



(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)



1-0036673

(51)⁷ C12P 7/46; C12N 1/14

(13) B

(21) 1-2019-00283

(22) 22/06/2017

(86) PCT/JP2017/022943 22/06/2017

(87) WO/2018/003641 04/01/2018

(30) 2016-129167 29/06/2016 JP

(45) 25/08/2023 425

(43) 27/05/2019 374A

(73) KAO CORPORATION (JP)

14-10, Nihonbashi-Kayabacho 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038210 (JP)

(72) NONAKA, Kyoshiro (JP); TAKAHASHI, Fumikazu (JP).

(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) TẾ BÀO BIẾN NẠP, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT DICACBOXYLIC C4
VÀ PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN NĂNG XUẤT AXIT DICACBOXYLIC C4
TRONG TẾ BÀO CHỦ

(57) Sáng chế đề cập đến việc cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào chủ. Polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quá trình sản xuất sinh học axit dicarboxylic C4.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit dicarboxylic C4 không chỉ được sử dụng trong các ứng dụng khác nhau trong ngành công nghiệp thực phẩm như một chất axit hóa, chất kháng khuẩn và chất điều chỉnh độ pH, mà còn được sử dụng làm nguyên liệu thô cho nhựa tổng hợp và polyme phân hủy sinh học. Do đó, axit dicarboxylic C4 là chất có giá trị về mặt công nghiệp. Axit dicarboxylic C4 được sản xuất công nghiệp bằng cách hoặc tổng hợp hóa học từ nguyên liệu hóa dầu hoặc lên men vi sinh vật. Trước đây, axit dicarboxylic C4 được sản xuất chủ yếu bằng phương pháp tổng hợp hóa học do có chi phí thấp hơn. Tuy nhiên, từ quan điểm tăng chi phí nguyên liệu thô, gánh nặng đối với môi trường, và các vấn đề tương tự, phương pháp sản xuất bằng cách lên men vi sinh vật sử dụng tài nguyên có thể tái chế làm nguyên liệu gần đây đang thu hút sự chú ý.

Được biết, axit fumaric là một trong các axit dicarboxylic C4, có thể được sản xuất bằng cách sử dụng một loại nấm lên men, chẳng hạn như *Rhizopus*.

Rhizopus tạo ra axit fumaric bằng cách sử dụng glucoza làm nguồn cacbon, và bài tiết axit fumaric được tạo ra bên ngoài tế bào. Đến nay, với kỹ thuật sản xuất axit fumaric có năng suất cao bằng cách sử dụng *Rhizopus*, sự cải tiến phương pháp nuôi cấy, và điều chế các chủng có năng suất cao bằng cách nhân giống đột biến đã được biết. Tuy nhiên, do nền tảng di truyền của *Rhizopus* chưa được nghiên cứu kỹ, sự phát triển kỹ thuật sản xuất axit fumaric với năng suất cao bằng cách sử dụng *Rhizopus* thông qua tái tổ hợp gen là không dễ dàng và có ít thông tin. Chỉ có một số báo cáo về việc cải thiện năng suất axit fumaric bằng cách đưa gen mã hóa pyruvat carboxylaza từ *Saccharomyces cerevisiae* vào *Rhizopus delemar* (Tài liệu sáng chế 1), hoặc bằng cách đưa gen mã hóa phosphoenol pyruvat carboxylaza từ *E. coli* vào *Rhizopus oryzae* (Tài liệu không phải sáng chế 1).

Tài liệu sáng chế 1: CN-A-103013843

Tài liệu không phải sáng chế 1: Metabolic Engineering, 2012, 14: 512-520.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự này.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit nêu trên.

Sáng chế cũng đề xuất vector hoặc đoạn ADN bao gồm polynucleotit nêu trên.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào biến nạp chứa polynucleotit nêu trên hoặc vector hoặc đoạn ADN nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất axit dicarboxylic C4 bao gồm việc nuôi cấy tế bào biến nạp nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất tế bào biến nạp bao gồm việc đưa polynucleotit nêu trên hoặc vector nêu trên vào tế bào chủ.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào chủ bao gồm việc đưa polynucleotit nêu trên hoặc vector hoặc đoạn ADN nêu trên vào tế bào chủ, hoặc tăng cường sự biểu hiện của polynucleotit nêu trên.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến polypeptit có tác dụng cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào chủ, gen mã hóa polypeptit, tế bào biến nạp bao gồm gen, và phương pháp sản xuất axit dicarboxylic C4 bằng cách sử dụng tế bào biến nạp này.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu chuyên sâu, và nhận thấy rằng tế bào trong đó sự biểu hiện của polypeptit bao gồm trình tự axit amin được

biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 được tăng cường đã cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4.

Polypeptit theo sáng chế có chức năng cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào. Tế bào trong đó sự biểu hiện của polypeptit theo sáng chế được tăng cường (ví dụ, tế bào trong đó gen mã hóa polypeptit được đưa vào) có thể tạo ra axit dicarboxylic C4 nhanh hơn. Do đó, polypeptit theo sáng chế và tế bào trong đó sự biểu hiện của polypeptit được tăng cường sẽ hữu ích cho sự sản xuất axit dicarboxylic C4 về mặt sinh học. Các đặc điểm và các ưu điểm này cùng với các đặc điểm và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn từ phần mô tả sau đây của bản mô tả này.

1. Định nghĩa

Như được sử dụng ở đây, độ đồng nhất của trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit được tính theo phương pháp Lipman-Pearson (Science, 1985, 227: 1435-1441). Cụ thể, độ đồng nhất của trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit được tính bằng cách sử dụng trình tự axit amin $\times$ trình tự axit amin khớp tối đa hoặc trình tự nucleotit $\times$ trình tự nucleotit khớp tối đa của chương trình phân tích tương đồng của phần mềm xử lý thông tin di truyền GENETYCS Phiên bản 12 và thực hiện phân tích với Khớp -1, Không khớp 1, Khoảng cách 1, và *N+2.

Như được sử dụng ở đây, độ đồng nhất của trình tự axit amin hoặc nucleotit đề cập đến tỷ lệ (%) số các vị trí mà các axit amin hoặc nucleotit giống

hệ nhau có mặt trong hai trình tự axit amin hoặc hai trình tự nucleotit dựa trên số lượng axit amin hoặc nucleotit có trình tự chiều dài đầy đủ khi hai trình tự axit amin hoặc hai trình tự nucleotit này được sắp thẳng hàng (thẳng hàng) sao cho hai trình tự trùng khớp tối đa. Độ đồng nhất khác biệt với độ tương đồng được tính bao gồm cả sự giống nhau và độ đồng nhất, trong đó một nhóm axit amin hoặc nucleotit tương tự được coi là có sự giống nhau.

Như được sử dụng ở đây, "độ đồng nhất ít nhất 90%" liên quan đến trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit đề cập đến độ đồng nhất 90% trở lên, tốt hơn là 95% trở lên, tốt hơn nữa là 96% trở lên, còn tốt hơn là 97% trở lên, còn tốt hơn là 98% trở lên, còn tốt hơn là 99% trở lên.

Như được sử dụng ở đây, "vùng tương ứng" trên trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit có thể được xác định bằng cách sắp thẳng hàng trình tự đích và trình tự tham chiếu (ví dụ, trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2) sao cho có độ tương đồng tối đa. Sự sắp thẳng hàng của trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các thuật toán đã biết, và các quy trình về chúng đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết đến. Ví dụ, sự sắp thẳng hàng có thể được thực hiện theo cách thủ công dựa trên phương pháp Lipman-Pearson đã được đề cập ở trên hoặc phương pháp tương tự, và cũng được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình sắp thẳng hàng đa trình tự Clustal W (Clustal W multiple alignment program) (Thompson,

J. D. et al, 1994, *Nucleic Acids Res.*22: 4673-4680) ở cài đặt mặc định. Clustal W có thể sẵn có trên các trang web như trang web của Viện thông tin sinh học châu Âu: EBI [www.ebi.ac.uk/index.html] hoặc trang web của Ngân hàng Dữ liệu ADN của Nhật Bản (DDBJ) [www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html] được điều hành bởi Viện di truyền học quốc gia. Một vùng của trình tự đích được sắp thẳng hàng với vùng nhất định của trình tự tham chiếu bằng hoạt động sắp thẳng hàng được mô tả ở trên được coi là "vùng tương ứng" với vùng nhất định.

Như được sử dụng ở đây, "trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin bị xóa bỏ, thay thế, bổ sung hoặc chèn vào" đề cập đến trình tự axit amin trong đó từ 1 đến 10, tốt hơn là từ 1 đến 8, tốt hơn nữa là từ 1 đến 5, còn tốt hơn là từ 1 đến 3 axit amin bị xóa bỏ, thay thế, bổ sung hoặc chèn vào. Cũng như được sử dụng ở đây, "trình tự nucleotit trong đó một hoặc nhiều nucleotit bị xóa bỏ, thay thế, bổ sung hoặc chèn vào" đề cập đến trình tự nucleotit trong đó từ 1 đến 30, tốt hơn là từ 1 đến 24, tốt hơn nữa là từ 1 đến 15, còn tốt hơn là từ 1 đến 9 nucleotit bị xóa bỏ, thay thế, bổ sung hoặc chèn vào. Như được sử dụng ở đây, việc "bổ sung" (các) axit amin hoặc (các) nucleotit bao gồm việc bổ sung (các) axit amin hoặc (các) nucleotit vào một đầu hoặc cả hai đầu của trình tự.

Như được sử dụng ở đây, "ngược chiều" và "xuôi chiều" liên quan đến gen đề cập đến quá trình ngược chiều và xuôi chiều của gen theo hướng phiên mã. Ví dụ, "gen được sắp xếp xuôi chiều của trình tự khởi đầu" nghĩa là gen đó có

mặt ở đầu 3' của trình tự khởi đầu trong chuỗi ADN mang mã, và ngược chiều của gen đề cập đến vùng có mặt ở đầu 5' của gen trong chuỗi ADN mang mã.

Như được sử dụng ở đây, "liên kết chức năng" giữa gen và vùng kiểm soát đề cập đến gen được liên kết với vùng kiểm soát để gen có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của vùng kiểm soát. Quy trình tạo ra "liên kết chức năng" giữa gen và vùng kiểm soát đã được biết đến nhiều trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "nội tại" liên quan đến chức năng, đặc tính hoặc đặc điểm của tế bào nghĩa là chức năng, đặc tính hoặc đặc điểm có mặt trong tế bào kiểu đại. Ngược lại, thuật ngữ "ngoại sinh" được sử dụng để biểu thị chức năng, đặc tính hoặc đặc điểm được đưa vào từ bên ngoài, không có ban đầu trong tế bào. Ví dụ, gen hoặc polynucleotit "ngoại sinh" là gen hoặc polynucleotit được đưa vào tế bào từ bên ngoài. Gen hoặc polynucleotit ngoại sinh có thể có nguồn gốc từ loại tế bào đồng nhất về mặt sinh học trong đó gen hoặc polynucleotit được đưa vào hoặc có thể có nguồn gốc từ các loại sinh vật khác (tức là, gen hoặc polynucleotit khác loại).

Như được sử dụng ở đây, "năng suất axit dicarboxylic C4" của tế bào được biểu thị bằng tốc độ tạo ra axit dicarboxylic C4 trong môi trường nuôi cấy tế bào. Cụ thể, "năng suất axit dicarboxylic C4" được biểu thị bằng giá trị (g/L/giờ) thu được bằng cách chia khối lượng axit dicarboxylic C4 được tế bào tạo ra trong thời gian nuôi cấy nhất định sau khi bắt đầu nuôi cấy trên một thể

tích môi trường theo thời gian nuôi cấy. Lượng axit dicarboxylic C4 do tế bào tạo ra có thể được tính bằng lượng axit dicarboxylic C4 trong dịch nổi nuôi cấy thu được bằng cách loại bỏ tế bào khỏi môi trường nuôi cấy của tế bào. Lượng axit dicarboxylic C4 trong dịch nổi nuôi cấy có thể được đo bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) hoặc tương tự. Quy trình đo cụ thể hơn được minh họa trong ví dụ tham khảo 1 được mô tả bên dưới.

Như được sử dụng ở đây, "cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4" trong tế bào biến nạp nghĩa là tế bào biến nạp đã cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 so với tế bào chủ hoặc tế bào đối chứng. Tỷ lệ cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào biến nạp được tính theo phương trình sau.

Tỷ lệ cải thiện (%)

$$= (\text{Năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào biến nạp} / \text{Năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào chủ hoặc tế bào đối chứng}) \times 100 - 100$$

Như được sử dụng ở đây, tế bào biến nạp nghĩa là tế bào trong đó sự biểu hiện của polypeptit theo sáng chế được tăng cường, ví dụ, tế bào thu được bằng cách đưa polynucleotit mã hóa polypeptit theo sáng chế vào tế bào chủ để cho phép biểu hiện, hoặc một tế bào trong đó sự biểu hiện của polynucleotit được tăng cường (tức là, lượng phiên mã của chúng được cải thiện). Ở đây, "tế bào chủ" đề cập đến tế bào chủ (tế bào mẹ) của tế bào biến nạp. Ngoài ra, "tế bào đối chứng" đề cập đến tế bào trong đó vector không chứa polynucleotit mã hóa

polypeptit theo sáng chế được đưa vào. Tế bào đối chứng được sử dụng để so sánh với tế bào biến nạp trong đó vector chứa polynucleotit được đưa vào. Tốt hơn là, tỷ lệ cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 được tính theo năng suất axit dicarboxylic C4 của mỗi tế bào tại thời điểm khi tốc độ tạo ra axit dicarboxylic C4 của tế bào biến nạp đạt tối đa. Theo đó, như được sử dụng ở đây, "tế bào biến nạp trong đó năng suất axit dicarboxylic C4 được cải thiện từ X% trở lên" đề cập đến tế bào biến nạp trong đó tỷ lệ cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 được tính theo phương trình ở trên là X% trở lên. Hơn nữa, như được sử dụng ở đây, "cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 từ X% trở lên" của tế bào nghĩa là tỷ lệ cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 của tế bào được tính theo phương trình ở trên là X% trở lên.

Ví dụ về axit dicarboxylic C4 được sản xuất theo sáng chế bao gồm axit fumaric, axit malic và axit succinic, tốt hơn là axit fumaric và axit malic, tốt hơn nữa là axit fumaric.

Như được sử dụng ở đây, "cacbonic anhydrase" nghĩa là enzym (EC 4.2.1.1) có hoạt tính xúc tác để thúc đẩy một trong hai hoặc cả hai phản ứng tạo ra ion cacbonat (HCO_3^-) từ phân tử cacbon dioxit (CO_2) và phân tử nước (H_2O) trong dung dịch nước và phản ứng ngược của chúng. Hơn nữa, "hoạt tính cacbonic anhydrase" đề cập đến hoạt tính xúc tác của cacbonic anhydrase, và có

thể được xác định, ví dụ, bằng phương pháp đã biết (C.S. Gai et al., AMB Express 2014, 4, 2-13.) hoặc phương pháp tương tự.

2. Cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào

2.1. Polypeptit mới

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự này.

Theo kết quả tìm kiếm với cơ sở dữ liệu polypeptit (ví dụ, trình tự protein không dự phòng ncbi (nr)), một protein có chức năng chưa xác định có nguồn gốc từ chủng *Lichtheimia ramosa* (số truy nhập: LRAMOSA05249) được tìm thấy là protein đã biết giống nhất với polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ NO: 2. Độ đồng nhất trình tự của chúng là 62,77%. Hơn nữa, polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ NO: 2 có vùng tương ứng với các vị trí 152-375 trong protein có chức năng không xác định bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 23 có nguồn gốc từ chủng *Rhizopus delemar* RA 99-880 (số truy nhập: RO3G_10751). Nói cách khác, polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ NO: 2 là một trình tự trong đó axit amin ở phía đầu N (trình tự của axit amin ở các vị trí từ 2 đến 151) đã bị xóa bỏ khỏi polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 23. Nhận thấy rằng độ đồng nhất trình tự của polypeptit với protein

có chức năng không xác định là 60,00%, và polypeptit này khác với protein có chức năng không xác định. Từ những vấn đề ở trên, polypeptit được xác định là polypeptit mới mà cho đến nay vẫn chưa được biết đến, và như được mô tả trong ví dụ bên dưới, polypeptit đã được xác nhận rằng polypeptit có hoạt tính cacbonic anhydrase. Hơn nữa, như được thể hiện trong ví dụ bên dưới, trong các chủng mà sự biểu hiện của protein có chức năng không xác định bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 23 được tăng cường, không quan sát thấy sự cải thiện năng suất axit fumaric. Mặt khác, sự cải thiện năng suất axit fumaric chỉ được quan sát thấy ở các chủng trong đó sự biểu hiện của polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ NO: 2 được tăng cường.

Theo đó, theo một phương án ưu tiên, polypeptit theo sáng chế là polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự này và có hoạt tính cacbonic anhydrase.

Ví dụ về trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 bao gồm trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin bị xóa bỏ, thay thế, bổ sung hoặc chèn vào trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2.

Ví dụ về phương pháp đưa đột biến vào như xóa bỏ, thay thế, bổ sung, hoặc chèn (các) axit amin vào trình tự axit amin bao gồm phương pháp đưa đột

biến vào như xóa bỏ, thay thế, bổ sung, hoặc chèn (các) nucleotit trong trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin. Ví dụ về phương pháp đưa đột biến vào trình tự nucleotit bao gồm gây đột biến bằng cách sử dụng các tác nhân gây đột biến hóa học như ethyl metansulfonat, N-metyl-N-nitrosoguanidin và axit nitơ, hoặc các tác nhân gây đột biến vật lý như tia cực tím, tia X, tia gamma và chùm ion, phương pháp gây đột biến điểm, và phương pháp được mô tả trong Dieffenbach et al (Cold Spring Harbar Laboratory Press, New York, 581-621, 1995). Ví dụ về phương pháp gây đột biến điểm bao gồm phương pháp kéo dài ghép đoạn chồng lấn (SOE) (Horton et al., Gene 77, 61-68, 1989), phương pháp ODA (Hashimoto-Gotoh et al., Gene, 152, 271-276, 1995), và phương pháp Kunkel (Kunkel, T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 488). Ngoài ra, kit gây đột biến điểm có sẵn trên thị trường như kit TransformerTM Site-Directed Mutagenesis (Takara Bio Inc.), kit TransformerTM Site-Directed Mutagenesis (Clontech Laboratories, Inc.), và kit KOD-Plus-Mutagenesis (TOYOBO CO., LTD.) có thể được sử dụng.

2.2. Gen, vector và tế bào biến nạp

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa polypeptit được đề cập ở trên theo sáng chế. Theo một phương án ưu tiên, polynucleotit theo sáng chế bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 hoặc polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit

có độ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO:

1. Theo một phương án ưu tiên, polynucleotit theo sáng chế mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự này và có hoạt tính cacbonic anhydrase.

Ví dụ về trình tự nucleotit có độ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 bao gồm trình tự nucleotit trong đó một hoặc nhiều nucleotit bị xóa bỏ, thay thế, bổ sung hoặc chèn vào trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1. Phương pháp đưa đột biến vào như xóa bỏ, thay thế, bổ sung, hoặc chèn (các) nucleotit vào trình tự nucleotit như được mô tả ở trên. Polynucleotit theo sáng chế có thể ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép, và có thể là ADN hoặc ARN. ADN có thể là cADN hoặc ADN nhân tạo như ADN được tổng hợp hóa học.

Polynucleotit theo sáng chế có thể được kết hợp thành một vector. Tốt hơn là, vector chứa polynucleotit theo sáng chế là vector biểu hiện. Tốt hơn là, vector là vector biểu hiện có khả năng đưa polynucleotit theo sáng chế vào tế bào chủ và biểu hiện polynucleotit trong tế bào chủ. Tốt hơn là, vector bao gồm polynucleotit theo sáng chế và vùng kiểm soát được liên kết chức năng với polynucleotit. Vector có thể là vector có khả năng tăng sinh và tái bản tự động và

ngoài nhiễm sắc thể, chẳng hạn như plasmit, hoặc có thể là một vector được kết hợp trong nhiễm sắc thể.

Ví dụ cụ thể về vector bao gồm pBluescript II SK(-) (Stratagene), vector pUC (Takara Bio Inc.) như pUC18/19 và pUC118/119, vector pET (Takara Bio Inc.), vector pGEX (GE healthcare), vector pCold (Takara Bio Inc.), pHY300PLK (Takara Bio Inc.), pUB110 (Mckenzie, T. et al., 1986, Plasmid 15(2): 93-103), pBR322 (Takara Bio Inc.), pRS403 (Stratagene), pMW218/219 (NIPPON GENE CO., LTD.), vector pRI (Takara Bio Inc.) như pRI909/910, vector pBI (Clontech Laboratories, Inc.), vector IN3 (Inplanta Innovations Inc.), pPTR1/2 (Takara Bio Inc.), pDJB2 (D. J. Ballance et al., Gene, 36, 321-331, 1985), pAB4-1 (van Hartingsveldt W et al., Mol Gen Genet, 206, 71-75, 1987), pLeu4 (M.I.G. Roncero et al., Gene, 84, 335-343, 1989), pPyr225 (C. D. Skory et al., Mol Genet Genomics, 268, 397-406, 2002), và pFG1 (Gruber, F. et al., Curr Genet, 18, 447-451, 1990).

Ngoài ra, có thể tạo đoạn ADN chứa polynucleotit theo sáng chế. Ví dụ về đoạn ADN bao gồm đoạn ADN được khuếch đại bằng PCR và đoạn ADN được phân cắt bằng enzym giới hạn. Tốt hơn là, đoạn ADN có thể là một catxet biểu hiện chứa polynucleotit theo sáng chế và vùng kiểm soát được liên kết chức năng với polynucleotit.

Vùng kiểm soát có trong vector hoặc đoạn ADN là trình tự biểu hiện polynucleotit theo sáng chế trong tế bào chủ mà vector hoặc đoạn ADN đã được đưa vào, và ví dụ về vùng kiểm soát bao gồm vùng kiểm soát biểu hiện chẳng hạn như trình tự khởi đầu và trình tự kết thúc, và trình tự tái bản. Loại vùng kiểm soát có thể được lựa chọn một cách thích hợp tùy thuộc vào loại tế bào chủ trong đó vector hoặc đoạn ADN được đưa vào. Khi cần thiết, vector hoặc đoạn ADN có thể chứa thêm dấu hiệu chọn lọc, chẳng hạn như gen kháng thuốc kháng sinh và gen liên quan đến tổng hợp axit amin.

Tế bào biến nạp theo sáng chế bao gồm tế bào trong đó polynucleotit mã hóa polypeptit theo sáng chế được đưa vào tế bào chủ cho phép biểu hiện và tế bào trong đó sự biểu hiện của polynucleotit được tăng cường. Tốt hơn là, tế bào biến nạp chứa polynucleotit ngoại sinh.

Ví dụ về kỹ thuật đưa polynucleotit vào cho phép biểu hiện hoặc tăng cường sự biểu hiện của polynucleotit bao gồm kỹ thuật đưa vào vector hoặc đoạn ADN chứa polynucleotit theo sáng chế được liên kết chức năng với vùng kiểm soát, tốt hơn là vùng kiểm soát nâng cao (vùng kiểm soát có thể tăng cường sự biểu hiện của polynucleotit so với kiểu dại) vào tế bào chủ, và kỹ thuật sắp xếp vùng kiểm soát nâng cao để có thể liên kết chức năng với polynucleotit theo sáng chế trong bộ gen của tế bào chủ (ví dụ, thay thế trình tự vùng kiểm soát của

polynucleotit theo sáng chế trong bộ gen của tế bào mẹ bằng vùng kiểm soát nâng cao).

Tế bào biến nạp theo sáng chế tốt hơn là gấp 1,1 lần trở lên, tốt hơn nữa là 2 lần trở lên, còn tốt hơn là 5 lần trở lên, còn tốt hơn là 10 lần trở lên, còn tốt hơn là 15 lần trở lên, còn tốt hơn là 20 lần trở lên hoạt tính cacbonic anhydrase được cải thiện trong tế bào, so với tế bào chủ (tế bào mẹ). Khi tế bào chủ không chứa gen mã hóa polypeptit theo sáng chế và không biểu hiện polypeptit theo sáng chế, tế bào biến nạp theo sáng chế bao gồm tế bào trong đó một đặc điểm được thay đổi để cho phép quá trình phiên mã gen.

Tế bào chủ của tế bào biến nạp có thể là tế bào bất kỳ của vi sinh vật, thực vật và động vật. Từ quan điểm về hiệu quả sản xuất axit dicarboxylic C₄, tế bào chủ tốt hơn là tế bào của vi sinh vật. Vi sinh vật có thể là sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân thực. Trong số đó, từ quan điểm về năng suất axit dicarboxylic C₄, vi sinh vật tốt hơn là nấm sợi hoặc nấm men, tốt hơn nữa là nấm sợi. Là nấm sợi, loại nấm bất kỳ ở dạng sợi thuộc các phân ngành, *Eumycota* và *Oomycota* đều được bao gồm (như được định nghĩa trong Hawksworth et al., In, Ainsworth và Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, bUniversity, Press, Cambridge, UK). Nấm sợi thường được đặc trưng bởi thành tế bào hệ sợi bao gồm kitin, xenlulo, glucan, chitosan, mannan, và polysacarit

phức hợp khác. Sự tăng trưởng thực vật của chúng thông qua sự kéo dài sợi nấm, và sự chuyển hóa cacbon của chúng là sự chuyển hóa hiếu khí bắt buộc.

Ví dụ ưu tiên của nấm sợi được sử dụng làm tế bào chủ của tế bào biến nạp theo sáng chế bao gồm nấm sợi của chi *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Parasitella*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Rhizopus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, và *Trichoderma*. Trong số này, từ quan điểm về năng suất axit dicarboxylic C4, được ưu tiên là nấm sợi thuộc chi *Rhizopus* như *Rhizopus delemar*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus chinensis*, *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus tonkinensis*, *Rhizopus tritici*, và được ưu tiên hơn là *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus delemar* và *Rhizopus oryzae*, và được ưu tiên hơn nữa là *Rhizopus delemar*.

Để đưa vector hoặc đoạn ADN vào tế bào chủ, các phương pháp biến nạp chung như phương pháp điện chuyển, phương pháp biến nạp, phương pháp chuyển nạp, phương pháp tiếp hợp, phương pháp dung hợp tế bào nguyên sinh, phương pháp bắn gen, phương pháp sử dụng *Agrobacterium*.

Có thể lựa chọn tế bào biến nạp trong đó vector hoặc đoạn ADN quan tâm được đưa vào bằng cách sử dụng một chất đánh dấu chọn lọc. Ví dụ, khi chất

đánh dấu chọn lọc là một gen kháng thuốc kháng sinh, có thể lựa chọn tế bào biến nạp mà vectơ hoặc đoạn ADN quan tâm được đưa vào bằng cách nuôi cấy tế bào trong môi trường chứa thuốc kháng sinh. Như một ví dụ khác, khi chất đánh dấu chọn lọc là một gen liên quan đến tổng hợp axit amin, tế bào biến nạp trong đó vectơ hoặc đoạn ADN quan tâm đã được đưa vào có thể được lựa chọn bằng cách đưa gen vào tế bào chủ có hiện tượng dinh dưỡng thụ động axit amin, và sử dụng sự có mặt hoặc không có mặt của hiện tượng dinh dưỡng thụ động axit amin làm chất chỉ thị. Ngoài ra, việc đưa vectơ hoặc đoạn ADN quan tâm vào cũng có thể được xác nhận bằng cách kiểm tra trình tự ADN của tế bào biến nạp bằng PCR hoặc phương pháp tương tự.

Ví dụ về vùng kiểm soát nâng cao bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vùng kiểm soát của operon rARN, vùng kiểm soát của gen mã hóa protein ribosom (ví dụ, gen rplS), trình tự khởi đầu adh1 (Đơn đăng ký sáng chế Nhật Bản số 2015-155759), trình tự khởi đầu ldhA (US-B-6268189), trình tự khởi đầu pgk1 (WO-A-2001/73083), trình tự khởi đầu pgk2 (WO-A-2001/72967), trình tự khởi đầu pdcA và trình tự khởi đầu amyA (Archives of Microbiology, 2006, 186: 41-50), và trình tự khởi đầu tef và 18S rARN (US-A-2010/112651).

Ví dụ về phương pháp thay thế vùng kiểm soát của polynucleotit theo sáng chế có trong bộ gen của tế bào mẹ với vùng kiểm soát nâng cao bao gồm phương pháp bao gồm việc đưa đoạn ADN chứa vùng kiểm soát nâng cao và

trình tự polynucleotit của chất đánh dấu chọn lọc vào tế bào chủ, và chọn tế bào được biến nạp bằng cách tái tổ hợp tương đồng hoặc không tương đồng hoặc phương pháp tương tự.

2.3. Cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4

Trong tế bào biến nạp theo sáng chế, lượng biểu hiện của polypeptit theo sáng chế được tăng lên và hoạt tính cacbonic anhydrase trong tế bào được tăng cường. Do đó, tế bào biến nạp đã cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4. Ví dụ, so với tế bào chủ (tế bào mẹ), tế bào biến nạp chứa vector hoặc đoạn ADN chứa polynucleotit được cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 tốt hơn là từ 5% trở lên, tốt hơn nữa là 10% trở lên, còn tốt hơn là 15% trở lên.

3. Sản xuất axit dicarboxylic C4

Tế bào biến nạp theo sáng chế có năng suất axit dicarboxylic C4 được cải thiện. Do đó, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất axit dicarboxylic C4 bao gồm nuôi cấy tế bào biến nạp theo sáng chế. Axit dicarboxylic C4 được sản xuất bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế bao gồm axit fumaric, axit malic, và axit succinic, và axit dicarboxylic C4 tốt hơn là axit fumaric và axit malic, tốt hơn nữa là axit fumaric.

Nuôi cấy tế bào biến nạp trong phương pháp sản xuất theo sáng chế bao gồm nuôi cấy vi sinh vật, thực vật, động vật, hoặc tế bào hoặc mô của chúng trong đó chứa tế bào biến nạp. Môi trường và điều kiện nuôi cấy để nuôi cấy tế

bào biến nạp có thể được lựa chọn một cách thích hợp tùy thuộc vào loại vật chủ của tế bào biến nạp. Nói chung, có thể sử dụng môi trường và các điều kiện nuôi cấy thường được sử dụng để nuôi cấy vật chủ của tế bào biến nạp.

Ví dụ, khi tế bào biến nạp là tế bào nấm sợi, nhiệt độ nuôi cấy có thể là, ví dụ, từ 10°C đến 50°C, tốt hơn là từ 25°C đến 45°C, và thời gian nuôi cấy không có giới hạn cụ thể miễn là axit dicarboxylic C4 quan tâm được sản xuất đủ, nhưng ví dụ có thể là từ 1 đến 240 giờ, tốt hơn là từ 12 đến 120 giờ, tốt hơn nữa là từ 24 đến 72 giờ. Tốt hơn là được nuôi cấy trong điều kiện khuấy hoặc sục khí.

Môi trường để nuôi cấy nấm sợi có thể là môi trường bất kỳ thường được sử dụng. Tốt hơn là, môi trường là môi trường lỏng, và môi trường có thể là môi trường bất kỳ trong các môi trường tổng hợp, môi trường tự nhiên, và môi trường bán tổng hợp thu được bằng cách bổ sung các thành phần tự nhiên vào môi trường tổng hợp. Môi trường có thể là môi trường PDB có sẵn trên thị trường (môi trường dextroza khoai tây; được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company, hoặc tương tự), môi trường PDA (được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company, hoặc tương tự), môi trường LB (môi trường Luria-Bertani; được sản xuất bởi NIHON PHARMACEUTICAL CO., LTD (dưới tên thương mại "Daigo"), hoặc tương tự), môi trường NB (Nutrient Broth; được sản xuất bởi Becton, Dickinson and Company, hoặc tương tự), môi trường SB (môi trường Sabouraud; được sản xuất bởi Oxoid Limited, hoặc tương tự), môi

trường SD (Synthetic Dropout Broth; ví dụ, từ Clontech Laboratories, Inc.) và tương tự. Nói chung, môi trường này chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, muối vô cơ và những thành phần tương tự, tuy nhiên các thành phần này và chế phẩm của môi trường có thể được lựa chọn một cách thích hợp.

Sau đây, chế phẩm môi trường ưa thích để nuôi cấy nấm sợi sẽ được mô tả chi tiết. Nồng độ của mỗi thành phần trong môi trường được mô tả sau đây thể hiện nồng độ ban đầu (khi chuẩn bị môi trường hoặc khi bắt đầu nuôi cấy).

Ví dụ về nguồn cacbon trong môi trường bao gồm glucoza, mantoza, tinh bột thủy phân, fructoza, xyloza và sucroza, và trong số này, glucoza và fructoza được ưu tiên sử dụng. Các loại sacarit này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp hai loại trở lên. Nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường tốt hơn là 1% (khối lượng/thể tích) trở lên, tốt hơn nữa là 5% (khối lượng/thể tích) trở lên, và tốt hơn là 40% (khối lượng/thể tích) trở xuống, tốt hơn nữa là 30% (khối lượng/thể tích) trở xuống. Ngoài ra, nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường tốt hơn là từ 1 đến 40% (khối lượng/thể tích), tốt hơn nữa là từ 5 đến 30% (khối lượng/thể tích).

Ví dụ về nguồn nitơ trong môi trường bao gồm các hợp chất chứa nitơ như amoni sulfat, urê, amoni nitrat, kali nitrat, và natri nitrat. Nồng độ của nguồn nitơ trong môi trường có thể tốt hơn là từ 0,001 đến 0,5% (khối lượng/thể tích), tốt hơn nữa là từ 0,001 đến 0,2% (khối lượng/thể tích).

Môi trường có thể chứa sulfat, muối magie, và muối kẽm. Ví dụ về sulfat bao gồm magie sulfat, kẽm sulfat, kali sulfat, natri sulfat, và amoni sulfat. Ví dụ về muối magie bao gồm magie sulfat, magie nitrat, và magie clorua. Ví dụ về muối kẽm bao gồm kẽm sulfat, kẽm nitrat, và kẽm clorua. Nồng độ của sulfat trong môi trường tốt hơn là từ 0,01 đến 0,5% (khối lượng/thể tích), tốt hơn nữa là từ 0,02 đến 0,2% (khối lượng/thể tích). Nồng độ của muối magie trong môi trường tốt hơn là từ 0,001 đến 0,5% (khối lượng/thể tích), tốt hơn nữa là từ 0,01 đến 0,1% (khối lượng/thể tích). Nồng độ của muối kẽm trong môi trường tốt hơn là từ 0,001 đến 0,05% (khối lượng/thể tích), tốt hơn nữa là từ 0,005 đến 0,05% (khối lượng/thể tích).

Độ pH của môi trường (25°C) tốt hơn là từ 3 đến 7, tốt hơn nữa là từ 3,5 đến 6. Độ pH của môi trường có thể được điều chỉnh bằng các bazơ như canxi hydroxit, natri hydroxit, canxi cacbonat, và amoniac, hoặc các axit như axit sulfuric và axit clohydric.

Ví dụ về môi trường được ưu tiên bao gồm môi trường lỏng chứa từ 7,5 đến 30% nguồn cacbon, từ 0,001 đến 0,2% amoni sulfat, từ 0,01 đến 0,6% kali dihydro phosphat, từ 0,01 đến 0,1% magie sulfat heptahydrat, từ 0,005 đến 0,05% kẽm sulfat heptahydrat, và từ 3,75 đến 20% canxi cacbonat (trong đó nồng độ % bất kỳ được tính theo % (khối lượng/thể tích)).

Để sản xuất axit dicarboxylic C4 hiệu quả hơn bằng cách sử dụng nấm biến nạp thu được bằng cách sử dụng nấm sợi làm vật chủ, quá trình sản xuất có thể được thực hiện theo các bước sau đây. Nghĩa là, axit dicarboxylic C4 có thể được sản xuất hiệu quả bằng cách chuẩn bị huyền phù bào tử của tế bào biến nạp (bước A), nuôi cấy huyền phù bào tử trong môi trường nuôi cấy để làm nảy mầm bào tử từ đó chuẩn bị sợi nấm (bước B1), tốt hơn nữa là nhân giống sợi nấm (bước B2), và nuôi cấy sợi nấm đã được chuẩn bị để sản xuất axit dicarboxylic C4 (bước C). Tuy nhiên, bước nuôi cấy tế bào biến nạp theo sáng chế không bị giới hạn bởi các bước sau.

Bước A: Chuẩn bị huyền phù bào tử

Huyền phù bào tử có thể được chuẩn bị bằng cách cấy các bào tử của nấm sợi biến nạp vào môi trường, chẳng hạn như môi trường thạch vô cơ (ví dụ về thành phần: 2% glucoza, 0,1% amoni sulfat, 0,06% kali dihydro phosphat, 0,025% magie sulfat heptahydrat, 0,009% kẽm sulfat heptahydrat, 1,5% thạch, trong đó nồng độ % bất kỳ được biểu thị bằng % (khối lượng/thể tích)) và môi trường PDA, và nuôi cấy tĩnh ở nhiệt độ từ 10 đến 40°C, tốt hơn là từ 27 đến 30°C trong 7 đến 10 ngày để hình thành bào tử, và sau đó làm lơ lửng bào tử trong nước muối hoặc tương tự. Huyền phù bào tử có thể chứa sợi nấm hoặc không.

Bước B1: Điều chế sợi nấm

Huyền phù bào tử thu được ở bước A được cấy vào môi trường nuôi cấy và nuôi cấy để làm nảy mầm bào tử để thu được sợi nấm. Số lượng bào tử của nấm sợi được cấy vào môi trường nuôi cấy là từ 1×10^2 đến 1×10^8 bào tử/mL-môi trường nuôi cấy, tốt hơn là từ 1×10^2 đến 5×10^4 bào tử/mL-môi trường nuôi cấy, tốt hơn nữa là từ 5×10^2 đến 1×10^4 bào tử/mL-môi trường nuôi cấy, còn tốt hơn là nữa là từ 1×10^3 đến 1×10^4 bào tử/mL-môi trường nuôi cấy. Là giải pháp môi trường nuôi cấy, có thể sử dụng môi trường có sẵn trên thị trường, chẳng hạn như môi trường PDB, môi trường LB, môi trường NB, môi trường SB, và môi trường SD. Từ quan điểm về tỷ lệ nảy mầm và sự phát triển của sợi nấm, môi trường nuôi cấy có thể được bổ sung một cách thích hợp với nguồn cacbon bao gồm monosacarit như glucoza và xyloza, oligosacarit như sucroza, lactoza và maltoza, và polysacarit như tinh bột; các chất sinh học như glyxerin và axit xitric; nguồn nitơ như amoni sulfat, urê hoặc axit amin; và các chất vô cơ khác như natri, kali, magie, kẽm, sắt, và các loại muối khác nhau như phosphat. Nồng độ ưu tiên của monosacarit, oligosacarit, polysacarit và glyxerin từ 0,1 đến 30% (khối lượng/thể tích), nồng độ ưu tiên của axit xitric từ 0,01 đến 10% (khối lượng/thể tích), nồng độ ưu tiên của amoni sulfat, urê và axit amin từ 0,01 đến 1% (khối lượng/thể tích), và nồng độ ưu tiên của chất vô cơ từ 0,0001 đến 0,5% (khối lượng/thể tích). Trong môi trường nuôi cấy, huyền phù bào tử được cấy, và dung dịch thu được này được nuôi cấy tốt hơn là từ 24 đến 120 giờ, tốt hơn

nữa là từ 48 đến 72 giờ dưới sự kiểm soát nhiệt độ nuôi cấy từ 25 đến 42,5°C trong khi khuấy ở tốc độ tốt hơn là 80 đến 250 vòng/phút, tốt hơn nữa là từ 100 đến 170 vòng/phút. Lượng môi trường nuôi cấy được đưa ra để nuôi cấy có thể được điều chỉnh thích hợp theo đúng vật chứa dùng để nuôi cấy, và có thể từ 50 đến 100 mL khi vật chứa là bình có vách ngăn 200 mL, và từ 100 đến 300 mL khi vật chứa là bình có vách ngăn 500 mL. Việc nuôi cấy này cho phép được cấy bào tử để nảy mầm và phát triển thành sợi nấm.

Bước B2: Nhân giống sợi nấm

Từ quan điểm cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4, tốt hơn là thực hiện bước nuôi cấy thêm sợi nấm thu được ở bước B1 để nhân giống (Bước B2). Môi trường nuôi cấy để nhân giống được sử dụng ở bước B2 không có giới hạn cụ thể và có thể là môi trường nuôi cấy vô cơ thường được sử dụng chứa glucoza. Ví dụ về dung dịch này bao gồm môi trường nuôi cấy chứa từ 7,5 đến 30% glucoza, từ 0,05 đến 2% amoni sulfat, từ 0,03 đến 0,6% kali dihydro phosphat, từ 0,01 đến 0,1% magie sulfat heptahydrat, từ 0,005 đến 0,05% kẽm sulfat heptahydrat, và từ 3,75 đến 20% canxi cacbonat (nồng độ % bất kỳ ở đây được biểu thị bằng % (khối lượng/thể tích)). Lượng môi trường nuôi cấy được điều chỉnh thích hợp theo đúng vật chứa dùng để nuôi cấy, và ví dụ, có thể từ 50 đến 300 mL, tốt hơn là từ 100 đến 200 mL khi vật chứa là bình Erlenmeyer 500 mL. Tế bào nấm được nuôi cấy ở bước B1 được cấy vào môi trường nuôi cấy để

thu được từ 1 đến 6g tế bào nấm/100 mL môi trường nuôi cấy, tốt hơn là từ 3 đến 4g tế bào nấm/100 mL môi trường nuôi cấy theo trọng lượng ướt, và dung dịch thu được này được nuôi cấy tốt hơn là từ 12 đến 120 giờ, tốt hơn nữa là từ 24 đến 72 giờ dưới sự kiểm soát nhiệt độ nuôi cấy từ 25 đến 42,5°C trong khi khuấy ở tốc độ từ 100 đến 300 vòng/phút, tốt hơn là từ 170 đến 230 vòng/phút.

Bước C: Sản xuất axit dicarboxylic C4

Bằng cách nuôi cấy sợi nấm của nấm sợi thu được trong quy trình nêu trên (bước B1 hoặc B2), axit dicarboxylic C4 được tạo ra bởi nấm. Các điều kiện nuôi cấy có thể tuân theo các điều kiện nuôi cấy thông thường của nấm sợi được mô tả ở trên. Lượng môi trường có thể từ 20 đến 80 mL khi sử dụng bình Erlenmeyer 200 mL, khoảng từ 50 đến 200 mL khi sử dụng bình Erlenmeyer 500 mL, và từ 10 đến 15 L khi sử dụng bình lên men 30 L. Lượng môi trường có thể được điều chỉnh phù hợp với vật chứa dùng để nuôi cấy. Lượng tế bào nấm thu được ở bước B1 hoặc B2 được cấy vào môi trường tốt hơn là từ 5g đến 90g tế bào nấm/100 mL môi trường, tốt hơn nữa là từ 5g đến 50g tế bào nấm/100 mL môi trường theo trọng lượng ướt. Một cách thích hợp, tế bào được nuôi cấy trong thời gian từ 2 đến 240 giờ, tốt hơn là từ 12 đến 120 giờ trong điều kiện nhiệt độ từ 25 đến 45°C, đồng thời khuấy ở tốc độ từ 100 đến 300 vòng/phút, tốt hơn là từ 150 đến 230 vòng/phút. Khi sử dụng bình lên men, thực hiện sục khí

tốt hơn là từ 0,05 đến 2 thể tích khí/thể tích chất lỏng/phút (vvm), tốt hơn nữa là từ 0,1 đến 1,5 thể tích khí/thể tích chất lỏng/phút (vvm).

Tế bào biến nạp theo sáng chế được nuôi cấy theo quy trình được đề cập ở trên để tạo ra axit dicarboxylic C4. Sau khi nuôi cấy, axit dicarboxylic C4 được thu hồi từ môi trường nuôi cấy. Nếu cần, axit dicarboxylic C4 thu được có thể được tinh chế thêm. Các phương pháp thu hồi hoặc tinh chế axit dicarboxylic C4 từ môi trường nuôi cấy không có giới hạn cụ thể, và có thể được thực hiện theo đúng các phương pháp thu hồi hoặc tinh chế đã biết. Ví dụ, axit dicarboxylic C4 trong môi trường nuôi cấy có thể được thu hồi hoặc tinh chế bằng cách loại bỏ tế bào hoặc tương tự khỏi môi trường nuôi cấy bằng phương pháp gradien, lọc, ly tâm hoặc tương tự, cô đặc phần nuôi cấy còn lại theo yêu cầu, và sau đó chuyển dịch cô đặc sang phương pháp kết tinh, phương pháp trao đổi ion, phương pháp chiết xuất bằng dung môi, hoặc sự kết hợp của các phương pháp này.

Tế bào biến nạp theo sáng chế được tách ra khỏi môi trường nuôi cấy có thể được tái sử dụng để tạo ra axit dicarboxylic C4. Ví dụ, đối với tế bào biến nạp theo sáng chế được tách ra khỏi môi trường nuôi cấy, môi trường được mô tả ở trên được bổ sung mới, và sau đó môi trường tạo ra được nuôi cấy lại trong các điều kiện trên để tạo ra axit dicarboxylic C4. Do đó, axit dicarboxylic C4 có thể được thu hồi từ môi trường. Quá trình này có thể được lặp lại nhiều hơn.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, việc nuôi cấy tế bào biến nạp và thu hồi axit dicarboxylic C4 có thể được tiến hành theo một cách thức bất kỳ trong số các cách thức hàng loạt, bán hàng loạt, và liên tục.

4. Phương án làm ví dụ

Như các phương án làm ví dụ theo sáng chế, các chất, phương pháp sản xuất, cách sử dụng và các phương pháp được đề cập thêm ở đây như sau. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án này.

(1) Polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự này.

(2) Polypeptit theo điểm (1), trong đó tốt hơn là, trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 là trình tự axit amin có 90% trở lên, tốt hơn là 95% trở lên, tốt hơn nữa là 96% trở lên, tốt hơn nữa là 97% trở lên, tốt hơn nữa là 98% trở lên, tốt hơn nữa là 99% độ đồng nhất với trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2; hoặc

trình tự axit amin trong đó từ 1 đến 10, tốt hơn là từ 1 đến 8, tốt hơn nữa là từ 1 đến 5, còn tốt hơn là từ 1 đến 3 axit amin bị xóa bỏ, thay thế, bổ sung hoặc chèn vào trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2.

(3) Polypeptit theo điểm (1) hoặc (2), tốt hơn là có hoạt tính cacbonic anhydrazơ.

(4) Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (3), tốt hơn là, có chức năng cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào.

(5) Polypeptit theo điểm (4), cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào tốt hơn là 5% trở lên, tốt hơn nữa là 10% trở lên, còn tốt hơn nữa là 15% trở lên.

(6) Polynucleotit mã hóa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (5).

(7) Polynucleotit theo điểm (6), tốt hơn là bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự nucleotit có độ đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự này.

(8) Polynucleotit theo điểm (7), trong đó tốt hơn là, trình tự nucleotit có độ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 là trình tự nucleotit có 90% trở lên, tốt hơn là 95% trở lên, tốt hơn là 96% trở lên, tốt hơn nữa là 97% trở lên, tốt hơn nữa là 98% trở lên, còn tốt hơn nữa là 99% độ đồng nhất với trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1; hoặc

trình tự nucleotit trong đó từ 1 đến 30, tốt hơn là từ 1 đến 24, tốt hơn nữa là từ 1 đến 15, còn tốt hơn nữa là từ 1 đến 9 nucleotit bị xóa bỏ, thay thế, bổ sung hoặc chèn vào trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1.

(9) Polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (6) đến (8), tốt hơn là cADN hoặc ADN tổng hợp hóa học.

(10) Vector hoặc đoạn ADN bao gồm polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (6) đến (9).

(11) Vector hoặc đoạn ADN theo điểm (10), tốt hơn là bao gồm thêm vùng kiểm soát được liên kết chức năng với polynucleotit.

(12) Tế bào biến nạp bao gồm polynucleotit ngoại sinh theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (6) đến (9).

(13) Tế bào biến nạp tốt hơn là bao gồm polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (6) đến (9) hoặc vector hoặc đoạn ADN theo điểm (10).

(14) Tế bào biến nạp trong đó sự biểu hiện của polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (6) đến (9) được tăng cường.

(15) Tế bào biến nạp theo điểm bất kỳ trong số các điểm (12), (13) hoặc (14), tốt hơn là tế bào của vi sinh vật.

(16) Tế bào biến nạp theo điểm (15), trong đó vi sinh vật tốt hơn là nấm sợi.

(17) Tế bào biến nạp theo điểm (16), trong đó nấm sợi tốt hơn là *Rhizopus*.

(18) Tế bào biến nạp theo điểm (17), trong đó *Rhizopus* tốt hơn là *Rhizopus delemar* hoặc *Rhizopus oryzae*, tốt hơn nữa là *Rhizopus delemar*.

(19) Tế bào biến nạp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (12) đến (18), tốt hơn là đã cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4.

(20) Tế bào biến nạp theo điểm (19), đã cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 tốt hơn là 5% trở lên, tốt hơn nữa là 10% trở lên, còn tốt hơn nữa là 15% trở lên.

(21) Tế bào biến nạp theo điểm (19) hoặc (20), trong đó axit dicarboxylic C4 tốt hơn là axit fumaric, axit malic hoặc axit succinic, tốt hơn nữa là axit fumaric hoặc axit malic, còn tốt hơn nữa là axit fumaric.

(22) Phương pháp sản xuất axit dicarboxylic C4 bao gồm nuôi cấy tế bào biến nạp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (12) đến (21).

(23) Phương pháp theo điểm (22), bao gồm thêm quá trình thu hồi axit dicarboxylic C4 từ môi trường nuôi cấy.

(24) Phương pháp theo điểm (22) hoặc (23), trong đó axit dicarboxylic C4 là axit fumaric, axit malic hoặc axit succinic, tốt hơn nữa là axit fumaric hoặc axit malic, còn tốt hơn nữa là axit fumaric.

(25) Phương pháp sản xuất tế bào biến nạp bao gồm việc đưa polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (6) đến (9) vào tế bào chủ, hoặc tăng cường sự biểu hiện của polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (6) đến (9).

(26) Phương pháp cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào chủ, bao gồm việc đưa polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (6)

đến (9) vào tế bào chủ, hoặc tăng cường sự biểu hiện của polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (6) đến (9).

(27) Phương pháp theo điểm (26), trong đó năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào chủ được cải thiện tốt hơn là 5% trở lên, tốt hơn nữa là 10% trở lên, còn tốt hơn nữa là 15% trở lên.

(28) Phương pháp theo điểm (26) hoặc (27), trong đó axit dicarboxylic C4 tốt hơn là axit fumaric, axit malic hoặc axit succinic, tốt hơn nữa là axit fumaric hoặc axit malic, còn tốt hơn nữa là axit fumaric.

(29) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (25) đến (28), tốt hơn là bao gồm việc đưa vector hoặc đoạn ADN theo điểm (10) vào tế bào chủ.

(30) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (25) đến (29), trong đó tế bào chủ tốt hơn là tế bào của vi sinh vật.

(31) Phương pháp theo điểm (30), trong đó vi sinh vật tốt hơn là nấm sợi.

(32) Phương pháp theo điểm (31), trong đó nấm sợi tốt hơn là *Rhizopus*.

(33) Phương pháp theo điểm (32), trong đó *Rhizopus* tốt hơn là *Rhizopus delemar* hoặc *Rhizopus oryzae*, tốt hơn nữa là *Rhizopus delemar*.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa trên các ví dụ, tuy nhiên, sáng chế không bị hạn chế ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Tạo tế bào biến nạp

(1) Chiết bộ gen

Các bào tử của chủng *Rhizopus delemar* JCM 5557 (Bộ sưu tập các vi sinh vật//RIKEN của Nhật Bản) (sau đây, được gọi là chủng 5557) được cấy vào môi trường PDA, và được nuôi cấy ở 30°C trong 5 ngày. Sau khi nuôi cấy, các sợi nấm thu được này được đặt vào một ống đồng nhất 3 mL cùng với nón kim loại dùng cho ống 3 mL (Yasui Kikai Corporation), và sau đó được đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng 10 phút trở lên. Sau đó, các sợi nấm được đồng nhất trong 10 giây ở tốc độ 1700 vòng/phút bằng cách sử dụng máy nghiền bi dao động (Yasui Kikai Corporation). Sau khi đồng nhất, 400 µL đệm TE (độ pH 8,0) (NIPPON GENE CO., LTD.) được bổ sung vào vật chứa và được trộn đều bằng cách đảo ngược, và 250 µL hỗn hợp thu được này được chuyển vào ống 1,5 mL. Từ dung dịch sợi nấm thu được, quá trình chiết bộ gen được thực hiện bằng cách sử dụng "Dr. GenTLE (từ nấm men)" (Takara Bio Inc.) theo quy trình chuẩn (Protocol). Cho 50 µL dung dịch chứa bộ gen thu được, bổ sung 1 µL RNaza A (Roche, Ltd.), và phản ứng ở 37°C trong 1 giờ. Sau phản ứng, một lượng phenolchloroform bằng nhau được bổ sung và sau khi trộn bằng cách nhỏ từ từ vào, hỗn hợp thu được này được ly tâm ở 4°C trong 5 phút ở tốc độ 14.500 vòng/phút, và dịch nổi được chuyển sang ống 1,5 mL mới. Quá trình xử lý phenolchloroform được lặp lại một lần nữa và sau đó sản phẩm thu được này

được đưa vào để kết tủa trong etanol để thu được dung dịch chứa bộ gen tinh sạch của chủng 5557.

(2) Điều chế cADN

(i) Tách chiết ARN tổng số

Trong môi trường lỏng 40 mL (0,1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 g/L KH_2PO_4 , 0,25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,09 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 g/L canxi cacbonat, và 100 g/L glucoza), 6 g, theo trọng lượng ướt, của sợi nấm thuộc chủng 5557 được cấy, và nuôi cấy ở 35°C trong 8 giờ với tốc độ 170 vòng/phút. Môi trường nuôi cấy thu được này được lọc để thu hồi các sợi nấm từ dung dịch, và các sợi nấm được rửa hai lần bằng 100 mL nước muối 0,85%. Sau khi rửa, nước thừa được loại bỏ bằng cách lọc hút, và sau đó cân 0,3 g sợi nấm, đặt vào ống đồng nhất 3 mL cùng với nón kim loại 3 mL (Yasui Kikai Corporation), và sau đó ngay lập tức đặt vào trong nitơ lỏng để đông lạnh. Các sợi nấm đông lạnh thu được này được đồng nhất trong 10 giây ở tốc độ 1.700 vòng/phút bằng cách sử dụng máy nghiền bi dao động (Yasui Kikai Corporation). Đối với sợi nấm đã được đồng nhất, 500 μL đệm RLT được bổ sung vào và trộn đều bằng cách đảo ngược, sau đó 450 μL hỗn hợp thu được này được đưa vào kit RNeasy Plant Mini (Qiagen), và thực hiện chiết xuất ARN tổng số. Cho 40 μL dung dịch ARN thu được, 1 μL DNaza I (Takara Bio Inc.) và bổ sung vào 5 μL 10 $\times$ đệm DNaza I (USB Corporation). Hỗn hợp thu được này được làm đầy tới 50 μL với nước không

chứa RNaza và được phản ứng ở 37°C trong 30 phút trở lên để loại bỏ ADN còn sót lại trong dung dịch. Hơn nữa, 1 μ L DNaza I được bổ sung vào, hỗn hợp thu được này được phản ứng ở 37°C trong 30 phút, và đưa vào chiết phenol/cloroform sau đó kết tủa bằng ethanol. Chất kết tủa được hòa tan trong 50 μ L nước vô trùng, và nồng độ và độ tinh khiết của dung dịch ARN được xác định bằng cách sử dụng Qubit (Life Technologies). Hơn nữa, dung dịch ARN được pha loãng một cách thích hợp, và thử nghiệm ARN chiết xuất được thực hiện bằng cách sử dụng Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) và kit ARN6000 Pico (Agilent Technologies). Dung dịch ARN thu được này được xác nhận là có chỉ số phân hủy ARN, "số nguyên vẹn ARN (RIN)" là 6,0 trở lên, và dung dịch ARN thu được này được gọi là ARN tổng số.

(ii) Tổng hợp cADN

Tổng hợp cADN được thực hiện bằng cách sử dụng SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix cho qRT-PCR (Invitrogen). Cụ thể là, 1 μ g dung dịch ARN thu được trong (i) được làm đầy đến 8 μ L với nước DEPC, sau đó, 10 μ L 2 $\times$ hỗn hợp phản ứng RT và 2 μ L hỗn hợp enzym RT được bổ sung vào dung dịch và trộn đều nhẹ nhàng, sau đó hỗn hợp thu được này được phản ứng ở 25°C trong 10 phút, ở 50°C trong 30 phút, và ở 85°C trong 5 phút. Sau phản ứng, 1 μ L RNaza H được bổ sung vào dung dịch, hỗn hợp thu được này được phản ứng ở 37°C trong 20 phút, và phần thu được được sử dụng làm dung dịch cADN.

(3) Chuẩn bị vectơ plasmit

(i) Đưa vùng gen trpC vào pUC18

Sử dụng ADN bộ gen của chủng 5557 thu được trong (1) ở trên làm khuôn, một đoạn ADN chứa gen trpC (SEQ ID NO: 3) được tổng hợp bằng PCR sử dụng đoạn mồi oJK162 (SEQ ID NO: 4) và oJK163 (SEQ ID NO: 5). Sau đó, bằng cách sử dụng plasmit pUC18 làm khuôn, đoạn ADN được khuếch đại bằng PCR sử dụng đoạn mồi oJK164 (SEQ ID NO: 6) và oJK165 (SEQ ID NO: 7). Hai đoạn trên được gắn với nhau bằng cách sử dụng kit In-Fusion HD Cloning (Clontech Laboratories, Inc.) để tạo ra plasmit pUC18-trpC.

(ii) Nhân bản trình tự khởi đầu và trình tự kết thúc ADH1

Sử dụng ADN bộ gen của chủng 5557 thu được trong (1) ở trên làm khuôn, một đoạn ADN chứa trình tự khởi đầu ADH1 (SEQ ID NO: 8) và một đoạn ADN chứa trình tự kết thúc ADH1 (SEQ ID NO: 9) mỗi đoạn được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp mồi oJK202 (SEQ ID NO: 10) và oJK204 (SEQ ID NO: 11), và cặp mồi oJK205 (SEQ ID NO: 12) và oJK216 (SEQ ID NO: 13) tương ứng. Tiếp theo, bằng cách sử dụng plasmit pUC18-trpC thu được trong (i) làm khuôn, một đoạn ADN được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp mồi oJK210 (SEQ ID NO: 14) và oJK211 (SEQ ID NO: 15). Ba đoạn ở trên được gắn với nhau theo quy trình tương tự như trong (i) để tạo thành plasmit pUC18-trpC-Padh-Tadh. Trong plasmit thu được, trình tự khởi đầu và trình tự kết thúc ADH1

được sắp xếp xuôi chiều của vùng gen trpC theo thứ tự này. Hơn nữa, ở phần xuôi chiều của trình tự kết thúc ADH1, một trình tự nhận dạng enzym giới hạn Not I được sắp xếp.

(iii) Chuẩn bị vectơ plasmit

Một plasmit chứa gen được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 (sau đây, được gọi là RdCA1S) được tổng hợp bằng cách tổng hợp gen nhân tạo, và được khuếch đại bằng PCR sử dụng các đoạn mồi NK-035 (SEQ ID NO: 16) và NK-036 (SEQ ID NO: 17). Tiếp theo, sử dụng plasmit pUC18-trpC-Padh-Tadh thu được trong (ii) làm khuôn, một đoạn ADN được khuếch đại bằng PCR sử dụng các đoạn mồi NK-011 (SEQ ID NO: 18) và NK-012 (SEQ ID NO: 19). Hai đoạn nêu trên được gắn với nhau theo quy trình tương tự như trong (i) để tạo ra plasmit pUC18-trpC-Padh-RdCA1S-Tadh. Trong plasmit thu được, gen RdCA1S được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 được chèn vào giữa trình tự khởi đầu và trình tự kết thúc ADH. Hơn nữa, một plasmit chứa gen được biểu thị bởi SEQ ID NO: 22 (sau đây được gọi là RdCA1L) được tổng hợp bằng cách tổng hợp gen nhân tạo, và được khuếch đại bằng PCR sử dụng các đoạn mồi Padh-RdCAfull F (SEQ ID NO: 24) và RdCA-Tadh R2 (SEQ ID NO: 25). Tiếp theo, sử dụng plasmit pUC18-trpC-Padh-Tadh thu được trong (ii) làm khuôn, đoạn ADN được khuếch đại bằng PCR sử dụng các đoạn mồi RdPADH R (SEQ ID NO: 26) và RdTADH F (SEQ ID NO: 27). Hai đoạn trên được gắn với nhau

theo quy trình tương tự như trong (i) để tạo ra plasmit pUC18-trpC-Padh-RdCA1L-Tadh.

Các đoạn môi PCR được sử dụng để chuẩn bị vectơ plasmit pUC18-trpC-Padh-RdCA1S-Tadh và pUC18-trpC-Padh-RdCA1L-Tadh được thể hiện trong

Bảng 1.

Bảng 1

Đoạn môi	Trình tự (5'→3')	SEQ ID NO:
oJK162	cgagctcgaattatttaaataaacagcaagttaataatctagaggg	4
oJK163	tatgacatgattacgatgagaggcaaaatgaagcgtac	5
oJK164	atttaaataattcgagctcggtagccgggg	6
oJK165	cgtaatcatggtagctg	7
oJK202	tagagggaagagagaattgaaatagg	10
oJK204	tttggtatttaattgtattaattgataatg	11
oJK205	aattaaataacaaaatcatttaattacgcatttc	12
oJK216	catgattacgcggccgcgcattataatgcactagt	13
oJK210	ctcttttccctctaataagagaggcaaaatgaagcgtac	14
oJK211	aattaaataacaaaatgtcttctatcgaaacctccaaaatctc	15
NK-035	aattaaataacaaaatgggtgtcttctctatccg	16
NK-036	gcgtaattaaaatgattataaagggtgacaagc	17
NK-011	tttggtatttaattgtattaattg	18
NK-012	tcatttaattacgcatttc	19
RdPADH R	tttggtatttaattgtattaattg	24
RdTADH F	tcatttaattacgcatttcatttac	25
Padh-RdCAfull F	aattaaataacaaaatgatgaccaagaactggatg	26
RdCA-Tadh R2	gcgtaattaaaatgattataaagggtgacaagcataaataag	27

(4) Đưa gen vào tế bào chủ

(i) Chuẩn bị chủng dinh dưỡng thụ động tryptophan

Chủng dinh dưỡng thụ động tryptophan được sử dụng làm tế bào chủ của quá trình chuyển gen đã được lựa chọn và thu nhận từ các chủng đột biến thu được bằng cách chiếu xạ chùm ion vào chủng 5557. Chiếu xạ chùm ion được thực hiện tại cơ sở chiếu xạ ion của Viện nghiên cứu bức xạ tiên tiến Takasaki (TIARA: Takasaki Ion Accelerators for Advanced Radiation Application), thuộc Viện Khoa học và Công nghệ Lượng tử và Phóng xạ Quốc gia. Quá trình chiếu xạ được thực hiện bằng cách tăng tốc $^{12}\text{C}^{5+}$ sử dụng AVF cyclotron, và chiếu xạ 100 đến 1250 Gray với năng lượng 220 MeV. Các bào tử được thu hồi từ các sợi nấm được chiếu xạ, và trong số đó, đã thu được chủng *Rhizopus delemar* 02T6 có biểu hiện dinh dưỡng thụ động tryptophan (sau đây được gọi là chủng 02T6). Chủng 02T6 có trình tự nucleotit trong đó nucleotit thứ 2093 bị xóa bỏ trong vùng mã hóa gen *trpC* (SEQ ID NO: 3) có chiều dài đầy đủ là 2298 bp.

(ii) Khuếch đại vector plasmit

Sử dụng các vector plasmit pUC18-*trpC*-*Padh*-*Tadh*, pUC18-*trpC*-*Padh*-*RdCA1S*-*Tadh* và pUC18-*trpC*-*Padh*-*RdCA1L*-*Tadh* được chuẩn bị trong (3) ở trên, chủng *E. coli* DH5 α (NIPPON GENE CO., LTD.) được biến nạp bằng phương pháp biến nạp tế bào khả biến. Tế bào biến nạp thu được này được để ở 37°C qua đêm, và khuẩn lạc thu được này được cấy vào 2 mL môi trường lỏng

LBamp (Bacto Trypton 1%, chiết xuất nấm men 0,5%, NaCl 1%, ampicillin natri 50 µg/mL) và được nuôi cấy ở 37°C qua đêm. Từ môi trường nuôi cấy thu được, mỗi vectơ plasmit được tinh chế bằng cách sử dụng kit High Pure Plasmid Isolation (Roche Life Science).

(iii) Đưa vectơ plasmit vào tế bào chủ

Mỗi 10µL dung dịch ADN (1 µg/µL) chứa vectơ plasmit pUC18-trpC-Padh-Tadh, pUC18-trpC-Padh-RdCA1S-Tadh và pUC18-trpC-Padh-RdCA1L-Tadh thu được trong (ii) được bổ sung vào 100 µL dung dịch chứa hạt vàng (60 mg/mL) và trộn, sau đó bổ sung 40 µL spermidin 0,1 M, và hỗn hợp thu được này được khuấy đều bằng dòng xoáy. Thêm nữa, 100 µL CaCl₂ 2,5 M được bổ sung vào, hỗn hợp thu được này được khuấy đều bằng dòng xoáy trong 1 phút và ly tâm trong 30 giây ở tốc độ 6000 vòng/phút, và dịch nổi được loại bỏ. Để kết tủa thu được, 200 µL EtOH 70% được bổ sung vào, hỗn hợp thu được được khuấy đều bằng dòng xoáy trong 30 giây và ly tâm trong 30 giây ở tốc độ 6000 vòng/phút, và dịch nổi được loại bỏ. Phần kết tủa thu được được tái huyền phù trong 100 µL EtOH 100%.

Tiếp theo, đối với các bào tử của chủng 02T6 được chuẩn bị trong (i), gen được đưa vào bởi GDS-80 (Nepa Gene Co., Ltd.) bằng cách sử dụng dung dịch chứa hạt vàng ADN được mô tả ở trên. Các bào tử có gen được đưa vào được nuôi cấy tĩnh trong môi trường thạch vô cơ (20 g/L glucoza, 1 g/L amoni sulfat,

0,6 g/L kali dihydro-phosphat, 0,25 g/L magie sulfat·heptahydrat, 0,09 g/L kẽm sulfat·heptahydrat, 15 g/L thạch) ở 30°C trong khoảng một tuần. Một phần của sợi nấm đã phát triển được loại ra bằng que cấy đầu tròn, và lơ lửng trong TE (độ pH 8,0) (NIPPON GENE CO., LTD.). Huyền phù thu được được xử lý ở 95°C trong 15 phút và các axit nucleic được chiết xuất từ các chủng biến nạp. Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng axit nucleic thu được làm khuôn và các đoạn mồi oJK438 (SEQ ID NO: 20) và oJK439 (SEQ ID NO: 21), và chủng trong đó việc đưa vào đoạn ADN quan tâm đã được xác nhận được lựa chọn làm chủng biến nạp. Các đoạn mồi PCR được sử dụng được liệt kê trong Bảng 2. Chủng thu được trong đó pUC18-trpC-Padh-RdCA1S-Tadh chứa ADN trong đó gen RdCA1S được gắn xuôi chiều trình tự khởi đầu ADH1 được đưa vào được chỉ định là chủng CA1S, và chủng thu được trong đó pUC18-trpC-Padh-RdCA1L-Tadh chứa ADN trong đó gen RdCA1L được gắn được đưa vào được chỉ định là chủng CA1L. Trong khi đó, chủng thu được trong đó vector plasmit pUC18-trpC-Padh-Tadh chứa ADN trong đó gen RdCA1 chưa được chèn được đưa vào sử dụng làm chủng đối chứng âm (sau đây được gọi là chủng NC). Các sợi nấm còn lại được loại ra bằng que cấy đầu tròn, và được trộn mạnh trong dung dịch thu hồi bào tử (8,5 g/L natri clorua, 0,5 g/L polyoxyetylen sorbitan monooleat). Hỗn hợp huyền phù bào tử được lọc bằng thiết bị lọc thủy tinh loại phễu hình trụ 3GP100 (SIBATA SCIENTIFIC TECHNOLOGY Ltd.)

để thu được dung dịch bào tử. Số lượng bào tử trong dung dịch bào tử thu được được đo bằng máy đếm tế bào tự động TC20 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Bảng 2

Đoạn môi	Trình tự (5'→3')	SEQ ID NO:
oJK438	gttccttgctgtggatttg	20
oJK439	gggtgtatctctgtcctattcatg	21

Ví dụ 2: Đo hoạt tính cacbonic anhydrase nội bào của chủng CA1S

(1) Nuôi cấy chủng

(i) Chuẩn bị sợi nấm

Cho vào bình Erlenmeyer có vách ngăn 500 mL (AGC Inc.), 200 mL môi trường SD/-Trp (Clontech Laboratories, Inc.) với nồng độ cuối của sorbitan monolaurat đạt 0,5% (thể tích/thể tích) (Rheodol SP-L10 (Kao Corporation)) và cung cấp môi trường PDB (Becton, Dickinson and Company), và mỗi dung dịch bào tử của chủng CA1S và chủng 5557 được chuẩn bị trong ví dụ 1 được cấy vào môi trường với tỷ lệ 1×10^3 bào tử/mL-môi trường, và môi trường thu được được nuôi cấy trong điều kiện khuấy ở 170 vòng/phút ở 27°C trong 3 ngày. Môi trường nuôi cấy thu được được lọc bằng lưới thép không gỉ được khử trùng trước có cỡ lỗ 250 μ m (AS ONE Corporation), và sợi nấm được thu hồi trên lưới lọc.

(ii) Sự nhân giống của sợi nấm

Cho 100 mL dung dịch nuôi cấy vô cơ (0,1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 g/L KH_2PO_4 , 0,25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,09 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 g/L canxi cacbonat, và 100 g/L glucoza) vào trong bình Erlenmeyer 500 mL, cấy 5,0 đến 8,0 g sợi nấm ươm được thu hồi trong (i) và dung dịch thu được được nuôi cấy trong điều kiện khuấy ở 220 vòng/phút ở 27°C trong khoảng 40 giờ. Môi trường nuôi cấy thu được này được lọc bằng giá bộ lọc lưới thép không gỉ đã khử trùng trước (MILLIPORE) để thu hồi sợi nấm trên lưới lọc. Các sợi nấm được rửa sạch thêm trên giá bộ lọc bằng 200 mL nước muối. Nước muối được sử dụng để rửa được loại bỏ bằng cách lọc hút.

(2) Chuẩn bị dịch đồng thể sợi nấm

Cho 40 mL môi trường nuôi cấy vô cơ (0,0175 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,06 g/L KH_2PO_4 , 0,375 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,135 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 g/L canxi cacbonat, 100 g/L glucoza) vào trong bình Erlenmeyer có thể tích 200 mL, cấy 6,0 g sợi nấm ươm của mỗi chủng CA1S và chủng 5557 thu được trong (1) ở trên, và dung dịch thu được được nuôi cấy trong điều kiện khuấy ở 170 vòng/phút ở 35°C trong 24 giờ. Môi trường nuôi cấy thu được này được lọc bằng giá bộ lọc màn chắn thép không gỉ được khử trùng trước (MILLIPORE) để thu hồi sợi nấm trên bộ lọc. Hơn nữa, sợi nấm được rửa sạch trên giá bộ lọc bằng 200mL nước muối, và được lọc hút để loại bỏ nước muối. Các sợi nấm được đông lạnh ở -80°C trong mỗi 0,3 g. Các sợi nấm đông lạnh được đồng nhất bằng cách sử dụng

máy nghiền bi dao động và nón kim loại (Yasui Kikai Corporation). Để thu được kết quả, bổ sung 1 ml đệm Tris-HCl 50mM (độ pH 8,0), và các sợi nấm được đồng nhất một lần nữa và được ly tâm ở 4°C trong 5 phút với tốc độ 15000 vòng/phút, và sau đó dịch nổi thu được này được cô đặc và rửa bằng cách sử dụng AmiconUltra-0,5 (3 kDa) để thu được dịch đồng thể sợi nấm.

(3) Đo hoạt tính cacbonic anhydraza

Cho vào đĩa xét nghiệm 96 giếng (IWAKI CO., LTD.) 10 μ L dịch đồng thể sợi nấm của chủng CA1S và chủng 5557 thu được trong (2) ở trên, bổ sung 120 μ L dung dịch phản ứng (nồng độ cuối cùng 50 mM của Tris-HCl độ pH 8,0, bổ sung 50 mM Na_2SO_4 , 0,004% phenol màu đỏ), và sau đó bổ sung 70 μ L nước bão hòa CO_2 thu được bằng cách ngâm nước đá khô vào nước trong 30 phút để bắt đầu phản ứng. Bằng cách sử dụng thời gian cho đến khi độ hấp thụ ở 557 nm ở 30°C trở nên thấp hơn 0,35 theo tiêu chuẩn, giá trị hoạt độ (U/g trọng lượng ướt của sợi nấm) được tính theo đúng tài liệu (C.S. Gai et al., AMB Express 2014, 4, 2-13.). Kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 3. So với hoạt tính cacbonic anhydraza của chủng 5557 là chủng kiểu đại, hoạt tính cacbonic anhydraza của chủng CA1S đã được cải thiện gấp 22 lần.

Bảng 3

Khuôn	Hoạt tính cacbonic anhydrase (U/g trọng lượng ướt của sợi nấm)	So sánh tương đối
Chủng 5557	5,1	1
Chủng CA1S	112	22

Ví dụ 3: Năng suất axit dicarboxylic C4 của chủng CA1S và chủng CA1L

(1) Nuôi cấy chủng

(i) Chuẩn bị sợi nấm

Cho vào bình Erlenmeyer có vách ngăn 500 mL (AGC Inc.), 200 mL môi trường SD/-Trp (Clontech Laboratories, Inc.) với nồng độ cuối của sorbitan monolaurat đạt 0,5% (thể tích/thể tích) (Rheodol SP-L10 (Kao Corporation)) được cung cấp, và mỗi dung dịch bào tử của chủng CA1S, chủng CA1L và chủng NC được chuẩn bị trong ví dụ 1 được cấy vào môi trường với tỷ lệ 1×10^3 bào tử/mL môi trường, và dung dịch thu được này được nuôi cấy trong điều kiện khuấy ở 170 vòng/phút ở 27°C trong 3 ngày. Môi trường nuôi cấy thu được được lọc bằng lưới thép không gỉ được khử trùng trước có cỡ lỗ 250 μm (AS ONE Corporation), và sợi nấm được thu hồi trên bộ lọc.

Cho vào bình Erlenmeyer có vách ngăn 500 mL (AGC Inc.), 200 mL môi trường SD/-Trp (Clontech Laboratories, Inc.) với nồng độ cuối của sorbitan monolaurat đạt 0,5% (thể tích/thể tích) (Rheodol SP-L10 (Kao Corporation))

được cung cấp, và mỗi dung dịch bào tử của chủng CA1 và chủng NC được chuẩn bị trong ví dụ 1 được cấy vào môi trường với tỷ lệ 1×10^3 bào tử/mL môi trường, và dung dịch thu được này được nuôi cấy trong điều kiện khuấy ở 170 vòng/phút ở 27°C trong ba ngày. Môi trường nuôi cấy thu được được lọc bằng lưới thép không gỉ được khử trùng trước có cỡ lỗ 250 μm (AS ONE Corporation), và sợi nấm được thu hồi trên bộ lọc.

(ii) Sự nhân giống của sợi nấm

Sợi nấm được nhân giống trong các điều kiện tương tự như trong ví dụ 2(1)(ii).

(2) Đánh giá năng suất axit dicarboxylic C4 của các chủng biến nạp

Cho 40 mL dung môi trường nuôi cấy vô cơ (0,0175 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,06g/L KH_2PO_4 , 0,375 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,135 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 g/L canxi cacbonat, 100 g/L glucoza) vào trong bình Erlenmeyer 200 mL, cấy 6,0 g sợi nấm ươm của mỗi chủng CA1S, chủng CA1L và chủng NC thu được trong (1) ở trên, và dung dịch thu được được nuôi cấy trong điều kiện khuấy ở 170 vòng/phút ở 35°C. Sau khi nuôi cấy trong 8 giờ, dịch nổi nuôi cấy không có sợi nấm được thu hồi, và được định lượng axit dicarboxylic C4 (axit fumaric, axit malic) bằng cách sử dụng quy trình được mô tả trong ví dụ tham khảo 1 bên dưới. Dựa trên lượng định lượng của mỗi axit dicarboxylic C4, tỷ lệ cải thiện

năng suất của từng axit dicarboxylic C4 của chủng CA1S và chủng CA1L được tính theo phương trình sau đây.

Tỷ lệ cải thiện (%)

= (tốc độ sản xuất của chủng CA1S và chủng CA1L /

tốc độ sản xuất của chủng NC và chủng 5557) $\times$ 100 - 100

Các kết quả được thể hiện trong bảng 5. So với chủng NC mà gen RdCA1 không được đưa vào, thấy rằng chủng CA1S đã cải thiện năng suất axit malic 18% và axit fumaric 28%. Mặt khác, không quan sát thấy sự cải thiện năng suất axit fumaric ở chủng CA1L so với chủng 5557.

Bảng 4

Tốc độ sản xuất axit dicarboxylic C4 ở 8-giờ (g/L/giờ)

Tên chủng	Axit malic	Axit fumaric
Chủng CA1S	0,13	1,92
Chủng NC	0,11	1,50

Tốc độ sản xuất axit dicarboxylic C4 ở 19-giờ (g/L/giờ)

Tên chủng	Axit malic	Axit fumaric
Chủng CA1L	0,24	0,93
Chủng 5557	0,07	1,26

Bảng 5

Tỷ lệ cải thiện năng suất (%)

Tên chủng	Axit malic	Axit fumaric
Chủng CA1S	18	28
Chủng CA1L	343	-26

Ví dụ tham khảo 1: Định lượng axit dicarboxylic C4

Định lượng axit dicarboxylic C4 (axit fumaric, axit malic và axit succinic) trong dịch nổi nuôi cấy được thực hiện bởi HPLC.

Dịch nổi nuôi cấy được đưa ra phân tích HPLC được pha loãng một cách thích hợp bằng cách sử dụng axit sulfuric 37 mM, và các chất không hòa tan được loại bỏ bằng cách sử dụng DISMIC-13cp (màng xeluloza axetat 0,20 μ m, ADVANTEC) hoặc tấm lọc AcroPrep 96 (màng GHP 0,2 μ m, Pall Corporation).

LaChrom Elite đã được sử dụng là thiết bị cho HPLC (Hitachi High-Technologies Corporation). Cột polyme là cột phân tích để phân tích axit hữu cơ ICsep ICE-ION-300 (7,8 mm I.D. $\times$ 30 cm, TRANSGENOMIC) được kết nối với ICsep ICE-ION-300 Guard Column Cartridge (4,0 mm I.D. $\times$ 2,0 cm, TRANSGENOMIC) được sử dụng. Quá trình rửa giải được tiến hành bằng cách sử dụng axit sulfuric 10 mM làm chất rửa giải trong điều kiện tốc độ dòng chảy 0,5 mL/phút và nhiệt độ cột 50°C. Mỗi axit dicarboxylic C4 được phát hiện bằng cách sử dụng máy dò UV (bước sóng phát hiện 210 nm). Các đường chuẩn

nồng độ được chuẩn bị bằng cách sử dụng các mẫu chuẩn [axit fumaric (mã nhà cung cấp: 063-00655, Wako pure chemical industries), axit malic (mã nhà cung cấp: 135-00562, Wako pure chemical industries) và axit succinic (mã nhà cung cấp 194-04335, Wako pure chemical industries)]. Dựa trên đường chuẩn nồng độ tương ứng, việc định lượng từng thành phần được thực hiện.

Giá trị thu được bằng cách lấy lượng axit dicarboxylic C4 ban đầu trong môi trường trừ đi lượng axit dicarboxylic C4 trong môi trường được sử dụng để định lượng được xác định là lượng sản xuất axit dicarboxylic C4. Các giá trị thu được bằng cách chia lượng của mỗi axit dicarboxylic C4 ở 8 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy cho thời gian nuôi cấy được sử dụng làm tốc độ sản xuất của mỗi axit dicarboxylic C4 của tế bào để tính.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tế bào biến nạp bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit, trình tự axit amin của polypeptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự này và có hoạt tính cacbonic anhydraz, trong đó polynucleotit là ngoại sinh của tế bào.
2. Tế bào biến nạp theo điểm 1, trong đó tế bào này đã cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4.
3. Tế bào biến nạp theo điểm 2, trong đó tế bào này đã cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 từ 5% trở lên.
4. Tế bào biến nạp theo điểm 2, trong đó axit dicarboxylic C4 là axit fumaric, axit malic hoặc axit succinic.
5. Tế bào biến nạp trong đó sự biểu hiện của polynucleotit được tăng cường, trong đó polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự này và có hoạt tính cacbonic anhydraz.
6. Tế bào biến nạp theo điểm 5, trong đó tế bào này đã cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4.
7. Tế bào biến nạp theo điểm 5, trong đó tế bào này đã cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 từ 5% trở lên.

8. Tế bào biến nạp theo điểm 5, trong đó axit dicarboxylic C4 là axit fumaric, axit malic hoặc axit succinic.
9. Phương pháp sản xuất axit dicarboxylic C4 bao gồm nuôi cấy tế bào biến nạp theo điểm 1.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó phương pháp này còn bao gồm thu hồi axit dicarboxylic C4 từ môi trường nuôi cấy.
11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó axit dicarboxylic C4 là axit fumaric, axit malic hoặc axit succinic.
12. Phương pháp cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào chủ bao gồm đưa vào tế bào chủ một polynucleotit mã hóa polypeptit, trình tự axit amin của polypeptit này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự này và có hoạt tính cacbonic anhydraza,
- hoặc tăng cường sự biểu hiện của polynucleotit trong tế bào chủ.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào chủ được cải thiện từ 5% trở lên.
14. Phương pháp theo điểm 12, trong đó axit dicarboxylic C4 là axit fumaric, axit malic hoặc axit succinic.
15. Phương pháp sản xuất axit dicarboxylic C4 bao gồm nuôi cấy tế bào biến nạp theo điểm 5.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó phương pháp này còn bao gồm thu hồi axit dicarboxylic C4 từ môi trường nuôi cấy.

17. Phương pháp theo điểm 15, trong đó axit dicarboxylic C4 là axit fumaric, axit malic hoặc axit succinic.

18. Phương pháp cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào chủ bao gồm tăng cường sự biểu hiện của polynucleotit, trong đó polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự này và có hoạt tính cacbonic anhydrazơ.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào chủ được cải thiện từ 5% trở lên.

20. Phương pháp theo điểm 18, trong đó axit dicarboxylic C4 là axit fumaric, axit malic hoặc axit succinic.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> KAO CORPORATION

<120> Tế bào biến nạp, phương pháp sản xuất axit dicarboxylic C4 và phương pháp cải thiện năng suất axit dicarboxylic C4 trong tế bào chủ

<130> KS1492

<150> JP 2016-129167

<151> 2016-06-29

<160> 27

<170> sáng chế phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 678

<212> ADN

<213> *Rhizopus delemar*

<400> 1

atggtgtctt ctcctatccg aatcaataag ttgatccca aagatgaaa acttgatagt	60
ttattaaaga gtaacgctga atggtccaag gccgtgacag aagctgaccc caactttttc	120
aaaaagctgg ctcagattca agaaccgaag atcttggtgg ttggctgtgc tgattctcgt	180
gtgcctgcta atcaactggg tcaattggca ccgggtgaag tctttgttca cagaaatattc	240
gcgaatgtcg tctgtcactc tgatttgaat tgcctttctg tcttacaata tgcggtagat	300
gtgctcaagg tagagcacgt gattgtctgc ggtcactcca actgtggtgg tgtggcagct	360
gcgatgggca gtggtcaata tgggtctgatt gataattggc ttaggaacat caaggatgtc	420

tatagatttt atgaaaagga actggatgaa atcaaggatt caaaggaacg tctgagtcga 480
 ctgatcgaat ttaacgcgat acactctgct caaatgtat gccgttcgac gattgttcag 540
 aacgcatggc atcgtggaca gaaattgaca gtacacgcat gggtttatga cttggaaaat 600
 ggattggtaa agagattgga attcagccat aaagatcctg ctaaacttcc atctatttat 660
 gcttgtaac ctttataa 678

<210> 2

<211> 225

<212> PRT

<213> *Rhizopus delemar*

<400> 2

Met Val Ser Ser Pro Ile Arg Ile Asn Lys Phe Asp Pro Lys Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Leu Asp Ser Leu Leu Lys Ser Asn Ala Glu Trp Ser Lys Ala Val
 20 25 30
 Thr Glu Ala Asp Pro Asn Phe Phe Lys Lys Leu Ala Gln Ile Gln Glu
 35 40 45
 Pro Lys Ile Leu Trp Val Gly Cys Ala Asp Ser Arg Val Pro Ala Asn
 50 55 60
 Gln Leu Val Gln Leu Ala Pro Gly Glu Val Phe Val His Arg Asn Ile
 65 70 75 80
 Ala Asn Val Val Cys His Ser Asp Leu Asn Cys Leu Ser Val Leu Gln
 85 90 95
 Tyr Ala Val Asp Val Leu Lys Val Glu His Val Ile Val Cys Gly His
 100 105 110
 Ser Asn Cys Gly Gly Val Ala Ala Ala Met Gly Ser Gly Gln Tyr Gly
 115 120 125

Leu Ile Asp Asn Trp Leu Arg Asn Ile Lys Asp Val Tyr Arg Phe Tyr

130

135

140

Glu Lys Glu Leu Asp Glu Ile Lys Asp Ser Lys Glu Arg Leu Ser Arg

145

150

155

160

Leu Ile Glu Phe Asn Ala Ile His Ser Ala Gln Asn Val Cys Arg Ser

165

170

175

Thr Ile Val Gln Asn Ala Trp His Arg Gly Gln Lys Leu Thr Val His

180

185

190

Ala Trp Val Tyr Asp Leu Glu Asn Gly Leu Val Lys Arg Leu Glu Phe

195

200

205

Ser His Lys Asp Pro Ala Lys Leu Pro Ser Ile Tyr Ala Cys Gln Pro

210

215

220

Leu

225

<210> 3

<211> 2298

<212> ADN

<213> *Rhizopus delemar*

<400> 3

atgaccactt tacttattga caactacgac agttttactt ataatgtcta tcaatacttg 60

agctgccaa ggcgcaatgt agttgtctac agaaacgaca aaatcaccat ttccgaaatt 120

gagcaattgg ctctcgcaa tattgtcatc tcacctggcc ctggccaccc ttccaccgat 180

gccggtgtct ctcgagaggc cattcgagct ttgacaggaa agattcccat cttgggtatt 240

tgtatgggtc agcaatgtat gtatgaagtg tacggtggta aagtgtcata tgcaggtgat 300

attgtgcatg gcaaggcatc cagcatcaag catgacagtc gaggtatctt caagggcggtt 360

cctcaaaaca acatggtcac tcgttaccat tcccttgctg gcatgccttc tactttacct	420
gaaacattag aagtcactgc gactaccgac gatggtatca tcatgggcat tcgacacaag	480
gaatacactg tcgaaggtgt tcagttccat cctgaaagta tcctttgtga acacggacat	540
acgatgatca acaacttctt aagcttgctg ggtggcacct gggaagagaa tcctgcagcc	600
ggtgttgtct ttaagaaagc tcgttccgaa acacccaaaa tcagtgctag tgaatcccaa	660
ctcgatctct ctcagcaaca acctgccgca gcaccttcca tcttgaccg catttactct	720
caacgactca aggatgttca ggcagccaag gagattcccg gccagacatt tgaagattta	780
gaaaaacttt taaagttgca cgtcgcccca cctcttcaag acgtcgtcgc tcgctgctgc	840
caaagcaagc ccgccttgat ggccgaagtc aagcgtgcct ctccctcgaa aggaaacatt	900
gatgtttcgg ccaacgcggc tgagcaggca cttcaatatg ctttagcagg tgcaagcgtc	960
gtctctgttc tgactgaacc caaatggttc cgcggtacga ttcattgatat gcatcaggtc	1020
cgagaggcct tgagccatct gcccaaccgt ccttggtgtg tgagaaagga ttttattgtc	1080
gatcgctatc aaatcttgga aggttgctg tacggtgctg atactatctt gttgatcgtg	1140
gccatgctga atgatgaaca actgcacgaa ttgtatcact atgcgaaatc attaggtatg	1200
gaacccttgg tcgaagtcaa taatacggaa gagatggccc gtgccaatgc tttgggcgca	1260

cgtctggtgg gtgttaataa tcgcaacttg cacagctttg atgttgatat ggaaaccacg	1320
agtcgattgg tagagatggg gcctgaagga acgatcttgt gtgcactttc tggattact	1380
ggacgagctg atgttgaaat gtacgtcaaa caggggtgtgc acgctgtctt ggtgggtgaa	1440
gccctgatgc gtgcttggaa tttgaaggag tttgtgtctg atttgttggg tcatgaaaag	1500
aaggatcctg tgcctgtgtc caaggaatca aaatcttcac tagtcaaggt atgtggtatc	1560
tctagtgtgg atgcagcagt tgaagcagcc aagtcagggg ctgacttgat tggctttatc	1620
tttgctgaaa agtccaaacg aaaagtgtct ttggaaagag ctcaagaaat cgtgtcctca	1680
gtgcgtgcgt tggatattca agtcaaacga acgttatcaa atgatgattc tcaactggat	1740
tggttccaga tgcacaagcg tctcttggaa aagcgagcaa gaaaaccttt ggtagtggc	1800
gtgtttgtga atcaatcgat tgaatacatg actgaggtgg caacgacagt cggactggac	1860
cttattcagc tgcattgaac cgaatcaacg gagcttgcac gctatttacc cgtgcctgtc	1920
atcaaagctt tccatattga cagtgggtgag ttcaatgaag ctcatatacc aaacctaaat	1980
caaccaggct cttatcatta tgtcttactg gacgctaaag tgcccagctt accatcggat	2040
caacaagggtg gacgtggtgt caagtttgat tgggtcaattg ctaccaaagt cgtgaaacat	2100
aggcactttg agtttttggg taatcaagat ttccctgtca tcttggctgg tgggttggat	2160

cctaccaatg tggcatctgc cattcaacag gtgaaaccct ggattgtgga tgtgtcgagt 2220

ggtgttgaaa cagatggagt gaaggattta gaaaagattc gtgcctttgt taaaactgtc 2280

cagtcaacac aattttaa 2298

<210> 4

<211> 46

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 4

cgagctcgaa ttattttaa gaacagcaag ttaataatct agaggg 46

<210> 5

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 5

tatgaccatg attacgatga gaggcaaaat gaagcgtac 39

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 6

atttaaataa ttcgagctcg gtacccgggg	30
<210> 7	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> oligonucleotit tổng hợp	
<400> 7	
cgtaatcatg gtcatactg	20
<210> 8	
<211> 1000	
<212> ADN	
<213> <i>Rhizopus delemar</i>	
<400> 8	
tagaggaaa aagagagaat tgaaatagga gaggatgagt caaaatatag ttacataaaa	60
atttctcttt tttgtgttaa atataatcta atagcagggg ttttcttagt ttacgtttat	120
atcaaagtta tcaagcatac acttttttat gatttttcat actttaatcc ctttttagtat	180
tctattgttt gaaaggagag aaaaaacagc tgagggtacg gtgcacacga gatcttacga	240
taattttcct gcccaacagg aaagaagtaa ttgatcttga ttgacgctcg gagtttgac	300
gttcggagtt tgcacttcac attgagttat actcttactt attttgaagg aagggacgag	360
aaaagatgta aatataataa taacagtagt aaatagtatg cgcatcaaga acagctacca	420
acaaaagaga gaaatatgag cttaataatg aacaatgtaa atggcagaat gaaatttaat	480

tatcaaagcg gcatctttca gaccttccgt tacttccgat agagtttttt atgcaaagta 540
 ataacaactg tatatataaa aaaaagaagg ttatcaagca aaagccacaa tgtcatatct 600
 ggaataatca agagtaacta ttgaatgttg gtagccaaaa gaggcacgta attttatgac 660
 gaaatatcac acaaaaagat tattttgaca attcatgaat aggacagaga tacaccctaa 720
 acatgaaatg taagctatat ttaaacacct caagttaatt ttgaagcttc atttgtatta 780
 ttgtaaccat ttagacaagc taaatccttt ttattattgt ccttattgat tttatccaga 840
 ttaccgtatc taaagagcga tcaacagaaa aacggctgat tttagaccaa agtttcacaa 900
 actacatttg catgaacgtc atatatatat aaaccttgac ttttcttttt tttttttttt 960
 tttttttttc attatcaatt aatacaatta aataacaaaa 1000

<210> 9

<211> 634

<212> ADN

<213> *Rhizopus delemar*

<400> 9

tcattttaat tacgcatttt catttactaa ttgtttacat ttgataacg tcaataaatc 60
 ttctaatttc ttttgttctc aaacagttta cagttctatc ttttttttta ccacaatcaa 120
 ttctcaatat acaacatagc aaatgtgctt cagtaaattc attaaattct ttttaaaaaa 180

ggtaatttgt agcataaaaat tcgactttat tgacgttttt tttatgatca tatacaaata 240
 aaatagttgc gaatgagaac taaatttttc attgttttta gtcatatcat ctggctgttg 300
 cacgatgatc gcagcatatt tttcttcaca acactcatcc tataagcacc tttcaggact 360
 ttcgtctgca ctttccatat ttgatttcac caattgattt gaatttttat ccagtacaat 420
 ggtttgaatc tatacaataa attagtcaca gtataaaatt atgtctcatc ttgaacacac 480
 acctgcttaa caagaaatg aagcactcta tcaatagtaa atacaatata tgcacgatg 540
 ccaaatatat atcgtagatt ctcttcaaac gtagcttgat ctaaatacgcc atcaataaac 600
 ctttcaatca tcctcactag tgcattataa tggc 634

<210> 10

<211> 29

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 10

tagagggaaa aagagagaat tgaaatagg

29

<210> 11

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 11

ttttgttatt taattgtatt aattgataat g

31

<210> 12

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 12

aattaaataa caaaatcatt ttaattacgc attttc

36

<210> 13

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 13

catgattacg cggccgcgcc attataatgc actagtg

37

<210> 14

<211> 38

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 14

ctctttttcc ctctaattgag aggcaaaatg aagcgtac

38

<210> 15

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 15

aattaaataa caaaaatgtc ttctatcgaa acctccaaaa tctc

44

<210> 16

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 16

aattaaataa caaaaatggg gtcttctcct atccg

35

<210> 17

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 17

gcgtaattaa aatgattata aaggttgaca agc

33

<210> 18

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 18

ttttgttatt taattgtatt aattg

25

<210> 19

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 19

tcattttaat tacgcatttt c

21

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 20

gttccttgct gtggatttgt g

21

<210> 21

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 21

gggtgtatct ctgtcctatt catg

24

<210> 22

<211> 1128

<212> ADN

<213> *Rhizopus delemar*

<400> 22

atgatgaccc aagaactgga tgatgaacca ctgtcactgg tgatagtcaa gaatgatgaa

60

caagtgatag caggatcaca aagtgggtgct ttgtatacct ggaattggaa cacatgggtca	120
gattactcaa aatggatagg tcatacctaata tcagtggatg ctctttgcaa gttggatgag	180
gacacgatct gtaccggagg cagtgatggg ttactgcatg tgatcactgt atcaccacag	240
cagcaattcg aaggtatcct gggatgatcac ggtgaggatt tcccgataga gaagatggcg	300
gttgggttttg atgaaaagta cctggcaagt tgtgggcatg atttacattt acgcttttgg	360
aacatcgaat ttctttatga aaacacaaag cggaaacaac aagaaacagc gacatctggt	420
gtaaataaac aagaaactaa tgaacccaac acagtgtctt ctctatccg aatcaataag	480
tttgatccca aagatgaaaa acttgatagt ttattaaaga gtaacgctga atggtccaag	540
gccgtgacag aagctgaccc caactttttc aaaaagctgg ctacagattca agaacccaag	600
atcttgtggg ttggctgtgc tgattctcgt gtgcctgcta atcaactggt tcaattggca	660
ccgggtgaag tctttgttca cagaaatata gcgaatgtcg tctgtcactc tgatttgaat	720
tgccctttctg tcttacaata tgcggtagat gtgctcaagg tagagcacgt gattgtctgc	780
ggtcactcca actgtggtgg tgtggcagct gcgatgggca gtggtcaata tgggtctgatt	840
gataattggc ttaggaacat caaggatgtc tatagatttt atgaaaagga actggatgaa	900
atcaaggatt caaaggaacg tctgagtcga ctgatcgaat ttaacgcgat acactctgct	960

caaaatgtat gccgttcgac gattgttcag aacgcatggc atcgtggaca gaaattgaca 1020

gtacacgcat gggtttatga cttggaaaat ggattggtaa agagattgga attcagccat 1080

aaagatcctg ctaaacttcc atctatttat gcttgtcaac ctttataa 1128

<210> 23

<211> 375

<212> PRT

<213> *Rhizopus delemar*

<400> 23

Met Met Thr Gln Glu Leu Asp Asp Glu Pro Leu Ser Leu Val Ile Val

1 5 10 15

Lys Asn Asp Glu Gln Val Ile Ala Gly Ser Gln Ser Gly Ala Leu Tyr

20 25 30

Thr Trp Asn Trp Asn Thr Trp Ser Asp Tyr Ser Lys Trp Ile Gly His

35 40 45

Pro Asn Ser Val Asp Ala Leu Cys Lys Leu Asp Glu Asp Thr Ile Cys

50 55 60

Thr Gly Gly Ser Asp Gly Leu Leu Arg Leu Ile Thr Val Ser Pro Gln

65 70 75 80

Gln Gln Phe Glu Gly Ile Leu Gly Asp His Gly Glu Asp Phe Pro Ile

85 90 95

Glu Lys Met Ala Val Gly Phe Asp Glu Lys Tyr Leu Ala Ser Cys Gly

100 105 110

His Asp Leu His Leu Arg Phe Trp Asn Ile Glu Phe Leu Tyr Glu Asn

115 120 125

Thr Lys Arg Lys Gln Gln Glu Thr Ala Thr Ser Gly Val Asn Lys Gln

130 135 140

Glu Thr Asn Glu Pro Asn Thr Val Ser Ser Pro Ile Arg Ile Asn Lys

145 150 155 160

Phe Asp Pro Lys Asp Glu Lys Leu Asp Ser Leu Leu Lys Ser Asn Ala
 165 170 175
 Glu Trp Ser Lys Ala Val Thr Glu Ala Asp Pro Asn Phe Phe Lys Lys
 180 185 190
 Leu Ala Gln Ile Gln Glu Pro Lys Ile Leu Trp Val Gly Cys Ala Asp
 195 200 205
 Ser Arg Val Pro Ala Asn Gln Leu Val Gln Leu Ala Pro Gly Glu Val
 210 215 220
 Phe Val His Arg Asn Ile Ala Asn Val Val Cys His Ser Asp Leu Asn
 225 230 235 240
 Cys Leu Ser Val Leu Gln Tyr Ala Val Asp Val Leu Lys Val Glu His
 245 250 255
 Val Ile Val Cys Gly His Ser Asn Cys Gly Gly Val Ala Ala Ala Met
 260 265 270
 Gly Ser Gly Gln Tyr Gly Leu Ile Asp Asn Trp Leu Arg Asn Ile Lys
 275 280 285
 Asp Val Tyr Arg Phe Tyr Glu Lys Glu Leu Asp Glu Ile Lys Asp Ser
 290 295 300
 Lys Glu Arg Leu Ser Arg Leu Ile Glu Phe Asn Ala Ile His Ser Ala
 305 310 315 320
 Gln Asn Val Cys Arg Ser Thr Ile Val Gln Asn Ala Trp His Arg Gly
 325 330 335
 Gln Lys Leu Thr Val His Ala Trp Val Tyr Asp Leu Glu Asn Gly Leu
 340 345 350
 Val Lys Arg Leu Glu Phe Ser His Lys Asp Pro Ala Lys Leu Pro Ser
 355 360 365
 Ile Tyr Ala Cys Gln Pro Leu
 370 375
 <210> 24
 <211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 24

ttttgttatt taattgtatt aattg

25

<210> 25

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 25

tcattttaat tacgcatttt catttac

27

<210> 26

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 26

aattaaataa caaaaatgat gaccgaagaa ctggatg

37

<210> 27

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> oligonucleotit tổng hợp

<400> 27

gcgtaattaa aatgattata aaggttgaca agcataaata g

41