



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

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

(11)



1-0029998

(51)⁸ C07K 14/195; C07K 14/34

(13) B

(21) 1-2017-04352

(22) 11/03/2016

(86) PCT/KR2016/002480 11/03/2016

(87) WO 2016/171392 27/10/2016

(30) 10-2015-0055495 20/04/2015 KR

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/01/2018 358A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) PARK, Sang Hee (KR); KIM, Hyung Joon (KR); KIM, Nam Hyun (KR); MOON, Jun Ok (KR); OH, Jeong Seok (KR); RYU, Song-Gi (KR); CHOI, Hyang (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH KÌM HẪM GLUCONAT, VI SINH VẬT BIỂU HIỆN POLYPEPTIT NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-LYSIN

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể kim hãm gluconat mới, vi sinh vật chứa biến thể này, và phương pháp sản xuất L-lysine bằng cách sử dụng biến thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể kim hãm gluconat mới, vi sinh vật chứa biến thể này, và phương pháp sản xuất L-lysin bằng cách sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Để sản xuất khối các sản phẩm hữu ích như axit amin, việc điều hòa quá trình hấp thu glucoza và con đường phosphoryl hóa pentoza trong chủng *Corynebacterium* là rất quan trọng (Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. 2005. 215-240).

Chất kim hãm gluconat (gluconate repressor - GntR) là protein điều hòa quan trọng, điều hòa dòng cacbon thông qua quá trình hấp thu glucoza và con đường phosphoryl hóa pentoza. Đã biết rằng hai chất kim hãm gluconat (GntR1 và GntR2) đã được tìm thấy trong chủng *Corynebacterium glutamicum*.

GntR1 và GntR2 ức chế mạnh sự biểu hiện của các gen mã hóa gluconat permeaza (gntP), gluconat kinaza (gntK), và 6-phosphogluconat dehydrogenaza (gnd) liên quan đến quá trình chuyển hóa gluconat, và đóng vai trò ức chế yếu sự biểu hiện operon tkt-tal-zwf-opcA-devB, là gen chủ yếu của con đường phosphoryl hóa pentoza. Đồng thời, sự biểu hiện các gen mã hóa enzym vận chuyển đặc hiệu glucoza II (ptsG) và enzym vận chuyển đặc hiệu sucroza II (ptsS) của hệ phospho-transferaza (PTS), là con đường chuyển hóa dung hợp đường chủ yếu của chủng *Corynebacterium*, được thúc đẩy để tham gia vào quá trình dung hợp đường (Julia Frunzke, Verena Engels, Sonja Hasenbein, Cornelia Gatgens and Michael Bott, *Molecular Microbiology* (2008) 67(2), 305-322).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã nỗ lực tìm kiếm gen có tác dụng hữu hiệu trong việc tổng hợp L-lysin và đã phát triển được biến thể kim hãm gluconat 1 (GntR1) mới, và đã xác nhận được rằng vi sinh vật chứa biến thể tổng hợp L-lysin này có mức sử dụng đường và có khả năng tổng hợp L-lysin cao hơn so với vi sinh vật chứa chất kim hãm gluconat 1

kiểu đại, và do đó các tác giả đã tạo ra sáng chế.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất biến thể mới của protein kim hãm gluconat.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể này và vector biểu hiện chứa polynucleotit này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật tổng hợp L-lysine biểu hiện biến thể của protein kim hãm gluconat.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-lysine bao gồm các bước: (a) nuôi cấy vi sinh vật tổng hợp L-lysine trong môi trường; và (b) thu L-lysine từ vi sinh vật đã được nuôi cấy hoặc môi trường ở bước (a).

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến biến thể mới của protein kim hãm gluconat.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “protein kim hãm gluconat” được dùng để chỉ protein điều hòa liên quan tới quá trình chuyển hóa gluconat hoặc hấp thu đường. Protein kim hãm gluconat không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, cụ thể là, protein kim hãm gluconat từ *Corynebacterium glutamicum*. Cụ thể hơn, protein kim hãm gluconat có thể là protein GntR1 từ *Corynebacterium glutamicum*, nhưng không chỉ giới hạn ở loại này. Protein kim hãm gluconat có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, GntR1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4. Ví dụ, protein kim hãm gluconat có thể là trình tự axit amin chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 và có mức độ tương đồng ít nhất là 80%, cụ thể ít nhất là 90%, cụ thể hơn ít nhất là 95%, và cụ thể hơn nữa ít nhất là 99%. Ngoài ra, protein kim hãm gluconat chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 có thể được mã hóa bởi gen gntR1 chứa trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3, nhưng không chỉ giới hạn ở trình tự này. Ví dụ, nó có thể là trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc có thể là trình tự nucleotit có mức độ tương đồng ít nhất là 80%, cụ thể ít nhất là 90%, cụ thể hơn ít nhất là 95%, hoặc cụ thể hơn nữa ít nhất là 99%.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “mức độ tương đồng” được dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm giống nhau giữa hai gốc polynucleotit hoặc polypeptit. Mức độ tương đồng giữa các

trình tự từ gốc này so với gốc khác có thể được xác định bằng các kỹ thuật đã biết. Ví dụ, mức độ tương đồng có thể được xác định bằng cách sắp hàng thông tin trình tự và sắp hàng trực tiếp thông tin trình tự giữa hai phân tử polynucleotit hoặc hai phân tử polypeptit bằng cách sử dụng chương trình máy tính có sẵn trên thị trường. Chương trình máy tính này có thể là BLAST (NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlign™ (DNASTAR Inc.), v.v.. Ngoài ra, mức độ tương đồng giữa các polynucleotit có thể được xác định bằng cách lai các polynucleotit trong các điều kiện tạo ra sợi kép ổn định giữa các vùng đồng nhất, sau đó phân giải nucleaza đặc hiệu sợi đơn để xác định kích thước của đoạn đã được phân giải.

Biến thể của protein kim hãm gluconat có thể là polypeptit, trong đó arginin (R) là axit amin thứ 102 trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4, được thế bằng axit amin khác với arginin. Cụ thể là, biến thể của protein kim hãm gluconat có thể là polypeptit chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó axit amin ở vị trí 102 được thế bằng cystein (C).

Biến thể của protein kim hãm gluconat này không những bao gồm polypeptit chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, mà còn bao gồm biến thể có mức độ tương đồng là 80% hoặc lớn hơn, cụ thể là 90% hoặc lớn hơn, cụ thể hơn là 95% hoặc lớn hơn, cụ thể hơn nữa là 99% hoặc lớn hơn, và về cơ bản là, rõ ràng rằng trình tự axit amin có hoạt tính sinh học giống với hoặc tương đương với protein có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, ngay cả trong các trường hợp trong đó một số trình tự có đoạn khuyết, cải biến, thay thế, hoặc bổ sung trình tự axit amin, nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa biến thể của protein kim hãm gluconat và vector biểu hiện chứa polynucleotit này.

Protein kim hãm gluconat và biến thể của nó là như được mô tả trên đây.

Cụ thể là, polynucleotit mã hóa biến thể của protein kim hãm gluconat có thể là polynucleotit mã hóa protein chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc có thể là polynucleotit có mức độ tương đồng ít nhất là 80%, cụ thể ít nhất là 90%, cụ thể hơn là 95%, cụ thể hơn nữa ít nhất là 99%. Polynucleotit mã hóa biến thể của protein kim hãm gluconat có thể có, ví dụ, trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 2, nhưng không chỉ giới hạn ở trình tự này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “polynucleotit” được dùng để chỉ polyme của nucleotit, trong đó đơn vị nucleotit được liên kết trong chuỗi dài bởi liên kết cộng hoá trị. Nói chung, nó được dùng để chỉ sợi ADN hoặc ARN dài hơn so với chiều dài đã biết. Polynucleotit này có thể có nhiều trình tự nucleotit cùng mã hóa một trình tự axit amin do sự thoái biến mã hóa gen của mã di truyền. Ngoài ra, các trình tự tối ưu codon có thể được dùng để tối ưu hóa sự biểu hiện tùy thuộc vào loại tế bào chủ.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vector” được dùng để chỉ phân tử axit nucleic bất kỳ để tách dòng và/hoặc chuyển polynucleotit vào tế bào chủ. Vector có thể là đơn vị sao chép mà có thể có khả năng sao chép đoạn đã được liên kết của đoạn ADN khác. “Đơn vị sao chép” được dùng để chỉ đơn vị di truyền bất kỳ (ví dụ, plasmit, thể thực khuẩn, cosmit, nhiễm sắc thể, và virus). Theo sáng chế, vector này không bị giới hạn cụ thể với điều kiện nó có khả năng sao chép trong vật chủ, và vector bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này đều có thể được sử dụng. Vector sử dụng cấu trúc vector tái tổ hợp có thể là plasmit, cosmit, virus, và thể thực khuẩn vi khuẩn ở trạng thái tự nhiên hoặc tái tổ hợp. Ví dụ, pWE15, M13, λ EMBL3, λ EMBL4, λ FIXII, λ DASHII, λ ZAPII, λ gt10, λ gt11, Charon4A, Charon21A, v.v., có thể được sử dụng làm vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmit, và làm plasmit vector, vector pDZ, hệ pBR, hệ pUC, hệ pBluescriptII, hệ pGEM, hệ pTZ, hệ pCL, hệ pET, v.v., có thể được sử dụng. Các vector có sẵn là không bị giới hạn cụ thể, và các vector biểu hiện đã biết có thể được sử dụng. Cụ thể là, pDZ (Đơn đăng ký sáng chế Hàn quốc số 10-0924065; được đưa vào bản mô tả này hoàn toàn bằng cách viện dẫn) có thể được sử dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở vector này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến nạp” được thực hiện bằng cách đưa polynucleotit mã hóa biến thể của protein kim hãm gluconat vào tế bào chủ sao cho polynucleotit đó có thể được biểu hiện trong tế bào chủ này, và polynucleotit mà được biến nạp, với điều kiện nó có thể được biểu hiện trong tế bào chủ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polynucleotit được cài xen vào nhiễm sắc thể hoặc nằm ngoài nhiễm sắc thể này.

Polynucleotit có thể được đưa vào tế bào chủ ở dạng cát-xét biểu hiện, là cấu trúc chứa tất cả các yếu tố cần cho chính sự biểu hiện của nó. Cát-xét biểu hiện nói chung có thể bao gồm vùng khởi động được liên kết theo chức năng với gen, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí gắn kết ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã. Cát-xét biểu hiện có thể ở

dạng vector biểu hiện có khả năng tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào chính tế bào chủ hoặc ở dạng cát-xét biểu hiện và được liên kết theo chức năng với trình tự cần cho sự biểu hiện trong tế bào chủ, nhưng không chỉ giới hạn ở dạng này.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật tổng hợp L-lysin mà biểu hiện biến thể của protein kim hãm gluconat.

Protein kim hãm gluconat và biến thể của nó được mô tả trên đây.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “L-lysin” là axit amin thiết yếu không được tổng hợp trong cơ thể ở dạng α -axit amin cơ bản và được dùng để chỉ loại L-axit amin có công thức hóa học là $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$. L-lysin được sinh tổng hợp từ axit oxaloacetic thông qua con đường sinh tổng hợp lysin, và reductaza phụ thuộc vào NADPH xúc tác quá trình trung gian để sinh tổng hợp lysin. Trong quá trình sinh tổng hợp L-lysin của một phân tử, ba phân tử NADPH được sử dụng trực tiếp bởi enzym đường, và một phân tử NADPH được sử dụng gián tiếp.

Vi sinh vật có thể bao gồm các biến thể của protein kim hãm gluconat bằng cách gây đột biến hoặc có thể được biến nạp bằng vector chứa polynucleotit mã hóa biến thể của protein kim hãm gluconat.

Vi sinh vật bao gồm protein có hoạt tính đột biến của protein kim hãm gluconat hoặc vi sinh vật không có nhân điển hình và vi sinh vật có nhân điển hình nếu vi sinh vật này được biến nạp sao cho protein glycosyltransferaza được biểu hiện. Ví dụ, chúng vi sinh vật như chi *Escherichia*, chi *Erwinia*, chi *Serratia*, chi *Providencia*, chi *Enterobacteria*, chi *Salmonella*, chi *Streptomyces*, chi *Pseudomonas*, chi *Brevibacterium*, hoặc chi *Corynebacterium*, v.v., có thể thuộc chủng vi sinh vật này. Cụ thể, chúng có thể là các vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, và cụ thể hơn là *Corynebacterium glutamicum*, nhưng không chỉ giới hạn ở các giống này.

Khi protein đột biến của protein kim hãm gluconat theo sáng chế nằm trong vi sinh vật tổng hợp L-lysin, thì khả năng tổng hợp L-lysin có thể được tăng lên bằng cách sử dụng sacarit có hiệu quả hơn so với vi sinh vật chứa protein kim hãm gluconat kiểu dại.

Vi sinh vật tổng hợp L-lysin có thể bao gồm loại vi sinh vật bất kỳ nếu nó có khả năng tổng hợp L-lysin, và bao gồm tất cả các dạng chủng tự nhiên và chủng tái tổ hợp.

Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng tổng hợp L-lysin có thể là chủng đột biến kháng chất tương tự L-lysin. Các chất tương tự L-lysin này ức chế sự phát

triển của vi sinh vật *Coryne*, nhưng sự ức chế này được xóa bỏ hoàn toàn hoặc một phần khi L-lysin cùng tồn tại trong môi trường. Ví dụ về các chất tương tự L-lysin bao gồm oxa L-lysin, L-lysin hydroxamat, S-(2-aminoethyl)-L-xystein (AEC), γ -metyl L-lysin, α -clocaprolactam, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này. Biến thể có tính kháng các chất tương tự L-lysin như vậy có thể thu được nhờ xử lý vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* bằng cách tạo đột biến nhân tạo thông thường, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này. Ví dụ không giới hạn về biến thể này bao gồm KCCM11016P của *Corynebacterium glutamicum* (Đơn đăng ký sáng chế Hàn quốc số 10-0159812), KFCC 11001 của *Corynebacterium glutamicum*, và KCCM11347P của *Corynebacterium glutamicum* (Đơn đăng ký sáng chế Hàn quốc số 10-0073610), nhưng không chỉ giới hạn ở các biến thể này.

Ngoài ra, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng tổng hợp L-lysin có thể được cải biến sao cho hoạt tính của protein liên quan đến quá trình sinh tổng hợp L-lysin cao hơn so với các chủng không được cải biến. Tức là, sự biểu hiện của một hoặc nhiều loại gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp L-lysin được tăng cường. Sự tăng cường biểu hiện này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự khuếch đại gen, thay thế hoặc biến đổi các trình tự như vùng khởi động hoặc codon khởi đầu, việc đưa các cải biến để cải thiện sự biểu hiện, v.v.. Ví dụ không giới hạn về sự tăng cường này bao gồm CJ3P của *Corynebacterium glutamicum* (Binder *et al.* Genome Biology 2012, 13:R40), nhưng không chỉ giới hạn ở chủng này.

Ngoài ra, ví dụ về gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp L-lysin bao gồm các gen thuộc con đường sinh tổng hợp L-lysin, và cụ thể là, gen syntaza của axit dihydrodipicolinic (dapA), gen aspartokinaza (lysC), gen reductaza của axit dihydrodipicolinic (dapB), gen diaminopimelat decarboxylaza (lysA), gen diaminopimelat dehydrogenaza (ddh), gen phosphoenolpyruvat carboxylaza (ppc), gen aspartat semialdehyt dehydrogenaza (asd), gen aspartaza (aspA), và pyruvat carboxylaza (pyc), nhưng không chỉ giới hạn ở các gen này. Ngoài ra, transketolaza (tkt) thuộc con đường pentoza phosphat, v.v., có thể đưa ra, nhưng gen này không chỉ bị giới hạn bởi loại này.

Đồng thời, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể có khả năng tổng hợp L-lysin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các cải biến đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật

này kèm theo sự tổng hợp L-lysin.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất L-lysin bao gồm các bước: (a) nuôi cấy vi sinh vật tổng hợp L-lysin trong môi trường; và (b) thu L-lysin từ vi sinh vật đã được nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy ở bước (a).

L-lysin và vi sinh vật tổng hợp L-lysin là như được mô tả nêu trên.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “nuôi cấy” được dùng để chỉ việc nuôi cấy vi sinh vật trong được các điều kiện môi trường có kiểm soát nhân tạo ở mức độ vừa phải. Quy trình nuôi cấy theo sáng chế có thể được thực hiện theo môi trường nuôi cấy và các điều kiện nuôi cấy thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các điều kiện như nhiệt độ nuôi cấy, thời gian ủ, và độ pH cụ thể của môi trường có thể được thực hiện theo kiến thức thông thường của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc theo phương pháp đã biết thông thường. Cụ thể là, các phương pháp nuôi cấy đã biết này được mô tả trong [Chmiel; Bioprozesstechnik 1. Einfuhrung indie Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991), and Storhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig / Wiesbaden, 1994)]. Ngoài ra, phương pháp nuôi cấy bao gồm nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, và nuôi cấy theo mẻ cấp. Cụ thể là, quy trình gián đoạn hoặc mẻ cấp hoặc quy trình cấp lặp lại có thể được nuôi cấy liên tục, nhưng không chỉ bị giới hạn bởi quy trình nuôi cấy này.

Môi trường dùng để nuôi cấy cần phải đáp ứng các yêu cầu của các chủng cụ thể theo cách thích hợp. Các nguồn cacbon có thể được sử dụng cho môi trường này bao gồm sacarit và hydrat cacbon như glucoza, saccaroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, xenluloza, v.v.; dầu và chất béo như dầu đỗ tương, dầu hướng dương, dầu thầu dầu, dầu dừa, v.v.; axit béo như axit palmitic, axit stearic, axit linoleic, v.v.; glyxerol; rượu như etanol; và axit hữu cơ như axit axetic, nhưng không chỉ giới hạn ở các nguồn này. Các chất này có thể được sử dụng riêng biệt hoặc ở dạng hỗn hợp và không bị giới hạn ở các chất này. Các nguồn nitơ có thể được sử dụng bao gồm pepton, dịch chiết nấm men, nước thịt, dịch chiết mạch nha, nước ngâm ngũ cốc, bột đậu tương, và ure hoặc hợp chất vô cơ, ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, amoni nitrat, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các nguồn này, và các nguồn nitơ cũng có thể được sử dụng riêng biệt hoặc ở dạng hỗn hợp. Các nguồn phosphat có sẵn bao gồm kali dihydro phosphat, đikali hydro phosphat, hoặc muối chứa natri tương ứng, v.v., nhưng không chỉ

giới hạn ở các loại này. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể chứa các muối kim loại như magie sulfat hoặc sắt sulfat, nhưng không bị giới hạn ở các muối này. Cuối cùng, ngoài các nguyên liệu nêu trên, các chất tăng trưởng thiết yếu như axit amin và vitamin có thể được sử dụng. Ngoài ra, các tiền chất thích hợp có thể được sử dụng cho môi trường nuôi cấy. Các nguyên liệu thô nêu trên có thể được bổ sung từng bước theo mẻ hoặc liên tục vào tủ nuôi trong quy trình nuôi, nhưng không chỉ giới hạn ở các cách này.

Ngoài ra, các hợp chất hoá học như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, và axit sulfuric có thể được bổ sung một cách thích hợp vào tủ nuôi trong quá trình nuôi cấy để điều chỉnh độ pH của môi trường nuôi cấy. Trong quá trình nuôi cấy, sự tạo bọt có thể được ức chế bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt như polyglycol axit béo. Ngoài ra, để duy trì điều kiện hiếu khí của tủ nuôi hoặc quá trình nuôi cấy, oxy hoặc khí chứa oxy có thể được bổ sung vào tủ nuôi, hoặc để duy trì các điều kiện kỵ khí, khí nitơ, hydro, hoặc cacbon đioxit có thể được phun vào hoặc khí có thể không được phun. Nhiệt độ của quá trình nuôi cấy thường nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C, cụ thể là nằm trong khoảng từ 30°C đến 35°C, nhưng không chỉ giới hạn ở nhiệt độ này. Thời gian ủ có thể được tiếp tục cho tới khi thu được lượng nguyên liệu thích hợp mong muốn, và cụ thể có thể từ 10 giờ đến 100 giờ. L-lysin có thể được tiết ra môi trường nuôi cấy hoặc được chứa trong vi sinh vật.

Ngoài ra, các phương pháp sản xuất L-lysin theo sáng chế hoặc các phương pháp thu L-lysin từ môi trường nuôi cấy là đã biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đối với phương pháp thu L-lysin, phương pháp lọc, sắc ký trao đổi ion âm, kết tinh, và HPLC, v.v., có thể được sử dụng, nhưng các phương pháp không chỉ bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trong phần dưới đây, sáng chế được mô tả chi tiết hơn qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này được dự định để minh họa sáng chế theo cách được lấy làm ví dụ, và phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Tạo ra thư viện ADN hệ gen tái tổ hợp của *Corynebacterium glutamicum*

Ở ví dụ này, để phát hiện ra khả năng tổng hợp L-lysin và các gen và các biến thể mà phát hiện ra tác dụng có lợi đối với hiệu suất tổng hợp, sau khi gây đột biến nhân tạo

ở các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 bằng N-metyl-N-nitro-N-nitroguanidin (NTG), ADN hệ gen được chiết bằng các phương pháp chiết thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Enzym giới hạn Sau3AI được dùng cho ADN đã được tạo ra thu được từng đoạn có kích thước nằm trong khoảng từ 1 kb đến 3 kb. Sau khi nối các đoạn này với vectơ con thoi biến nạp pECCG122 vào *E. coli* và *Corynebacterium* với enzym giới hạn đầu BamHI, chúng được biến nạp vào *E. coli* DH5α và cấy trải lên môi trường rắn LB chứa kanamycin (25mg/l). Sau khi chọn các khuẩn lạc đã được biến nạp vectơ được cài xen các đoạn này bằng PCR (bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 5 và 6), tất cả các khuẩn lạc này được trộn với nhau để tách chiết các plasmit bằng phương pháp chiết đã biết thông thường.

SEQ ID NO: TCAGGGTGTAGCGGTTCGGTTTAT

SEQ ID NO: CCGCGCGTAATACGACTCACTATA

Ví dụ 2: Đưa ra thư viện biến thể nhân tạo và tăng cường khả năng tổng hợp L-lysin

Bằng cách sử dụng chủng KCCM11016P làm chủng bố mẹ (vi sinh vật được bộc lộ là KFCC10881 và được lưu giữ lại vào cơ quan lưu giữ quốc tế theo Hiệp ước Bu-đa-pét và được đăng ký với số lưu giữ KCCM11016P, Số đơn patent Hàn quốc 10-0159812), vectơ đã tạo ra được biến nạp và được cấy trải lên môi trường đĩa composit như sau.

Môi trường đĩa composit

Glucosa 20g, (NH₄)₂SO₄ 50g, pepton 10g, dịch chiết nấm men 5g, ure 1,5g, KH₂PO₄ 5g, K₂HPO₄ 10g, MgSO₄ 7H₂O 0,5g, biotin 100μg, muối thiamin clorua 1000μg, axit canxi-pantothenic 2000μg, nicotinamit 2000μg, agar 20g, và kanamycin 25mg (11 nước cất).

Khoảng 10000 khuẩn lạc được cấy vào từng môi trường chọn lọc với thể tích 300μL và được nuôi cấy trong khoảng 16 giờ với tốc độ 1000 vòng/phút ở 32°C trong đĩa có 96 giếng. Để phân tích lượng L-lysin tổng hợp tạo ra được trong quá trình nuôi cấy, phương pháp ninhydrin đã được sử dụng (*J. Biol. Chem.* 1948. 176:367-388). Sau khi nuôi cấy, 10μL dịch nuôi cấy và 190μL dung dịch phản ứng ninhydrin (63% glyxerol,

27% dung dịch ninhydrin) được phản ứng ở 65°C trong 30 phút, độ hấp thụ được đo bằng phổ quang kế ở bước sóng 570nm, và được so sánh với độ hấp thụ của nhóm đối chứng (KCCM11016P/pECCG122), 248 loại chủng biến thể có độ hấp thụ tương tự hoặc tăng lên đã được chọn. Trong quá trình nuôi cấy ở các điều kiện này, do chủng của nhóm đối chứng có lượng đường còn dư nằm trong khoảng từ 1g/l đến 2g/l, nên mức độ sử dụng đường ở mỗi nhóm đối chứng được gia tăng, và các chủng có khả năng tổng hợp lysin cao có thể được chọn.

Môi trường lựa chọn (độ pH=8,0)

Glucose 10g, amoni sulfat 5,5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2g, KH_2PO_4 0,8g, K_2HPO_4 16,4g, biotin 100 μg , thiamin HCl 1000 μg , axit canxi-pantothenic 2000 μg , và nicotinamit 2000 μg (1l nước cất tiêu chuẩn).

Ngoài ra, dựa trên các chủng của 248 loài đã được chọn, phương pháp này đã được thực hiện lặp lại. Kết quả là, các chủng biến thể thuộc 29 loài nêu trên có khả năng tổng hợp L-lysine lớn hơn 10% so với chủng KCCM11016P/pECCG122 đã được chọn.

Ví dụ 3: Khả năng tổng hợp L-lysine của các chủng biến thể nhân tạo đã được chọn và phân tích mức độ sử dụng đường

Khả năng tổng hợp L-lysine của các chủng thuộc 29 loài đã được chọn ở ví dụ 2 và mức độ sử dụng đường được nuôi cấy theo phương pháp dưới đây và được phân tích.

Mỗi chủng này được cấy vào chai nuôi cấy lệch góc dung tích 250ml và được nuôi cấy kèm theo lắc ở 30°C trong 20 giờ ở tốc độ 200 vòng/phút. Sau đó, 1ml dung dịch nuôi cấy của các loài được nuôi cấy được cấy vào chai nuôi cấy lệch góc dung tích 250ml chứa 24ml môi trường tổng hợp. Bằng cách sử dụng HPLC, nồng độ của L-lysine đã được phân tích, và để đo mức độ sử dụng đường của các chủng này và hiệu suất tổng hợp của chúng, nồng độ đường còn lại trong số các dung dịch nuôi cấy theo thời gian đã được đo.

Môi trường loài (độ pH=7,0)

Glucose 20g, pepton 10g, dịch chiết nấm men 5g, ure 1,5g, KH_2PO_4 4g, K_2HPO_4 8g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g, biotin 100 μg , thiamin HCl 1000 μg , axit canxi-pantothenic

2000 μ g, nicotinamit 2000 μ g (1l nước cất tiêu chuẩn).

Môi trường tổng hợp (độ pH=7,0)

Glucosa 100 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40g, protein đậu tương 2,5g, chất rắn ngâm trong ngũ cốc 5g, ure 3g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g, biotin 100 μ g, muối thiamin clorua 1000 μ g, axit canxi pantothenic 2000 μ g, nicotinamit 3000 μ g, và CaCO_3 30g (1l nước cất tiêu chuẩn).

Trong số các chủng biến thể của 29 loài, nồng độ L-lysin được so sánh với nhóm đối chứng là lớn hơn so với nồng độ tương đương, và ba loại chủng có mức độ sử dụng đường và hiệu suất tổng hợp cao được chọn để thực hiện nuôi cấy và phân tích lặp lại, và các kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1

Số chủng		Đường còn lại (g/l)		L-lysin (g/l)	Trung bình
		18 giờ	28 giờ		
KCCM11016P /pECCG122	1	50,9	38,2	43,1	43,4
	2	51,9	39,8	42,5	
	3	51,2	37,6	44,5	
KCCM11016P/3	1	47,9	34,2	43,3	43,4
	2	48,6	33,8	43,8	
	3	46,9	31,9	43,0	
KCCM11016P/94	1	47	33,7	44,5	44,3
	2	46,7	33,6	44,3	
	3	44,8	32,8	44,1	
KCCM11016P/1160	1	42,2	26,8	44,2	43,9
	2	43,5	25,4	44,1	
	3	42,9	24,3	43,5	

Đã xác nhận rằng ba chủng tổng hợp L-lysin nhiều hơn mức tương đương của nhóm đối chứng, và mức độ sử dụng đường/đơn vị giờ được tăng lên bằng cách cải thiện hiệu suất lên men. Trong số các chủng biến thể đã được chọn, cuối cùng chủng KCCM11016P/1160 có hiệu suất tổng hợp tăng nhiều nhất đã được chọn, và các plasmit đã được tách chiết để nghiên cứu về sự đột biến trình tự nucleotit ở mức độ di truyền cơ bản mà làm tăng mức độ sử dụng đường và hiệu suất tổng hợp. Sau đó, các trình tự nucleotit được phân tích bằng cách sử dụng trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 5 và 6. Các plasmit từ KCCM11016P/1160 chứa từ vùng ngược dòng của codon kết thúc ORF trong gen NCgl2440 với kích thước khoảng 450 cặp bazơ đến vùng xuôi dòng của codon kết thúc chứa khoảng 350 cặp bazơ. Ngoài ra, bằng cách phân tích trình tự nucleotit của gen trên cơ sở Ngân hàng gen của Viện Sức khỏe Quốc gia (the National Institutes of Health - NIH), gen này được xác nhận là gntR1, là một trong số các chất kim hãm gluconat, và biến thể gntR1 được đưa vào chủng KCCM11016P/1160 đã được thế C bằng T ở trình tự nucleotit thứ 304, và đã xác nhận được rằng axit amin thứ 102, arginin đã bị đột biến thành xystein.

Tức là, đã xác nhận được rằng arginin là axit amin thứ 102 của gntR1, có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4, đã được thay thế bằng xystein.

Ví dụ 4: Tạo ra vectơ để đưa biến thể gntR1 vào nhiễm sắc thể của chủng tổng hợp L-lysin

Để xác nhận hiệu quả sử dụng biến thể gntR1 mà đã được xác nhận ở ví dụ 3, vectơ mà có thể đưa biến thể này vào nhiễm sắc thể được tạo ra.

Trên cơ sở trình tự nucleotit đã được thông báo, đoạn môi (SEQ ID NO: 7), trong đó vùng enzym giới hạn EcoRI được cài xen vào đầu 5' và vùng enzym giới hạn SalI được cài xen vào đầu 3' đã được tổng hợp. Bằng cách sử dụng các cặp đoạn môi này, PCR được thực hiện bằng cách dùng plasmid của KCCM11016P/1160 làm khuôn để khuếch đại các đoạn gen gntR1. Điều kiện PCR được thực hiện lặp lại 30 chu trình biến tính ở 94°C trong 5 phút, làm biến tính ở 94°C trong 30 giây, được gắn môi ở 56°C trong 30 giây, và polyme hóa ở 72°C trong 40 giây, và phản ứng polyme hóa được thực hiện ở 72°C trong 7 phút.

SEQ ID NO: 7: AAGAATTCAGCAGATCGAAGAAGAAGC

SEQ ID NO: 8: AAGTCGACGGGACTAAAAGCTGGCG

Sau khi xử lý các đoạn gen đã được khuếch đại bằng PCR bằng các enzym giới hạn EcoRI và SalI, đã thu được từng đoạn ADN, và sau đó nối chúng với vector pDZ (Số đơn patent Hàn quốc 10-0924065) có các đầu enzym giới hạn EcoRI và SalI, nó được biến nạp vào *E. coli* DH5 α và cấy trên môi trường rắn LB chứa kanamycin (25mg/l). Sau khi chọn khuẩn lạc đã được biến nạp bằng vector trong đó gen đích được cài xen thông qua PCR, plasmit thu được bằng cách sử dụng phương pháp tách chiết plasmit đã biết thông thường, và theo các biến thể được cài xen trong gntR1 của plasmit, nó được gọi là pDZ-gntR1 (R102C).

Ví dụ 5: Tạo ra chủng trong đó biến thể gntR1 được đưa vào KCCM11016P, chủng tổng hợp L-lysin, và so sánh hiệu suất tổng hợp

Vector đưa biến thể mới được tạo ra ở ví dụ 4 được biến nạp vào *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, là chủng tổng hợp L-lysin, theo quy trình tái tổ hợp nhiễm sắc thể đồng nhất hai bước. Sau đó, chủng mà biến thể gntR1 trên nhiễm sắc thể được đưa vào được chọn theo phân tích trình tự nhiễm sắc thể, và chủng trong đó biến thể gntR1 được đưa vào được gọi là KCCM11016P::gntR1(R102C).

Bằng cách nuôi cấy bằng các phương pháp tương tự như ở ví dụ 3, nồng độ của L-lysin và nồng độ đường còn lại được đo từ đó. Ngoài ra, để xác nhận hiệu quả nuôi cấy từ đường thô, môi trường tổng hợp đường thô thay vì môi trường tổng hợp glucoza đã được sử dụng để phân tích bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự [Bảng 2].

Môi trường tổng hợp đường ban đầu (độ pH=7,0)

Đường thô 100g, (NH₄)₂SO₄ 40g, protein đậu tương 2,5g, chất rắn ngâm trong ngũ cốc 5g, enzym 3g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄·7 H₂O 0,5g, biotin 100 μ g, muối thiamin clorua của axit tương ứng 1000 μ g, axit canxi-pantothenic 2000 μ g, nicotinamit 3000 μ g, CaCO₃ 30g (1l nước cất).

Bảng 2

	Số chủng		Đường còn lại (g/l)		L-lysine (g/l)	Trung bình
			18 giờ	28 giờ		
Đường	KCCM11016P	1	47,1	32,5	43,8	43,5
		2	46,2	33,8	42,6	
		3	45	32,0	44,1	
	KCCM11016P::GntR1(R102C)	1	34,5	21,4	43,5	43,9
		2	39,5	21,2	44,2	
		3	37	20,6	43,9	
Đường thô	KCCM11016P	1	42,9	28,6	47,3	47,0
		2	42,0	,		
		3	41,0	28,4	47,6	
	KCCM11016P::GntR1(R102C)	1	34,1	17,2	47	47,4
		2	35,2	16,3	47,7	
		3	33,7	15,6	47,4	

Kết quả là, đã xác nhận được rằng mức độ sử dụng đường của KCCM11016P::gntR1(R102C) được tăng lên mà không làm ảnh hưởng đến khả năng tổng hợp L-lysine so với KCCM11016, là nhóm so sánh trong môi trường glucoza và môi trường đường ban đầu. Ngoài ra, do kết quả xác nhận thời điểm khi tất cả glucoza và đường ban đầu đã được sử dụng nên việc so sánh các nhóm được sử dụng hoàn toàn sau 72 giờ và 68 giờ, và L-lysine được tổng hợp lần lượt ở nồng độ 43,5g/l và 47,0g/l, và chủng đưa vào biến thể gntR1 được tổng hợp ở nồng độ 43,9g/l và 47,4g/l sau 60 giờ và 58 giờ. Tức là, trong trường hợp các chủng trong đó biến thể gntR1 được đưa vào, đã xác nhận được rằng khả năng tổng hợp L-lysine theo thời gian được tăng lên lần lượt là 21% và 18% khi có glucoza và đường thô [Bảng 3].

Bảng 3

	Số chủng	Khả năng tổng hợp (g/giờ)	%
Glucosa	KCCM11016P	0,60	100
	KCCM11016P::gntR1(R102C)	0,73	121
Đường thô	KCCM11016P	0,69	100
	KCCM11016P::gntR1(R102C)	0,82	118

Có thể thấy từ các kết quả nêu trên, việc đưa biến thể gntR1 có khả năng tổng hợp L-lysine ở cùng nồng độ và là hiệu quả trong mức độ sử dụng glucosa và đường thô. Tức là, khi biến thể gntR1 được đưa vào theo sáng chế, đã gợi ý về hiệu quả vượt trội về khả năng tổng hợp L-lysine. Như vậy, các tác giả sáng chế đã gọi KCCM11016P::gntR1(R102C) là *Corynebacterium glutamicum* “CA01-2293”, có mức độ và hiệu suất sử dụng glucosa ở mức cao, và vào ngày 5 tháng 12 năm 2014, nó được đưa ra với số lưu giữ KCCM11628P, được lưu giữ ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc (KCCM), là cơ quan lưu giữ quốc tế.

Ví dụ 6: Tạo ra các chủng trong đó biến thể gntR1 được đưa vào chủng tổng hợp L-lysine và so sánh hiệu suất tổng hợp

Để xác định hiệu quả của các chủng khác thuộc *Corynebacterium glutamicum*, chủng trong đó biến thể gntR1 được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P (vi sinh vật được bộc lộ là KFCC10750 và được lưu giữ tại cơ quan lưu giữ quốc tế theo Hiệp ước Bu-đa-pét và được đăng ký là KCCM11347P. Số đơn patent Hàn quốc 10-0073610) được tạo ra và được gọi là KCCM11347P::gntR1(R102C). Bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như ở ví dụ 5, các chủng đã được tạo ra được nuôi cấy, và so sánh khả năng tổng hợp lysine và đường còn lại [Bảng 4].

Bảng 4

	Số chủng	Đường còn lại (g/l)		L-lysine (g/l)	Trung bình
		18 giờ	28 giờ		

Glucoza	KCCM11347P	1	43,8	27,6	38,5	38,6
		2	42,6	28,8	38,7	
		3	43,2	27,2	38,6	
	KCCM11347P::gntR1 (R102C)	1	39,2	18,2	38,6	38,7
		2	37,6	18,0	38,6	
		3	37,0	17,5	38,9	
Đường còn lại	KCCM11347P	1	39,9	24,9	41,2	41,3
		2	39,3	25,3	41,4	
		3	38,8	24,7	41,3	
	KCCM11347P::gntR1 (R102C)	1	35,7	14,4	41,3	41,4
		2	34,2	13,7	41,3	
		3	33,3	13,1	41,6	

Do đó, tương tự như ở ví dụ 5, đã xác nhận được rằng tất cả mức độ sử dụng glucoza được tăng lên trong glucoza và đường thô so với nhóm so sánh. Ngoài ra, theo kết quả xác định thời điểm mà tại đó glucoza và đường thô được sử dụng hoàn toàn, nhóm so sánh đã sử dụng toàn bộ đường ở 72 giờ và 69 giờ, và L-lysin được tổng hợp ở nồng độ 38,6g/l và 41,3g/l, và biến thể gntR1 tổng hợp L-lysin ở 61 giờ và 58 giờ ở nồng độ 38,7g/l và 41,4g/l. Tức là, trong trường hợp các chủng trong đó biến thể gntR1 được đưa vào, hiệu suất tổng hợp của L-lysin theo thời gian đã xác nhận lượng glucoza và đường thô tăng lần lượt là 18% và 19% [Bảng 5].

Bảng 5

	Số chủng	Hiệu suất tổng hợp (g/giờ)	%
Glucoza	KCCM11347P	0,54	100
	KCCM11347P::gntR1(R102C)	0,63	118
Đường thô	KCCM11347P	0,60	100
	KCCM11347P::gntR1(R102C)	0,71	119

Ví dụ 7: Tạo ra chủng trong đó biến thể gntR1 được đưa vào trong chủng tổng hợp L-lysine CJ3P và so sánh hiệu suất tổng hợp

Để xác nhận hiệu quả của các chủng khác thuộc *Corynebacterium glutamicum*, chủng trong đó biến thể gntR1 được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* CJ3P (Binder *et al.* Genome Biology 2012, 13: R40) đã được tạo ra, và được gọi là CJ3P::GntR1(R102C). Chủng CJ3P là chủng của *Corynebacterium glutamicum* có khả năng tổng hợp L-lysine trong đó 3 loại biến thể (pyc(Pro458Ser), hom(Val59Ala), lysC(Thr311Ile)) được đưa vào trong chủng kiểu đại bằng kỹ thuật đã nêu. Chủng đã được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như ở ví dụ 5 đã được chuẩn bị, và khả năng tổng hợp lysine và nồng độ của đường còn lại trong dung dịch nuôi cấy theo thời gian đã được đo [Bảng 6].

Bảng 6

	Số chủng		Đường còn lại (g/l)		L-lysine (g/l)	Trung bình
			12 시간	18 시간		
Glucose	CJ3P	1	37,2	23,6	8,1	8,2
		2	37,9	23,0	8,2	
		3	37,4	21,1	8,2	
		1	35,0	17,7	8,4	8,4
	CJ3P::gntR1(R102C)	2	35,5	17,5	8,3	
		3	34,2	16,7	8,4	
		1	34,3	21,5	8,7	8,8
		2	34,1	20,9	8,8	
Đường thô	CJ3P	3	32,7	19,2	8,8	
		1	30,8	16,1	9,0	9,0
	CJ3P::gntR1(R102C)	2	31,8	15,9	8,9	
		3	31,3	15,2	9,0	
		1	30,8	16,1	9,0	9,0
		2	31,8	15,9	8,9	

Do đó, tương tự ví dụ 5 và 6, đã xác nhận được rằng mức độ sử dụng đường được tăng lên trong chủng cải biến thể gntR1 so với nhóm đối chứng. Ngoài ra, theo kết quả xác nhận thời điểm mà tại đó glucoza và đường thô được sử dụng hoàn toàn, glucoza và đường thô được sử dụng hoàn toàn tại thời điểm 48 giờ và 42 giờ ở nhóm đối chứng, và L-lysin được tổng hợp lần lượt ở nồng độ 8,2g/l và 8,8g/l, và chủng cải biến gntR1(R102C) tổng hợp lysin lần lượt ở thời điểm 42 giờ và 38 giờ ở nồng độ 8,4g/l và 9,0g/l. Tức là, trong trường hợp chủng, biến thể gntR1 được đưa vào, đã xác nhận được rằng mức độ tổng hợp L-lysin theo thời gian lần lượt được tăng lên 17% và 13% [Bảng 7].

Bảng 7

	Chủng	Hiệu suất tổng hợp (g/giờ)	%
Glucoza	CJ3P	0,17	100
	CJ3P::gntR1(R102C)	0,20	117
Đường thô	CJ3P	0,21	100
	CJ3P::gntR1(R102C)	0,24	113

Do đó, từ các kết quả nêu trên, khi biến thể gntR1 được đưa vào chủng tổng hợp lysin thuộc giống *Corynebacterium*, đã xác nhận được rằng do tăng mức độ sử dụng đường nên hiệu suất tổng hợp lysin được tăng lên một cách đáng kể.

Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan đến sáng chế có thể được hiểu rằng sáng chế có thể được đưa ra ở dạng các phương án cụ thể khác mà không cần cải tiến giải pháp kỹ thuật hoặc đặc điểm cơ bản của sáng chế. Về mặt này, các phương án được lấy làm ví dụ nêu trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Trái lại, sáng chế được dự định không những bao hàm các phương án được lấy làm ví dụ mà còn bao hàm các biến đổi, cải biến, dạng tương đương khác nhau, và các phương án khác mà có thể được nằm trong ý tưởng và phạm vi của sáng chế như được xác định bởi yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Vi sinh vật chứa biến thể kim hãm gluconat tổng hợp L-lysin theo sáng chế có mức độ sử dụng đường cao hơn so với vi sinh vật không chứa biến thể này và dẫn tới quá

trình sản xuất L-lysin một cách hữu hiệu. Cụ thể là, L-lysin là axit amin thiết yếu của thức ăn cho động vật và cần được tạo ra khối lượng lớn trong công nghiệp, và khi L-lysin được sản xuất với hiệu suất cao theo sáng chế, chi phí sản xuất thức ăn còn có thể được giảm đi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit có hoạt tính kim hãm gluconat chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1.
2. Polynucleotit mã hóa polypeptit theo điểm 1.
3. Polynucleotit theo điểm 2, trong đó polynucleotit này chứa trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 2.
4. Vector biểu hiện chứa polynucleotit theo điểm 2.
5. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* tổng hợp L-lysin biểu hiện polypeptit theo điểm 1.
6. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm 5, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* này là *Corynebacterium glutamicum*.
7. Phương pháp sản xuất L-lysin bao gồm các bước:
 - (a) nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm 5 hoặc 6 trong môi trường; và
 - (b) thu L-lysin từ vi sinh vật đã được nuôi cấy hoặc môi trường thu được ở bước (a).

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH KÌM HẮM GLUCONAT, VI SINH VẬT BIỂU HIỆN
 POLYPEPTIT NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-LYSIN
 <130> OPA15327-PCT
 <150> KR 10-2015-0055495
 <151> 2015-04-20
 <160> 8
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> GntR1 (R102C)
 <400> 1
 Met Thr Pro Ala Asn Glu Ser Pro Met Thr Asn Pro Leu Gly Ser Ala
 1 5 10 15
 Pro Thr Pro Ala Lys Pro Leu Leu Asp Ser Val Leu Asp Glu Leu Gly
 20 25 30
 Gln Asp Ile Ile Ser Gly Lys Val Ala Val Gly Asp Thr Phe Lys Leu
 35 40 45
 Met Asp Ile Gly Glu Arg Phe Gly Ile Ser Arg Thr Val Ala Arg Glu
 50 55 60
 Ala Met Arg Ala Leu Glu Gln Leu Gly Leu Val Ala Ser Ser Arg Arg
 65 70 75 80
 Ile Gly Ile Thr Val Leu Pro Gln Glu Glu Trp Ala Val Phe Asp Lys
 85 90 95
 Ser Ile Ile Arg Trp Cys Leu Asn Asp Glu Gly Gln Arg Glu Gly Gln
 100 105 110
 Leu Gln Ser Leu Thr Glu Leu Arg Ile Ala Ile Glu Pro Ile Ala Ala
 115 120 125
 Arg Ser Val Ala Leu His Ala Ser Thr Ala Glu Leu Glu Lys Ile Arg
 130 135 140
 Ala Leu Ala Thr Glu Met Arg Gln Leu Gly Glu Ser Gly Gln Gly Ala
 145 150 155 160
 Ser Gln Arg Phe Leu Glu Ala Asp Val Thr Phe His Glu Leu Ile Leu
 165 170 175
 Arg Tyr Cys His Asn Glu Met Phe Ala Ala Leu Ile Pro Ser Ile Ser
 180 185 190

Ala Val Leu Val Gly Arg Thr Glu Leu Gly Leu Gln Pro Asp Leu Pro
 195 200 205

Ala His Glu Ala Leu Asp Asn His Asp Lys Leu Ala Asp Ala Leu Leu
 210 215 220

Asn Arg Asp Ala Asp Ala Ala Glu Thr Ala Ser Arg Asn Ile Leu Asn
 225 230 235 240

Glu Val Arg Ser Ala Leu Gly Thr Leu Asn
 245 250

<210> 2
 <211> 753
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> gntR1 (R102C)

<400> 2
 atgaccccag caaacgaaag tcctatgact aatccattag gttctgcccc caccocagcc 60
 aagccacttc ttgacagtgt tcttgatgag ctcggtcaag atatcatcag tggcaagggtt 120
 gctgtcggag ataccttcaa gctgatggac atcggcgagc gttttggcat ttcccgcaca 180
 gtggcagcgc aagcgatgcg cgctttggag cagctcggtc ttgtcgcttc ttcacgtcgc 240
 attggcatta ctgttttgcc acaggaagag tgggctgttt ttgataagtc catcattcgc 300
 tgggtgtctca atgacgaagg tcagcgtgaa ggccagcttc agtctcttac cgagcttcgt 360
 attgctattg aaccgattgc cgcgcgagc gttgctcttc acgctcaac cgccgagctc 420
 gagaaaatcc gcgcgctcgc aacagagatg cgtcagttgg gtgaatctgg tcagggtgcg 480
 tcccagcgct tcctcgaagc ggacgtcact ttccacgagc tcattcttgcg ttattgccac 540
 aatgagatgt tcgctgcact gattccgtcg attagcgcgg ttcttgctgg ccgcaccgag 600
 ctcggcctgc agcctgatct gccggcgac gaggcgctag acaaccacga taagcttgcc 660
 gacgccctcc ttaaccgcga cgccgacgcc gcagaaactg cgtcccgaaa catcctcaat 720
 gaggtgcgca gcgcgctggg cacgctgaac taa 753

<210> 3
 <211> 753
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 3
 atgaccccag caaacgaaag tcctatgact aatccattag gttctgcccc caccocagcc 60
 aagccacttc ttgacagtgt tcttgatgag ctcggtcaag atatcatcag tggcaagggtt 120
 gctgtcggag ataccttcaa gctgatggac atcggcgagc gttttggcat ttcccgcaca 180

```

gtggcacgcg aagcgatgcg cgctttggag cagctcggtc ttgtcgcttc ttcacgtcgc      240
attggcatta ctgttttgcc acaggaagag tgggctgttt ttgataagtc catcattcgc      300
tggcgctctca atgacgaagg tcagcgtgaa ggccagcttc agtctcttac cgagcttcgt      360
attgctattg aaccgattgc cgcgcgcagc gttgctcttc acgcgtcaac cgccgagctc      420
gagaaaatcc gcgcgctcgc aacagagatg cgtcagttgg gtgaatctgg tcagggtgcg      480
tcccagcgct tcctcgaagc ggacgtcact ttccacgagc tcattcttgcg ttattgccac      540
aatgagatgt tcgctgcact gattccgtcg attagcgcgg ttcttgtcgg ccgcaccgag      600
ctcggcctgc agcctgatct gccggcgcac gagggcgctag acaaccacga taagcttgcc      660
gacgcctccc ttaaccgcga cgccgacgcc gcagaaactg cgtcccgaag catcctcaat      720
gaggtgcgca gcgcgctggg cacgctgaac taa                                     753

```

```

<210>      4
<211>     250
<212>      PRT
<213>    Corynebacterium glutamicum

```

```

<400>      4
Met Thr Pro Ala Asn Glu Ser Pro Met Thr Asn Pro Leu Gly Ser Ala
  1              5              10              15

Pro Thr Pro Ala Lys Pro Leu Leu Asp Ser Val Leu Asp Glu Leu Gly
          20              25              30

Gln Asp Ile Ile Ser Gly Lys Val Ala Val Gly Asp Thr Phe Lys Leu
  35              40              45

Met Asp Ile Gly Glu Arg Phe Gly Ile Ser Arg Thr Val Ala Arg Glu
  50              55              60

Ala Met Arg Ala Leu Glu Gln Leu Gly Leu Val Ala Ser Ser Arg Arg
  65              70              75              80

Ile Gly Ile Thr Val Leu Pro Gln Glu Glu Trp Ala Val Phe Asp Lys
          85              90              95

Ser Ile Ile Arg Trp Arg Leu Asn Asp Glu Gly Gln Arg Glu Gly Gln
  100             105             110

Leu Gln Ser Leu Thr Glu Leu Arg Ile Ala Ile Glu Pro Ile Ala Ala
  115             120             125

Arg Ser Val Ala Leu His Ala Ser Thr Ala Glu Leu Lys Ile Arg
  130             135             140

Ala Leu Ala Thr Glu Met Arg Gln Leu Gly Glu Ser Gly Gln Gly Ala
  145             150             155             160

Ser Gln Arg Phe Leu Glu Ala Asp Val Thr Phe His Glu Leu Ile Leu
          165             170             175

Arg Tyr Cys His Asn Glu Met Phe Ala Ala Leu Ile Pro Ser Ile Ser

```

	180		185		190
Ala Val	Leu Val Gly Arg Thr	Glu Leu Gly Leu Gln	Pro Asp Leu Pro		
195		200	205		
Ala His	Glu Ala Leu Asp Asn	His Asp Lys Leu Ala	Asp Ala Leu Leu		
210		215	220		
Asn Arg	Asp Ala Asp Ala	Glu Thr Ala Ser	Arg Asn Ile Leu	Asn	
225		230	235	240	
Glu Val	Arg Ser Ala Leu	Gly Thr Leu	Asn		
	245	250			

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 5
 tcagggtgta gcggttcggt ttat

24

<210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 6
 ccgcgcgtaa tacgactcac tata

24

<210> 7
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 7
 aagaattcag cagatcgaag aagaagc

27

<210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 8
aagtcgacgg gactaaaagc tggcg

25