggcgcg aggatcgaca tcacgatcat gaacttcagc atgccgtag 1980
 agaatccgga tgcgtaatcg ttggtttgga agctgcggta catggacatc gccatggtga 2040
 ttgcggtag gattgcgct gtgatgaaca gtggcaaac gaaactaaga acttccgct 2100
 gcgtggtgct caaatatttt agctgctcag tgggcatcga aacataagcg ggcagaggca 2160
 cattgctcac gcgaccagcg aggaaagatt ccaacttctc aggagttagg aag 2213

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 34
 ggccccggcc tgcctggttt gtcttgta 28

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 35
 cggaaaatga agaaagttcg gccacgtcct ttcgg 35

<210> 36
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 36
 aggacgtggc cgaactttct tcattttccg aaggg 35

<210> 37
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 37
 atccccgggt ttcgatgccc actgagca

28

<210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 38
 aatctggatt tccgccaggt

20

<210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 39
 cttcctaact cctgaggaag

20

<210> 40
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> homoserin dehydrogenaza (ATCC14067)

<400> 40
 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> 41
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> homoserin dehydrogenaza (ATCC13869)

<400> 41
 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 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 Lys Ala Ile Asn Ser Val Ile Arg Leu Glu Arg Asp
 435 440 445