



(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)



1-0030244

(51)⁷ C12N 15/77; C12P 13/00; C12N 15/52

(13) B

(21) 1-2016-01671

(22) 08/10/2014

(86) PCT/KR2014/009468 08/10/2014

(87) WO2015/053552 16/04/2015

(30) 10-2013-0121090 11/10/2013 KR; 10-2014-0091307 18/07/2014 KR

(45) 25/12/2021 405

(43) 25/07/2016 340A

(73) CJ CHEILJEDANG CORP. (KR)

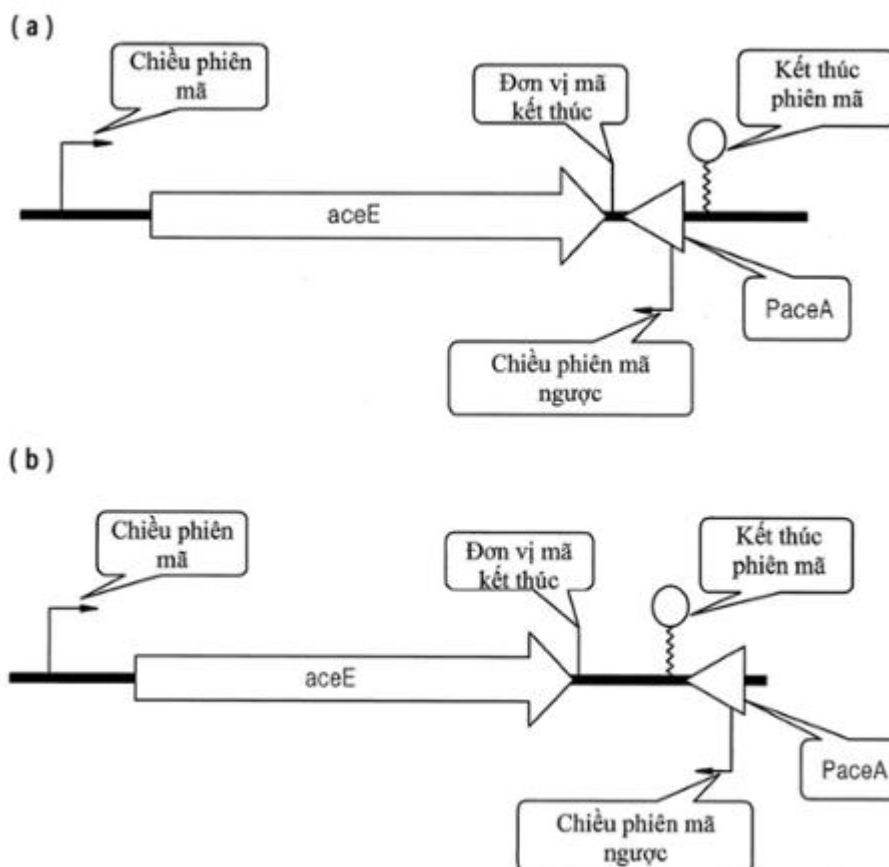
(Ssangnim-dong) 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea

(72) MOON, Jun Ok (KR); LIM, Sang Jo (KR); KWON, Do Hyun (KR); LEE, Kwang Ho (KR); BAE, Hyun Won (KR).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L- AXIT AMIN

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất L-axit amin bằng cách sử dụng vi sinh vật coryneform tái tổ hợp trong đó sự biểu hiện của gen đích được làm suy yếu nhờ sử dụng phương pháp ức chế phiên mã gen.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất L-axit amin, và cụ thể là phương pháp sản xuất L-axit amin nhờ sử dụng phương pháp ức chế phiên mã gen.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Pyruvat được sản xuất thông qua sự thủy phân các nguồn cacbon khác nhau trong các vi sinh vật coryneform, được chuyển hóa thành aspartat thông qua oxaloaxetat. Aspartat được chuyển hóa thành các axit amin ví dụ như threonin, metionin, isoleuxin, và lysin thông qua các con đường sinh tổng hợp khác nhau (như thể hiện trên Fig.1). Do đó, sự biểu hiện của các gen, được đặt ở mỗi điểm phân nhánh trong các quá trình sinh tổng hợp axit amin, có thể được ức chế để làm giảm sản phẩm phụ và tăng sản sinh axit amin mong muốn.

Như được mô tả ở trên, để phát triển chủng vi sinh vật có khả năng sản sinh vật liệu đích hiệu quả cao nhờ sử dụng kỹ thuật di truyền và kỹ thuật trao đổi chất (kỹ thuật biến dưỡng), sự biểu hiện của các gen tham gia vào các quá trình trao đổi chất khác nhau của vi sinh vật cần được kiểm soát có chọn lọc. Gần đây, đã có phát biểu chính thức về kỹ thuật làm yếu biểu hiện gen, còn được gọi là “phiên mã hội tụ nhân tạo” (Krylov et al., J Mol Microbiol Biotechnol, 18:1-13, 2010). Phiên mã hội tụ nhân tạo là kỹ thuật làm yếu sự biểu hiện của gen đích bằng cách chèn promotor vào vùng xuôi dòng của trình tự kết thúc phiên mã của gen đích sao cho chiều ngược lại của promotor gây ra sự xung đột giữa các phức polymeraza ARN xuất phát từ mỗi promotor trong quá trình phiên mã.

Các tác giả sáng chế đã phát triển kỹ thuật ức chế có chọn lọc sự biểu hiện của gen đích với sự có mặt của axetat bằng cách chèn promotor cảm ứng axetat theo chiều ngược lại với sự phiên mã gen đích, và áp dụng hiệu quả kỹ thuật ức chế sự biểu hiện gen đặt tại các vị trí nhánh trong các vi sinh vật coryneform. Sau đó, các tác giả sáng chế đã kiểm chứng để tạo ra vi sinh vật coryneform có khả năng sản sinh L-axit amin với hiệu suất cao nhờ sử dụng công nghệ và hoàn thành sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-axit amin bằng cách

sử dụng promotor cảm ứng axetat để ức chế sự phiên mã gen đích.

Một phương án của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-axit amin, phương pháp bao gồm:

1) nuôi cấy vi sinh vật coryneform tái tổ hợp có khả năng sản sinh L-axit amin, trong đó vi sinh vật coryneform tái tổ hợp có promotor cảm ứng axetat ở phía sau (downstream) của đơn vị mã kết thúc của gen đích trong nhiễm sắc thể; và

2) bổ sung axetat trong quá trình nuôi cấy để làm yếu sự biểu hiện của gen đích, và để làm tăng khả năng sản sinh L-axit amin của vi sinh vật coryneform tái tổ hợp.

trong đó, promotor cảm ứng axetat ở chiều ngược lại với sự phiên mã gen đích.

Phương án khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-axit amin, phương pháp bao gồm:

nuôi cấy vi sinh vật coryneform tái tổ hợp có khả năng sản sinh L-axit amin, trong đó vi sinh vật coryneform tái tổ hợp có promotor được thể hiện bằng trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 ở phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen đích trong nhiễm sắc thể, trong đó phía sau của đơn vị mã kết thúc là giữa đơn vị mã kết thúc và phía trước (upstream) của trình tự kết thúc phiên mã của gen đích.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Mục đích này và/hoặc các mục đích khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng và hiểu đúng hơn từ phần mô tả các phương án dưới đây dựa vào các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 thể hiện các điểm phân nhánh của quá trình sinh tổng hợp axit amin trong vi sinh vật coryneform; và

Các Fig.2 là các sơ đồ thể hiện sự ức chế sự biểu hiện gen aceE bằng cách chèn promotor gen aceA vào gen aceE, trong đó Fig.2a thể hiện phương pháp chèn promotor gen aceA vào giữa đơn vị mã kết thúc và phía trước của trình tự kết thúc phiên mã của gen aceE, và Fig.2b thể hiện phương pháp chèn promotor gen aceA vào phía sau của trình tự kết thúc phiên mã theo chiều ngược lại với chiều phiên mã gen aceE.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới dạng các phương án thực hiện, ví dụ được minh họa kết hợp với các hình vẽ kèm theo, trong đó các số chỉ dẫn giống nhau dùng cho các chi tiết tương tự trong toàn bộ phần mô tả. Về mặt này, các phương án của sáng chế có thể ở các dạng khác nhau và không được hiểu là để giới hạn phạm vi của sáng chế ở phần mô tả được thiết lập ở đây. Theo đó, các phương án được mô tả dưới đây dựa trên các hình vẽ chỉ đơn thuần là để giải thích các khía cạnh của sáng chế. Các cách thể hiện ví dụ như “ít nhất một trong số”, đặt trước một danh sách các yếu tố là để bỏ nghĩa cho toàn bộ danh sách các yếu tố và không phải là bỏ nghĩa cho các yếu tố cụ thể của danh sách.

Sau đây sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Một phương án của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất L-axit amin, phương pháp bao gồm:

- 1) nuôi cấy vi sinh vật coryneform tái tổ hợp có khả năng sản sinh L-axit amin, trong đó vi sinh vật coryneform tái tổ hợp được biến nạp bằng cách chèn promotor cảm ứng axetat vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen đích trong nhiễm sắc thể; và
- 2) bổ sung axetat trong quá trình nuôi cấy để làm yếu sự biểu hiện của gen đích, và để làm tăng khả năng sản sinh L-axit amin của vi sinh vật coryneform tái tổ hợp.

Thuật ngữ “promotor cảm ứng axetat” được sử dụng ở đây để chỉ promotor có hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện gen với sự có mặt của axetat.

Trong vi sinh vật coryneform, axetat được chuyển hóa bởi enzym axetat kinaza (ackA, NCgl2656) và phosphotransaxetylaza (pta, NCgl2657), hoặc bởi suxinyl-CoA:axetat CoA-transferaza (actA, NCgl2480), thành axetyl CoA, và sau đó được chuyển hóa bởi isoxitrat lyaza (aceA, NCgl2248) trong chu trình glyoxalat. Trong vi khuẩn *Escherichia coli*, axetat được chuyển hóa thành axetyl CoA nhờ axetyl-CoA synthetaza (acs, b4069) (Gerstmeir et al., J Biotechnol, 104:99-122, 2003). Sự biểu hiện của các gen nêu trên tham gia vào sự chuyển hóa axetat được kích thích với sự có mặt của axetat. Do đó, khi sử dụng các promotor của các gen, sự biểu hiện của gen có thể được kích thích đặc biệt với sự có mặt của axetat.

Các promotor cảm ứng axetat bao gồm promotor của gen mã hóa isoxitrat lyaza (aceA, NCgl2248) hoặc promotor của operon của gen mã hóa axetat kinaza (ackA,

NCgl2656) và gen mã hóa phosphotransaxetylaza (pta, NCgl2657) là promotor phía trước của gen pta. Cụ thể hơn, trong số các promotor cảm ứng axetat được mô tả ở trên, promotor của mỗi gen aceA được thể hiện bởi trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và bao gồm 486 cặp bazơ trong phía trước của gen aceA và 36 cặp bazơ từ đầu cuối N của khung đọc mở (open reading frame - ORF).

Promotor phía trước của gen pta là một promotor cảm ứng axetat khác được thể hiện bằng trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 2 và bao gồm 340 cặp bazơ ở phía trước của gen pta.

Ngoài ra, rõ ràng là promotor bất kỳ có khả năng kích thích sự biểu hiện gen đích bằng axetat có thể thuộc phạm vi của sáng chế. Ví dụ, các promotor cảm ứng axetat có thể bao gồm trình tự nucleotit chứa trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc 2, hoặc bao gồm trình tự bảo tồn của trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc 2, và một hoặc nhiều nucleotit (tốt hơn là từ 2 đến 20, tốt hơn nữa là từ 2 đến 10, tốt nhất là từ 2 đến 5 nucleotit, phụ thuộc vào cấu trúc không gian của các gốc axit amin của protein) được thay thế, xóa, chèn, thêm hoặc đảo đoạn tại một hoặc nhiều vị trí. Chỉ cần chức năng của promotor cảm ứng vẫn được duy trì hoặc củng cố, nó có thể bao gồm trình tự nucleotit có sự tương đồng cao hơn 80% với trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc 2, tốt hơn là cao hơn 90%, tốt hơn nữa là cao hơn 95%, tốt nhất là cao hơn 97%. Chỉ cần chức năng của promotor cảm ứng vẫn được duy trì, trình tự nucleotit đã thay thế, xóa, chèn, thêm, hoặc đảo đoạn cũng có thể bao gồm trình tự đột biến tự phát hoặc thậm chí là trình tự đột biến nhân tạo.

Thuật ngữ “độ tương đồng” được sử dụng ở đây là sự đồng nhất giữa hai trình tự nucleotit khác nhau. Độ tương đồng có thể được xác định bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng chương trình phần mềm BLAST 2.0 tính toán các tham số dưới dạng điểm số, độ đồng nhất và độ tương tự. Tuy nhiên, phương pháp xác định độ tương đồng không bị giới hạn ở đây.

Trừ khi được đề cập ngược lại ở đây, thuật ngữ “phía trước” là chỉ hướng 5', và thuật ngữ “phía sau” là chỉ hướng 3'. Thông thường, hướng phiên mã là từ 5' đến 3', sao cho vị trí promotor thường là phía trước (5') của gen đích.

Ở đây, gen đích trong nhiễm sắc thể có thể là gen tham gia vào quá trình tổng hợp sinh học các axit amin ví dụ như threonin, metionin, isoleuxin, và lysin từ các

nguồn cacbon khác nhau, cụ thể là gen được đặt ở điểm phân nhánh của con đường sinh tổng hợp.

Ví dụ, đối với lysin, gen pyruvat dehydrogenaza tiểu đơn vị (subunit) E1 (aceE, NCgl2167) tham gia vào sự chuyển hóa pyruvat thành axetyl CoA, gen homoserin dehydrogenaza (hom, NCgl1136) tạo ra homoserin từ aspartat, và gen UDP-N-axetylmuramoylalanyl-D-glutamat-2,6-diaminopimelat ligaza (murE, NCgl2083) sử dụng meso-2,6-diaminopimelat là tiền chất của lysin trong tổng hợp sinh dưỡng, được định vị ở các điểm phân nhánh của con đường sinh tổng hợp.

Đồng thời, gen dihydrodipicolinat syntaza (dapA, NCgl1896) tham gia vào sự sản sinh lysin từ aspartat ở điểm phân nhánh đối với threonin, và gen homoserin kinaza (thrB, NCgl1137) tham gia vào sự sản sinh threonin từ homoserin ở điểm phân nhánh đối với metionin. Đối với alanin và valin, các axit amin xuất phát từ pyruvat, gen pyruvat dehydrogenaza tiểu đơn vị E1 (aceE, NCgl2167) tham gia vào sự chuyển hóa pyruvat thành axetyl CoA ở điểm phân nhánh.

Do đó, gen đích có thể được lựa chọn từ nhóm gồm có gen mã hóa pyruvat dehydrogenaza tiểu đơn vị E1 (aceE, NCgl2167), gen mã hóa homoserin dehydrogenaza (hom, NCgl1136), gen mã hóa UDP-N-axetylmuramoylalanyl-D-glutamat-2,6-diaminopimelat ligaza (murE, NCgl2083), và gen mã hóa dihydrodipicolinat synthaza (dapA, NCgl1896), nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Cụ thể, gen pyruvat dehydrogenaza tiểu đơn vị E1 (aceE, NCgl2167) là một trong số các đơn vị protein con của phức chất pyruvat dehydrogenaza (pyruvate dehydrogenase complex: PDHC), chất tham gia vào việc đưa pyruvat, là chất chuyển hóa cuối cùng của sự glucoza phân vào chu trình axit tricarboxylic (sau đây gọi là chu trình TCA). Do đó, việc làm yếu sự biểu hiện của gen aceE có thể làm giảm sự đưa các nguồn cacbon vào chu trình TCA và làm tăng việc đưa các nguồn cacbon vào con đường sinh tổng hợp lysin để làm tăng sự sản sinh lysin.

Homoserin dehydrogenaza (hom, NCgl1136) là enzym tổng hợp homoserin từ aspartat semialdehyt. Vì aspartat semialdehyt là một trong các tiền chất trung gian quan trọng của con đường sinh tổng hợp lysin, việc làm yếu hoạt tính gen hom có thể làm giảm sự đưa các nguồn cacbon vào con đường sinh tổng hợp homoserin và làm tăng việc đưa các nguồn cacbon vào con đường sinh tổng hợp lysin để làm tăng sản

sinh lysin.

UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamat-2,6-điaminopimelat ligaza (murE, NCgl2083) sử dụng meso-2,6-điaminopimelat để tổng hợp sinh dưỡng. Vì meso-2,6-điaminopimelat cũng được sử dụng làm tiền chất trong sinh tổng hợp lysin, nên việc làm suy yếu hoạt tính gen murE có thể làm giảm sự đưa các nguồn cacbon vào tổng hợp sinh dưỡng và làm tăng việc đưa các nguồn cacbon vào con đường sinh tổng hợp lysin để làm tăng sản sinh lysin.

Dihydrođipicolinat synthaza (dapA, NCgl1896) là enzym tham gia vào quá trình sản sinh lysin nhờ sử dụng aspartat semialđehyt. Vì aspartat semialđehyt là một trong các tiền chất trung gian của con đường sinh tổng hợp lysin, nên việc làm suy yếu hoạt tính gen dapA có thể làm giảm sự đưa các nguồn cacbon vào con đường sinh tổng hợp lysin và làm tăng việc đưa các nguồn cacbon vào con đường sinh tổng hợp threonin để làm tăng sản sinh threonin.

Thuật ngữ “đơn vị mã kết thúc” được sử dụng ở đây là để chỉ các đơn vị mã không mã hóa axit amin trên mARN, nhưng có tác dụng là tín hiệu để kết thúc sự tổng hợp protein. Ba đơn vị mã bao gồm UAA, UAG, và UGA thường được sử dụng làm các đơn vị mã kết thúc.

Thuật ngữ “trình tự kết thúc phiên mã” được sử dụng ở đây là để chỉ trình tự lặp nghịch đảo giàu cặp bazơ GC. Trình tự kết thúc phiên mã tạo ra vòng gấp cặp tóc để kết thúc sự phiên mã gen.

Theo sáng chế, để làm suy yếu sự biểu hiện của gen đích, như được mô tả ở trên, promotor cảm ứng axetat có thể được đưa vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen đích, cụ thể là giữa đơn vị mã kết thúc và phía trước của trình tự kết thúc phiên mã. Promotor cảm ứng axetat có thể được sử dụng để gây ra sự phiên mã ngược gen đích sao cho các phức chất ARN polymeraza có thể xung đột với nhau để làm yếu sự biểu hiện của gen đích.

Sự biểu hiện của gen đích có thể được làm suy yếu tại thời điểm bất kỳ khi nuôi cấy. Cụ thể hơn, sự biểu hiện của gen đích có thể được làm suy yếu trước khi hoặc trong khi nuôi cấy.

Thuật ngữ “biến nạp” được sử dụng ở đây để chỉ việc đưa vector bao gồm

polynucleotit mã hóa gen đích vào tế bào vật chủ sao cho protein được mã hóa bởi polynucleotit có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ. Chỉ cần polynucleotit được đưa vào có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ, polynucleotit có thể được chèn vào trong nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ hoặc tồn tại bên ngoài nhiễm sắc thể. Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN hoặc ARN mã hóa protein đích. Chỉ cần polynucleotit có thể được đưa vào và được biểu hiện trong tế bào vật chủ, polynucleotit có thể được đưa vào ở dạng bất kỳ.

Theo phương án của sáng chế, vi sinh vật coryneform có thể bao gồm các vi sinh vật chi *Corynebacterium*, chi *Brevibacterium*, chi *Arthrobacter* sp., và chi *Microbacterium* sp.. Các ví dụ về vi sinh vật coryneform bao gồm *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, và các biến thể sản sinh L-axit amin được điều chế từ chúng. Cụ thể là, vi sinh vật coryneform có thể là *Corynebacterium glutamicum*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Cụ thể hơn, các vi sinh vật coryneform theo sáng chế có thể bao gồm *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (số lưu chủng trước là KFCC10881, tham chiếu patent Hàn Quốc số 10-0159812), *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P (tham chiếu patent Hàn Quốc số 10-0924065), và *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P (số lưu chủng trước là KFCC10750, tham chiếu patent Hàn Quốc số 10-0073610).

Corynebacterium glutamicum CJ3P cũng có thể là vi sinh vật coryneform theo sáng chế. CJ3P đã được phát triển để có khả năng sản sinh lysin nhờ đưa đột biến vào ba gen tham gia vào khả năng sản sinh lysin (pyc(P458S), hom(V59A), và lysC(T311I)) vào chủng bố mẹ là loài *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032) hoang dại theo đề xuất bởi Binder và đồng sự (Binder et al., Genome Biology, 13:R40, 2012).

Ngoài ra, vi sinh vật coryneform khác theo sáng chế có thể là *Corynebacterium glutamicum* KCCM11222P, một chủng vi sinh sản sinh L-threonin (tham chiếu patent Hàn Quốc số 10-1335853).

Theo một phương án của sáng chế, trong tất cả các vi sinh vật coryneform có promotor được thể hiện bằng trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 hoặc

SEQ ID NO: 2 được đưa vào, khả năng sản sinh L-lysin hoặc L-threonin tăng lên so với chủng bố mẹ.

Đối với phương pháp được đề xuất theo sáng chế, việc nuôi cấy vi sinh vật coryneform có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các điều kiện nuôi cấy và phương pháp nuôi cấy bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Môi trường nuôi cấy, có thể được sử dụng khi nuôi cấy chủng vi khuẩn coryneform, có thể là các môi trường nuôi cấy, ví dụ, được mô tả trong Cẩm nang các phương pháp nghiên cứu vi khuẩn tổng quát (Manual of Methods for General Bacteriology) do Hiệp hội vi trùng học và vi sinh học Hoa Kỳ (American Society for Bacteriology) phát hành (Washington D.C., USA, 1981).

Các nguồn cacbon có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy có thể bao gồm hydrat cacbon ví dụ như glucoza, sacaroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xelluloza, và dầu hoặc chất béo chẳng hạn như dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu thầu dầu, và dầu dừa, axit béo chẳng hạn như axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic, rượu chẳng hạn như glyxerol và etanol, và axit hữu cơ ví dụ như axit axetic. Các chất này có thể ở dạng riêng rẽ hoặc dưới dạng hỗn hợp.

Các nguồn nitơ có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy có thể bao gồm pepton, cao nấm men, cao thịt bò, cao mạch nha, dịch ngâm ngô, đậu nành, và urê, và nguồn nitơ vô cơ ví dụ như amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni carbonat, và amoni nitrat. Các nguồn nitơ này cũng có thể ở dạng riêng rẽ hoặc hỗn hợp.

Các nguồn phospho có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy có thể bao gồm kali dihydro phosphat, đikali hydro phosphat, và muối chứa natri của chúng. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể còn bao gồm muối kim loại ví dụ như magie sulfat và sắt sulfat cần thiết cho sinh trưởng. Bên cạnh các chất được mô tả ở trên, các chất cần thiết cho sinh trưởng ví dụ như các axit amin và các vitamin có thể được sử dụng. Ngoài ra, các tiền chất thích hợp có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy. Các nguyên liệu thô có thể được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy theo từng mẻ hoặc liên tục trong khi nuôi cấy.

Trong khi nuôi cấy vi sinh vật, độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng cách bổ sung hợp chất bazơ ví dụ như amoni hydroxyt, kali hydroxyt, và

amoniac, hoặc hợp chất axit ví dụ như axit phosphoric và axit sulfuric vào môi trường nuôi cấy ở chế độ thích hợp. Đồng thời, việc tạo bọt có thể được ngăn chặn bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt ví dụ như polyglycol este của axit béo. Để duy trì các điều kiện hiếu khí, oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ không khí) có thể được thổi vào môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy có thể thường trong khoảng từ 20°C đến 45°C, tốt hơn là khoảng từ 25°C đến 40°C. Việc nuôi cấy có thể tiếp tục đến khi sản sinh được lượng L-axit amin mong muốn, nhưng thời gian nuôi cấy thích hợp có thể khoảng từ 10 đến 160 giờ.

Đối với phương pháp được đề xuất theo sáng chế, việc nuôi cấy có thể được thực hiện theo chế độ liên tục hoặc theo từng mẻ chẳng hạn như nuôi cấy mẻ, nuôi cấy mẻ bổ sung cơ chất, và nuôi cấy mẻ bổ sung cơ chất lặp lại. Các phương pháp nuôi cấy này đã biết trong lĩnh vực này và các phương pháp nuôi cấy bất kỳ cũng có thể được sử dụng.

Thuật ngữ “nuôi cấy” được sử dụng ở đây có thể bao gồm cả chuẩn bị môi trường nuôi cấy và thời gian sinh dưỡng vi sinh vật.

Đối với phương pháp được đề xuất theo sáng chế, phương pháp có thể còn bao gồm bước tinh chế hoặc thu hồi. L-axit amin cần tạo ra có thể được tinh chế hoặc thu hồi từ dung dịch nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này theo phương pháp chẳng hạn như nuôi cấy mẻ, nuôi cấy liên tục và nuôi cấy mẻ bổ sung cơ chất.

L-axit amin được tạo ra trong khi nuôi cấy theo sáng chế có thể là một axit được chọn từ nhóm gồm có threonin, metionin, isoleuxin, lysin, valin, và alanin, cụ thể là lysin hoặc threonin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa trên các ví dụ thực hiện. Các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Lựa chọn promotor cảm ứng axetat

Isoxitrat lyaza (aceA, NCgl2248) là enzym chủ đạo của chu trình glyoxylat, và gen mã hóa isoxitrat lyaza được biểu hiện với sự có mặt của axetat. Ngoài ra, axetat

kinaza (ackA, NCgl2656) và phosphotransaxetylaza (pta, NCgl2657), các enzym tham gia vào quá trình chuyển hóa axetat, tạo ra operon, và sự biểu hiện của operon này được tăng cường với sự có mặt của axetat. Các vùng promotor của gen aceA và operon pta-ackA đã được biết đến (Gerstmeir et al., J Biotechnol, 104, 99-122, 2003).

Ở ví dụ 1 này, promotor của gen aceA và promotor của operon pta-ack là vùng promotor phía đầu của gen pta được lựa chọn để ức chế sự phiên mã của gen đích với sự có mặt của axetat. Dựa trên gen aceA được đăng ký tại ngân hàng gen Hoa Kỳ NIH (US NIH GenBank) (số đăng ký NCBI: NCgl2248), thu được trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 1) bao gồm 486 cặp bazơ ở phía trước của gen aceA và 36 cặp bazơ từ đầu N của khung đọc mở (ORF). Ngoài ra, dựa trên gen pta được đăng ký tại US NIH GenBank (số đăng ký NCBI: NCgl2657) thu được trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 2) bao gồm 340 cặp bazơ ở phía trước của gen pta.

Ví dụ 2: Điều chế vectơ dùng để ức chế sự biểu hiện gen aceE

Pyruvat dehydrogenaza tiểu đơn vị E1 (aceE, NCgl2167) là một trong các đơn vị protein con của phức chất pyruvat dehydrogenaza (PDHC), phức chất tham gia vào việc đưa pyruvat, chất chuyển hóa cuối cùng của quá trình glucoza phân vào chu trình TCA. Do đó, việc suy yếu sự biểu hiện của gen aceE có thể làm giảm việc đưa các nguồn cacbon vào chu trình TCA và làm tăng việc đưa các nguồn cacbon vào con đường sinh tổng hợp lysin để làm tăng sản sinh lysin (Blombach et al., Appl Microbiol Biotechnol, 76(3):615-23, 2007).

Promotor của gen aceA được chèn vào phía sau của gen aceE sao cho sự phiên mã từ promotor này có thể xảy ra theo chiều ngược lại với chiều phiên mã gen aceE ban đầu để ức chế sự biểu hiện của gen aceE một cách chọn lọc với sự có mặt của axetat (Fig.2).

Trước hết, phần mềm CLC Main Workbench (CLC Bio, Denmark) được sử dụng để dự đoán trình tự kết thúc phiên mã của gen aceE. Trình tự kết thúc phiên mã là trình tự lặp nghịch đảo giàu cặp bazơ GC và tạo ra vòng gấp cặp tóc để kết thúc sự phiên mã gen. Kết quả dự đoán trình tự kết thúc phiên mã của gen aceE chỉ ra rằng có 36 cặp bazơ, từ cặp bazơ số 21 đến cặp bazơ số 56 trong phía sau từ đơn vị mã kết thúc của gen aceE, tạo ra vòng gấp cặp tóc là trình tự kết thúc phiên mã. Dựa trên kết quả này, hai vectơ được chuẩn bị để chèn tương ứng promotor aceE vào hoặc là phía trước hoặc

là phía sau của trình tự kết thúc phiên mã của gen aceE sao cho sự phiên mã từ promotor này có thể xảy ra theo chiều ngược lại với chiều ban đầu.

<2-1> Chuẩn bị vector pDZ-aceE1-PaceA để ức chế sự biểu hiện của gen aceE

Vector được chuẩn bị bằng cách chèn promotor của gen aceA vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen aceE ở giữa đơn vị mã kết thúc và phía trước của trình tự kết thúc phiên mã.

Để thu được đoạn gen aceE có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, ADN nhiễm sắc thể của chủng vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm mạch khuôn để tổng hợp các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 3 và 4) được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn XbaI ở đầu 5' của đoạn gen và vị trí nhận biết enzym giới hạn SpeI ở đầu 3' của đoạn gen. Phản ứng chuỗi trùng hợp PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi đã tổng hợp để thu được đoạn ADN bao gồm 296 cặp bazơ giữa nucleotit số 2474 từ đơn vị mã khởi đầu của gen aceE và nucleotit số 2769, đơn vị mã kết thúc của gen aceE. Ngoài ra, các đoạn mồi (các SEQ ID NO: 5 và 6), được thiết kế để có vị trí nhận biết SpeI tại đầu 5' của đoạn mồi này và vị trí nhận biết XbaI tại đầu 3' của đoạn mồi này được tổng hợp, và quá trình PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi để thu được đoạn ADN bao gồm 300 cặp bazơ trong phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen aceE. PfuUltra™ High-Fidelity ADN Polymeraza (Stratagene) được sử dụng làm enzym xúc tác sự trùng hợp (polymeraza), và quá trình PCR được thực hiện với 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 30 giây; ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 30 giây; và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 30 giây và sau đó tiếp tục trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 7 phút.

Hai sản phẩm khuếch đại PCR và vector pDZ (tham chiếu patent Hàn Quốc số 10-0924065) để đưa vào nhiễm sắc thể đã được chuẩn bị bằng cách phân cắt với enzym giới hạn XbaI được tạo dòng bằng cách sử dụng kit tạo dòng dung hợp (Infusion Cloning Kit (TAKARA, JP)) để tạo ra vector pDZ-aceE1.

SEQ ID NO: 3: aceE-P1F 5'- ccggggatcctctagacctccggcccatcgttg -3'

SEQ ID NO: 4: aceE-P1R 5'- ttgagactagttattcctcaggagcggttg -3'

SEQ ID NO: 5: aceE-P2F 5'- gaataactagtctcaaggacagataaatc -3'

SEQ ID NO: 6: aceE-P2R 5'- gcaggtcgactctagagaccgaaaagatcgtggcag -3'

Đề thu được đoạn promotor của gen aceA có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, tổng hợp các đoạn mồi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn SpeI ở đầu 5' và ở đầu 3' của đoạn (các SEQ ID NO: 7 và 8). Quá trình PCR được thực hiện sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P làm mạch khuôn và các đoạn mồi đã tổng hợp để khuếch đại vùng promotor của khoảng 500 cặp bazơ được thể hiện bởi trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Sản phẩm khuếch đại PCR và đoạn ADN thu được bằng cách xử lý pDZ-aceE1 với enzym giới hạn SpeI được tạo dòng nhờ sử dụng kit tạo dòng dung hợp (In-fusion Cloning Kit (TAKARA, JP)) để tạo ra vector pDZ-aceE1-PaceA.

SEQ ID NO: 7: PaceA-P3F 5'- gtccttgagactagtagcactctgactacctctg -3'

SEQ ID NO: 8: PaceA-P3R 5'- ctgaggaata actagtttctgtgcggtacgtggc -3'

<2-2> Chuẩn bị vector pDZ-aceE2-PaceA để ức chế sự biểu hiện gen aceE

Vector được chuẩn bị bằng cách chèn promotor của gen aceA vào phía sau của trình tự kết thúc phiên mã của gen aceE.

Đề thu được đoạn gen aceE có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm mạch khuôn, và sử dụng các đoạn mồi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn XbaI ở đầu 5' của đoạn và vị trí nhận biết enzym giới hạn SpeI ở đầu 3' của đoạn (các SEQ ID NO: 9 và 10). Quá trình PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi đã tổng hợp để thu được đoạn ADN bao gồm 294 cặp bazơ giữa nucleotit số 2538 từ đơn vị mã khởi đầu của gen aceE và nucleotit số 62 ở phía sau của đơn vị mã kết thúc. Ngoài ra, sử dụng các đoạn mồi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn SpeI ở đầu 5' của đoạn và vị trí nhận biết enzym giới hạn XbaI ở đầu 3' của đoạn (các SEQ ID NO: 11 và 12) để thực hiện quá trình PCR để thu được đoạn ADN bao gồm 294 cặp bazơ giữa nucleotit số 69 ở phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen aceE và nucleotit số 362. PfuUltra™ High-Fidelity ADN Polymeraza (Stratagene) được sử dụng làm enzym xúc tác sự trùng hợp (polymeraza), và quá trình PCR được thực hiện với 30 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 30 giây, ủ để gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 30 giây, và trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 30 giây và sau đó tiếp tục trùng hợp ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 7 phút.

Hai sản phẩm khuếch đại PCR và vector pDZ để đưa vào nhiễm sắc thể đã được chuẩn bị sẵn sàng bằng cách phân cắt với enzym giới hạn XbaI được tạo dòng bằng cách sử dụng kit tạo dòng dung hợp (In-fusion Cloning Kit (TAKARA, JP)) để tạo ra vector pDZ-aceE2.

SEQ ID NO: 9: aceE-P4F 5'- ccggggatcctctagaggtcccaggcgactacacc -3'

SEQ ID NO: 10: aceE-P4R 5'- gagctactagtagcagcaatcccgccgcagacta -3'

SEQ ID NO: 11: aceE-P5F 5'- gtcgtactagtagctcttttagccgaggaacgcc -3'

SEQ ID NO: 12: aceE-P5R 5'- gcaggtcgactctagacatgctgttgatgagcac -3'

Đề thu được đoạn promotor của gen aceA có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, tổng hợp các đoạn môi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn SpeI ở đầu 5' và ở đầu 3' của đoạn (các SEQ ID NO: 13 và 14). Quá trình PCR được thực hiện sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P làm mạch khuôn và các đoạn môi đã tổng hợp được để khuếch đại vùng promotor là khoảng 500 cặp bazơ được thể hiện bằng trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Sản phẩm khuếch đại PCR và đoạn ADN thu được bằng cách xử lý vector pDZ-aceE2 với enzym giới hạn SpeI được tạo dòng bằng cách sử dụng kit tạo dòng dung hợp (In-fusion Cloning Kit (TAKARA, JP)) để tạo ra vector pDZ-aceE2-PaceA.

SEQ ID NO: 13: PaceA-P6F 5'- aaaaagagctactagtagcactctgactacctctg -3'

SEQ ID NO: 14: PaceA-P6R 5'- gattcgtcgtactagtttctgtgcggtacgtggc -3'

Ví dụ 3: Chuẩn bị các chủng vi sinh trong đó Promotor của gen aceA được chèn vào phía sau của gen aceE

Các vector pDZ-aceE1-PaceA và pDZ-aceE2-PaceA được chuẩn bị trong ví dụ 2 được đưa lần lượt vào chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, chủng vi sinh sản sinh L-lysin bằng xung điện (phương pháp biến nạp được mô tả trong tài liệu Van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol, 52:541-545, 1999). Các chủng vi sinh tương ứng trong đó promotor của gen aceA được chèn vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen aceE trên nhiễm sắc thể sao cho sự phiên mã từ promotor này có thể xảy ra theo chiều ngược lại với chiều ban đầu được lựa chọn bằng cách thực hiện quá trình PCR để thu được chủng vi sinh sản sinh L-lysin. Các chủng vi sinh được lựa chọn

được đặt tên lần lượt là *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P::aceE1-PaceA, và *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P::aceE2-PaceA. *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P::aceE1-PaceA được lưu chủng quốc tế dưới tên *Corynebacterium glutamicum* CA01-2271 tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganism (KCCM)) ngày 12/6/2013 với số lưu chủng KCCM11432P. Phân tích các chủng vi sinh đã chuẩn bị được xác nhận là trình tự nucleotit của vùng đích thu được bằng cách thực hiện quá trình PCR sử dụng SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 6 làm các đoạn mồi cho KCCM11016P::aceE1-PaceA, và SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 12 làm các đoạn mồi cho KCCM11016P::aceE2-PaceA.

Ví dụ 4: So sánh khả năng tạo lysin của các chủng vi sinh trong đó Promotor của gen aceA được chèn vào phía sau của gen aceE

Chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm chủng bố mẹ, và các chủng sản sinh L-lysin *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P::aceE1-PaceA và *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P::aceE2-PaceA được chuẩn bị từ ví dụ 3 được nuôi cấy bằng phương pháp được mô tả dưới đây.

Corynebacterium glutamicum KCCM11016P KCCM11016P::aceE1-PaceA, và KCCM11016P::aceE2-PaceA lần lượt được cấy vào 25 ml môi trường nhân giống được mô tả dưới đây trong các bình tam giác có vách ngăn ở góc dung tích 250 ml, sau đó lắc bình nuôi cấy ở tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 20 giờ. 1 ml dung dịch nhân giống được bổ sung vào bình tam giác có vách ngăn ở góc dung tích 250 ml đã chứa 24 ml môi trường sinh dưỡng được mô tả dưới đây, sau đó lắc bình nuôi cấy ở tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 72 giờ. Các thành phần của môi trường nhân giống và môi trường sinh dưỡng lần lượt được mô tả dưới đây.

<Môi trường nhân giống (độ pH 7,0)>

Glucosa 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 1000 μg , canxi pantothenat 2000 μg , nicotinamit 2000 μg (bổ sung nước cất đến 1 L).

<Môi trường sinh dưỡng (độ pH 7,0)>

Glucosa 100 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 g, protein đậu nành 2,5 g, bột ngô ngâm 5 g, ure 3 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$ 0,5 g, biotin 100 μg , thiamin HCl 1000 μg , canxi pantothenat 2000 μg , nicotinamit 3000 μg , CaCO_3 30 g (bổ sung nước cất đến 1 L).

Sau khi nuôi cấy, thực hiện đo nồng độ L-lysine bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Khi không bổ sung axetat, nồng độ L-lysine trong các dung dịch nuôi cấy *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, KCCM11016P::aceE1-PaceA, và KCCM11016P::aceE2-PaceA được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Sự khác biệt trong sản sinh L-lysine (không bổ sung axetat)

Chủng vi sinh	Lysin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
KCCM11016P	43,5	43,1	43,4
KCCM11016P::aceE1-PaceA	43,7	43,2	43,6
KCCM11016P::aceE2-PaceA	43,3	43,4	43,7

Đồng thời, nuôi cấy các chủng vi sinh theo phương pháp tương tự trừ việc bổ sung axetat với lượng 5 g/L vào môi trường sinh dưỡng để so sánh khả năng sản sinh L-lysine. Nồng độ L-lysine trong các dung dịch nuôi cấy được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Sự khác biệt trong sản sinh L-lysine (bổ sung 5 g/L axetat)

Chủng vi sinh	Lysin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
KCCM11016P	45,6	45,3	45,8
KCCM11016P::aceE1-PaceA	47,2	47,1	47,4
KCCM11016P::aceE2-PaceA	46,7	46,5	47,0

Như được thể hiện trong bảng 1, khi không có mặt axetat, khả năng sản sinh L-lysine của các chủng KCCM11016P::aceE1-PaceA và KCCM11016P::aceE2-PaceA không khác với chủng bố mẹ KCCM11016P.

Tuy nhiên, như được thể hiện trong bảng 2, khi có mặt của axetat, khả năng sản sinh L-lysine của chủng KCCM11016P::aceE1-PaceA cao hơn 3,6% so với chủng bố mẹ KCCM11016P, và của KCCM11016P::aceE2-PaceA cao hơn 2,5% so với chủng bố mẹ KCCM11016P.

Ngoài ra, kết quả so sánh chủng KCCM11016P::aceE1-PaceA và chủng

KCCM11016P::aceE2-PaceA cho thấy chủng KCCM11016P::aceE1-PaceAm trong đó promotor aceA được chèn vào phía trước của trình tự kết thúc phiên mã của gen aceE ở giữa đơn vị mã kết thúc và phía trước của trình tự kết thúc phiên mã, sản sinh L-lysine hiệu quả hơn. Điều này chỉ ra rằng vùng giữa đơn vị mã kết thúc và phía trước của trình tự kết thúc phiên mã có thể được sử dụng để ức chế sự biểu hiện gen một cách hiệu quả hơn.

Ví dụ 5: Chuẩn bị vector pDZ-aceE-Ppta để ức chế sự biểu hiện gen aceE

Axetat kinaza (ackA, NCgl2656) và phosphotransaxetylaza (pta, NCgl2657), các enzym tham gia vào quá trình chuyển hóa axetat tạo ra operon, và sự biểu hiện operon này được tăng cường với sự có mặt của axetat. Do đó, khi sử dụng các promotor của các gen, sự biểu hiện của gen có thể được thúc đẩy đặc biệt với sự có mặt của axetat.

Ở ví dụ 5, để ức chế sự biểu hiện của gen aceE với sự có mặt của axetat, vector để sử dụng làm promotor pta-ack operon là vùng promotor phía trước của gen pta được chuẩn bị.

Để ức chế sự biểu hiện của gen aceE, vector có thể bao gồm promotor của gen pta trong phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen aceE ở giữa đơn vị mã kết thúc và phía trước của trình tự kết thúc phiên mã được xây dựng sao cho sự phiên mã từ promotor của gen pta có thể xảy ra theo chiều ngược lại với chiều phiên mã gen aceE ban đầu.

Để thu được đoạn gen aceE có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm mạch khuôn để tạo ra vector pDZ-aceE1 bằng phương pháp tương tự như ở ví dụ 2.

Để thu được đoạn promotor của gen pta có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, các đoạn môi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn SpeI ở đầu 5' và đầu 3' của đoạn (SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16) được tổng hợp. ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm mạch khuôn, và sử dụng các đoạn môi đã tổng hợp để thực hiện quá trình PCR để khuếch đại vùng promotor chứa khoảng 340 cặp bazơ được thể hiện bằng trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 2. Sản phẩm khuếch đại PCR và đoạn ADN thu được bằng cách xử lý vector pDZ-aceE1 với enzym giới hạn SpeI được tạo dòng nhờ sử dụng kit tạo dòng dung hợp (In-fusion Cloning Kit (TAKARA, JP) để tạo ra vector pDZ-aceE1-Ppta.

SEQ ID NO: 15: Ppta-P7F 5'- gtcccttgagactagtctttgctggggtcagatttg-3'

SEQ ID NO: 16: Ppta-P7R 5'- ctgaggaataactagtagcatcgcttttctaatttc-3'

Ví dụ 6: Chuẩn bị các chủng vi sinh trong đó promotor của gen pta được chèn vào phía sau của gen aceE và so sánh khả năng sản sinh lysin của chúng

Chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được biến nạp với vector pDZ-aceE1-Ppta được chuẩn bị ở ví dụ 5 theo phương pháp tương tự phương pháp ở ví dụ 3. Chủng vi sinh trong đó promotor của gen pta được chèn vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen aceE trên nhiễm sắc thể sao cho sự phiên mã có thể xảy ra theo chiều ngược lại với chiều phiên mã gen aceE ban đầu được lựa chọn bằng cách thực hiện quá trình PCR để thu được chủng vi sinh sản sinh L-lysine được đặt tên là KCCM11016P::aceE1-Ppta. Chủng KCCM11016P::aceE1-Ppta thu được được xác nhận là có thể phân tích trình tự nucleotit của vùng đích thu được bằng cách thực hiện quá trình PCR sử dụng SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 6 làm các đoạn mồi.

Chủng vi sinh đã chuẩn bị được nuôi cấy theo phương pháp tương tự như ở ví dụ 4, và nồng độ của L-lysine được thu hồi từ dịch nuôi cấy được đo lại. Khi không bổ sung axetat, nồng độ L-lysine trong dịch nuôi cấy được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Sự khác biệt trong sản sinh L-lysine (không bổ sung axetat)

Chủng vi sinh	Lysin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
KCCM11016P	42,9	43,5	43,4
KCCM11016P::aceE1-Ppta	43,2	43,3	43,6

Đồng thời, chủng vi sinh được nuôi cấy theo phương pháp tương tự trừ việc bổ sung axetat với lượng 5 g/L vào môi trường sinh dưỡng để so sánh về khả năng sản sinh L-lysine. Nồng độ của L-lysine trong dịch nuôi cấy được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Sự khác biệt trong sản sinh L-lysine (bổ sung 5 g/L axetat)

Chủng vi sinh	Lysin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
KCCM11016P	45,5	45,7	45,3
KCCM11016P::aceE1-Ppta	46,7	46,5	46,6

Như được thể hiện trong bảng 3, khi không có mặt axetat, khả năng sản sinh L-

lysin của chủng KCCM11016P::aceE1-Ppta không khác so với chủng bố mẹ KCCM11016P.

Tuy nhiên, như được thể hiện trong bảng 4, khi có mặt của axetat, khả năng sản sinh L-lysin của chủng KCCM11016P::aceE1-Ppta cao hơn 2,4% so với chủng bố mẹ KCCM11016P.

Ngoài ra, do khả năng sản sinh L-lysin của chủng KCCM11016P::aceE1-PaceA cao hơn so với chủng KCCM11016P::aceE1-Ppta, khi có mặt của axetat, sự biểu hiện của gen đích có thể được ức chế hiệu quả hơn nhờ sử dụng promotor của gen aceA so với sử dụng promotor của gen pta.

Ví dụ 7: Chuẩn bị các chủng vi sinh trong đó promotor của gen aceA được chèn vào phía sau của gen aceE

Ba chủng vi sinh sản sinh L-lysin là *Corynebacterium glutamicum* KFCC10750, KCCM10770P, và CJ3P lần lượt được biến nạp với vector pDZ-aceE1-PaceA được chuẩn bị ở ví dụ 2 theo phương pháp tương tự như ở ví dụ 3. Lựa chọn các chủng vi sinh trong đó promotor của gen aceA được chèn vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen aceE trên nhiễm sắc thể sao cho sự phiên mã có thể xảy ra theo chiều ngược lại với chiều phiên mã gen aceE ban đầu bằng cách thực hiện quá trình PCR. Ba chủng sản sinh L-lysin thu được là KFCC10750::aceE1-PaceA, KCCM10770P::aceE1-PaceA, và CJ3P::aceE1-PaceA. Các chủng thu được này được xác nhận là có thể phân tích trình tự nucleotit của vùng đích thu được nhờ thực hiện quá trình PCR sử dụng SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 6 làm các đoạn mồi.

Các chủng đã chuẩn bị được nuôi cấy bằng phương pháp tương tự như ở ví dụ 4, và nồng độ của L-lysin được thu hồi từ dịch nuôi cấy được đo lại. Khi không bổ sung axetat, nồng độ L-lysin trong các dịch nuôi cấy được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. Sự khác biệt trong sản sinh L-lysin (không bổ sung axetat)

Chủng vi sinh	Lysin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
KFCC10750	38,3	38,0	38,4
KFCC10750::aceE1-PaceA	38,6	38,2	38,3
KCCM10770P	47,5	47,3	47,6
KCCM10770P::aceE1-PaceA	47,3	47,7	47,5

CJ3P	8	8,4	8,3
CJ3P::aceE1-PaceA	8,2	8,1	8,5

Ngoài ra, các chủng được nuôi cấy bằng phương pháp tương tự trừ việc bổ sung thêm 5 g/L axetat vào môi trường sinh dưỡng để so sánh sự sản sinh L-lysin. Nồng độ L-lysin trong các dịch nuôi cấy được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. Sự khác biệt trong sản sinh L-lysin (bổ sung 5 g/L axetat)

Chủng vi sinh	Lysin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
KFCC10750	39,3	39,5	39,2
KFCC10750::aceE1-PaceA	41,3	41,6	41,0
KCCM10770P	47,5	47,3	47,6
KCCM10770P::aceE1-PaceA	49,0	48,6	48,8
CJ3P	8	8,4	8,3
CJ3P::aceE1-PaceA	9,5	9,7	9,4

Như được thể hiện trên bảng 5, khi không có mặt axetat, khả năng sản sinh L-lysin của ba chủng KFCC10750::aceE1-PaceA, KCCM10770P::aceE1-PaceA, CJ3P::aceE1-PaceA không khác biệt với chủng bố mẹ.

Tuy nhiên, như được thể hiện trong bảng 6, khi có mặt của axetat, khả năng sản sinh L-lysin của chủng KFCC10750::aceE1-PaceA cao hơn 5% so với chủng bố mẹ, của chủng KCCM10770P::aceE1-PaceA cao hơn 2,8% so với chủng bố mẹ, và của chủng CJ3P::aceE1-PaceA cao hơn 15% so với chủng bố mẹ.

Ví dụ 8: Chuẩn bị vector để ức chế sự biểu hiện của gen hom

Con đường sinh tổng hợp L-threonin sử dụng cùng một loại chất nền giống như con đường sinh tổng hợp L-lysin có thể được làm yếu để làm tăng khả năng sản sinh L-lysin. Ví dụ về các phương pháp làm yếu con đường sinh tổng hợp L-threonin là làm giảm hoạt tính enzyme của homoserin dehydrogenaza (hom, NCgl1136) tạo ra homoserin từ aspartat.

Trong loài *Corynebacterium glutamicum*, gen hom tạo ra operon hom-thrB với gen thrB, và trình tự kết thúc phiên mã của gen hom tồn tại trong phía sau của gen thrB. Đã có báo cáo cho thấy promotor tồn tại trong phía trước của operon hom-thrB là phía trước của gen hom. Ngoài ra, đã có báo cáo cho thấy promotor thứ hai tồn tại

trong phía trước của operon của gen *thrB* (Mateos et al., J Bacteriol, 176:7362-7371, 1994). Do đó, promotor của gen *aceA* được chèn vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen hom sao cho sự phiên mã từ promotor này có thể xảy ra theo chiều ngược lại so với chiều phiên mã gen hom ban đầu để ức chế có chọn lọc sự biểu hiện của gen hom với sự có mặt của axetat. Để duy trì sự biểu hiện của gen *thrB*, trình tự promotor thứ hai được bổ sung vào phía trước của khung đọc mở của gen *thrB*.

Ở ví dụ 8 này, vector tái tổ hợp được chuẩn bị bằng các chèn promotor của gen *aceA* giữa phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen hom và phía trước của gen *thrB*.

Để thu được đoạn gen hom có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm mạch khuôn, và các đoạn mồi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn *XbaI* ở đầu 5' của đoạn và vị trí nhận biết enzym giới hạn *SpeI* ở đầu 3' của đoạn (các SEQ ID NO: 17 và 18) được tổng hợp. Quá trình PCR được thực hiện sử dụng các đoạn mồi đã tổng hợp để thu được đoạn ADN bao gồm 300 cặp bazơ giữa nucleotit số 1039 từ đơn vị mã khởi đầu của gen hom và nucleotit số 1338 là đơn vị mã kết thúc. Ngay cả khi gen *aceA* được chèn giữa các operon hom-*thrB*, sự biểu hiện của gen *thrB* vẫn cần được duy trì. Do đó, khi đoạn ADN bao gồm 300 cặp bazơ của phía sau đơn vị mã kết thúc của gen hom được chuẩn bị, các đoạn mồi được thiết kế để bổ sung trình tự promotor *thrB* có 32 cặp bazơ vào đầu 5' (các SEQ ID NO: 19 và 20) được tổng hợp. Quá trình PCR được thực hiện sử dụng các đoạn mồi này (các SEQ ID NO: 19 và 20) để thu được đoạn ADN có 334 cặp bazơ có vị trí nhận biết enzym giới hạn *SpeI* ở đầu 5' của đoạn và vị trí nhận biết enzym hạn chế *XbaI* ở đầu 3' của đoạn. Quá trình PCR được thực hiện dưới các điều kiện tương tự như ở ví dụ 2.

Hai sản phẩm khuếch đại PCR và vector pDZ để đưa vào nhiễm sắc thể đã được chuẩn bị bằng cách phân cắt với enzym giới hạn *XbaI* được tạo dòng bằng cách sử dụng kit tạo dòng dung hợp (In-fusion Cloning Kit (TAKARA, JP)) để tạo ra vector pDZ-hom.

SEQ ID NO: 17: hom-h1F 5'- ccggggatcctctagaccaggtgagtgccacctacg -3'

SEQ ID NO: 18: hom-h1R 5'- gaggcggatcactagtttagtccctttcgaggcgg -3'

SEQ ID NO: 19: hom-h2F 5'- actagtgatccgcctcgaaaggac -3'

SEQ ID NO: 20: hom-h2R 5'- gcaggtcgactctagagactgcggaatgtgtgtg -3'

Để thu được đoạn promotor của gen *aceA* có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, các đoạn mồi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn *SpeI* ở đầu 5' và ở đầu 3' của đoạn (các SEQ ID NO: 21 và 22) được tổng hợp. Quá trình PCR được thực hiện sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P làm mạch khuôn, và các đoạn mồi đã tổng hợp được để khuếch đại vùng promotor có khoảng 500 cặp bazơ được biểu hiện bởi trình tự nucleotit có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Sản phẩm khuếch đại PCR và đoạn ADN thu được bằng cách xử lý vectơ pDZ-hom với enzym hạn chế *SpeI* được tạo dòng nhờ sử dụng kit tạo dòng dung hợp (In-fusion Cloning Kit (TAKARA, JP)) để chuẩn bị vectơ pDZ-hom-PaceA.

SEQ ID NO: 21: PaceA-h3F 5'- gaggcggatcactagtagcactctgactacctctg -3'

SEQ ID NO: 22: PaceA-h3R 5'- aagggactaaactagtttcctgtgcggtacgtggc -3'

Ví dụ 9: Chuẩn bị các chủng vi sinh có promotor của gen *aceA* được chèn vào phía sau của gen *hom* và so sánh khả năng sản sinh lysin của chúng

Chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P là chủng sản sinh L-lysin được biến nạp với vectơ pDZ-hom-PaceA được chuẩn bị trong ví dụ 8 bằng phương pháp tương tự như phương pháp ở ví dụ 3. Lựa chọn chủng vi sinh trong đó promotor của gen *aceA* được chèn vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen *hom* trên nhiễm sắc thể sao cho sự phiên mã có thể xảy ra theo chiều ngược lại với chiều phiên mã gen *hom* ban đầu bằng cách thực hiện quá trình PCR để thu được chủng vi sinh sản sinh L-lysin, được đặt tên là KCCM11016P::hom-PaceA. Chủng KCCM11016P::hom-PaceA thu được được xác nhận là có thể phân tích trình tự nucleotit của vùng đích thu được bằng cách thực hiện quá trình PCR sử dụng SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 20 làm các đoạn mồi.

Chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm chủng bố mẹ và chủng KCCM11016P::hom-PaceA đã chuẩn bị được nuôi cấy theo phương pháp tương tự như ở ví dụ 4, và nồng độ của L-lysin được thu hồi từ các dịch nuôi cấy được đo lại. Khi không bổ sung axetat, nồng độ L-lysin trong các dịch nuôi cấy của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P và chủng KCCM11016P::hom-PaceA được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7. Sự khác biệt trong sản sinh L-lysine (không bổ sung axetat)

Chủng vi sinh	Lysin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
KCCM11016P	43,2	43,3	43,6
KCCM11016P::hom-PaceA	43,3	43,6	43,4

Ngoài ra, các chủng vi sinh được nuôi cấy theo phương pháp tương tự trừ việc bổ sung 5 g/L axetat vào môi trường sinh dưỡng để so sánh sự sản sinh L-lysine. Nồng độ L-lysine trong các dịch nuôi cấy được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8. Sự khác biệt trong sản sinh L-lysine (bổ sung 5 g/L axetat)

Chủng vi sinh	Lysin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
KCCM11016P	44,9	45,6	45,2
KCCM11016P::hom-PaceA	46,3	46,6	46,4

Như được thể hiện trong Bảng 7, khi không có mặt axetat, khả năng sản sinh L-lysine của chủng KCCM11016P::hom-PaceA không khác biệt với chủng bố mẹ KCCM11016P.

Tuy nhiên, như được thể hiện trong bảng 8, khi có mặt của axetat, khả năng sản sinh L-lysine của chủng KCCM11016P::hom-PaceA cao hơn 2,6% so với chủng bố mẹ KCCM11016P.

Ví dụ 10: Chuẩn bị vector để ức chế sự biểu hiện của gen *murE*

UDP-N-axetylmuramoylalanyl-D-glutamat-2,6-điaminopimelat ligaza (*murE*, NCgl2083) sử dụng meso-2,6-điaminopimelat là một tiền chất để sinh tổng hợp lysine, trong tổng hợp sinh dưỡng. Việc làm yếu hoạt tính của gen *murE* có thể làm giảm việc đưa các nguồn cacbon vào tổng hợp sinh dưỡng và làm tăng việc đưa các nguồn cacbon vào con đường sinh tổng hợp lysine để làm tăng sự sản sinh lysine.

Trong loài *Corynebacterium glutamicum*, gen *murE* (NCgl2083) tạo ra operon với bảy gen từ NCgl2076 tới NCgl2082. Sự phiên mã operon bắt đầu từ NCgl2083 *murE* theo chiều của gen NCgl2076. Vì vậy, trình tự kết thúc phiên mã tồn tại trong phía sau của gen NCgl2076. Do đó, promoter của gen *aceA* được chèn vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen *murE* sao cho sự phiên mã có thể diễn ra theo chiều ngược lại với chiều phiên mã gen *murE* ban đầu để ức chế chọn lọc sự biểu hiện của gen

murE với sự có mặt của axetat. Để duy trì sự biểu hiện của bảy gen khác trừ gen murE được định vị trong vùng thứ nhất của operon, promotor của operon murE được bổ sung thêm vào phía trước của khung đọc mở của gen NCgl2082.

Ở ví dụ 10 này, vectơ tái tổ hợp được chuẩn bị bằng cách chèn promotor của gen aceA vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen murE.

Để thu được đoạn gen murE có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm mạch khuôn, và các đoạn mồi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn XbaI ở đầu 5' của đoạn và vị trí nhận biết enzym giới hạn XhoI ở đầu 3' của đoạn (các SEQ ID NO: 23 và 24) được tổng hợp. Quá trình PCR được thực hiện sử dụng các đoạn mồi đã tổng hợp để thu được đoạn ADN gồm có 300 cặp bazơ giữa nucleotit số 1267 từ đơn vị mã khởi đầu gen murE và nucleotit số 1566 là đơn vị mã kết thúc. Ngoài ra, các đoạn mồi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn XhoI ở đầu 5' của đoạn và vị trí nhận biết enzym giới hạn XbaI ở đầu 3' của đoạn (các SEQ ID NO: 25 và 26) được tổng hợp. Quá trình PCR được thực hiện sử dụng các đoạn mồi đã tổng hợp để thu được đoạn ADN gồm có 292 cặp bazơ từ nucleotit số 10 trong phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen murE. Quá trình PCR được thực hiện dưới các điều kiện tương tự như ở ví dụ 2. Hai sản phẩm khuếch đại PCR và vectơ pDZ để đưa vào nhiễm sắc thể đã chuẩn bị bằng cách phân cắt với enzym giới hạn XbaI được tạo dòng nhờ sử dụng kit tạo dòng dung hợp (In-fusion Cloning Kit (TAKARA, JP)) để chuẩn bị vectơ pDZ-murE.

SEQ ID NO: 23: mur-m1F 5'- ccggggatcctctagaaaccctcggttcagaggtgc -3'

SEQ ID NO: 24: mur-m1R 5'- ttgtgatcatctcgagctatccttctccgtagtaag -3'

SEQ ID NO: 25: mur-m2F 5'- ag ctcgagatgatcacaatgacccttg -3'

SEQ ID NO: 26: mur-m2R 5'- gcaggtcgactctagacatgagcataaatgtcagc -3'

Để thu được đoạn gen aceA có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, các đoạn mồi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn XhoI ở đầu 5' của đoạn (các SEQ ID NO: 27 và 28) được tổng hợp. ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P làm mạch khuôn, và các đoạn mồi đã tổng hợp được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR để khuếch đại vùng promotor có

khoảng 500 cặp bazơ được thể hiện bởi trình tự bazơ có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, để thu được vùng promotor của operon *murE* có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm mạch khuôn, và các đoạn mồi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn *XhoI* ở đầu 3' của đoạn (các SEQ ID NO: 29 và 30) được tổng hợp. Phản ứng PCR được thực hiện sử dụng các đoạn mồi đã tổng hợp để thu được đoạn ADN bao gồm 300 cặp bazơ trong phía trước của khung đọc mở của gen *murE*.

Hai sản phẩm khuếch đại PCR và đoạn ADN thu được bằng cách xử lý vector pDZ-*murE* với enzym giới hạn *XhoI* được tạo dòng nhờ sử dụng kit tạo dòng dung hợp (In-fusion Cloning Kit (TAKARA, JP)) để chuẩn bị vector pDZ-*murE*-PaceA-*PmurE*.

SEQ ID NO: 27: *mur-m3F* 5'- tcacgacgacgactctgactacctctg -3'

SEQ ID NO: 28: *mur-m3R* 5'- agaaggatagctcgagttcctgtgcggtacgtggc -3'

SEQ ID NO: 29: *mur-m4F* 5'- agagtgtgtgtgatgatcctcgatttg -3'

SEQ ID NO: 30: *mur-m4R* 5'- ttgtgatcatctcgagggtttctctctccacagg -3'

Ví dụ 11: Chuẩn bị các chủng vi sinh có promotor của gen *aceA* được chèn vào phía sau của gen *murE* và so sánh khả năng sản sinh lysin của chúng

Chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được biến nạp với vector pDZ-*murE*-PaceA-*PmurE* được chuẩn bị ở ví dụ 10 bằng phương pháp tương tự như ở ví dụ 3.

Chủng vi sinh trong đó promotor của gen *aceA* được chèn vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen *murE* trên nhiễm sắc thể sao cho sự phiên mã có thể xảy ra theo chiều ngược lại với chiều phiên mã gen *murE* ban đầu được lựa chọn bằng cách thực hiện phản ứng PCR để thu được chủng vi sinh sản sinh L-lysin, chủng này được đặt tên là KCCM11016P::*murE*-PaceA-*PmurE*. Chủng KCCM11016P::*murE*-PaceA-*PmurE* thu được được xác nhận là có thể thực hiện phân tích các trình tự nucleotit của vùng đích thu được bằng cách thực hiện phản ứng PCR sử dụng SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 26 làm các đoạn mồi.

Chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm chủng bố

mẹ và chủng KCCM11016P::murE-PaceA-PmurE được nuôi cấy bằng phương pháp tương tự như ở ví dụ 4, và nồng độ của L-lysin được thu hồi từ các dịch nuôi cấy được đo lại. Khi không bổ sung axetat, nồng độ L-lysin trong các dịch nuôi cấy của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P và chủng KCCM11016P::murE-PaceA-PmurE được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9. Sự khác biệt trong sản sinh L-lysin (không bổ sung axetat)

Chủng vi sinh	Lysin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
KCCM11016P	43,5	43,9	44,0
KCCM11016P::murE-PaceA-PmurE	43,7	44,1	43,8

Đồng thời, các chủng vi sinh cũng được nuôi cấy theo phương pháp tương tự trừ việc có bổ sung 5 g/L axetat vào môi trường sinh dưỡng để so sánh sự sản sinh L-lysin. Nồng độ L-lysin trong các dịch nuôi cấy được thể hiện trong bảng 10.

Bảng 10. Sự khác biệt trong sản sinh L-lysin (bổ sung 5 g/L axetat)

Chủng vi sinh	Lysin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
KCCM11016P	45,2	45,6	45,3
KCCM11016P::murE-PaceA-PmurE	46,6	46,9	46,5

Như được thể hiện trong bảng 9, khi không có mặt axetat, khả năng sản sinh L-lysin của chủng KCCM11016P::murE-PaceA-PmurE không khác biệt với chủng bố mẹ KCCM11016P.

Tuy nhiên, như được thể hiện trong bảng 10, khi có mặt của axetat, khả năng sản sinh L-lysin của chủng KCCM11016P::murE-PaceA-PmurE cao hơn 2,8% so với chủng bố mẹ KCCM11016P.

Ví dụ 12: Chuẩn bị vectơ ức chế sự biểu hiện của gen dapA

Con đường sinh tổng hợp L-lysin sử dụng cùng một loại chất nền giống như con đường sinh tổng hợp L-threonin có thể bị làm suy yếu để tăng khả năng sản sinh L-threonin. Một ví dụ về các phương pháp làm suy yếu con đường sinh tổng hợp L-lysin là làm giảm hoạt tính enzym của dihydrodipicolinat syntaza (dapA, NCgl1896) tham gia vào sự sản sinh lysin từ aspartat.

Trong loài *Corynebacterium glutamicum*, gen dapA tạo ra operon dapA-ORF4

với gen ORF4 (NCgl1895), và do đó trình tự kết thúc phiên mã của gen *dapA* tồn tại trong phía sau của gen ORF4. Đồng thời, đã có báo cáo cho thấy promotor tồn tại trong phía trước của operon *dapA*-ORF4 là phía trước của gen *dapA*, và promotor thứ hai tồn tại trong phía trước của gen ORF4 (Patek et al., Biotechnology letters, 19:1113-1117, 1997). Do đó, promotor của gen *aceA* được chèn vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen *dapA* sao cho sự phiên mã có thể diễn ra theo chiều ngược lại với chiều phiên mã gen *dapA* ban đầu để ức chế có chọn lọc sự biểu hiện của gen *dapA* với sự có mặt của axetat. Để duy trì sự biểu hiện của gen ORF4, trình tự vùng promotor có khoảng 100 cặp bazơ trong phía sau của gen ORF4 được bổ sung vào phía trước của ORF của gen ORF4.

Ở ví dụ 12 này, vector tái tổ hợp được chuẩn bị bằng cách chèn promotor của gen *aceA* vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen *dapA*.

Để thu được đoạn gen *dapA* có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng làm mạch khuôn, và các đoạn mồi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn *Xba*I ở đầu 5' của đoạn và vị trí nhận biết enzym giới hạn *Spe*I ở đầu 3' của đoạn (các SEQ ID NO: 31 và 32) được tổng hợp. PCR được thực hiện sử dụng các đoạn mồi đã tổng hợp được để thu đoạn ADN gồm có 301 cặp bazơ giữa nucleotit số 606 từ đơn vị mã khởi đầu của gen *dapA* và nucleotit số 906 là đơn vị mã kết thúc. Ngoài ra, các đoạn mồi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn *Spe*I ở đầu 5' của đoạn và vị trí nhận biết enzym giới hạn *Xba*I ở đầu 3' của đoạn (các SEQ ID NO: 33 và 34) được tổng hợp. Thông qua phản ứng PCR, thu được đoạn ADN còn bao gồm trình tự vùng promotor có khoảng 100 cặp bazơ giữa nucleotit số 809 từ đơn vị mã khởi đầu gen *dapA* và nucleotit số 2 trong phía sau của đơn vị mã kết thúc, để duy trì sự biểu hiện của gen ORF4, và 213 cặp bazơ trong phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen *dapA*. Quá trình PCR được thực hiện dưới các điều kiện tương tự như ở ví dụ 2. Hai sản phẩm khuếch đại PCR và vector pDZ để đưa vào nhiễm sắc thể đã được chuẩn bị bằng cách phân cắt với enzym giới hạn *Xba*I được tạo dòng bằng cách sử dụng kit tạo dòng dung hợp (In-fusion Cloning Kit (TAKARA, JP)) để tạo ra vector pDZ-*dap*.

SEQ ID NO: 31: *dapA*-d1F 5'- ccggggatcctctaga tgtttgcttgctttgggc -3'

SEQ ID NO: 32: *dapA*-d1R 5'- gttgatgcactagtttatagaactccagcttt-3'

SEQ ID NO: 33: dapA-d2F 5'- ttctataaactagtgcatcaacgtaggagatcc -3'

SEQ ID NO: 34: dapA-d2R 5'- gcaggtcgactctagacgttctgggaaccctgag -3'

Để thu được đoạn promotor của gen aceA có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, các đoạn môi được thiết kế để có vị trí nhận biết enzym giới hạn SpeI ở đầu 5' và ở đầu 3' của đoạn (các SEQ ID NO: 35 và 36) được tổng hợp. Quá trình PCR được thực hiện sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P làm mạch khuôn và các đoạn môi đã tổng hợp được để khuếch đại vùng promotor có khoảng 500 cặp bazơ được thể hiện bởi trình tự nucleotit SEQ ID NO: 1. Sản phẩm khuếch đại PCR và đoạn ADN thu được bằng cách xử lý vectơ pDZ-dap với enzym giới hạn SpeI, được tạo dòng nhờ sử dụng kit tạo dòng dung hợp (In-fusion Cloning Kit (TAKARA, JP)) để chuẩn bị vectơ pDZ-dapA-PaceA.

SEQ ID NO: 35: PaceA-d3F 5'- acgttgatgc actagt agcactctgactacctctg -3'

SEQ ID NO: 36: PaceA-d3R 5'- agttctataa actagt ttctgtgcggtacgtggc -3'

Ví dụ 13: Chuẩn bị các chủng vi sinh trong đó promotor của gen aceA được chèn vào phía sau của gen dapA và so sánh khả năng sản sinh threonin của chúng

Để xác nhận hiệu quả ức chế sự hiệu hiện của gen dapA trong chủng vi sinh sản sinh L-threonin, vectơ pDZ-dapA-PaceA được chuẩn bị trong ví dụ 12 được biến nạp vào chủng sản sinh L-threonin *Corynebacterium glutamicum* KCCM11222P (patent Hàn Quốc số 2013-0061570) bằng phương pháp tương tự ở ví dụ 3. Lựa chọn chủng vi sinh trong đó promotor của gen aceA được chèn vào phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen dapA trên nhiễm sắc thể sao cho sự phiên mã có thể xảy ra theo chiều ngược lại với chiều phiên mã gen dapA ban đầu bằng cách thực hiện phản ứng PCR, chủng này được đặt tên là KCCM11222P::dapA-PaceA. Chủng KCCM11222P::dapA-PaceA đã chuẩn bị được xác nhận là có thể thực hiện phân tích trình tự nucleotit của vùng đích thu được bằng cách thực hiện phản ứng PCR nhờ sử dụng SEQ ID NO: 31 và SEQ ID NO: 34 làm các đoạn môi.

Chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11222P được sử dụng làm chủng bố mẹ, và chủng KCCM11222P::dapA-PaceA đã chuẩn bị được nuôi cấy theo phương pháp được mô tả dưới đây.

Mỗi chủng vi sinh lần lượt được cấy vào 25 ml môi trường nhân giống trong các

bình tam giác có vách ngăn ở góc dung tích 250 ml, sau đó lắc bình nuôi cấy ở tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 20 giờ. Sau đó, 1 ml dung dịch nhân giống được bổ sung vào bình tam giác có vách ngăn ở góc dung tích 250 ml đã chứa 24 ml môi trường sinh dưỡng, sau đó lắc bình nuôi cấy ở tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 48 giờ. Các thành phần của môi trường nhân giống và môi trường sinh dưỡng lần lượt được mô tả dưới đây.

<Môi trường nhân giống (độ pH 7,0)>

Glucosa 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 1000 μg , canxi pantothenat 2000 μg , nicotinamit 2000 μg (bổ sung nước cất đến 1 L).

<Môi trường sinh dưỡng (độ pH 7,0)>

Glucosa 100 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 g, protein đậu nành 2,5 g, bột ngô ngâm 5 g, ure 3 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$ 0,5 g, biotin 100 μg , thiamin HCl 1000 μg , canxi pantothenat 2000 μg , nicotinamit 3000 μg , CaCO_3 30 g (bổ sung nước cất đến 1 L).

Sau khi nuôi cấy, nồng độ L-threonin trong dịch nuôi cấy được đo bằng HPLC. Khi không bổ sung axetat, nồng độ L-threonin trong các dung dịch nuôi cấy *Corynebacterium glutamicum* KCCM11222P và KCCM11222P::dapA-PaceA được thể hiện trong bảng 11.

Bảng 11. Sự khác biệt trong sản sinh L-threonin (không bổ sung axetat)

Chủng vi sinh	Threonin(g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ
KCCM11222P	7,0	6,9	7,2
KCCM11222P::dapA-PaceA	7,1	7,3	7,0

Đồng thời, các chủng vi sinh được nuôi cấy bằng phương pháp tương tự trừ việc bổ sung 5 g/L axetat vào môi trường sinh dưỡng để so sánh sự sản sinh L-threonin. Nồng độ L-threonin trong các dịch nuôi cấy được thể hiện trong bảng 12.

Bảng 12. Sự khác biệt trong sản sinh L-threonin (bổ sung 5 g/L axetat)

Chủng vi sinh	Threonin (g/L)		
	Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3
KCCM11222P	7,6	7,4	7,7

KCCM11222P::dapA-PaceA	11,2	11,5	11,4
------------------------	------	------	------

Như được thể hiện trong bảng 11, khi không có mặt axetat, khả năng sản sinh L-threonin của chủng KCCM11222P::dapA-PaceA không khác biệt so với chủng bố mẹ KCCM11222P.

Tuy nhiên, như được thể hiện trong bảng 12, khi có mặt của axetat, khả năng sản sinh L-threonin của chủng KCCM11222P::dapA-PaceA cao hơn 50% so với chủng bố mẹ KCCM11222P.

[số lưu chủng]

Cơ quan lưu giữ: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Cơ quan lưu giữ quốc tế)

Số lưu chủng: KCCM11432P

Ngày nộp lưu chủng: 12/6/2013

Như được mô tả ở trên, theo một hoặc nhiều phương án nêu trên của sáng chế, promotor cảm ứng axetat có thể được sử dụng để sản xuất các loại L-axit amin một cách hiệu quả, vì L-axit amin mong muốn có thể được sản sinh với hiệu suất cao bằng cách làm suy yếu sự biểu hiện của gen đích bằng cách bổ sung axetat ở thời điểm thích hợp.

Cần hiểu rằng các phương án ví dụ được mô tả ở đây cần được xem xét chỉ mang ý nghĩa minh họa mà không nhằm mục đích giới hạn sáng chế. Sự mô tả các đặc điểm hoặc các khía cạnh thuộc mỗi phương án cần được xem xét là có thể dùng được cho các đặc điểm hoặc các khía cạnh tương tự trong các phương án khác.

Trong khi một hoặc nhiều phương án theo sáng chế đã được mô tả dựa trên các hình vẽ, cần hiểu rằng những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực có thể thực hiện các thay đổi khác nhau về mặt hình thức và chi tiết mà không tách khỏi phạm vi của sáng chế như được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang CORP.
 <120> Phương pháp sản xuất L-axit amin
 <150> KR 2013/0121090
 <151> 2013-10-11
 <150> KR 2014/0091307
 <151> 2014-07-18
 <160> 36
 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 522
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(486)
 <223> aceA

<400> 1
 agcactctga ctacctctgg aatctaggtg ccactcttct ttcgatttca acccttatcg 60
 tgtttggcga tgtgatcaga ctaagtgatc accgtcacca gcaaaagggg tttgcgaact 120
 ttactaagtc attacccccg cctaaccgct actttttatct aggtcacacc ttcgaaacct 180
 acggaacggt gcggtgcctg cattttccca tttcagagca tttgccaggt acatccgtac 240
 tagcaactcc cccgccact ttttctgcga agccagaact ttgcaaactt cacaacaggg 300
 gtgaccaccc ccgcacaaaa cttaaaaacc caaacggatt gacgcaccaa tgcccgatgg 360
 agcaatgtgt gaaccacgcc accacgcaaa ccgatgcaca tcacgtcgaa acagtgaacg 420
 tgcattagct catactttgt ggtcggcacc gccattgctg aatcagcact taaggaagtg 480
 actttgatgt caaacgttgg aaagccacgt accgcacagg aa 522

<210> 2
 <211> 340
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(340)
 <223> pta

<400> 2
 ctttgctggg gtcagatttg tcacgtgctg cgctttcata gacccatta atgggggggtg 60
 aagagctgta aagtaccgct aaaaactttg caaaggggtg ttcgcaactt gtaaccgctc 120
 cgtattgttt tctacggcaa taagcatttg tgctgctcaa agcgtggaat tgagatcggg 180
 ttgaaaatta caaaataaaa ctttgcaaac cgggctgtac gcaaggcgga cgaacgctaa 240
 actatgtaag aaatcacaac ctccctcat tagtgccagg aggcacaagc ctgaagtgtc 300

atcaatgaga aggttcaggc tgaaattaga aaggcgatgt	340
<210> 3	
<211> 35	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> aceE P1F	
<400> 3	
ccgggggatcc tctagacctc cggcccatac gttgc	35
<210> 4	
<211> 30	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> aceE P1R	
<400> 4	
ttgagactag ttattcctca ggagcgtttg	30
<210> 5	
<211> 30	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> aceE P2F	
<400> 5	
gaataactag tctcaaggga cagataaatc	30
<210> 6	
<211> 36	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> aceE P2R	
<400> 6	
gcaggtcgac tctagagacc gaaaagatcg tggcag	36
<210> 7	
<211> 35	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> PaceA P3F	
<400> 7	

gtcccttgag actagtagca ctctgactac ctctg 35

<210> 8
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PaceA P3R

<400> 8
 ctgaggaata actagtttcc tgtgcggtac gtggc 35

<210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> aceE P4F

<400> 9
 ccgggggatcc tctagaggtc ccaggcgact acacc 35

<210> 10
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> aceE P4R

<400> 10
 gagctactag tacgacgaat cccgccgcca gacta 35

<210> 11
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> aceE P5F

<400> 11
 gtcgtactag tagctctttt tagccgagga acgcc 35

<210> 12
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> aceE P5R

<400> 12
 gcaggtcgac tctagacatg ctgttgatg agcac 35

<210>	13	
<211>	35	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	PaceA P6F	
<400>	13	
	aaaaagagct actagtagca ctctgactac ctctg	35
<210>	14	
<211>	35	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	PaceA P6R	
<400>	14	
	gattcgctcgt actagtttcc tgtgcggtac gtggc	35
<210>	15	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Ppta P7F	
<400>	15	
	gtcccttgag actagtcttt gctggggtca gatttg	36
<210>	16	
<211>	35	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Ppta P7R	
<400>	16	
	ctgaggaata actagtacat cgcctttcta atttc	35
<210>	17	
<211>	35	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	hom h1F	
<400>	17	
	ccggggatcc tctagaccag gtgagtccac ctacg	35

<210> 18
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hom h1R

 <400> 18
 gaggcggatc actagtttag tccctttcga ggcgg 35

 <210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hom h2F

 <400> 19
 actagtgatc cgcctcgaaa gggac 25

 <210> 20
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> hom h2R

 <400> 20
 gcaggtcgac tctagagact gcggaatgtt gttgtg 36

 <210> 21
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PaceA h3F

 <400> 21
 gaggcggatc actagtagca ctctgactac ctctg 35

 <210> 22
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PaceA h3R

 <400> 22
 aagggactaa actagtttcc tgtgcggtac gtggc 35

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

 <220>
 <223> mur m1F

 <400> 23
 ccgggggatcc tctagaaacc ctcgttcaga ggtgc 35

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

 <220>
 <223> mur m1R

 <400> 24
 ttgtgatcat ctcgagctat ccttcttccg tagtaag 37

 <210> 25
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mur m2F

 <400> 25
 agctcgagat gatcacaatg acccttgg 28

 <210> 26
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mur m2R

 <400> 26
 gcaggtcgac tctagacatg agcataaatg tcagc 35

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

 <220>
 <223> mur m3F

 <400> 27
 tcatcagcag cactctgact acctctg 27

 <210> 28

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

 <220>
 <223> mur m3R

 <400> 28
 agaaggatag ctcgagttcc tgtgcggtac gtggc 35

 <210> 29
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mur m4F

 <400> 29
 agagtgtctgc tgatgacccg cgatttg 27

 <210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> mur m4R

 <400> 30
 ttgtgatcat ctcgaggggtt ttctctcctc cacagg 36

 <210> 31
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> dapA d1F

 <400> 31
 ccggggatcc tctagatggtt tggcttgctt tgggc 35

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

 <220>
 <223> dapA d1R

 <400> 32
 gttgatgcac tagtttatag aactccagct tt 32

 <210> 33
 <211> 33

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> dapA d2F

 <400> 33
 ttctataaac tagtgcattca acgtaggaga tcc 33

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

 <220>
 <223> dapA d2R

 <400> 34
 gcaggtcgac tctagacgtt ctgggaaccc tgag 34

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

 <220>
 <223> PaceA d3F

 <400> 35
 acgttgatgc actagtagca ctctgactac ctctg 35

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

 <220>
 <223> PaceA d3R

 <400> 36
 agttctataa actagtttcc tgtgcggtac gtggc 35

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất L-axit amin bao gồm:

nuôi cấy vi sinh vật coryneform tái tổ hợp có khả năng sản sinh L-axit amin, trong đó vi sinh vật coryneform tái tổ hợp có promotor cảm ứng axetat ở phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen đích trong nhiễm sắc thể; và

bổ sung axetat trong quá trình nuôi cấy để làm yếu sự biểu hiện của gen đích, và làm tăng khả năng sản sinh L-axit amin của vi sinh vật coryneform tái tổ hợp,

trong đó, promotor cảm ứng axetat là theo chiều ngược lại với sự phiên mã gen đích.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phía sau của đơn vị mã kết thúc là giữa đơn vị mã kết thúc và phía trước của trình tự kết thúc phiên mã của gen đích.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó promotor cảm ứng axetat được thể hiện bằng trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó gen đích là ít nhất một gen được lựa chọn từ nhóm gồm có gen mã hóa pyruvat dehydrogenaza tiểu đơn vị E1, gen mã hóa homoserin dehydrogenaza, gen mã hóa gen UDP-N-axetylmuramoylalanyl-D-glutamat-2,6-di-aminopimelat ligaza và gen mã hóa dihydrodipicolinat synthaza.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó L-axit amin là L-lysin hoặc L-threonin.

6. Phương pháp sản xuất L-axit amin bao gồm:

nuôi cấy vi sinh vật coryneform tái tổ hợp có khả năng sản sinh L-axit amin, trong đó vi sinh vật coryneform tái tổ hợp có promotor được thể hiện bằng trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 ở phía sau của đơn vị mã kết thúc của gen đích trong nhiễm sắc thể, trong đó phía sau của đơn vị mã kết thúc là giữa đơn vị mã kết thúc và phía trước của trình tự kết thúc phiên mã của gen đích.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó gen đích là ít nhất một gen được lựa chọn từ nhóm gồm có gen mã hóa pyruvat dehydrogenaza tiểu đơn vị E1, gen mã hóa homoserin dehydrogenaza, gen mã hóa gen UDP-N-axetylmuramoylalanyl-D-glutamat-2,6-di-aminopimelat ligaza và gen mã hóa dihydrodipicolinat synthaza.

8. Phương pháp theo điểm 6, trong đó L-axit amin là L-lysin hoặc L-threonin.

Fig.1

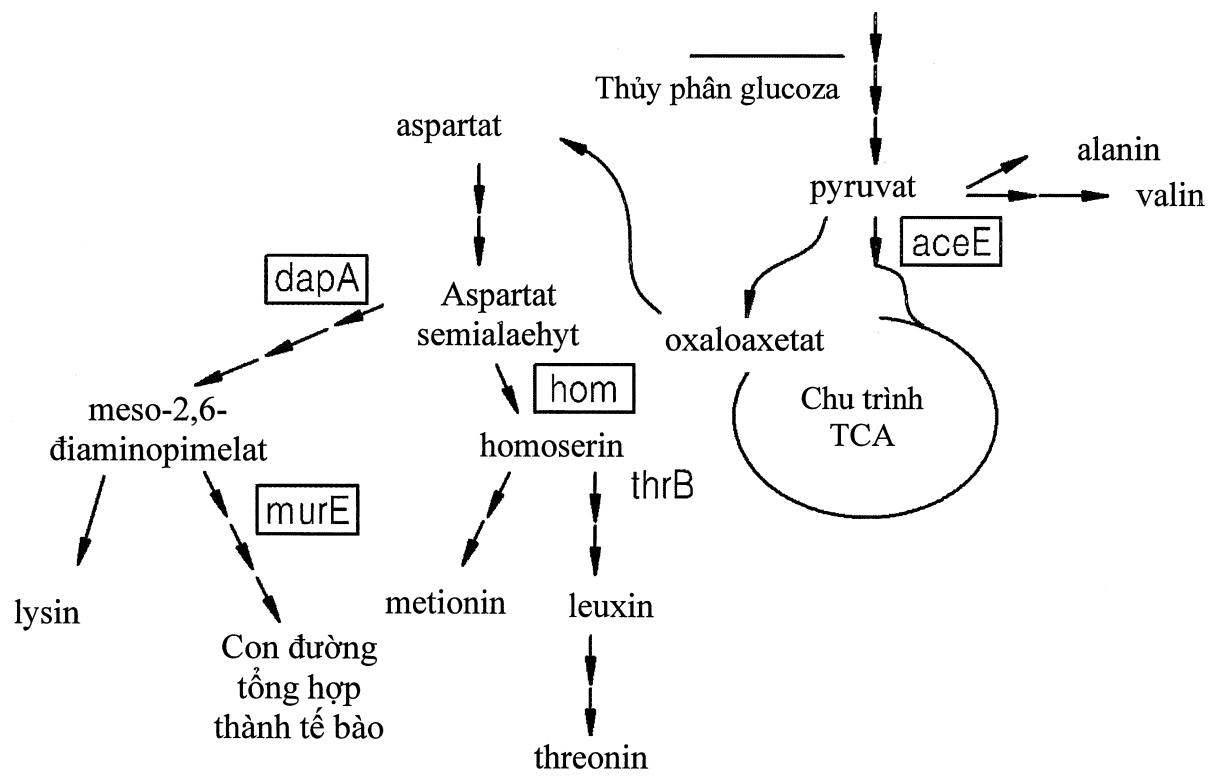


Fig.2

