



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026227

(51)⁷ C12N 1/21; C12P 13/22; C12N 15/70

(13) B

(21) 1-2014-02613

(22) 07/01/2013

(86) PCT/KR2013/000072 07/01/2013

(87) WO2013/103268 11/07/2013

(30) 10-2012-0001819 06/01/2012 KR

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/12/2014 321A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea

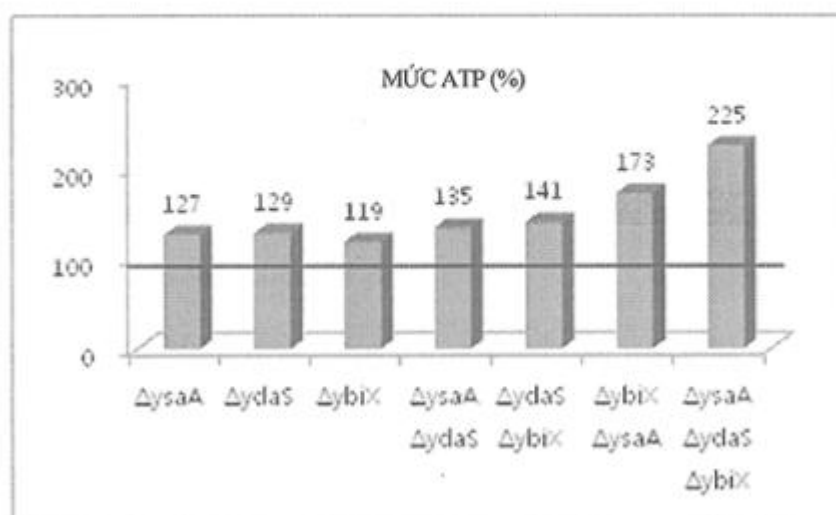
(72) CHEONG, Ki Yong (KR); LEE, Seok Myung (KR); HWANG, Young Bin (KR);
LEE, Keun Cheol (KR); LEE, Kwang Ho (KR).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHỦNG *ESCHERICHIA COLI* TÁI TỔ HỢP SẢN XUẤT L-THREONIN HOẶC L-TRYPTOPHAN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-THREONIN HOẶC L-TRYPTOPHAN SỬ DỤNG CHỦNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật có khả năng sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan, và phương pháp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan sử dụng vi sinh vật này. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến: *Escherichia coli* tái tổ hợp có hiệu quả hơn trong việc sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan bằng cách tăng khả năng sản xuất ATP được sử dụng làm nguồn năng lượng phong phú nhất trong tế bào khi sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan; và phương pháp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan nhờ sử dụng vi sinh vật này.

CHỦNG SẢN XUẤT L-THREONIN



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

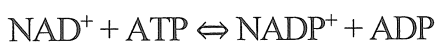
Sáng chế đề cập đến vi sinh vật có khả năng sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan và đến phương pháp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Như đã biết rằng các vi sinh vật sản xuất các sản phẩm hữu dụng thông qua lên men yêu cầu lượng lớn năng lượng như ATP khi con đường sinh tổng hợp được tăng cường.

Như đã biết trong các giải pháp kỹ thuật hiện nay, rất quan trọng rằng sự cân bằng nội bào giữa nicotinamid adenin dinucleotit (nicotinamide adenine dinucleotide - NAD(H)) được sản xuất bằng phản ứng dị hóa và nicotinamid adenin dinucleotit phosphat (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate -NADP(H)) được sử dụng trong các phản ứng đồng hóa trong các quy trình trao đổi chất ở vi sinh vật. NAD(H) là chất trung gian trong các phản ứng dị hóa tạo thành ATP thông qua sự oxy hóa thức ăn và có chức năng làm nguồn năng lượng. NADP(H) đóng vai trò trong việc cung cấp năng lượng giảm trong quá trình trao đổi chất *in vivo*, đó là cung cấp các electron năng lượng cao cần thiết để tổng hợp các phân tử bằng phản ứng với enzym thường xúc tác phản ứng đồng hóa. Sự cân bằng giữa chúng được điều hòa hoặc bởi sự phosphoryl hóa của NAD như được thể hiện trong phương trình 1) sau đây hoặc bởi dephosphoryl hóa của NADP như được thể hiện trong công thức 2) sau đây.

Phương trình 1)



Phương trình 2)



Do đó, để sản xuất một cách có hiệu quả năng lượng giảm như NADPH, nguồn phosphat như ATP nên được tăng đồng thời.

ATP (Adenozin-5'-triphosphat) có liên kết phosphat năng lượng cao, và tạo ra năng lượng khi nó được thủy phân thành ADP và phosphat. ATP được sản xuất chủ yếu nhờ sự phosphoryl hóa thẩm thấu thông qua hệ thống vận chuyển electron trong vi sinh vật hoặc bởi sự phosphoryl hóa mức cơ chất. ATP tạo ra được phân hủy để cung cấp năng lượng yêu cầu cho tế bào và được tái sử dụng bằng cách tái tạo lại thông qua con đường thủy phân glucoza hoặc phosphoryl hóa oxy hóa.

Từ thực tế này, các nghiên cứu được thực hiện để áp dụng quy trình tái tạo năng lượng ATP của vi khuẩn vào sản xuất sinh khối các sản phẩm hữu dụng nhằm tạo điều kiện thuận lợi cho việc cung cấp năng lượng (Biosci Biotechnol Biochem., (1997) 61: 840-845). Trong các nghiên cứu về sự tái tạo ATP trong *E. coli*, đã thấy rằng mức ATP trong vi sinh vật là khoảng 150% lớn hơn so với trong chủng bố mẹ khi một số gen, bao gồm *ysaA* (NCBI Gene ID: 948085), *ydaS* (NCBI Gene ID: 945923) và *ybiX* (NCBI Gene ID: 947502) bị thiếu hụt một cách tương ứng, và phát hiện này được áp dụng cho quá trình sản xuất glutathion (FEMS Microbiol Lett., (2009) 297:217-224). Tuy nhiên, không có báo cáo trực tiếp nào giải thích về sự tăng sản xuất axit amin gây ra bởi sự suy giảm hoạt tính của protein được mã hóa bởi các gen.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng sự tăng mức ATP nội bào được sử dụng làm nguồn năng lượng dồi dào nhất trong các tế bào sản xuất L-axit amin, có hiệu quả trong việc tăng sự sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan, từ đó hoàn thiện sáng chế.

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng *E. coli* tái tổ hợp có khả năng sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan tăng nhờ tăng sự tạo thành ATP.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan sử dụng chủng *E. coli* tái tổ hợp.

Nhằm hoàn thành các mục đích nêu trên, theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng *E. coli* tái tổ hợp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan, trong đó chủng này được cải biến để làm yếu đi hoạt tính của ít nhất một protein được lựa chọn từ nhóm bao gồm protein YsaA có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, protein YdaS có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4, và protein YbiX có trình tự axit amin được

thể hiện bởi SEQ ID NO: 6.

Một phương án của sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan, bao gồm bước nuôi cấy chủng *E. coli* tái tổ hợp.

Sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan được cải thiện nhờ sự tăng mức ATP nội bào trong vi sinh vật có khả năng tạo L-threonin hoặc L-tryptophan. Theo sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp tăng sự sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan bằng cách khôi phục sự cân bằng sự trao đổi năng lượng để làm tăng hoạt tính tế bào và làm giảm thời gian nuôi cấy.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện mức ATP tương đối (%) của chủng sản xuất L-threonin so với mức trong chủng bố mẹ.

FIG. 2 thể hiện mức ATP tương đối (%) của chủng sản xuất L-tryptophan so với mức trong chủng bố mẹ.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Một phương án của sáng chế đề xuất chủng *E. coli* tái tổ hợp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan, trong đó chủng này được cải biến để làm suy yếu hoạt tính của ít nhất một protein được lựa chọn từ nhóm bao gồm protein YsaA có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, protein YdaS có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4, và protein YbiX có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 6.

Vi sinh vật sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan có thể được sử dụng trong sáng chế có thể là bất kỳ vi sinh vật nào có khả năng sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan, như vi khuẩn *Escherichia* sp., *E. coli*, vi khuẩn *Corynebacterium*, vi khuẩn *Serratia* sp., vi khuẩn *Providencia* sp., hoặc loài tương tự. Cụ thể là, vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* có thể được sử dụng.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, chủng *E. coli* tái tổ hợp CJ600 (KCCM 10812P) (Đăng ký patent Hàn Quốc số 10-0792095) có khả năng sản xuất L-tryptophan được sử dụng, thu được bằng cách xử lý kỹ thuật gen chủng *E. coli* tái tổ hợp (KFCC 10066)

có khả năng sản xuất L-phenylalanin để khử nhạy đối với sự khuyết dưỡng tryptophan, ngăn chặn sự sinh tổng hợp L-phenylalanin và tăng cường gen liên quan đến sinh tổng hợp tryptophan.

Theo phương án cụ thể khác của sáng chế, chủng *E. coli* tái tổ hợp FTR2533 (KCCM-10541) (Đăng ký patent Hàn Quốc số 10-0576342) có khả năng sản xuất L-threonin được sử dụng, thu được bằng cách xử lý kỹ thuật gen chủng *E. coli* đột biến (KFCC 10718) có khả năng sản xuất L-threonin để bất hoạt gen kiểu dại *galR*.

YsaA, protein có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, được dự đoán là hydrogenaza của thành phần kiểu ferredoxin 4Fe-4S, nhưng chức năng chính xác của nó là chưa được xác định.

YdaS, protein có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4, được dự đoán là chất điều hòa phiên mã liên kết ADN, nhưng chức năng chính xác của nó chưa được xác định.

YbiX, protein có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 6, là một trong số liên họ oxygenaza phụ thuộc Fe(II), có chức năng là một oxidoreductaza mà oxy hóa cơ chất sử dụng oxy.

Polypeptit YsaA, YdaS và YbiX theo sáng chế có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NOS: 2, 4 và 6, một cách tương ứng, nhưng không bị giới hạn chỉ ở các trình tự này, vì trình tự axit amin của protein có thể phụ thuộc vào loại hoặc chủng vi sinh vật.

Theo cách khác, các protein theo sáng chế có thể là thể đột biến hoặc các biến thể nhân tạo mã hóa protein mà có trình tự axit amin bao gồm sự thay thế, loại bỏ, chèn, bổ sung hoặc đảo một hoặc vài axit amin ở một hoặc nhiều vị trí của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, 4 hoặc 6, miễn là các thể đột biến hoặc biến thể nhân tạo có thể hữu dụng trong việc tăng sự sản xuất axit amin bằng cách làm suy giảm các hoạt tính mô tả trong sáng chế. Ở đây, con số “vài” axit amin thay đổi phụ thuộc vào vị trí hoặc loại gốc axit amin trong cấu trúc ba chiều của protein, nhưng cụ thể là từ 2 đến 20, cụ thể hơn là từ 2 đến 10, hoặc cụ thể hơn nữa là từ 2 đến 5. Ngoài ra, việc thay thế, loại bỏ, chèn, bổ sung hoặc đảo các axit amin cũng bao gồm các thay đổi gây ra bởi sự đột biến xảy ra tự nhiên hoặc sự cải biến nhân tạo dựa trên sự khác biệt trong mỗi cá thể hoặc mỗi loài vi sinh vật có hoạt tính của polypeptit.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "làm yếu đi" có nghĩa là hoạt tính của protein bị làm yếu đi hoặc bằng cách xoá một hoặc tất cả các gen mã hóa protein, hoặc bằng cách cải biến trình tự điều hòa biểu hiện để làm giảm sự biểu hiện của gen, hoặc bằng cách cải biến trình tự gen trong nhiễm sắc thể để làm yếu đi hoạt tính của protein, hoặc bằng tổ hợp các phương pháp này.

Trong sáng chế, sự làm yếu hoạt tính có thể đạt được bằng phương pháp được lựa chọn từ nhóm bao gồm: 1) loại bỏ một phần hoặc tất cả polynucleotit mã hóa protein; 2) cải biến trình tự điều hòa biểu hiện để làm giảm sự biểu hiện của polynucleotit; 3) cải biến trình tự polynucleotit trong nhiễm sắc thể để làm suy yếu hoạt tính của protein; và 4) tổ hợp các phương pháp này.

Phương pháp loại bỏ một phần hoặc toàn bộ polynucleotit mã hóa protein có thể được thực hiện bằng cách thay thế polynucleotit mã hóa protein đích nội sinh trong nhiễm sắc thể, với hoặc polynucleotit mà một phần của trình tự axit amin bị loại bỏ hoặc gen đánh dấu thông qua vector chèn trong nhiễm sắc thể.

Ở đây, thuật ngữ "một phần" trình tự axit amin thay đổi phụ thuộc vào loại gen, không xét đến vị trí của chúng, và cụ thể là từ 1 đến 200, cụ thể hơn là từ 1 đến 100, và cụ thể hơn nữa là từ 1 đến 50.

Tương tự, phương pháp cải biến trình tự điều hòa biểu hiện để làm giảm sự biểu hiện của polynucleotit có thể thực hiện hoặc bằng cách gây đột biến trong trình tự điều hòa biểu hiện của một hoặc nhiều nucleotit bằng việc loại bỏ, chèn, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn, hoặc tổ hợp các phương pháp này, để làm suy yếu hoạt tính của trình tự điều hòa biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế trình tự điều hòa biểu hiện với hoạt tính yếu hơn. Trình tự điều hòa biểu hiện bao gồm trình tự khởi đầu, trình tự điều khiển, gen mã hóa vị trí liên kết a ribosom, gen điều hoạt sự ngừng sự phiên mã hoặc dịch mã.

Ngoài ra, phương pháp cải biến trình tự polynucleotit trong nhiễm sắc thể mã hóa protein theo sáng chế có thể được thực hiện hoặc bằng cách gây đột biến trong trình tự một hoặc nhiều nucleotit bằng cách loại bỏ, chèn, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn, hoặc tổ hợp các phương pháp, để làm suy yếu hoạt tính của trình tự, hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự nucleotit cải biến có hoạt tính yếu hơn.

Polynucleotit mã hóa protein theo sáng chế có thể được đưa vào tế bào chủ và có thể

được thể bằng codon khó biểu hiện trong vật chủ. Ngoài ra, đầu N hoặc đầu C của nó có thể được mở rộng hoặc bị loại bỏ bỏ, và codon khởi đầu có thể được cải biến để điều hòa mức biểu hiện.

Mỗi một polynucleotit theo sáng chế có thể có trình tự polynucleotit mã hóa protein có độ tương đồng là ít nhất 80%, cụ thể là ít nhất 90%, cụ thể hơn là ít nhất 95%, và cụ thể hơn nữa là ít nhất 97% đối với trình tự axit amin của mỗi trình tự được thể hiện bởi SEQ ID NOS: 2, 4 và 6, miễn là polynucleotit có thể làm suy yếu hoạt tính của protein của biến thể. Cụ thể hơn là, các polynucleotit có trình tự polynucleotit được đặc trưng một cách tương ứng bởi SEQ ID NOS: 1, 3 và 5.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tương đồng" đề cập đến tính đồng nhất giữa hai trình tự axit amin. Sự tương đồng có thể được xác định sử dụng các phương pháp đã biết một cách rộng rãi, ví dụ, chương trình máy tính BLAST 2.0 tính toán các thông số như lỗi, tính đồng nhất và tính đồng dạng.

Tương tự, các trình tự polynucleotit của sáng chế có thể được lai với các trình tự polynucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1, 3 và 5 và các mẫu dò tạo ra bởi trình tự nucleotit mô tả trên đây dưới các điều kiện nghiêm ngặt, và có thể được cải biến các trình tự mã hóa các protein có chức năng bình thường.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "các điều kiện nghiêm ngặt" đề cập đến các điều kiện cho phép sự lai đặc hiệu giữa các polynucleotit. Theo cách khác, thuật ngữ liên quan đến các polypeptit hoặc các protein, bao gồm các dẫn xuất của chúng (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, J. Sambrook *et al.*, Editors, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; or Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel *et al.*, Editors, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Cụ thể là, "các điều kiện nghiêm ngặt" đề cập đến việc lai ở 65 °C trong đệm lai (3,5×SSC, 0,02% Ficoll, 0,02% polyvinylpyrrolidon, 0,02% albumin huyết thanh bò, 2,5 mM NaH₂PO₄ (pH 7), 0,5% SDS, 2 mM EDTA). SSC là natri clorua 0,15 M /natri xitrat 0,15 M ở độ pH 7. Sau khi lai, màng mà ADN được chuyển lên được rửa trong 2×SSC ở nhiệt độ phòng và sau đó trong 0,1-0,5×SSC/0,1×SDS ở 68 °C.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vectơ" đề cập đến cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit của gen mã hóa protein đích được liên kết hoạt động với trình tự điều hòa thích hợp

để có khả năng biểu hiện gen đích trong tế bào chủ thích hợp. Trình tự điều hòa bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng khởi đầu sự phiên mã, trình tự điều khiển bất kỳ để điều hòa sự phiên mã này, trình tự mã hóa vị trí liên kết ARN thông tin ribosom thích hợp, và trình tự điều hòa sự ngừng phiên mã và dịch mã. Một khi được biến nạp vào vật chủ thích hợp, vector có thể sao chép hoặc hoạt động một cách độc lập với hệ gen của vật chủ, hoặc trong một số trường hợp có thể tiếp hợp vào hệ gen của nó.

Vector được sử dụng trong sàng chế không bị giới hạn một cách cụ thể và có thể là bất kỳ vector nào đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, miễn là nó có thể sao chép trong vật chủ. Ví dụ về các vector thường được sử dụng bao gồm các plasmid, cosmid, virus và thể thực khuẩn tự nhiên hoặc tái tổ hợp. Ví dụ, vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmid bao gồm pWE15, M13, λ BL3, λ BL4, λ XII, λ SHIII, λ PII, λ 10, λ 11, Charon4A, và Charon21A, và vector plasmid bao gồm pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL1920 và plasmid loại pET. Các vector có thể được sử dụng không bị giới hạn một cách cụ thể, và bất kỳ một vector biểu hiện đã biết nào cũng có thể được sử dụng. Cụ thể là, các vector pACYC177, pACYC184, pCL1920, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118 hoặc pCC1BAC có thể được sử dụng. Cụ thể nhất là các vector pACYC177, pCL1920 và pCC1BAC có thể được sử dụng.

Ngoài ra, vector được sử dụng trong sàng chế là vector có khả năng biến nạp tế bào vật chủ, để chèn polynucleotit mã hóa protein đích vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Ví dụ cụ thể về vector bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vector con thoi pECCG112 có thể tự sao chép trong cả *E. coli* và vi khuẩn loại Coryne (Kap-Soo, Noh, Kor. Jour. Microbiol. July 1991, p149-154).

Tương tự, polynucleotit mã hóa protein đích nội bào trong nhiễm sắc thể có thể được thay thế bằng polynucleotit mới bởi vector để chèn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Sự chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, tái tổ hợp tương đồng. Vì vector theo sàng chế có thể được chèn vào nhiễm sắc thể bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng, có thể còn bao gồm thêm dấu chuẩn lựa chọn để xác nhận sự chèn vào nhiễm sắc thể. Dấu chuẩn lựa chọn được sử dụng để lựa chọn tế bào biến nạp với vector, đó là xác nhận sự chèn của polynucleotit đích. Dấu chuẩn lựa chọn sử dụng trong sàng chế có thể được lựa chọn từ các dấu chuẩn cung cấp các kiểu hình lựa chọn, như kháng thuốc, khuyết dưỡng, kháng các tác nhân gây độc tế bào,

hoặc biểu hiện protein bề mặt. Chỉ các tế bào biểu hiện dấu chuẩn lựa chọn là có khả năng sống sót hoặc thể hiện kiểu hình khác trong môi trường được xử lý bằng tác nhân lựa chọn, và do đó các tế bào biến nạp có thể được lựa chọn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” có nghĩa là đưa vector chứa polynucleotit mã hóa protein đích vào vật chủ để có khả năng biểu hiện protein được mã hóa bởi polynucleotit trong tế bào chủ. Các polynucleotit biến nạp bao gồm các gen được chèn trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ hoặc nằm ngoài nhiễm sắc thể, miễn là nó có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Ngoài ra, các polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Miễn là polynucleotit có thể được đưa vào trong tế bào chủ và được biểu hiện trong đó, gen có thể được đưa vào ở dạng bất kỳ.

Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ ở dạng catxet biểu hiện là cấu trúc polynucleotit bao gồm các yếu tố để biểu hiện gen. Catxet biểu hiện bao gồm trình tự khởi đầu liên kết hoạt động với gen, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí liên kết ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã. Catxet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện có khả năng tự sao chép. Polynucleotit cũng có thể được đưa vào tế bào chủ bởi chính nó, và có thể được liên kết hoạt động với trình tự cần thiết để biểu hiện trong tế bào chủ.

Cụ thể là, sự suy yếu hoạt tính của protein mã hóa bởi gen *ysaA*, *ydaS* hoặc *ybiX* có thể thu được bằng cách loại bỏ đoạn gen. Cụ thể là, sự đột biến trong gen có thể được tạo ra sử dụng chất hóa học hoặc ánh sáng như ánh sáng tử ngoại, từ đó thu được các biến thể có gen bị loại bỏ đoạn. Theo cách khác, biến thể thiếu hụt hoạt tính của protein có thể thu được bằng cách thế gen của nhiễm sắc thể vào nucleotit thiếu hụt hoạt tính bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen, bằng phương pháp thay thế gen thông qua tái tổ hợp tương đồng.

Phương án khác của sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan, phương pháp bao gồm bước nuôi cấy chủng *E. coli* tái tổ hợp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan, trong đó chủng này được cải biến để làm suy yếu hoạt tính của ít nhất một protein, được lựa chọn từ nhóm bao gồm, protein YsaA có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, protein YdaS có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4, và protein YbiX có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 6.

Quy trình nuôi cấy theo sáng chế có thể được thực hiện trong môi trường thích hợp và các điều kiện nuôi cấy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Bước nuôi cấy này có thể được

thay đổi một cách dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình bất kỳ trong lĩnh vực, phụ thuộc vào chủng lựa chọn. Ví dụ về quy trình nuôi cấy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục và nuôi cấy theo mẻ có bổ sung cơ chất.

Môi trường và các điều kiện nuôi cấy được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế có thể là môi trường và các điều kiện được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Escherichia*, nhưng cần thỏa mãn một cách chính xác các yêu cầu của vi sinh vật theo sáng chế.

Theo phương án cụ thể theo sáng chế, vi sinh vật có thể được nuôi cấy trong môi trường truyền thống chứa một cách thích hợp các nguồn cacbon, nitơ, axit amin, vitamin và các nguồn tương tự trong điều kiện hiếu khí trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH và thông số tương tự.

Các nguồn cacbon có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm các hydrat cacbon như glucoza, fructoza, sucroza, maltoza, manitol, sorbitol; các rượu như rượu đường, glyxerol, axit pyruvic, axit lactic và axit xitric; và các axit amin như axit hữu cơ, axit glutamic, methionin và lysin. Ngoài ra, các nguồn dinh dưỡng hữu cơ tự nhiên như sản phẩm thủy phân tinh bột, rỉ đường, mật mía, cám gạo, bột sắn, bã mía và dịch ngâm ngô có thể được sử dụng. Cụ thể là, các nguồn dinh dưỡng hữu cơ bao gồm glucoza và rỉ đường đã xử lý thô và tiệt trùng (đó là, rỉ đường được chuyển hóa thành đường khử), và lượng thích hợp các nguồn cacbon có thể sử dụng mà không bị giới hạn.

Các nguồn nitơ có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm nguồn nitơ vô cơ như amoniac, amoni sulfat, amoni clorua, amoni axetat, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat; các axit amin như axit glutamic, methionin và glutamin; và các nguồn nitơ hữu cơ như pepton, NZ-amin, dịch chiết từ thịt, dịch chiết nấm men, dịch chiết từ mạch nha, dịch ngâm ngô, sản phẩm thủy phân casein, thức ăn của cá hoặc sản phẩm tiêu hóa được từ đó, hạt bánh đậu tương được tách mỡ hoặc sản phẩm tiêu hóa được từ đó, v.v.. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng một mình hoặc trong hỗn hợp. Môi trường có thể chứa kali phosphat monobazơ, điaxit kali phosphat và muối chứa natri tương ứng, làm nguồn phospho.

Các chất vô cơ có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm natri clorua, canxi clorua, sắt clorua, magie sulfat, sắt sulfat, mangan sulfat và canxi cacbonat. Ngoài ra, môi

trường có thể chứa các axit amin, vitamin và các tiền chất thích hợp. Các môi trường hoặc các tiền chất này có thể được bổ sung vào môi trường trong phương pháp nuôi cấy theo mẻ hoặc liên tục.

Các hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric và axit sulfuric có thể được thêm vào môi trường theo cách thích hợp trong quá trình nuôi cấy để điều chỉnh độ pH của môi trường nuôi cấy.

Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy, tác nhân khử bọt như este của axit béo polyglycol có thể được sử dụng để ngăn chặn sự tạo thành bọt. Ngoài ra, để duy trì môi trường nuôi cấy ở điều kiện hiếu khí, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được đưa vào môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, để duy trì môi trường nuôi cấy ở điều kiện yếm khí hoặc không hiếu khí thì không đưa khí vào, hoặc khí nitơ, hydro hoặc cacbon dioxit có thể được đưa vào môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được đặc biệt duy trì ở nhiệt độ từ 27 °C đến 37 °C, và đặc biệt từ 30 °C đến 35 °C. Việc nuôi cấy vi sinh vật có thể được tiếp tục đến mức mong muốn đạt được của hợp chất hữu dụng. Cụ thể là, thời gian nuôi cấy là từ 10 đến 100 giờ.

Phương pháp sáng chế có thể bao gồm thêm bước làm tinh sạch và thu hồi L-axit amin tạo ra trong bước nuôi cấy. Quy trình tinh sạch hoặc thu hồi có thể được thực hiện bằng cách tinh sạch hoặc thu hồi L-axit amin mong muốn từ môi trường nuôi cấy sử dụng phương pháp thích hợp được lựa chọn phụ thuộc vào phương pháp sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật, ví dụ phương pháp nuôi cấy theo mẻ, phương pháp nuôi cấy liên tục hoặc phương pháp nuôi cấy theo mẻ có bổ sung cơ chất.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với sự tham chiếu đến các ví dụ. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng, các ví dụ này chỉ để minh họa sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo cấu trúc các chủng sản xuất L-threonin và L-tryptophan có hoạt tính của protein bị làm yếu được mã hóa bởi gen *ysaA*, *ydaS* or *ybiX*

Trong ví dụ này, mỗi gen *ysaA*, *ydaS* và *ybiX* trong chủng sản xuất L-tryptophan KCCM10812P (Đăng ký patent Hàn Quốc số 10-0792095) và chủng sản xuất L-threonin

KCCM10541 (Đăng ký patent Hàn Quốc số 10-0576342) bị loại bỏ bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng.

Chủng bố mẹ sản xuất L-tryptophan KCCM10812P là chủng thu được từ biến thể *E. coli* KFCC 10066 có khả năng sản xuất L-phenylalanin. Đây là chủng *E. coli* tái tổ hợp có khả năng sản xuất L-tryptophan, đặc trưng trong đó sự khuyết dưỡng tryptophan nhiễm sắc thể được khử nhạy, các gen *pheA*, *trpR*, *mitr* và *tnaAB* được làm yếu và các gen *aroG* và *trpE* được cải biến.

Chủng bố mẹ sản xuất L-threonin KCCM10541 là chủng thu được từ *E. coli* KFCC10718 (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 1992-0008365). Chúng có khả năng kháng đối với tác nhân tương tự L-methionin, kiểu hình khuyết dưỡng methionin, kháng tác nhân tương tự L-threonin, kiểu hình khuyết dưỡng giảm hình isoleuxin, kháng tác nhân tương tự L-lysin và kháng axit α -aminobutyric và có khả năng sản xuất L-threonin.

Các gen *ysaA*, *ydaS* và *ybiX* sẽ bị loại bỏ có các trình tự polynucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1, 2 và 3 một cách tương ứng.

Để đạt được mục đích này, phương pháp bất hoạt một bước (được phát triển bởi Datsenko KA et al.) là kỹ thuật gây đột biến sử dụng recombinaza đỏ lambda (Proc Natl Acad Sci USA., (2000) 97: 6640-6645). Với vai trò làm dấu chuẩn xác nhận việc chèn vào gen, gen kháng cloramphenicol của pUCprmflox^C được sử dụng (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 2009-0075549).

Đoạn gen có khoảng 1200 cặp bazơ được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (sau đây gọi là PCR) sử dụng pUCprmflox^C làm khuôn mẫu và cặp môi 1 và 2, cặp môi 7 và 8 và cặp môi 13 và 14, có một phần của một trong số ba gen và một phần của gen kháng cloramphenicol của pUCprmflox^C. PCR được thực hiện trong 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm bước biến tính tại 94 °C trong 30 giây, tái ở 55 °C trong 30 giây và bước kéo dài ở 72 °C trong 1 phút.

Bảng 1

Môi số	Trình tự	SEQ ID NO
1	5'- GTAGGGACGCGCTCTCTGGCACTCTGCTGTTTTAGTGCAAAGG	7

	AGTGATCAGGTGACACTATAGAACGCG-3'	
2	5'- GGCATAAACAAAGCGCACTGTTCCGGCGTTGAGAAACGCCGG AAAACGTTTAGTGGATCTGATGGGTACC-3'	8
3	5'- GCTTTGGACAAGTGCCAAAACCTTTAACATTTTCCTTCGTTGGATC AAAGCAGTAGGGACGCGCTCTCTGGC-3'	9
4	5'- ATTGAATTTGGAAGAATTTGTAGGCCGGATAAGGCGTTTACGC CGCATCTGGCATAAACAAAGCGCACTG-3'	10
5	5'- GAGAGAAAAATCTCCTGAAA -3'	11
6	5'- CCTACATGATTTCTGCAATA-3'	12
7	5'- ATTGCGTTAGGCGTCGCCTAATATTTCTGTGTGTTTTTGGAGTT CATTCGAGGTGACACTATAGAACGCG-3'	13
8	5'- ATTCGATGTGCTCATGCTTGATTTTCATGAATCATTTGCCTCTTG ATGTTTAGTGGATCTGATGGGTACC-3'	14
9	5'- TTACATTAGGCAATCCCTACCCTTACTGCATTAGGCACAGCCTA TTGACAATTGCGTTAGGCGTCGCCTA-3'	15
10	5'- ATTGGCTACCCATGCCTGCCCTTTTTTCGGCTGCTAGGGCAAACA ACACTGATTCGATGTGCTCATGCTTG-3'	16
11	5'- TATAGAGCCTTTCTTAATCC-3'	17
12	5'- CGCAGATATTCTTCAGTAAT-3'	18
13	5'- CATTTCTGATTCAGATGTGGGGCGCAGGCCCCACTTTTTGGAG AAATTGTAGGTGACACTATAGAACGCG-3'	19
14	5'- TGTACAGTTAAGTGTAGCTAATCCAGGGACGAACTCGGGCAGT TCAAGCATAGTGGATCTGATGGGTACC-3'	20
15	5'- ACCGTTATCACCCGGGCGAGCCAAGAACCTTCTTGCTCACAGC CAATATGCATTTCTGATTCAGATGTGG-3'	21

16	5'- GTCATCGTTAGCCCAACCGGATGCCATATCGACCTCCCCATATC AATACTTGTACAGTTAAGTGTAGCTA-3	22
17	5'- AAAGGTTTCAGACGGCGCGGT -3'	23
18	5'- TAAGCGCACGCCAGGAATGG-3'	24

Các đoạn ADN thu được bằng khuếch đại PCR được điện di ở gel agarosa 0,8%, và sau đó được sử dụng làm mẫu trong lần PCR thứ hai. Lần PCR thứ hai được thực hiện sao cho vùng đầu 5' và 3' của đoạn ADN ban đầu có 20 cặp bazơ nucleotit bổ sung. Các đoạn gen có khoảng 1300 cặp bazơ được khuếch đại bằng PCR sử dụng sản phẩm PCR lần đầu đã pha loãng làm mẫu và cặp mồi 3 và 4, cặp mồi 9 và 10 cặp mồi 15 và 16, bao gồm vùng 5' và 3' của gen. Phản ứng PCR được thực hiện trong 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm bước biến tính ở 94 °C trong 30 giây, tái ở 55 °C trong 30 giây và kéo dài ở 72 °C trong 1 phút. Các đoạn ADN thu được bằng PCR được điện di trên gel agarosa 0,8%, và được pha loãng để sử dụng cho tái tổ hợp.

Theo phương pháp được phát triển bởi Datsenko KA et al. (Proc Natl Acad Sci USA., (2000) 97:6640-6645), chủng *E. coli* được biến nạp với pKD46 được làm khả biến, và sau đó được biến nạp với đoạn gen gồm 1300 cặp bazơ thu được bởi PCR. Các chủng thu được được chọn lọc trên môi trường LB kháng cloramphenicol. PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi số 5 và 6, cặp mồi số 11 và 12 và cặp mồi số 17 và 18, và sản phẩm khuếch đại có kích thước tương ứng là 1450, 1530 và 1640 cặp bazơ và được xác nhận là các gen bị loại bỏ.

pKD46 được loại bỏ từ các chủng tái tổ hợp ban đầu kháng cloramphenicol, và sau đó vector pJW168 được đưa vào các chủng này, và dấu chuẩn cloramphenicol được loại bỏ khỏi tế bào vi khuẩn (Gene, (2000) 247,255-264). Các tế bào vi khuẩn thu được là sản phẩm khuếch đại có khoảng 400 cặp bazơ, 500 bazơ và 600 bazơ bởi cặp mồi số 5 và 6, cặp mồi số 11 và 12 và cặp mồi số 17 và 18, và được xác nhận là việc loại bỏ gen mong muốn là đã đạt được.

Theo phương pháp mô tả trên đây, các chủng sản xuất L-threonin KCCM10541 $\Delta ysaA$, KCCM10541 $\Delta ydaS$ và KCCM10541 $\Delta ybiX$ được tạo cấu trúc. Tương tự, các

chúng sản xuất L-tryptophan KCCM10812P $\Delta ysaA$, KCCM10812P $\Delta ydaS$ và KCCM10812P $\Delta ybiX$ cũng được tạo cấu trúc.

Ví dụ 2: Tạo cấu trúc các chủng tái tổ hợp sản xuất L-threonin và L-tryptophan bị loại bỏ hai hoặc nhiều gen *ysaA*, *ydaS* và *ybiX*

Theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ, các chủng tái tổ hợp bị loại bỏ hai hoặc nhiều gen được tạo cấu trúc.

Vector pKD46 để sử dụng recombinaza đỏ lambda được đưa vào chủng bị loại bỏ một gen bất kỳ trong số các gen này, và sau đó các chủng này được làm khả biến. Ngoài ra, các đoạn gen được khuếch đại bởi PCR để bao gồm một phần của ba gen và gen kháng chloramphenicol của pUCprmflox^C được biến nạp vào các chủng khác nhau mà bị loại bỏ một trong số các gen. Các chủng thu được được chọn lọc trên môi trường LB kháng chloramphenicol, và việc loại bỏ tổ hợp các gen được xác nhận bằng cách sử dụng các cặp môi được mô tả trong Ví dụ 1.

Theo phương pháp mô tả trên đây, các chủng sản xuất L-threonin KCCM10541 $\Delta ysaA$ $\Delta ydaS$, KCCM10541 $\Delta ydaS$ $\Delta ybiX$, KCCM10541 $\Delta ybiX$ $\Delta ysaA$ và KCCM10541 $\Delta ysaA$ $\Delta ydaS$ $\Delta ybiX$ được tạo cấu trúc. Tương tự, các chủng sản xuất L-tryptophan KCCM10812P $\Delta ysaA$ $\Delta ydaS$, KCCM10812P $\Delta ydaS$ $\Delta ybiX$, KCCM10812P $\Delta ybiX$ $\Delta ysaA$ và KCCM10812P $\Delta ysaA$ $\Delta ydaS$ $\Delta ybiX$ cũng được tạo cấu trúc.

Trong số các chủng tái tổ hợp thu được như mô tả trên đây, KCCM10541 $\Delta ysaA$ $\Delta ydaS$ $\Delta ybiX$ và KCCM10812P $\Delta ysaA$ $\Delta ydaS$ $\Delta ybiX$ được đặt tên tương ứng là “*E. coli* CA03-4257P” và “*E. coli* CA04-2002” và được nộp lưu tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật của Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms) (361-221, Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul, Korea), Cơ quan lưu giữ quốc tế vào ngày 29/12/2011 với số đăng ký tương ứng là KCCM11243P và KCCM11245P.

Ví dụ 3: Đo mức ATP trong các chủng sản xuất L-threonin và L-tryptophan được tạo cấu trúc

Trong ví dụ này, mức ATP trong các chủng được tạo cấu trúc trong các ví dụ 1 và 2 được đo.

Với mục đích này, phương pháp được phát triển bởi Kiyotaka Y. Hara et al., sử dụng luciferaza (“An Efficient Method for Quantitative determination of Cellular ATP Synthetic Activity”, J Biom Scre, (2006) V11:No.3:PP310-17).

Cụ thể là, các chủng có đặc tính di truyền khác nhau được nuôi cấy qua đêm trong môi trường lỏng LB chứa glucoza. Dịch nổi được loại bỏ bằng ly tâm, các tế bào vi khuẩn được rửa bằng Tris-Cl 100 mM (pH 7,5), và sau đó xử lý bằng đệm PB (đệm thấm: glucoza 40%[thể tích/thể tích], Triton X-100 0,8%[thể tích/thể tích]) trong 30 phút để giải phóng ATP nội bào. Sau đó, dịch nổi được loại bỏ bằng ly tâm, và luxiferin làm cơ chất cho luciferaza được bổ sung vào tế bào. Các tế bào được giữ trong 10 phút và sau đó hoạt tính của luciferaza trong tế bào được đo bằng quang kế để xác định mức ATP. Các kết quả đo được thể hiện trên FIG. 1 và 2. Các kết quả được ghi là giá trị trung bình của ba thử nghiệm lặp lại.

Như có thể thấy trên FIG. 1 và 2, mức ATP trong các chủng tạo thành từ chủng sản xuất L-threonin và chủng sản xuất L-tryptophan trong các ví dụ 1 và 2 đều tăng. Ngoài ra, mức ATP trong chủng bị loại bỏ tổ hợp gen cao hơn so với chủng bị loại bỏ một gen.

Ví dụ 4: Kiểm tra độ chuẩn của chủng sản xuất L-threonin có hoạt tính của một hoặc tổ hợp các enzym bị làm suy yếu được mã hóa bởi các gen *ysaA*, *ydaS* và *ybiX* trong môi trường chứa glucoza

Theo các phương pháp được mô tả trong các Ví dụ 1 và 2, một hoặc tổ hợp các gen *ysaA*, *ydaS* và *ybiX* bị loại bỏ ở chủng sản xuất L-threonin KCCM10541 (Đăng ký patent Hàn Quốc số 10-0576342) để làm tăng mức ATP nội bào. Độ chuẩn của chủng thu được được đánh giá sử dụng glucoza làm nguồn cacbon.

Cụ thể là, các chủng có các đặc tính di truyền khác nhau được nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB rắn trong tủ áp ở 33 °C và cấy bằng vòng platin vào 25 mL môi trường chứa glucoza có hỗn hợp được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây. Sau đó, các chủng được ủ trong tủ áp ở 33 °C và tốc độ quay ở tốc độ 200 rpm trong 50 giờ. Các kết quả thu được được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây. Các kết quả được ghi là giá trị trung bình của kết quả trong ba bình.

Bảng 2

Hỗn hợp	Nồng độ (/lit)
Glucosa	70 g
KH ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g
MgSO ₄ ·H ₂ O	1 g
FeSO ₄ ·H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	5 mg
Dịch chiết nấm men	2 g
Canxi cacbonat	30 g
Độ pH	6,8

Bảng 3

Chủng	OD	Lượng tiêu thụ glucoza (g/L)*	L-threonin (g/L)**
KCCM10541	23,7	30,3	31,8
KCCM10541 $\Delta ysaA$	24,6	33,4	32,2
KCCM10541 $\Delta ydaS$	23,5	34,7	33,0
KCCM10541 $\Delta ybiX$	22,7	33,9	32,7
KCCM10541 $\Delta ysaA \Delta ydaS$	24,9	35,1	32,9
KCCM10541 $\Delta ydsS \Delta ybiX$	24,5	36	33,1
KCCM10541 $\Delta ybiX \Delta ysaA$	25,0	32,1	33,0
KCCM10541 $\Delta ysaA \Delta ydaS \Delta ybiX$	26,1	36,9	33,9

* được đo ở 30 giờ

** được đo ở 50 giờ

Như có thể thấy từ Bảng 3 trên đây, đã chứng minh được rằng lượng tiêu thụ glucosa của chủng *E.coli* tái tổ hợp sản xuất L-threonin được tạo cấu trúc theo sáng chế tăng tới khoảng 22% so với lượng tiêu thụ trong chủng bố mẹ, và việc sản xuất threonin của các chủng tái tổ hợp tăng tới khoảng 7% so với lượng tiêu thụ trong chủng bố mẹ. Trên cơ sở xem xét mức ATP thể hiện trong FIG. 1, các kết quả này chỉ ra rằng tỷ lệ tiêu thụ glucosa hoặc năng suất tạo axit amin của các chủng tái tổ hợp tăng lên nhờ mức ATP tăng.

Ví dụ 5: Kiểm tra độ chuẩn của chủng sản xuất L-threonin, có hoạt tính của một enzym hoặc tổ hợp các enzym được làm yếu, các enzym này được mã hóa bởi gen *ysaA*, *ydaS* và *ybiX*, trong môi trường chứa sucroza

Theo các phương pháp được mô tả trong các Ví dụ 1 và 2, một hoặc tổ hợp các gen *ysaA*, *ydaS* và *ybiX* bị loại bỏ ở chủng sản xuất L-threonin KCCM10541 (Đăng ký patent Hàn Quốc số 10-0576342) để làm tăng mức ATP nội bào. Độ chuẩn của các chủng thu được được đánh giá sử dụng sucroza làm nguồn cacbon.

Cụ thể là, các chủng có các đặc tính di truyền khác nhau được nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB rắn trong tủ áp ở 33 °C và cấy bằng vòng platin vào 25 mL môi trường chứa sucroza có hỗn hợp được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây. Sau đó, các chủng ủ trong tủ áp ở 33 °C và tại 200 vòng/phút trong 48 giờ. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây. Kết quả được ghi là giá trị trung bình của kết quả của ba bình.

Bảng 4

Hỗn hợp	Nồng độ (/lit)
Sucroza	70 g
KH ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g
MgSO ₄ ·H ₂ O	1 g
FeSO ₄ ·H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	5 mg
Dịch chiết nấm men	2 g
Canxi cacbonat	30 g
pH	6,8

Bảng 5

Chủng	OD	Lượng tiêu thụ sucroza (g/L)*	L-threonin (g/L)**
KCCM10541	26,2	40,0	37,0
KCCM10541 Δ <i>ysaA</i>	27,1	40,9	37,5
KCCM10541 Δ <i>daS</i>	26,7	41,7	37,8
KCCM10541 Δ <i>ybiX</i>	25	41,1	38,1
KCCM10541 Δ <i>ysaA</i> Δ <i>ydaS</i>	27,5	42,1	38,0

KCCM10541 $\Delta dsS \Delta ybiX$	27,2	43,0	38,1
KCCM10541 $\Delta ybiX \Delta ysaA$	28,3	42,8	38,7
KCCM10541 $\Delta ysaA \Delta ydaS \Delta ybiX$	27,9	43,9	38,9

* đo tại 24 giờ

** đo tại 48 giờ

Như có thể thấy trong Bảng 5 trên đây, đã chứng minh được rằng lượng sucroza tiêu thụ của chủng *E.coli* tái tổ hợp sản xuất L-threonin được tạo cấu trúc theo sáng chế tăng tới khoảng 10% so với lượng tiêu thụ của chủng bố mẹ, và sự tạo thành threonin của các chủng tái tổ hợp tăng khoảng 5% so với lượng tạo thành trong chủng bố mẹ. Trên cơ sở mức ATP trong FIG. 1, các kết quả này chỉ ra rằng hoạt tính và tỷ lệ tiêu thụ sucroza hoặc hiệu suất tạo axit amin của các chủng tái tổ hợp tăng lên nhờ mức ATP tăng.

Ví dụ 6: Kiểm tra độ chuẩn của chủng sản xuất L-tryptophan, có hoạt tính của một hoặc tổ hợp các enzym được làm yếu, trong đó các enzym này được mã hóa bởi các gen *ysaA*, *ydaS* và *ybiX*, trong môi trường chứa glucoza

Theo các phương pháp được mô tả trong các Ví dụ 1 và 2, một hoặc tổ hợp các gen *ysaA*, *ydaS* và *ybiX* bị loại bỏ ở chủng sản xuất L-tryptophan KCCM10812P (Đăng ký patent Hàn Quốc số 10-0792095) để làm tăng mức ATP nội bào. Độ chuẩn của các chủng thu được được đánh giá sử dụng glucoza làm nguồn cacbon.

Để xác định độ chuẩn, các chủng được cấy bằng vòng platin trên môi trường LB rắn và sau đó được ủ qua đêm trong tủ ủ. Và, được cấy bằng vòng platin vào 25 mL môi trường chuẩn trong bình có hỗn hợp được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây. Sau đó, các chủng được ủ trong tủ ủ ở 37 °C và ở 200 vòng/phút 48 giờ. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây. Kết quả được ghi là giá trị trung bình của kết quả trong ba bình.

Bảng 6

Chế phẩm	Nồng độ (/lit)
Glucoza	60 g
K ₂ HPO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
NaCl	1 g

MgSO ₄ ·H ₂ O	1 g
Natri xitrat	5 g
Dịch chiết nấm men	2 g
Canxi cacbonat	40 g
Sodium xitrat	5 g
Phenylalanin	0,15 g
Tyrosin	01 g
PH	6,8

Bảng 7

Chủng	OD	Lượng glucoza tiêu thụ (g/L)*	L-tryptophan (g/L)**
KCCM10812P	18,2	47,2	5,7
KCCM10812P $\Delta ysaA$	18,3	48,3	6,9
KCCM10812P $\Delta ydaS$	18	49,1	6,6
KCCM10812P $\Delta ybiX$	17,7	50	6,0
KCCM10812P $\Delta ysaA\Delta ydaS$	17,9	48,4	7,5
KCCM10812P $\Delta ydaS\Delta ybiX$	18,7	49,3	7,6
KCCM10812P $\Delta ybiX\Delta ysaA$	19,9	49	7,3
KCCM10812P $\Delta ysaA\Delta ydaS\Delta ybiX$	18,9	51,9	7,9

* đo tại 33 giờ

** đo tại 48 giờ

Như có thể thấy trong Bảng 7 trên đây, đã chứng minh được rằng lượng glucoza tiêu thụ của chủng *E.coli* tái tổ hợp sản xuất L-threonin được tạo cấu trúc theo sáng chế tăng tới khoảng 10% so với lượng tiêu thụ trong chủng bố mẹ, và sự tạo thành tryptophan của các chủng tái tổ hợp tăng tới khoảng 38% so với trong chủng bố mẹ. Trên cơ sở mức ATP trong FIG. 2, các kết quả này chỉ ra rằng hoạt tính và tỷ lệ tiêu thụ glucoza hoặc năng suất tạo thành axit amin của các chủng tái tổ hợp tăng lên nhờ mức ATP tăng.

Trong khi sáng chế được mô tả với sự tham chiếu đến các phương án minh họa cụ thể, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế có thể hiểu rằng sáng

chế có thể có các phương án ở các dạng cụ thể mà không tách rời khỏi các đặc tính chính của sáng chế. Do đó, các phương án được mô tả trên đây là để minh họa ở mọi khía cạnh và không làm giới hạn sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo hơn là ở phần mô tả chi tiết, và cần phải hiểu rằng mọi sửa đổi, cải biến từ ý nghĩa và phạm vi của sáng chế và các phương án tương đương của nó được bao gồm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Số tham chiếu

Cơ quan lưu giữ: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms (quốc tế))

Số nộp lưu: KCCM11243P

Ngày nộp lưu: 29/12/ 2011

Cơ quan lưu giữ: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms (quốc tế))

Số nộp lưu: KCCM11245P

Ngày nộp lưu: 29/12/ 2011

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng *E. coli* tái tổ hợp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan, trong đó chủng này được cải biến để làm suy yếu hoạt tính của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm protein YsaA có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, protein YdaS có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, và protein YbiX có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.
2. Chúng *E. coli* tái tổ hợp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan theo điểm 1, trong đó protein YsaA được mã hóa bởi trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1, protein YdaS được mã hóa bởi trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3, và protein YbiX được mã hóa bởi trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5.
3. Chúng *E. coli* tái tổ hợp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan theo điểm 1, trong đó chủng *E. coli* tái tổ hợp này là *Escherichia coli* CA03-4257 (KCCM11243P) sản xuất L-threonin.
4. Chúng *E. coli* tái tổ hợp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan theo điểm 1, trong đó chủng *E. coli* tái tổ hợp này là *Escherichia coli* CA04-2002 (KCCM11245P) sản xuất L-tryptophan.
5. Phương pháp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy chủng *E. coli* tái tổ hợp sản xuất L-threonin hoặc L-tryptophan, trong đó chủng này được cải biến để làm suy yếu hoạt tính của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm protein (YsaA) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, protein (YdaS) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, và protein (YbiX) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó chủng *E. coli* tái tổ hợp này là *Escherichia coli* CA03-4257 (KCCM11243P) sản xuất L-threonin.
7. Phương pháp theo điểm 5, trong đó chủng *E. coli* tái tổ hợp này là *Escherichia coli* CA04-2002 (KCCM11245P) sản xuất L-tryptophan.

Fig.1.

CHỦNG SẢN XUẤT L-THREONIN

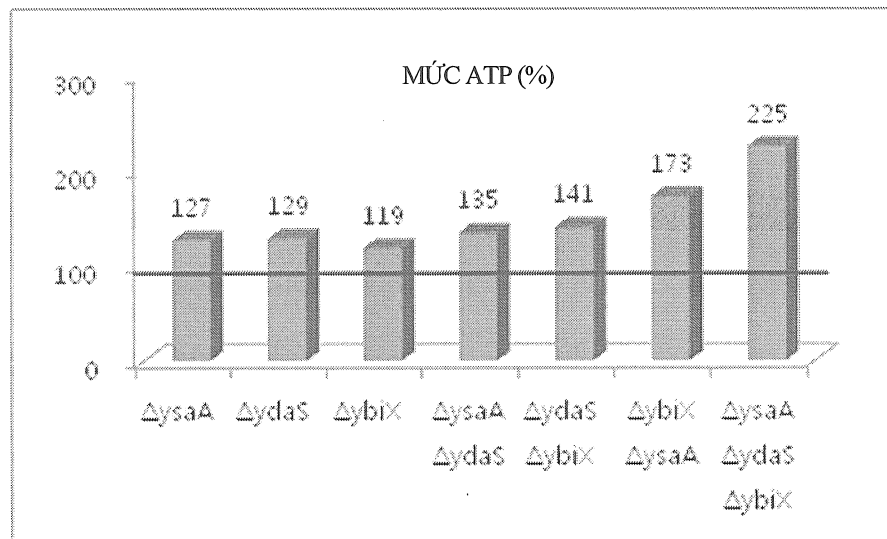
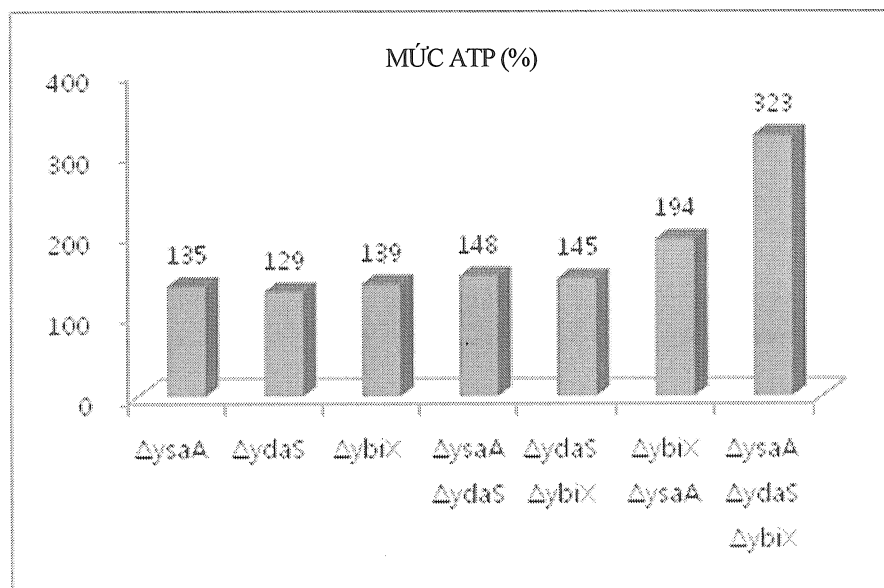


Fig. 2.

CHỦNG SẢN XUẤT L-TRYTOPHAN



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> CHỦNG *ESCHERICHIA COLI* TÁI TỔ HỢP SẢN XUẤT L-THREONIN HOẶC L-TRYPTOPHAN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-THREONIN HOẶC L-TRYPTOPHAN SỬ DỤNG CHỦNG VI SINH VẬT NÀY

<130> PCT-KR2013-000072

<160> 24

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 474

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 1

atgaaccggt ttattattgc ggatgcgacg aaatgtatcg gttgccgtac ctgtgaagtg 60

gcttgcgacg tgtcgcatca tgagaatcag gattgcgctg cgttgctcacc agacgagttt 120

atttcccgta ttcgtgtcat taaagaccac tgctggacca cggcagtagc ctgtcatcag 180

tgtgaagatg caccgtgcgc gaatgtctgc cctgttgacg cgataagccg cgaacatggg 240

catatttttcg ttgaacaaac acgttgcatc ggctgtaaaa gctgtatgct ggcttgcccc 300

tttgggtgca tggaggtcgt ttcttcgcgc aaaaaggcga gggcgattaa gtgcgatctg 360

tgctggcatc gggagacggg accggcctgt gttgaagcct gcccgacaaa ggcgttgacg 420

tgcatggatg tcgagaaagt gcagcggcat cggctacggc agcagcctgt ttga 474

<210> 2

<211> 157

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 2

Met Asn Arg Phe Ile Ile Ala Asp Ala Thr Lys Cys Ile Gly Cys Arg

1 5 10 15

Thr Cys Glu Val Ala Cys Ala Val Ser His His Glu Asn Gln Asp Cys

20 25 30

Ala Ala Leu Ser Pro Asp Glu Phe Ile Ser Arg Ile Arg Val Ile Lys

35 40 45

Asp His Cys Trp Thr Thr Ala Val Ala Cys His Gln Cys Glu Asp Ala

50 55 60

Pro Cys Ala Asn Val Cys Pro Val Asp Ala Ile Ser Arg Glu His Gly
 65 70 75 80
 His Ile Phe Val Glu Gln Thr Arg Cys Ile Gly Cys Lys Ser Cys Met
 85 90 95
 Leu Ala Cys Pro Phe Gly Ala Met Glu Val Val Ser Ser Arg Lys Lys
 100 105 110
 Ala Arg Ala Ile Lys Cys Asp Leu Cys Trp His Arg Glu Thr Gly Pro
 115 120 125
 Ala Cys Val Glu Ala Cys Pro Thr Lys Ala Leu Gln Cys Met Asp Val
 130 135 140
 Glu Lys Val Gln Arg His Arg Leu Arg Gln Gln Pro Val
 145 150 155

<210> 3
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 3
 atgaaaaaag agaactattc attcaagcaa gcttgtgctg ttgtcgggtgg gcaatcagca 60
 atggctaggc ttttaggtgt atcacctcca agcgtaaadc aatggatcaa aggggtacgt 120
 caattgcttg ccgagagatg tccagcaatt gaacgtgcaa caagaggtga ggttctgtgc 180
 gaagaacttc gtctgatata tgactgggtca tatttacgac gttcggcatg ttgttcgcag 240
 aatatgtcag tgaagcaact aatgacagt aacaaatcct catttgatca tacctga 297

<210> 4
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 4
 Met Lys Lys Glu Asn Tyr Ser Phe Lys Gln Ala Cys Ala Val Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Gln Ser Ala Met Ala Arg Leu Leu Gly Val Ser Pro Pro Ser Val
 20 25 30
 Asn Gln Trp Ile Lys Gly Val Arg Gln Leu Pro Ala Glu Arg Cys Pro
 35 40 45
 Ala Ile Glu Arg Ala Thr Arg Gly Glu Val Leu Cys Glu Glu Leu Arg
 50 55 60
 Pro Asp Ile Asp Trp Ser Tyr Leu Arg Arg Ser Ala Cys Cys Ser Gln
 65 70 75 80

Asn Met Ser Val Lys Gln Leu Asn Asp Ser Asn Lys Ser Ser Phe Asp
 85 90 95

His Thr

<210> 5
 <211> 678
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 5
 atgatgtacc acattcccgg cgtgttatcg ccacaggacg tcgctcgttt tcgcgaacaa 60
 ctggaacaag ccgaatgggt ggatggacgc gtcaccaccg gcgcacaagg tgcgcaagtt 120
 aagaacaatc aacaggtcga caccgcgacg acgttatatcg ccgccctgca aaatgaggtg 180
 ctgaacgcgg ttaaccaaca tgctttattc tttgccgcgg ccttgccgcg taccctttcc 240
 acgccgctgt ttaatcgcta tcagaacaat gaaacctatg gtttccatgt ggatggcgca 300
 gtacgcagcc atccacaaaa cggctggatg cgtactgacc tttctgccac gctgttttta 360
 agcgatccac aaagctacga cggcgggcga ctggtcgtta atgacacctt cggacaacat 420
 cgggtaaaac tcccggcagg cgatctcgtg ttgtatccct ccagcagcct gcattgcgtg 480
 acaccgtaa cccgcggcgt acgagtggca tcatttatgt ggatccagtc gatgatccgc 540
 gatgataaaa agcgcgccat gctgtttgaa ctggacaaca atattcagtc gctgaaaagc 600
 cgctacggcg aaagtgaaga gatcctgtcg ctgcttaatc tttatcataa tctgctgcgg 660
 gaatggtcgg agatctga 678

<210> 6
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

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

Asn Gln His Ala Leu Phe Phe Ala Ala Ala Leu Pro Arg Thr Leu Ser
 65 70 75 80
 Thr Pro Leu Phe Asn Arg Tyr Gln Asn Asn Glu Thr Tyr Gly Phe His
 85 90 95
 Val Asp Gly Ala Val Arg Ser His Pro Gln Asn Gly Trp Met Arg Thr
 100 105 110
 Asp Leu Ser Ala Thr Leu Phe Leu Ser Asp Pro Gln Ser Tyr Asp Gly
 115 120 125
 Gly Glu Leu Val Val Asn Asp Thr Phe Gly Gln His Arg Val Lys Leu
 130 135 140
 Pro Ala Gly Asp Leu Val Leu Tyr Pro Ser Ser Ser Leu His Cys Val
 145 150 155 160
 Thr Pro Val Thr Arg Gly Val Arg Val Ala Ser Phe Met Trp Ile Gln
 165 170 175
 Ser Met Ile Arg Asp Asp Lys Lys Arg Ala Met Leu Phe Glu Leu Asp
 180 185 190
 Asn Asn Ile Gln Ser Leu Lys Ser Arg Tyr Gly Glu Ser Glu Glu Ile
 195 200 205
 Leu Ser Leu Leu Asn Leu Tyr His Asn Leu Leu Arg Glu Trp Ser Glu
 210 215 220

Ile
225

<210> 7
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mỗi 1

<400> 7
 gtagggacgc gctctctggc actctgctgt tttagtgcaa aggagtgatc aggtgacact 60
 atagaacgcg 70

<210> 8
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi 2

<400> 8

ggcataaaca aagcgactg ttccggcggtt gagaaacgcc ggaaaacggt tagtggatct 60

gatgggtacc 70

<210> 9

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi 3

<400> 9

gctttggaca agtgccaaaa cttaacatt tccttcggtg gatcaaagca gtagggacgc 60

gctctctggc 70

<210> 10

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi 4

<400> 10

attgaatttg gaagaatttg taggccggat aaggcggtta cgccgcatct ggcataaaca 60

aagcgactg 70

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi 5

<400> 11

gagagaaaaa tctcctgaaa 20

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi 6

<400> 12

cctacatgat ttctgcaata

20

<210> 13

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi 7

<400> 13

attgcgtag gcgtcgcta atatttctgt gtgtttttgg agttcattcg aggtgacact

60

atagaacgcg

70

<210> 14

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi 8

<400> 14

attcgatgtg ctcatgcttg attttcatga atcatttgcc tcttgatgtt tagtggatct

60

gatgggtacc

70

<210> 15

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi 9

<400> 15

ttacattagg caatccctac ccttactgca ttaggcacag cctattgaca attgcgtag

60

gcgtcgcta

70

<210> 16

<211> 70

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mỗi 10

<400> 16
 attggctacc catgcctgcc ctttttcggc tgctagggca aacaacactg attcgatgtg 60
 ctcatgcttg 70

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mỗi 11

<400> 17
 tatagagcct ttcttaatcc 20

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

<220>
 <223> Mỗi 12

<400> 18
 cgcagatatt cttcagtaat 20

<210> 19
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mỗi 13

<400> 19
 catttctgat tcagatgtgg ggcgcaggcc ccactttttg gagaaattgt aggtgacact 60
 atagaacgcg 70

<210> 20
 <211> 70

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi 14

 <400> 20
 tgtacagtta agtgtagcta atccagggac gaactcgggc agttcaagca tagtggatct 60
 gatgggtacc 70

 <210> 21
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi 15

 <400> 21
 accgttatca cccgggcgag ccaagaacct tcttgctcac agccaatatg catttctgat 60
 tcagatgtgg 70

 <210> 22
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi 16

 <400> 22
 gtcacgtta gcccaaccgg atgccatatc gacctccca tatcaatact tgtacagtta 60
 agtgtagcta 70

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

 <220>
 <223> Mỗi 17

 <400> 23
 aaaggttcag acggcgcggt 20

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mỗi 18

<400> 24
taagcgacg ccaggaatgg

20