



(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)



1-0031832

(51)⁷ C12N 1/21; C12N 15/77; C12P 13/08; (13) B
C12N 15/63

(21) 1-2015-03498

(22) 05/03/2014

(86) PCT/KR2014/001793 05/03/2014

(87) WO2014/142463 18/09/2014

(30) 10-2013-0025528 11/03/2013 KR

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/12/2015 333A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

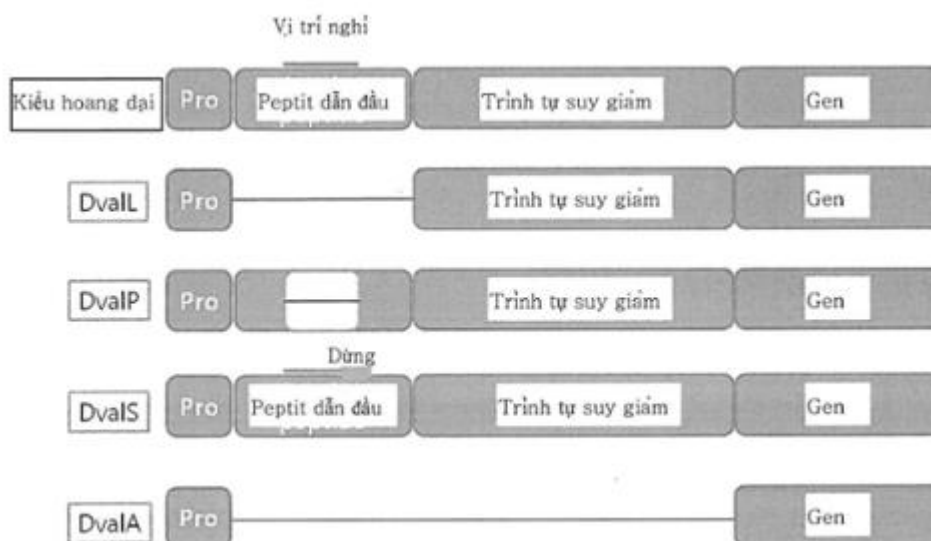
CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) KIM, Hye Won (KR); LEE, Ji Hye (KR); SONG, Byeong Cheol (KR); KIM, Jong Hyun (KR); LEE, Han Hyoung (KR); JEON, Ae Ji (KR).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHỨNG SẢN XUẤT L-VALIN ĐƯỢC BIẾN NẠP ĐỂ GIA TĂNG SỰ BIỂU HIỆN CỦA OPERON L-VALIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-VALIN BẰNG CÁCH SỬ DỤNG CHỨNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng sản xuất L-valin mới mà được biến nạp để tăng cường sự biểu hiện của operon L-valin do có trình tự nucleotit, để mã hóa peptit dẫn đầu trong vùng điều hòa của operon ilvBN, được loại bỏ toàn bộ, hoặc được loại bỏ một phần hoặc được thay thế. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất L-valin bằng cách sử dụng chủng sản xuất L-valin mới. Theo chủng sản xuất valin mới và phương pháp sản xuất L-valin theo sáng chế bằng cách sử dụng chủng này, hiệu quả có lợi là có thể sản xuất L-valin với hiệu quả cao và sản lượng cao.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng có khả năng sản xuất L-valin được gia tăng và phương pháp sản xuất L-valin bằng cách sử dụng chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong vi sinh vật, L-valin là một trong số các axit amin mạch nhánh, được sinh tổng hợp khởi đầu từ pyruvat nhờ axit axetolactic, axit dihydroxyisovaleric, và axit ketoisovaleric. Các sản phẩm chuyển hóa trung gian này được sản xuất nhờ phản ứng được xúc tác bởi axit axetohydroxy synthaza, axit actohydroxy isomeroreductaza, axit dihydroxy dehydrataza, và transaminaza B. Tuy nhiên, các enzym này còn đòi hỏi trong sinh tổng hợp L-isoleuxin khởi đầu từ axit ketobutyric và pyruvat, và cả L-leuxin được sinh tổng hợp từ axit ketoisovaleric, mà là sản phẩm chuyển hóa trung gian, nhờ axit 2-isopropylmalic, axit 3-isopropylmalic, và axit ketoisocaproic. Do đó, khi axit amin mạch nhánh, tức là, L-valin, L-isoleuxin, và L-leuxin sử dụng cùng các enzym cho các quy trình sinh tổng hợp của chúng, đã được biết đến là sản xuất về mặt công nghiệp một dạng của axit amin mạch nhánh thông qua sự lên men là gặp phải khó khăn. Hơn nữa, có vấn đề là việc sản xuất với quy mô công nghiệp bị giới hạn bởi nhược điểm là hạn chế do L-valin gây ra, mà là sản phẩm cuối, hoặc dẫn xuất của chúng.

Sau khi đã có nhiều cố gắng nỗ lực để phát triển chủng có khả năng sản xuất L-valin được gia tăng, các tác giả sáng chế đã hoàn thiện sáng chế bằng việc phát hiện ra rằng, chủng được biến nạp để có vùng điều hòa được bất hoạt của operon L-valin có khả năng sản xuất L-valin vượt trội so với chủng gốc.

Tài liệu sáng chế 1: công bố patent Hàn Quốc số KR 10-1990-0007948 B1

Tài liệu sáng chế 2: công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số KR 10-2008-0025355 A1

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích thứ nhất của sáng chế là đề xuất chủng sản xuất L-valin mới được biến nạp để gia tăng sự biểu hiện của operon L-valin bằng cách loại bỏ toàn bộ hoặc loại bỏ một phần hoặc thay thế trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu trong vùng điều hòa của operon ilvBN.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-valin bằng cách sử dụng chủng sản xuất L-valin mới.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất biến thể vùng điều hòa của operon ilvBN.

Giải pháp kỹ thuật

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng sản xuất L-valin mới được biến nạp để giải phóng kiểm soát suy giảm của operon L-valin bằng cách loại bỏ toàn bộ hoặc loại bỏ một phần hoặc thay thế trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu trong vùng điều hòa của operon ilvBN, trong đó peptit dẫn đầu được đại diện bởi trình tự axit amin SEQ ID NO:1.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất L-valin bằng cách sử dụng chủng sản xuất L-valin mới.

Hơn nữa, theo phương án khác, sáng chế đề xuất biến thể vùng điều hòa của operon L-valin có trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO: 3 hoặc 4.

Hiệu quả của sáng chế

Như đã nêu trên, hiệu quả của sáng chế ở chỗ chủng sản xuất L-valin mới theo sáng chế có khả năng sản xuất L-valin được gia tăng do sự biểu hiện tăng của axit axetohydroxy synthaza, mà là enzym được bao hàm trong quá trình sinh tổng hợp L-valin, bằng cách loại bỏ toàn bộ hoặc loại bỏ một phần hoặc thay thế trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu trong vùng điều hòa của operon ilvBN, trong đó peptit dẫn đầu được đại diện bởi trình tự axit amin SEQ ID NO:1.

Hơn nữa, theo phương pháp sản xuất L-valin bằng cách sử dụng chủng sản xuất L-valin mới theo sáng chế, có thể sản xuất L-valin với hiệu quả cao và sản lượng cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ dạng sơ đồ thể hiện operon *ilvBN* bao gồm: vùng điều hòa của operon *ilvBN* *Corynebacterium glutamicum* kiểu hoang dại ATCC13032; biến thể vùng điều hòa (DvalL) trong đó toàn bộ trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu được loại bớt; biến thể vùng điều hòa (DvalP) trong đó vị trí nghỉ trong peptit dẫn đầu được loại bớt; biến thể vùng điều hòa (DvalS) trong đó axit amin cuối cùng của vị trí nghỉ trong peptit dẫn đầu được thay thế bằng codon dừng; và biến thể vùng điều hòa (DvalA) trong đó cả peptit dẫn đầu và trình tự suy giảm được loại bớt.

Fig.2 là biểu đồ chi tiết thể hiện vùng điều hòa của operon *ilvBN* *Corynebacterium glutamicum* kiểu hoang dại ATCC13032

Fig.3 là biểu đồ chi tiết của biến thể vùng điều hòa (DvalL) của Fig.1 trong đó toàn bộ trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu được loại bớt.

Fig.4 là biểu đồ chi tiết biến thể vùng điều hòa (DvalP) của Fig.1 trong đó vị trí nghỉ trong peptit dẫn đầu được loại bớt.

Fig.5 là biểu đồ chi tiết của biến thể vùng điều hòa (DvalS) của Fig.1 trong đó axit amin cuối cùng của vị trí nghỉ trong peptit dẫn đầu được thay thế bằng codon dừng.

Fig.6 là biểu đồ chi tiết vùng điều hòa kiểu biến thể (DvalA) của Fig.1 trong đó cả hai peptit dẫn đầu và trình tự suy giảm được loại bớt.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chủng sản xuất L-valin mới được biến nạp để gia tăng sự biểu hiện của operon L-valin bằng cách loại bớt toàn bộ hoặc loại bớt một phần hoặc thay thế trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu trong vùng điều hòa của operon *ilvBN*, trong đó peptit dẫn đầu được đại diện bởi trình tự axit amin SEQ ID NO:1.

Theo sáng chế, thuật ngữ “operon L-valin (operon *ilvBN*)” bao gồm gen *ilvBN* mã hóa axit axetohydroxy synthaza mà là enzym được bao hàm trong bước đầu tiên của sinh tổng hợp L-valin trong vi sinh vật sản xuất L-valin và tổng hợp axetolactat từ 2 phân tử pyruvat.

Cụ thể hơn, operon *ilvBN* bao gồm vùng điều hòa và gen cấu trúc mã hóa axit axetohydroxy synthaza, trong đó vùng điều hòa bao gồm gen khởi đầu, trình tự

nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu, vị trí nghỉ được đặt nằm trong peptit dẫn đầu, và trình tự suy giảm (tham khảo các hình vẽ Fig.1 và Fig.2).

Theo sáng chế, sự biểu hiện của gen cấu trúc mã hóa axit axetohydroxy synthaza được gia tăng bằng cách loại bỏ toàn bộ hoặc loại bỏ một phần hoặc thay thế trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu trong vùng điều hòa của operon *ilvBN*, nhờ đó tăng cường khả năng sản xuất L-valin. Cụ thể, vị trí loại bỏ một phần hoặc thay thế trong trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu có thể ở trong vị trí nghỉ, và cụ thể hơn, đầu cuối của vị trí nghỉ có thể được thay thế bằng codon dừng.

Theo sáng chế, để tạo ra chủng sản xuất L-valin mới được biến nạp để gia tăng sự biểu hiện của operon L-valin bằng cách loại bỏ toàn bộ hoặc loại bỏ một phần hoặc thay thế trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu trong vùng điều hòa của operon *ilvBN* như được mô tả trên đây, trước tiên, vector tái tổ hợp có trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu được loại bỏ toàn bộ hoặc được loại bỏ một phần hoặc được thay thế trong vùng điều hòa của operon *ilvBN* có thể được tạo cấu trúc.

Trong ví dụ cụ thể của sáng chế, để tạo cấu trúc vector, các vùng điều hòa có trình tự nucleotit được loại bỏ toàn bộ hoặc được loại bỏ một phần hoặc được thay thế mà ghi mã peptit dẫn đầu trong vùng điều hòa của operon *ilvBN* (*DvalL*, *DvalP*, *DvalS*) được khuếch đại thông qua phản ứng chuỗi trùng hợp sử dụng nhiễm sắc thể của *Corynebacterium sp.* làm khuôn. Sau đó, vùng điều hòa được khuếch đại được chèn vào trong vector để tạo cấu trúc vector tái tổ hợp. Sau đó, chủng gốc được biến nạp theo cách tương ứng với vector tái tổ hợp.

Vector được sử dụng để tạo cấu trúc vector tái tổ hợp có thể là plasmit, cosmit, virus, hoặc thể thực khuẩn ở trạng thái nguyên thủy hoặc trạng thái tái tổ hợp. Ví dụ, pWE15, M13, λ EMBL3, λ EMBL4, λ FIXII, λ DASHII, λ ZAPII, λ gt10, λ gt11, Charon4A, và Charon21A, v.v có thể được sử dụng làm vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmit; và vector pDZ, vector trên cơ sở pBR, trên cơ sở pUC, trên cơ sở pBluescriptII, trên cơ sở pGEM, trên cơ sở pTZ, trên cơ sở pCL và trên cơ sở pET, v.v có thể được sử dụng làm vector plasmit. Vector khả thi không bị giới hạn một cách cụ thể, và cả vector biểu hiện đã được biết đến có thể được sử dụng.

Trong ví dụ cụ thể của sáng chế, pDZ được sử dụng. Vector pDZ, mà là vector để chèn vào nhiễm sắc thể của vi sinh vật của *Corynebacterium sp.*, được điều chế bằng phương pháp được bộc lộ trong công bố đơn Patent Hàn Quốc số 2008-0025355.

Vector tái tổ hợp pDZDvalL, pDZDvalP, và pDZDvalS được tạo cấu trúc bằng việc chèn theo cách tương ứng vào các vùng điều hòa được khuếch đại (DvalL, DvalP, và DvalS) vào trong vector pDZ.

Theo sáng chế, chủng gốc để được biến nạp bằng vector tái tổ hợp có thể là vi sinh vật bất kỳ có khả năng sản xuất L-valin không bị giới hạn một cách cụ thể. Cụ thể, vi sinh vật *Escherichia sp.* hoặc vi sinh vật *Corynebacterium sp.* có thể được sử dụng, cụ thể hơn, *Corynebacterium glutamicum* có thể được sử dụng. Hơn nữa cụ thể hơn, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 có thể được sử dụng làm chủng gốc. Ngoài ra, chủng sản xuất L-valin kháng L-valin hoặc dẫn xuất của chúng có thể được sử dụng, cụ thể, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P có thể được sử dụng.

Corynebacterium glutamicum KCCM11201P, mà là chủng được bộc lộ trong Patent được đăng ký trước đó số 10-1117022 của cùng tác giả là biến thể đồng kháng mà có tính kháng lại axit α -Aminobutyric (ABA), α -hydroxyvalin (AHV), thiazol alanin (TA), và Norvalin (NV) ở nồng độ lần lượt bằng 20mM, 20mM, 40mM và 50mM, khi trải rộng trên môi trường tối thiểu mà α -ABA, AHV TA, và NV được bổ sung cùng với nhau vào trong đó, sau khi thực hiện đột biến ngẫu nhiên sử dụng *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10661 (Đơn yêu cầu cấp Patent Hàn Quốc số 1988-0016543; Công bố đơn số 1990-0007948) làm chủng gốc, trong đó ABA là dẫn xuất isoleuxin và AHV, TA và NV là các dẫn xuất valin. Biến thể đồng kháng này là chủng nổi bật có khả năng sản xuất L-valin tăng 4 lần so với khả năng sản xuất của chủng gốc *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10661.

KCCM11336P, KCCM11337P, và KCCM11338P được biết đến là các chủng được biến nạp của *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P với vector tái tổ hợp, có khả năng sản xuất L-valin vượt trội so với chủng gốc *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P.

Corynebacterium glutamicum KCCM11336P là chủng được sản xuất bằng cách biến nạp vector tái tổ hợp pDZDvalL vào *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P. pDZvalL được điều chế bằng cách chèn biến thể vùng điều hoà (DvalL) vào trong vector pDZ, trong đó biến thể vùng điều hoà (DvalL) có việc loại bỏ toàn bộ trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu có trình tự axit amin là SEQ ID NO:1. *Corynebacterium glutamicum* KCCM11336P được đặt tên là KCJ-456 và được lưu trữ ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc ngày 19 tháng 11 năm 2012 với số truy cập là KCCM11336p.

Corynebacterium glutamicum KCCM11337P là chủng được sản xuất bằng cách biến nạp vector tái tổ hợp pDZDvalP vào *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P. PDZvalP được điều chế bằng cách chèn biến thể vùng điều hoà (DvalP) vào trong vector pDZ, trong đó biến thể vùng điều hoà (DvalP) có việc loại bỏ vị trí nghỉ trong peptit dẫn đầu có trình tự axit amin SEQ ID NO:1. *Corynebacterium glutamicum* KCCM11337P được đặt tên là KCJ-457 và được lưu trữ ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc ngày 19 tháng 11 năm 2012 với số truy cập là KCCM11337P.

Corynebacterium glutamicum KCCM11338P là chủng được sản xuất bằng cách biến nạp vector tái tổ hợp pDZDvalS vào *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P. pDZvalS được điều chế bằng cách chèn biến thể vùng điều hoà (DvalS) vào trong vector pDZ, trong đó biến thể vùng điều hoà (DvalS) có sự thay thế của axit amin cuối cùng của vị trí nghỉ trong peptit dẫn đầu có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 với codon dừng. *Corynebacterium glutamicum* KCCM11338P được đặt tên là KCJ-458 và được lưu trữ ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc ngày 19 tháng 11 năm 2012 với số truy cập là KCCM11338P.

Hơn nữa, theo sáng chế, vector biểu hiện có vùng điều hòa biến đổi được tạo cấu trúc để tăng cường khả năng biểu hiện của valin sinh tổng hợp. Do đó, được đề xuất là chủng sản xuất L-valin bằng cách biến nạp *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, mà là chủng kiểu hoang dại đã được biết đến, sử dụng vector biểu hiện trên đây.

Theo sáng chế, để tạo cấu trúc biểu hiện vector có vùng điều hòa biến đổi của cụm gen sinh tổng hợp operon L-valin và valin. Các trình tự nucleotit đối với vector chèn vào được khuếch đại bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P, *Corynebacterium glutamicum*

KCCM11336P, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11337P, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11338P, và *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P_DvalA làm khuôn. Sau đó, từng trình tự trong số các trình tự nucleotit được khuếch đại được chèn vào trong vector pECCG117 để tạo cấu trúc pECCG117-DvalW, pECCG117-DvalL, pECCG117-DvalP, pECCG117-DvalS và pECCG117-DvalA.

Sau đó, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 được biến nạp lần lượt với các vector được đề cập trên đây, pECCG117-DvalW, pECCG117-DvalL, pECCG117-DvalP, pECCG117-DvalS và pECCG117-DvalA. Các chủng sản xuất L-valin, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalW, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalL, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalS và *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalA, được tạo cấu trúc.

Trong số các chủng đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalL, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalS các chủng có khả năng sản xuất L-valin vượt trội so với *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalW mà là được biến nạp để có vùng điều hòa của operon L-valin của *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P.

Như đã nêu trên, hiệu quả của sáng chế ở chỗ chủng sản xuất L-valin mới theo sáng chế có khả năng sản xuất L-valin nổi bật do sự biểu hiện tăng của axit axetohydroxy synthaza, mà là enzym được bao hàm trong sinh tổng hợp L-valin, bằng cách loại bỏ toàn bộ hoặc loại bỏ một phần hoặc thay thế trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu trong vùng điều hòa của operon ilvBN, trong đó peptit dẫn đầu được đại diện bởi trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1.

Hơn nữa, một phương án khác của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất L-valin bằng cách sử dụng chủng sản xuất L-valin mới được biến nạp để gia tăng sự biểu hiện của operon L-valin bằng cách loại bỏ toàn bộ hoặc loại bỏ một phần hoặc thay thế trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu trong vùng điều hòa của operon L-valin, trong đó peptit dẫn đầu được đại diện bởi trình tự axit amin là SEQ ID NO:1.

Để sản xuất L-valin theo sáng chế, chủng sản xuất L-valin mới theo sáng chế có thể được nuôi cấy bằng phương pháp được biết đến một cách rộng rãi để nuôi cấy vi sinh vật của *Corynebacterium sp.*. Cụ thể, các ví dụ về phương pháp nuôi cấy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục và nuôi cấy nạp theo mẻ. Các phương pháp khác nhau này, ví dụ, được bộc lộ trong ấn phẩm: “Thiết kế sinh hóa” (James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp138-176, 1991) v.v.

Môi trường được sử dụng trong nuôi cấy nên thỏa mãn yêu cầu của chủng cụ thể theo cách thích hợp. Môi trường nuôi cấy đối với vi sinh vật là *Corynebacterium sp.* là đã được biết đến (tham khảo, ví dụ ấn phẩm: Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981). Làm nguồn glucoza khả thi, gồm có đường và hydrat cacbon như glucoza, sacaroza, lactoza, fructoza, mạch nha, tinh bột, và xenluloza; dầu và chất béo như dầu đậu tương, dầu hướng dương, dầu thầu dầu, và dầu dừa; axit béo như axit palmitic, axit stearic, và axit linolenic; rượu như glyxerol và etanol; và axit hữu cơ như axit axetic. Các vật liệu này có thể được sử dụng theo cách riêng rẽ hoặc ở dạng hỗn hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở các dạng này. Để làm nguồn nitơ khả thi, pepton, phân chiết nấm men, nước xốt, tinh chất mạch nha, nước ép ngô, bột đậu tương, và ure, hoặc hợp chất vô cơ như amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat có thể được bao gồm. Nguồn nitơ còn có thể được sử dụng riêng hoặc ở dạng hỗn hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Làm nguồn phospho khả thi, kali dihydrophosphat, hoặc kali phosphat dibazơ, hoặc muối chứa natri tương ứng có thể có mặt, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy nên chứa muối kim loại cần thiết cho sự tăng trưởng như magie sulfat hoặc sắt sulfat. Bên cạnh đó, ngoài các vật liệu này, sản phẩm tăng trưởng cơ bản như axit amin và vitamin có thể có mặt.

Hơn nữa, tiền chất thích hợp có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy. Vật liệu thô trên đây có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy ở dạng mẻ hoặc dạng liên tục như thích hợp.

Độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng hợp chất bazơ như natri hydroxit, kali hydroxit, và amoniac hoặc hợp chất axit như axit phosphoric, và axit sulfuric theo cách thích hợp. Hơn nữa, việc hình thành bọt có thể

được ngăn chặn bằng cách sử dụng tác nhân chống tạo bọt như este của polyglycol và axit béo. Oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ, không khí) có thể được bơm vào trong môi trường nuôi cấy để duy trì điều kiện hiếu khí. Nhiệt độ nuôi cấy có thể thường là nằm trong khoảng từ 20 đến 45°C. Quy trình nuôi cấy có thể là liên tục cho đến khi thu được lượng được sản xuất tối đa của L-valin mong muốn. Mục đích này thường có thể đạt được trong khoảng thời gian từ 10 đến 160 giờ. L-valin có thể hoặc là được tiết vào môi trường nuôi cấy hoặc có mặt trong các tế bào.

Phương pháp tạo ra L-valin theo sáng chế có thể còn bao gồm việc thu hồi L-valin từ các tế bào hoặc môi trường nuôi cấy. Làm phương pháp thu hồi L-valin từ các tế bào hoặc môi trường nuôi cấy, phương pháp được biết đến trong ngành, ví dụ, ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, tạo tinh thể và HPLC có thể được sử dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Theo một ví dụ của sáng chế, môi trường nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ thấp để loại bỏ sinh khối, và sau đó, tách dịch nổi bề mặt thu được thông qua sắc ký trao đổi ion.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách cụ thể thông qua các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ dưới đây chỉ được đưa ra với ý định giải thích sáng chế theo cách làm ví dụ, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Tạo cấu trúc vector có loại bỏ toàn bộ hoặc loại bỏ một phần hoặc thay thế trong trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu để làm bất hoạt vùng điều hòa của operon L-valin

Các hình vẽ Fig.1 và Fig.2 thể hiện operon L-valin (operon *ilvBN*) để tổng hợp axit axetohydroxy synthaza bao gồm gen cấu trúc mã hóa axit axetohydroxy synthaza và vùng điều hòa bao gồm gen khởi đầu (Pro), trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu, vị trí nghỉ được đặt trong trình tự peptit dẫn đầu, và một trình tự suy giảm. Từ vùng điều hòa, như được thể hiện trên Fig.1, để khuếch đại các vùng điều hòa kiểu biến thể, việc khuếch đại được tiến hành thông qua phản ứng chuỗi trùng hợp (sau đây, được gọi là “phương pháp PCR”) sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium*

glutamicum ATCC13032, mà mua được từ Bộ sưu tập chủng chuẩn của Mỹ (American Type Culture collection - ATCC), làm khuôn, trong đó các biến thể ở vùng điều hòa đã được khuếch đại là như sau: vùng điều hòa trong đó toàn bộ trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu được loại bớt (sau đây, là để chỉ đến “DvalL”); vùng điều hòa kiểu biến thể trong đó vị trí nghỉ trong peptit dẫn đầu được loại bớt (sau đây, là để chỉ đến “DvalP”); vùng điều hòa kiểu biến thể trong đó axit amin cuối cùng của vị trí nghỉ trong peptit dẫn đầu được thay thế bằng codon dừng (sau đây, là để chỉ đến “DvalS”); và vùng điều hòa kiểu biến thể trong đó cả hai peptit dẫn đầu và trình tự suy giảm được loại bớt (sau đây, là để chỉ đến “DvalA”).

Cụ thể, để điều chế DvalL, trước tiên, đoạn dài khoảng 700 cặp bazơ có vị trí enzym giới hạn BamHI trong vùng 5’ được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn và các đoạn mồi của các SEQ ID NO:5 và 6, trong đó điều kiện PCR là để lặp lại 30 chu kỳ gồm: biến tính trong một phút ở 94°C; gắn mồi trong 30 giây ở 58°C; và polyme hóa trong 30 giây ở 72 °C với Pfu polymeraza.

Thứ hai, đoạn dài khoảng 700 cặp bazơ có vị trí enzym giới hạn XbaI trong vùng 3’ được khuếch đại bằng phương pháp PCR được mô tả trên đây sử dụng các đoạn mồi của các SEQ ID NO:7 và 8. Đoạn ADN thu được được phân lập bởi kit GeneAII[®]Expin[™] GEL SV (Seoul, Korea), và sau đó được sử dụng làm khuôn cho PCR.

Sau đó, PCR được tiến hành có sử dụng các đoạn mồi của các SEQ ID NO:5 và 8 và 2 đoạn ADN thu được trên đây làm khuôn. Cụ thể, đoạn dài khoảng 2000 cặp bazơ được khuếch đại bằng phương pháp PCR được mô tả trên đây. Các đoạn được khuếch đại được xử lý với các enzym giới hạn BamHI, và XbaI, và sau đó được nối với pDZ được xử lý với cùng các enzym nêu trên để tạo cấu trúc pDZvalL.

Để điều chế DvalP, trước tiên, đoạn dài khoảng 700 cặp bazơ có vị trí enzym giới hạn BamHI trong vùng 5’ được khuếch đại, sử dụng nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn và các đoạn mồi của các SEQ ID NO:5 và 9.

Thứ hai, đoạn dài khoảng 700 cặp bazơ có vị trí enzym giới hạn XbaI trong vùng 3' được khuếch đại bằng phương pháp PCR được mô tả trên đây sử dụng các đoạn mồi của các SEQ ID NO:10 và 8.

Sau đó, đoạn dài khoảng 2000 cặp bazơ được khuếch đại bằng phương pháp PCR được mô tả trên đây bằng cách sử dụng 2 đoạn ADN được khuếch đại làm khuôn. Các đoạn được khuếch đại được xử lý với các enzym giới hạn BamHI, và XbaI, và sau đó được nối với pDZ được xử lý với cùng các enzym để tạo cấu trúc pDZvalP.

Để điều chế DvalS, đoạn dài khoảng 700 cặp bazơ có vị trí enzym giới hạn BamHI trong vùng 5' được khuếch đại, sử dụng nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn và các đoạn mồi của các SEQ ID NO:5 và 11.

Thứ hai, đoạn dài khoảng 700 cặp bazơ có vị trí enzym giới hạn XbaI trong vùng 3' được khuếch đại bằng phương pháp PCR được mô tả trên đây sử dụng các đoạn mồi của các SEQ ID NO:12 và 8.

Sau đó, đoạn dài khoảng 2000 cặp bazơ được khuếch đại bằng phương pháp PCR được mô tả trên đây sử dụng 2 đoạn ADN được khuếch đại làm khuôn. Các đoạn được khuếch đại được xử lý với các enzym giới hạn BamHI, và XbaI, và sau đó được nối với pDZ được xử lý với cùng các enzym để tạo cấu trúc pDZvalS.

Để điều chế DvalA, trước tiên, đoạn dài khoảng 700 cặp bazơ có vị trí enzym giới hạn BamHI trong vùng 5' được khuếch đại, sử dụng nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn và các đoạn mồi của các SEQ ID NO:5 và 13.

Thứ hai, đoạn dài khoảng 700 cặp bazơ có vị trí enzym giới hạn XbaI trong vùng 3' được khuếch đại bằng phương pháp PCR được mô tả trên đây sử dụng các đoạn mồi của các SEQ ID NO:14 và 8.

Sau đó, đoạn dài khoảng 2000 cặp bazơ được khuếch đại bằng cách sử dụng 2 đoạn ADN được khuếch đại làm khuôn bằng phương pháp PCR được mô tả trên đây. Các đoạn được khuếch đại được xử lý với các enzym giới hạn BamHI, và XbaI, và sau đó được nối với pDZ được xử lý với cùng các enzym để tạo cấu trúc pDZvalA.

Ở nồng độ axit amin, các trình tự của peptit dẫn đầu và vị trí nghỉ được nêu trong các SEQ ID NO:1 và 2, tương ứng, và trình tự axit amin của DvalP và DvalS được nêu trong các SEQ ID NO:3 và 4, tương ứng.

Hơn nữa, trình tự nucleotit của toàn bộ vùng điều hòa của operon L-valin, ilvBN, trình tự nucleotit của peptit dẫn đầu và trình tự nucleotit của vị trí nghỉ được nêu trong các SEQ ID NO:21, 22, và 23, tương ứng. Các trình tự nucleotit DvalL, DvalP, DvalS và DvalA được nêu trong các SEQ ID NO:24 đến 27, tương ứng.

Ví dụ 2: Tạo cấu trúc chủng có vùng điều hòa bất hoạt của operon L-valin thu được từ chủng sản xuất L-valin *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P

Để tạo cấu trúc chủng có vùng điều hòa biến đổi của operon L-valin, chủng sản xuất L-valin *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P được sử dụng làm chủng gốc.

Corynebacterium glutamicum KCCM11201P được biến nạp tương ứng với các vectơ pDZDvalL, pDZDvalP, pDZDvalS và pDZDvalA mà được tạo cấu trúc trong Ví dụ 1 thông qua điện biến nạp.

Nhờ quy trình PCR thứ hai, thu được các chủng sản xuất L-valin tương ứng có vùng điều hòa biến đổi của operon L-valin trên nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P.

Sự thay thế bazơ trong gen khởi đầu cuối cùng được khẳng định bằng cách phân tích trình tự nucleotit đối với vị trí đích; và phân tích nếu gen được khuếch đại hoặc không thông qua PCR khi sử dụng tổ hợp của đoạn khởi đầu của SEQ ID NO:8; DvalL và đoạn khởi đầu của SEQ ID NO:15; DvalP và đoạn khởi đầu của SEQ ID NO:16; DvalS và đoạn khởi đầu của SEQ ID NO:17; và DvalA và đoạn khởi đầu của SEQ ID NO:18.

Các chủng được biến nạp với các vectơ pDZDvalL, pDZDvalP, và pDZDvalS được đặt tên là *Corynebacterium glutamicum* KCJ-456, *Corynebacterium glutamicum* KCJ-457, và *Corynebacterium glutamicum* KCJ-458, tương ứng, và được lưu trữ ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc ngày 19 tháng 11 năm 2012 với số truy cập là KCCM11336P, KCCM11337P, và KCCM11338P, tương ứng.

Ngoài ra, chủng được biến nạp với các vectơ pDZDvalA được chỉ định là *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P_DvalA.

Ví dụ 3: Tạo cấu trúc vectơ biểu hiện quá mức để sinh tổng hợp L-valin có vùng điều hòa được bất hoạt của operon L-valin

Vectơ biểu hiện quá mức để sinh tổng hợp L-valin được tạo cấu trúc từ *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P mà là chủng sản xuất L-valin.

Hơn nữa, các vectơ biểu hiện có vùng điều hòa biến đổi của operon L-valin được tạo cấu trúc từ từng chủng trong số *Corynebacterium glutamicum* KCCM11336P, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11337P, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11338P và *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P_DvalA được điều chế trong Ví dụ 2.

Để tạo cấu trúc vectơ, sử dụng các đoạn môi của các SEQ ID NO:19 và 20, các gen được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11336P, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11337P, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11338P và *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P_DvalA làm khuôn. Sau đó, các gen được khuếch đại được xử lý với các enzym giới hạn BamHI và XbaI, và sau đó được chèn vào trong vectơ pECCG117 được xử lý với cùng các enzym để tạo cấu trúc vectơ biểu hiện quá mức tương ứng để sinh tổng hợp L-val trong đó là pECCG117-DvalW, pECCG117-DvalL, pECCG117-DvalP, pECCG117-DvalS và pECCG117-DvalA.

Ví dụ 4: Tạo cấu trúc chủng biểu hiện quá mức để sinh tổng hợp L-valin có vùng điều hòa được bất hoạt của operon L-valin

Từng vectơ trong số các vectơ biểu hiện, mà là pECCG117-DvalW, pECCG117-DvalL, pECCG117-DvalP, pECCG117-DvalS và pECCG117-DvalA như được điều chế trong Ví dụ 3, được đưa vào trong *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 thông qua điện biến nạp để tạo cấu trúc *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalW, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalL, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalS, và

Corynebacterium glutamicum ATCC13032_DvalA, tương ứng. Khi vector được biến nạp, đạt được sự kháng kanamycin. Do đó, sự biến nạp được khẳng định bằng cách điều tra nghiên cứu xem là có sự tăng trưởng xuất hiện hay không trong môi trường bao gồm kanamycin ở nồng độ là 25µg/ml.

Ví dụ 5: Sản xuất L-valin trong chủng có vùng điều hòa được bất hoạt của operon L-valin

Để sản xuất L-valin từ từng chủng trong số các chủng sản xuất L-valin *Corynebacterium glutamicum* KCCM11336P, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11337P, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11338P và *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P_DvalA được điều chế trong Ví dụ 2 được nuôi cấy như sau. *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P, mà là chủng gốc, được nuôi cấy làm đối chứng.

Ngoài ra, các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalW, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalL, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalP, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalS, và *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalA được nuôi cấy bởi cùng phương pháp như trên đây để sản xuất L-valin.

Một vòng platin của chủng được cấy truyền trong bình thót cổ Corner-Baffle 250ml chứa 25ml của môi trường sản xuất, và việc sản xuất được tiến hành trong 72 giờ ở 30°C với tốc độ 200 vòng/phút. Chế phẩm của môi trường sản xuất được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

Sau khi môi trường nuôi cấy được hoàn thiện, đo lượng L-valin được sản xuất ra bởi HPLC. Nồng độ L-valin trong môi trường nuôi cấy để từng chủng được thể hiện trong các Bảng 2 và 3 dưới đây.

Bảng 1

Môi trường sản xuất
Glucosa 5%, Amoni sulfat 2%, Kali phosphat monobazơ 0,1%, Magie sulfat heptahydrat 0,05%, dịch chiết ngô (Corn Steep Liquid-CSL) 2,0%, Biotin 200µg/L,

độ pH=7,2

Bảng 2

Khả năng sản xuất valin của *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P, KCCM11336P, KCCM11337P, KCCM11338P và KCCM11201P_DvalA

Chủng	Nồng độ L-valin (g/L)
KCCM11201P	2,8
KCCM11336P	3,1
KCCM11337P	3,2
KCCM11338P	3,5
KCCM11201P_DvalA	0,5

Bảng 3

Khả năng sản xuất valin của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalW, ATCC13032_DvalL, ATCC13032_DvalP, ATCC13032_DvalS, và ATCC13032_DvalA

Chủng	Nồng độ L-valin (g/L)
ATCC13032_DvalW	0,1
ATCC13032_DvalL	0,9
ATCC13032_DvalP	1,1
ATCC13032_DvalS	1,3
ATCC13032_DvalA	0,1

Như được thể hiện trong Bảng 2, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, chủng được biến nạp để bất hoạt vùng điều hòa của operon L-valin, ngoại trừ *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P_DvalA, có khả năng sản xuất L-valin được gia tăng so với khả năng sản xuất của chủng sản xuất L-valin *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201 mà là chủng gốc. Cụ thể, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11338P thể hiện khả năng sản xuất L-valin được gia tăng so với khả năng sản xuất của chủng gốc tăng 25%.

Hơn nữa, như được thể hiện trong Bảng 3 trên đây, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, chủng sản xuất L-valin, mà là các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalL, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalP và *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalS, có vùng điều hòa biến đổi của operon L-valin, có khả năng sản xuất L-valin cao hơn 9 đến 13 lần so với khả năng sản xuất của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032_DvalW mà được biến nạp để có vùng điều hòa của operon L-valin của *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P.

Giải thích các ký hiệu

Pro: promotor (vùng khởi đầu),

Peptit dẫn đầu: trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu

Vị trí nghỉ: vị trí nghỉ

Trình tự suy giảm: một trình tự suy giảm

Gen: gen cấu trúc

[Số truy cập]

Tên của của tổ chức lưu trữ: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (quốc tế)

Số truy cập: KCCM11336P

Ngày lưu trữ: 20121119

Tên của của tổ chức lưu trữ: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (quốc tế)

Số truy cập: KCCM11337P

Ngày lưu trữ: 20121119

Tên của của tổ chức lưu trữ: Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (quốc tế)

Số truy cập: KCCM11338P

Ngày lưu trữ: 20121119

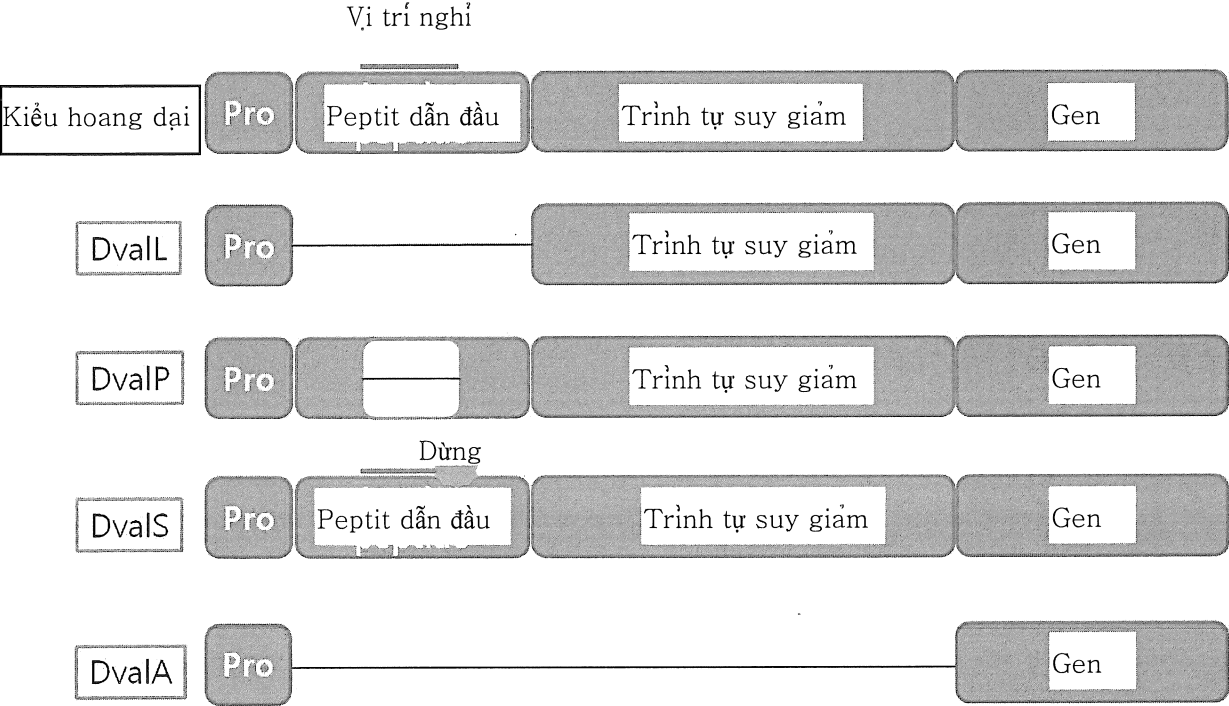
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng sản xuất L-valin được biến nạp để gia tăng sự biểu hiện của operon L-valin bằng cách loại bớt toàn bộ hoặc loại bớt một phần hoặc thay thế trình tự nucleotit mã hóa peptit dẫn đầu trong vùng điều hòa của operon ilvBN, trong đó peptit dẫn đầu được đại diện bởi trình tự axit amin của SEQ ID NO:1.
2. Chúng theo điểm 1, trong đó peptit dẫn đầu bao gồm vị trí nghỉ của trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO:2.
3. Chúng theo điểm 2, trong đó tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit mã hóa vị trí nghỉ được loại bớt hoặc được thay thế một phần của trình tự nucleotit mã hóa vị trí nghỉ.
4. Chúng theo điểm 3, trong đó axit nucleic từ thứ 13 đến 15 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 23 mã hóa vị trí nghỉ được thay thế bằng codon dừng.
5. Chúng theo điểm 1, trong đó chủng này là vi sinh vật *Corynebacterium* sp.
6. Chúng theo điểm 5, trong đó chủng này là *Corynebacterium glutamicum*.
7. Phương pháp sản xuất L-valin, phương pháp này bao gồm các bước:

nuôi cấy chủng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 trong môi trường nuôi cấy;

thu hồi L-valin từ môi trường nuôi cấy của chủng này.
8. Biến thể vùng điều hòa của operon L-valin có trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO:3 hoặc 4.

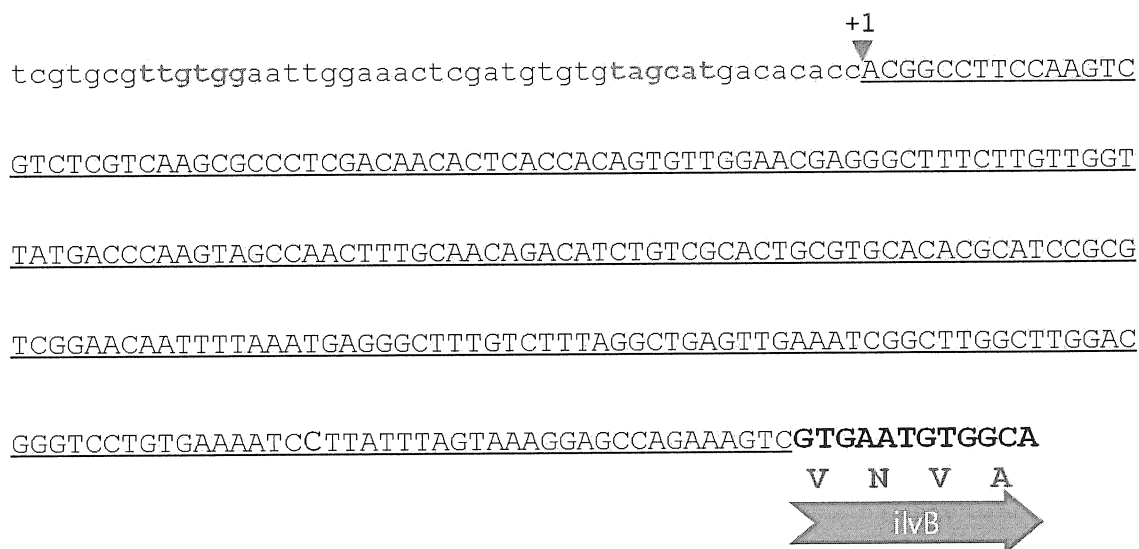
[Fig. 1]



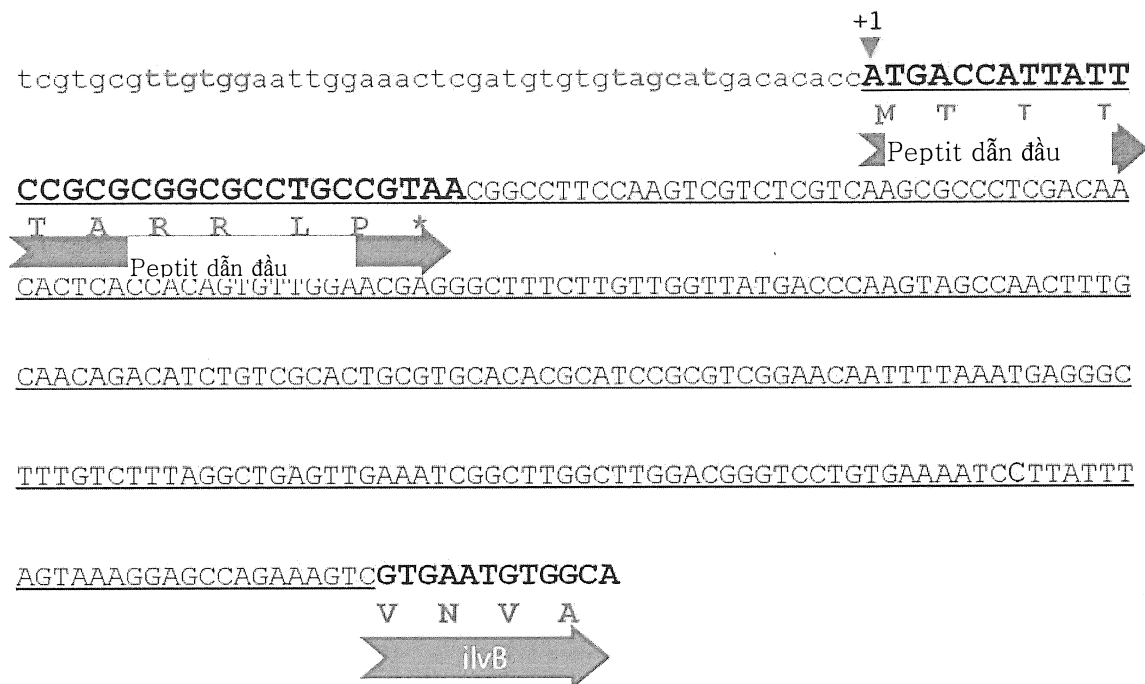
[Fig. 2]



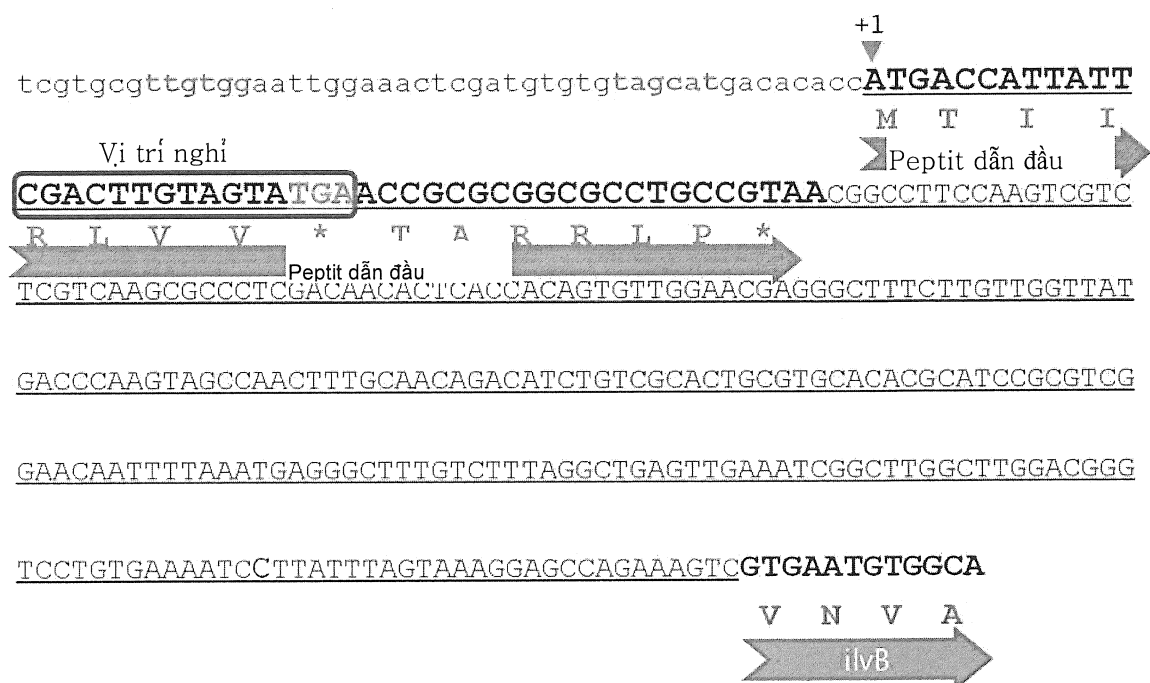
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]

tcgtgcgttggtggaattggaaaactcgatgtgtgttagcatgacacaccTGAAATCGGCTTGGC
+1
TTGGACGGGTCCTGTGAAAATCCTTATTTAGTAAAGGAGCCAGAAAGTC**GTGAATGTGGCA**
V N V A
ilvB

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> CJ Cheiljedang Corporation
- <120> Chủng sản xuất L-valin được biến nạp để gia tăng sự biểu hiện của operon L-valin và phương pháp sản xuất L-valin sử dụng chủng này
- <130> PA12-0466
- <160> 27
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
- <400> 1
 Met Thr Ile Ile Arg Leu Val Val Val Thr Ala Arg Arg Leu Pro
 1 5 10 15
- <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
- <400> 2
 Arg Leu Val Val Val
 1 5
- <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
- <400> 3
 Met Thr Ile Ile Thr Ala Arg Arg Leu Pro
 1 5 10
- <210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
- <400> 4
 Met Thr Ile Ile Arg Leu Val Val *** Thr Ala Arg Arg Leu Pro
 1 5 10 15
- <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
 <223> đoạn mỗi đối với DvalL, DvalP, DvalS

<400>	5		
gcgcgatgac	atctgtgatg	tt	22
<210>	6		
<211>	41		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mỗi đối với DvalL		
<400>	6		
agacgacttg	gaaggccggt	gtgtcatgct	acacacatcg a
			41
<210>	7		
<211>	38		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mỗi đối với DvalL		
<400>	7		
tgtgtgtagc	atgacacacc	ggccttc	caa gtcgtctc
			38
<210>	8		
<211>	23		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mỗi đối với DvalL, DvalP, DvalS		
<400>	8		
cagttcttcg	tgtgcatcag	cct	23
<210>	9		
<211>	47		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mỗi đối với DvalP		
<400>	9		
tgtagcatga	cacaccatga	ccattattac	cgcgcggcgc ctgccgt
			47
<210>	10		
<211>	38		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		

<220>
 <223> đoạn mỗi đối với DvalP

<400> 10
 cggcagggcg cgcgcggtaa taatgggtcat ggtgtgtc 38

<210> 11
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi đối với Dvals

<400> 11
 cggcagggcg cgcgcggtca tactacaagt cgaataatgg tcatgggtgtg 50

<210> 12
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi đối với Dvals

<400> 12
 ccattattcg acttgtagta tgaaccggcg ggcgcctgcc g 41

<210> 13
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi đối với DvalA

<400> 13
 cgtccaagcc aagccgattt cagtgtgtca tgctacacac a 41

<210> 14
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi đối với DvalA

<400> 14
 ctcgatgtgt gtagcatgac acactgaaat cggcttggtc ttg 43

<210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi đối với DvalL

<400> 15
 catgacacac cggccttc 18

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi đối với DvalP

<400> 16
 atgaccatta ttaccgcgcg 20

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

<220>
 <223> đoạn mỗi đối với Dvals

<400> 17
 acttgtagta tgaaccgcgc 20

<210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi đối với DvalA

<400> 18
 gtagcatgac acactgaaat cgg 23

<210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400>	19		
		cgaggatcca accggtatcg acaatccaat	30
<210>	20		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mồi		
<400>	20		
		ctgtctagaa atcgtgggag ttaaactcgc	30
<210>	21		
<211>	303		
<212>	ADN		
<213>	Corynebacterium glutamicum		
<400>	21		
		atgaccatta ttcgacttgt agtagtaacc gcgcggcgcc tgccgtaacg gccttccaag	60
		tcgtctcgtc aagcgccctc gacaacactc accacagtgt tggaacgagg gctttcttgt	120
		tggttatgac ccaagtagcc aactttgcaa cagacatctg tcgcactgcg tgcacacgca	180
		tccgcgtcgg aacaatttta aatgagggct ttgtctttag gctgagttga aatcggttg	240
		gcttgacgg gtcctgtgaa aatccttatt tagtaaagga gccagaaagt cgtgaatgtg	300
		gca	303
<210>	22		
<211>	48		
<212>	ADN		
<213>	Corynebacterium glutamicum		
<400>	22		
		atgaccatta ttcgacttgt agtagtaacc gcgcggcgcc tgccgtaa	48
<210>	23		
<211>	15		
<212>	ADN		
<213>	Corynebacterium glutamicum		
<400>	23		
		cgacttgtag tagta	15
<210>	24		
<211>	1582		
<212>	ADN		
<213>	Corynebacterium glutamicum		
<400>	24		
		ttgttgatgc acactttcgc cgtggagttg gggatgatca cggctctcttg tgcaatcgtg	60

cgaatthttgg tcgcgcgcat ggtgatetca atgacggtgc cttcgacaac gatgccgttg 120
 ccctcaaaac gcaccagtc acccacgccg aattgctttt cgtcaggat gaaaaatccg 180
 gccagaagt cgcgaacaat cgactcgca ccaaggccaa tggcagctga cgcaatggtt 240
 gccggaatcg cagcgcccg gagagagaaa ccaaaagcct gcatcgcgga gacggcaagc 300
 atgaaaaacg ccacaatthg cgcgatataa acgccaacgc cagcgaacgc gagctggttc 360
 ttagtggtgt ccgcatcggc tgcagactcc actcgccgct tgataatacg catggccagt 420
 cggccgatac gtggaatcaa aaacgccaag accaggataa ttgctacatc aaaaccggta 480
 tcgacaatcc aattccacaa tgaatagagc aaatattgaa tgggtacgcc taaaatcatg 540
 agccaagatt agcgctgaaa agtagcggga gcctgcctga actthgtgag aatcctgatt 600
 ccttaaccga agtgggggag thttgggggt gggaattthc gtgcgttggt gaattggaaa 660
 ctcgatgtgt gtagcatgac acaccggcct tccaagtcgt ctgctcaagc gccctcgaca 720
 aactcacca cagtgttga acgagggctt tcttgthgt tatgaccaa gtagccaact 780
 ttgcaacaga catctgtcgc actgcgtgca cagcatccg cgtcggaaca atthtaaatg 840
 agggctthgt cthtaggctg agthgaaac ggctthgctt ggacgggtcc tgtgaaaac 900
 cthatttagt aaaggagcca gaaagtcgtg aatgtggcag cthctcaaca gccactccc 960
 gccacggttg caagccgtgg tcgatccgcc gccctgagc ggatgacagg tgcacaggca 1020
 attgttcgat cgtcgagga gcttaacgcc gacatcgtgt tcggtattcc tggthgtgcg 1080
 gtgctaccgg tgtatgacc gctctattcc tccacaaag tgcgccacgt cctggtgcgc 1140
 cagcagcagg gcgcaggcca cgcagcaacc ggctacgcgc aggttactgg acgcgttggc 1200
 gtctgcattg caacctctgg ccagggcga accaactthg thacccaat cgtgatgca 1260
 aactthgact ccgttcccat gthtgccatc accggccagg tcggaagtgg cctgctgggt 1320
 accgatgctt tccaggaagc cgatatccgc ggcatcacca tgccagtgc caagcacaa 1380
 thcatggtca ccgaccccaa cgacattcca caggcattgg ctgaggcatt ccacctcgcg 1440
 attactggtc gccctggccc tgttctggtg gatattccta aggatgtcca aaacgctgaa 1500
 ttggatttcg tctggccacc aaagatcgac ctgccaggct accgccagt thctactccg 1560
 catgctcgac agattgagca gg 1582

<210> 25
 <211> 1616
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 25
 ttgtgatgc acactthcgc cgtggagthg gggatgatca cgtctctthg tgcaatcgtg 60

cgaatttttg tgcgcgcat ggtgatetca atgacggtgc cttcgacaac gatgccgttg 120
 ccctcaaaac gcaccagtc acccacgccg aattgctttt cgcgcaggat gaaaaatccg 180
 gccaaagaagt cgcgaacaat cgactgcgca ccaaggccaa tggcagctga cgcaatggtt 240
 gccggaatcg cagcgcccg gcagagagaaa ccaaaagcct gcacgcgga gacggcaagc 300
 atgaaaaacg ccacaatttg cgcgatataa acgccaacgc cagcgaacgc gagctggttc 360
 ttagtgggtg cgcgcacggc tgcagactcc actcgccgct tgataatacg catggccagt 420
 cggccgatac gtggaatcaa aaacgccaa accaggataa ttgctacatc aaaaccggta 480
 tcgacaatcc aattccacaa tgaatagagc aaatattgaa tgggtacgcc taaaatcatg 540
 agccaagatt agcgtgaaa agtagcggga gcctgcctga actttgtgag aatcctgatt 600
 ccttaaccga agtgggggag ttttgggggt gggaattttt gtgcgttgtg gaattggaaa 660
 ctcgatgtgt gtagcatgac acaccatgac cattattacc gcgcggcgcc tgccgtaacg 720
 gccttccaag tcgtctcgtc aagcgccctc gacaacactc accacagtgt tggaacgagg 780
 gctttcttgt tggttatgac ccaagtagcc aactttgcaa cagacatctg tcgcactgcg 840
 tgcacacgca tccgcgtcgg aacaatttta aatgagggct ttgtcttttag gctgagttga 900
 aatcggttg gcttgacgg gtcctgtgaa aatccttatt tagtaaagga gccagaaagt 960
 cgtgaatgtg gcagcttctc aacagccac tcccgccacg gttgcaagcc gtggctgac 1020
 cgccgcccct gagcggtatga cagggtgcaca ggcaattggt cgatcgctcg aggagcttaa 1080
 cgccgacatc gtgttcggta ttcctggtgg tgcggtgcta ccggtgtatg acccgctcta 1140
 ttcctccaca aaggtgcgcc acgtcctggt gcgccacgag cagggcgag gccacgcagc 1200
 aaccggctac gcgcaggtta ctggacgcgt tggcgtctgc attgcaacct ctggcccagg 1260
 cgcaaccaac ttggttacct caatcgctga tgcaaaactg gactccgttc ccattggttg 1320
 catcaccggc caggctcgaa gtggcctgct gggtagcgat gctttccagg aagccgatat 1380
 ccgcggcatc accatgccag tgaccaagca caacttcatg gtcaccgacc ccaacgacat 1440
 tccacaggca ttggctgagg cattccacct cgcgattact ggtcgccctg gccctgttct 1500
 ggtggatatt cctaaggatg tccaaaacgc tgaattggat ttcgtctggc caccaaagat 1560
 cgacctgcca ggctaccgcc cagtttctac tccgcatgct cgacagattg agcagg 1616

<210> 26
 <211> 1631
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 26
 ttgttgatgc acactttcgc cgtggagttg gggatgatca cggctctctg tgcaatcgtg 60

```

cgaattttgg tcgcgcgcgc ggtgatctca atgacggtgc cttcgacaac gatgccgttg 120
ccctcaaaac gcacccagtc acccacgccg aattgctttt ccgtcaggat gaaaaatccg 180
gccaaagaagt ccgcaacaat cgactgcgca ccaaggccaa tggcagctga cgcaatggtt 240
gccggaatcg cagcgcccg gcgagagaaa ccaaaagcct gcatcgcgga gacggcaagc 300
atgaaaaacg ccacaatttg cgcgatataa acgccaacgc cagcgaacgc gagctggttc 360
ttagtgggtg ccgcatcggc tgcagactcc actcgccgct tgataatacg catggccagt 420
cggccgatac gtggaatcaa aaacgccaa accaggataa ttgctacatc aaaaccggta 480
tcgacaatcc aattccacaa tgaatagagc aaatattgaa tgggtacgcc taaaatcatg 540
agccaagatt agcgctgaaa agtagcgga gcctgcctga actttgtgag aatcctgatt 600
ccttaaccga agtgggggag ttttgggggt gggaattttc gtgcgttggt gaattggaaa 660
ctcgatgtgt gtagcatgac acaccatgac cattattcga cttgtagtat gaaccgcgcg 720
gcgcctgccg taacggcctt ccaagtcgtc tcgtcaagcg ccctcgacaa cactcaccac 780
agtgttgaa cgagggttt cttgttggt atgaccaag tagccaact tgcaacagac 840
atctgtcgca ctgcgtgcac acgcatccgc gtcggaacaa ttttaaatga gggctttgtc 900
tttaggctga gttgaaatcg gcttggttg gacgggtcct gtgaaaatcc ttatttagta 960
aaggagccag aaagtcgtga atgtggcagc ttctcaacag cccactcccg ccacgggtgc 1020
aagccgtggt cgatccgccg ccctgagcg gatgacaggt gcacaggcaa ttgttcgac 1080
gctcgaggag cttaacgcg acatcgtgt cggtattcct ggtggtgcg tgctaccggt 1140
gtatgaccog ctctattcct ccacaaaggt gcgccacgtc ctggtgcgcc acgagcaggg 1200
cgcaggccac gcagcaaccg gctacgcgca ggttactgga cgcgttggcg tctgcattgc 1260
aacctctggc ccaggcgcaa ccaacttggt taccaccaatc gctgatgcaa acttggactc 1320
cgttcccatg gttgccatca ccggccaggt cggaagtggc ctgctgggta ccgatgcttt 1380
ccaggaagcc gatatccgcg gcatcaccat gccagtgacc aagcacaact tcatggtcac 1440
cgaccccaac gacattccac aggcatggc tgaggcattc cacctcgga ttaactggtcg 1500
ccctggccct gttctggtg atattcctaa ggatgtccaa aacgctgaat tggatttcgt 1560
ctggccacca aagatcgacc tgccaggcta ccgccagtt tctactccgc atgctcgaca 1620
gattgagcag g 1631

```

```

<210> 27
<211> 1403
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

```

<400> 27
 ttgttgatgc acactttcgc cgtggagttg gggatgatca cggctctcttg tgcaatcgtg 60
 cgaattttgg tcgcgcgcac ggtgatctca atgacggtgc cttcgacaac gatgccgttg 120
 ccctcaaaac gcacccagtc acccacgccg aattgctttt ccgtcaggat gaaaaatccg 180
 gccagaagt ccgcaacaat cgactgcgca ccaaggccaa tggcagctga cgcaatggtt 240
 gccggaatcg cagcgcccg gcgagagaaa ccaaaagcct gcacgcgga gacggcaagc 300
 atgaaaaacg ccacaatttg cgcgatataa acgccaacgc cagcgaacgc gagctggttc 360
 ttagtggtgt ccgcatcggc tgcagactcc actcgccgct tgataatacg catggccagt 420
 cggccgatac gtggaatcaa aaacgccaag accaggataa ttgctacatc aaaaccggta 480
 tcgacaatcc aattccacaa tgaatagagc aaatattgaa tgggtacgcc taaaatcatg 540
 agccaagatt agcgtgaaa agtagcggga gcctgcctga actttgtgag aatcctgatt 600
 ccttaaccga agtgggggag ttttgggggt gggaattttc gtgcgttggtg gaattggaaa 660
 ctcgatgtgt gtagcatgac aactgaaat cggcttggtt tggacgggtc ctgtgaaaat 720
 ccttatttag taaaggagcc agaaagtcgt gaatgtggca gcttctcaac agcccactcc 780
 cgccacgggt gcaagccgtg gtcgatccgc cgcccctgag cggatgacag gtgcacaggc 840
 aattgttcga tcgctcgagg agcttaacgc cgacatcgtg ttcggtattc ctggtggtgc 900
 ggtgctaccg gtgtatgacc cgctctattc ctccacaaag gtgcgccacg tcctggtgctg 960
 ccacgagcag ggcgcaggcc acgcagcaac cggctacgag caggttactg gacgcgttgg 1020
 cgtctgcatt gcaacctctg gcccaggcgc aaccaacttg gttaccccaa tcgctgatgc 1080
 aaacttggac tccgttccca tggttgccat caccggccag gtcggaagtg gcctgctggg 1140
 taccgatgct ttccaggaag ccgatatccg cggcatcacc atgccagtga ccaagcacia 1200
 cttcatggtc accgacccca acgacattcc acaggcattg gctgaggcat tcacctcgc 1260
 gattactggt cgccctggcc ctgttctggt ggatattcct aaggatgtcc aaaacgctga 1320
 attggatttc gtctggccac caaagatcga cctgccaggc taccgccag tttctactcc 1380
 gcatgctcga cagattgagc agg 1403