(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) **1-0038265**

(51)[2020.01] **C12N 15/77**; C12P 19/32; C07K 14/34 (13) **B**

(21) 1-2020-04233 (22) 25/01/2019
(86) PCT/KR2019/001117 25/01/2019 (87) WO2019/147078 01/08/2019
(30) 10-2018- 0009632 25/01/2018 KR
(45) 25/01/2024 430 (43) 25/11/2020 392A
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea
(72) KIM, Hee Ju (KR); LIM, Bo Ram (KR); YOON, Byoung Hoon (KR); BAEK, Min Ji (KR); LEE, Ji Hye (KR).
(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) VI SINH VẬT CORYNEBACTERIUM STATIONIS SẢN SINH NUCLEOTIT PURIN, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT NUCLEOTIT PURIN, VÀ PHƯƠNG PHÁP TĂNG CƯỜNG SẢN XUẤT NUCLEOTIT PURIN

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật *Corynebacterium stationis* sản sinh nucleotit purin, phương pháp sản xuất nucleotit purin, và phương pháp tăng cường sản xuất nucleotit purin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh nucleotit purin và phương pháp sản xuất nucletotit purin sử dụng vi sinh vật này, và phương pháp tăng cường sản xuất nucleotit purin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các nucleotit purin như 5'-inosin monophosphat (sau đây gọi là IMP), 5'-xanthosin monophosphat (sau đây gọi là XMP), 5'-guanosin monophosphat (sau đây gọi là GMP), 5'-ađenyl axit (sau đây, AMP), v.v., là các chất trung gian của hệ thống trao đổi chất của quá trình sinh tổng hợp axit nucleic. Các chất trung gian có vai trò sinh lý quan trọng trong cơ thể và được sử dụng rộng rãi trong thực phẩm, dược phẩm, v.v.. Trong số các chất trung gian này, IMP có hương vị thịt bò và GMP có hương vị nấm được sử dụng rộng rãi như là phụ gia gia vị thực phẩm. Ngoài ra, người ta đã biết khi trộn hai nguyên liệu đó với bột ngọt (mononatri glutamate: MSG), hương vị của chúng được tăng thêm, và do đó, hỗn hợp gia vị thành phức hợp trong đó có hỗn hợp ba nguyên liệu này được sử dụng rộng rãi.

Trong khi đó, các ví dụ phương pháp sản xuất nucleotit purin có thể bao gồm: (1) phương pháp bằng cách phân hủy enzym của axit ribonucleic (ARN) được chiết xuất từ các tế bào nấm men; (2) phương pháp điều chế bằng cách lên men nuôi cấy vi sinh vật sản sinh nucleotit purin và thu hồi trực tiếp nucleotit purin trong chất lỏng nuôi cấy; (3) phương pháp phosphoryl hóa học nucleosit sản xuất bằng lên men, v.v. (patent Hàn Quốc số 10-1049023, công bố Patent Nhật Bản số 4363042, patent Hàn Quốc số 10-1210704, và *Agri. Biol. Chem.*, 36(9), 1511-1522). Trong các phương pháp này, trong khi phương pháp (1) có các vấn đề về cung/cầu nguyên liệu thô và hiệu quả kinh tế, phương pháp (2) được sử dụng rộng rãi do các lợi thế về kinh tế và môi trường của nó. Trong khi đó, trong trường hợp sản xuất GMP (một loại nucleotit purin), nó có hạn chế ở chỗ năng suất thấp do vấn đề độ thấm màng tế bào của nó, và do đó, phương pháp sản xuất GMP bằng biến đổi enzym của XMP được sản xuất thông qua lên men vi khuẩn được sử dụng.

Tuy nhiên, trong quá trình sản xuất nucleotit purin bằng lên men sử dụng vi sinh vật, vi sinh vật có thể bị căng thẳng do các yếu tố nhiệt độ, độ pH, áp suất thẩm thấu, suy dinh dưỡng, và oxy hóa. Trong các yếu tố này, đặc biệt là mất cân bằng oxy hóa, các gốc tự do oxy hóa (reactive oxygen species: ROS) là yếu tố không thể tránh khỏi phát sinh trong quá trình sản xuất lên men, trở thành nguyên nhân chính, và ROS có thể là nguyên nhân gây tăng trưởng bất thường của vi sinh vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu và nỗ lực thực hiện để cải thiện năng suất của các nucleotit purin bằng cách khắc phục mất cân bằng oxy hóa có thể xảy ra trong quá trình lên men của vi sinh vật. Kết quả là, họ đã xác định rằng trong vi sinh vật có protein cụ thể bị bất hoạt, năng suất của các nucleotit purin được cải thiện cũng như sự tăng trưởng của vi sinh vật được duy trì, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh nucleotit purin, trong đó protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 bị bất hoạt.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất nucleotit purin sử dụng vi sinh vật.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp tăng cường sản xuất nucleotit purin trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* bao gồm bất hoạt protein của sáng chế trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất sử dụng vi sinh vật để sản xuất nucleotit purin.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Vi sinh vật sản sinh các nucleotit purin theo sáng chế có thể sản xuất các nucleotit purin với hiệu suất cao. Ngoài ra, các nucleotit purin được sản xuất có thể ứng dụng không chỉ với thức ăn động vật hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi, mà còn trong các sản phẩm khác nhau (ví dụ, thức ăn của người hoặc các phụ gia thực phẩm, các gia vị, dược phẩm, v.v.).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây. Trong khi đó, các phần mô tả và các phương án tương ứng được bộc lộ ở đây có thể được áp dụng cho các phần mô tả và các phương

án khác. Tức là, tất cả sự kết hợp của các yếu tố khác nhau bộc lộ ở đây nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi các phần mô tả cụ thể dưới đây.

Để đạt được các mục đích nêu trên, khía cạnh của sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh nucleotit purin, trong đó vi sinh vật có protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 bị bất hoạt.

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất chủng *Corynebacterium stationis* sản sinh nucleotit purin, trong đó chủng có protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 bị bất hoạt.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ "nucleotit purin" đề cập chung đến hợp chất hữu cơ, có purin nucleosit và trong đó nhóm phosphat là liên kết với gốc đường của nucleosit bằng liên kết este.

Cụ thể là, nucleotit purin có thể là ít nhất một nucleotit purin được chọn từ nhóm gồm có IMP, XMP, GMP, và AMP, nhưng các nucleotit purin có khả năng tăng năng suất bằng cách bất hoạt protein có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 có thể được bao gồm nhưng không giới hạn.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ "protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1" đề cập đến protein được mã hóa bởi gen thuộc nhóm họ WhiB, và cụ thể là, chúng có thể là điều chỉnh phiên mã WhiB. Protein bao gồm bốn gốc xystein được bảo tồn để tạo thành nhóm nhạy cảm với oxy và nitơ oxit (4Fe-4S) và protein đã biết đóng vai trò quan trọng trong biểu hiện các đặc tính sinh học của xạ khuẩn *Actinomycetes*. Những chức năng của nó được xác định đến nay đã biết có liên quan đến chức năng tế bào tổng thể (ví dụ, sinh bệnh học, kháng kháng sinh, sinh trưởng tế bào, v.v.), nhưng các chức năng và cơ chế cụ thể của chúng chưa được nghiên cứu kỹ.

Protein có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 của sáng chế có thể là protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, protein về cơ bản chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, hoặc protein có chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, nhưng protein không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, protein của sáng chế có thể là protein gồm có trình tự axit amin được thể hiện như SEQ ID NO: 1, nhưng bất kỳ trình tự có hoạt tính đồng nhất với protein có thể

bao gồm không giới hạn, và người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể thu được thông tin trình tự từ dữ liệu đã biết (ví dụ, Ngân hàng gen-GenBank của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia - NCBI: National Center for Biotechnology Information, v.v.). Ngoài ra, protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 của sáng chế có thể là protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, hoặc protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 có độ tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 ít nhất 60%, 70%, 80%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, hoặc 99%. Ngoài ra, rõ ràng là protein bất kỳ có trình tự axit amin bị xóa, sửa đổi, thay thế, hoặc thêm một phần trình tự có thể nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế, miễn là protein có trình tự axit amin với bất kỳ tương đồng hoặc đồng nhất ở trên và biểu hiện hoạt tính sinh học tương ứng với protein ở trên.

Hơn nữa, bất kỳ polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit lai hóa dưới các điều kiện nghiêm ngặt với đầu dò có thể được điều chế từ các trình tự gen đã biết (ví dụ, các trình tự bổ sung với tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit mã hóa cho polypeptit cấu thành protein ở trên) và có hoạt tính đồng nhất với protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, có thể bao gồm mà không bị giới hạn.

Tức là, theo sáng chế, mặc dù được mô tả như "protein hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO cụ thể", "protein hoặc polypeptit chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO cụ thể", hoặc "protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin của SEQ ID NO cụ thể", rõ ràng là protein bất kỳ có trình tự axit amin bị xóa, sửa đổi, thay thế, thay thế bảo thủ hoặc thêm một phần trình tự có thể bao gồm trong phạm vi của sáng chế, miễn là protein có hoạt tính đồng nhất hoặc tương tứng với polypeptit chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO cụ thể. Ví dụ, trong trường hợp trình tự không thay đổi chức năng của protein được thêm vào đầu tận cùng N (N-terminus) và/hoặc đầu tận cùng C (C-terminus) của trình tự axit amin, trường hợp trình tự axit amin có đột biến xảy ra tự nhiên, hoặc trong trường hợp trình tự axit amin có đột biến câm (im lặng) hoặc thay thế bảo thủ của chúng.

Thuật ngữ "thay thế bảo thủ" đề cập đến thay thế một axit amin bằng axit amin khác có cấu trúc và/hoặc tính chất hóa học tương tự. Sự thay thế axit amin này thường có thể thực hiện dựa trên sự tương tự về độ phân cực, tích điện, độ hòa tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc tính lưỡng cực của axit amin. Ví dụ, axit amin tích điện dương

(bazơ) bao gồm arginin, lysin, và histiđin; các axit amin tích điện âm (axit) bao gồm axit glutamic và axit aspartic; các axit amin thơm bao gồm phenylalanin, tryptophan, và tyrosin; và các axit amin kỵ nước bao gồm alanin, valin, isoleuxin, leuxin, methionin, phenylalanin, tyrosin, và tryptophan.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ "polynucleotit" có nghĩa là polynucleotit thường bao gồm phân tử ADN hoặc ARN, và nucleotit (tức là, đơn vị cấu thành cơ bản của polynucleotit) có thể bao gồm không chỉ các nucleotit tự nhiên, mà còn chất tương tự trong đó đường hoặc gốc bazơ bị thay đổi (tham khảo Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York (1980); Uhlman and Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584 (1990)).

Trình tự polynucleotit của gen mã hóa protein có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 có thể thu được từ dữ liệu đã biết (ví dụ, GenBank của NCBI), nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Polynucleotit có thể là polynucleotit mã hóa protein có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 của sáng chế, hoặc polynucleotit mã hóa protein có độ tương đồng hoặc đồng nhất với protein của sáng chế là 60%, 70%, 80%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, hoặc 99%.

Cụ thể là, protein có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 có thể là polynucleotit có độ tương đồng hoặc đồng nhất với trình tự polynucleotit SEQ ID NO: 2 ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%. Tuy nhiên, rõ ràng là trình tự bất kỳ polynucleotit mã hóa protein có hoạt tính tương ứng với protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, có thể nằm trong trong phạm vi bảo hộ của sáng chế, mà không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, rõ ràng là, dựa trên sự thoái hóa mã di truyền, bất kỳ polynucleotit có thể dịch mã thành protein chứa trình tự axit amin giống hoặc protein có tương đồng với nó có thể nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngoài ra, trình tự nucleotit có thể là bất kỳ trình tự có khả năng lai hóa với đầu dò, có thể được điều chế từ trình tự gen đã biết (ví dụ, trình tự bổ sung cho tất cả hoặc một phần của các trình tự nucleotit bên trên), trong các điều kiện nghiêm ngặt để mã hóa protein có hoạt tính của protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1.

Thuật ngữ "các điều kiện nghiêm ngặt" đề cập tới các điều kiện cho phép lai hóa cụ thể giữa các polypeptit. Các điều kiện được mô tả cụ thể trong tài liệu (ví dụ., J.

Sambrook *et al.*, Nhân dòng phân tử, Hướng dẫn sử dụng trong phòng thí nghiệm, tái bản lần 2, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel *et al.*, Các quy trình hiện có trong Sinh học phân tử, John Wiley & Sons, Inc., New York). Các điều kiện có thể gồm thực hiện lai hóa giữa các gen có độ tương đồng hoặc đồng nhất cao, ví dụ, độ tương đồng hoặc đồng nhất là tối thiểu 40%, tốt hơn là tối thiểu 70%, tối thiểu 80%, tối thiểu 85%, và tối thiểu 90%, tốt hơn là tối thiểu 95%, tốt hơn nữa là tối thiểu 97%, và tốt nhất là tối thiểu 99%, trong khi không thực hiện lai hóa giữa các gen có độ tương đồng và đồng nhất thấp hơn độ tương đồng hoặc đồng nhất nêu trên; hoặc thực hiện các điều kiện rửa thông thường cho lai Southern, tức là, rửa 1 lần, tốt hơn là, rửa 2 hoặc 3 lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, và 0,1% SDS, tốt hơn là 60°C, 0,1×SSC, và 0,1% SDS, và tốt nhất là 68°C, 0,1×SSC, và 0,1% SDS. Lai hóa yêu cầu hai axit nucleic có trình tự bổ sung, mặc dù chúng có thể bắt cặp không đặc hiệu giữa bazơ tùy thuộc vào độ nghiêm ngặt của lai hóa. Thuật ngữ "bổ sung" được sử dụng mô tả mối quan hệ giữa các nucleotit bazơ có thể lai với nhau. Ví dụ, với ADN, ađenosin bổ sung với thymin trong khi xystosin bổ sung với guanin. Theo đó, sáng chế có thể bao gồm các đoạn axit nucleic đã phân lập bổ sung với toàn bộ trình tự như các trình tự axit nucletic tương tự.

Cụ thể là, các polynucleotit có sự tương đồng hoặc đồng nhất có thể được tìm thấy ở giá trị T_m là 55°C sử dụng các điều kiện lai hóa bao gồm bước lai hóa và sử dụng các điều kiện mô tả ở trên. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là 60°C, 63°C, hoặc 65°C, nhưng nhiệt độ không bị giới hạn ở đây và có thể được điều chỉnh phù hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tùy theo mục đích.

Tính nghiêm ngặt phù hợp của lai hóa các polynucleotit dựa vào chiều dài và mức độ bổ sung của các polynucleotit, và sự thay đổi đã được biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (tham khảo Sambrook *et al., supra*, 9.50 đến 9.51 và 11.7 đến 11.8).

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ "tương đồng" hoặc "đồng nhất" đề cập tới mức độ đồng nhất giữa hai trình tự axit amin hoặc các trình tự nucloetit, và chúng có thể biểu diễn dưới dạng phần trăm. Các thuật ngữ "tương đồng" hoặc "đồng nhất" có thể sử dụng thay thế nhau. Theo đặc điểm kỹ thuật sáng chế, trình tự tương đồng có hoạt tính đồng nhất hoặc tương tự với trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit được biểu diễn là "% tương đồng".

Trình tự tương đồng hoặc đồng nhất của các polynucleotit hay polypeptit bảo thủ được xác định bằng thuật toán căn chỉnh tiêu chuẩn, và các hàm phạt khoảng trống mặc định được thiết lập với chương trình đang sử dụng có thể được sử dụng cùng nhau. Trên thực tế, các trình tự tương đồng hoặc đồng nhất có thể lai với nhau theo toàn bộ trình tự hoặc ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% hoặc lớn hơn toàn bộ chiều dài dưới các điều kiện trung bình hoặc nghiêm ngặt cao nhất. Trong lai hóa, các polynucleotit bao gồm các codon thoái hóa để thay thế cho các codon đang xem xét.

Cho dù bất kỳ hai chuỗi trình tự polynucleotit hoặc polypeptit có tương đồng, tương tự hay đồng nhất có thể được xác định sử dụng thuật toán máy tính đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, chương trình "FASTA" sử dụng tham số mặc định được mô tả bởi Pearson *et al.* (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. HOA KỲ 85: 2444]). Ngoài ra, thuật toán Needleman-Wunsch (1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) được thực hiện trong chương trình Bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu-The European Molecular Biology Open Software Suite của gói EMBOSS (Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277) (tốt nhất là, phiên bản 5.0.0 hoặc cao hơn) có thể được sử dụng để xác định theo cách tương tự (bao gồm gói chương trình GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [*ET AL.*, J Molec Biol 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, và [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073). Ví dụ, sự tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng BLAST hoặc ClustalW của National Center for Biotechnology Information – Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia.

Sự tương đồng, tương tự, hoặc đồng nhất giữa các polynucleotit hoặc polypeptit, ví dụ, có thể được xác định bằng so sánh thông tin trình tự đã cho sử dụng chương trình máy tính GAP, như là chương trình được giới thiệu bởi Needleman *et al.* (J Mol Biol. 48: 443 (1970)) như được bộc lộ bởi Smith and Waterman (Adv. Appl. Math (1981) 2: 482). Tóm lại, chương trình GAP định nghĩa độ tương đồng, tương tự hoặc đồng nhất là giá trị thu được bằng số lượng các dấu hiệu được căn chỉnh (tức là, các nucleotit hoặc các axit amin) chia cho tổng số dấu hiệu trong trình tự ngắn hơn của hai trình tự. Các tham số mặc định cho chương trình GAP có thể bao gồm (1) ma trận so sánh đơn phân (chứa giá trị 1 là đồng nhất và 0 là không đồng nhất) và ma trận so sánh trọng số của Gribskov *et al.* (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745, đưa ra trong tài liệu (Schwartz và

Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence và Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979); (2) điểm phạt là 3,0 cho mỗi khoảng trống dịch chuyển và điểm phạt bổ sung là 0,10 cho mỗi dấu hiệu trong mỗi khoảng trống dịch chuyển (hoặc điểm phạt mở khoảng trống dịch chuyển là 10 và điểm phạt mở rộng khoảng trống dịch chuyển là 0,5); và (3) không bị phạt đối với các khoảng trống dịch chuyển cuối.

Theo sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh nucleotit purin có thể là vi sinh vật có protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 bị bất hoạt.

Cụ thể, sự bất hoạt protein bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 có thể sử dụng thay thế cho nhau theo hướng tương tự như trong sự bất hoạt của protein họ WhiB, bất hoạt bộ điều hòa phiên mã của WhiB, hoặc bất hoạt protein mã hóa bởi gen chứa trình tự polynucleotit SEQ ID NO: 2.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ "protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 bị bất hoạt" nghĩa là protein chứa trình tự SEQ ID NO: 1 không được biểu hiện trong tất cả; hoặc protein có thể được biểu hiện nhưng không có hoặc bị giảm hoạt tính so với chủng bố mẹ hoặc chủng không sửa đổi. Ngoài ra, thuật ngữ trên có nghĩa là protein WhcEDBA được mã hóa bởi gen nhóm họ WhiB, không có hoạt tính hoặc hoạt tính của chúng bị giảm so với chủng bố mẹ hoặc chủng không sửa đổi. Cụ thể, sự giảm được mô tả trên là khái niệm bao gồm trường hợp hoạt tính của protein bị giảm do sự đột biến, xóa, v.v. của gen mã hóa protein so với hoạt tính của protein ban đầu vi sinh vật sở hữu; trường hợp mức độ của hoạt tính nội bào tổng thể của protein thấp hơn so với chủng hoang dại hoặc chủng trước khi sửa đổi, do ức chế biểu hiện của gen mã hóa protein hoặc ức chế dịch mã của gen, v.v., và kết hợp các trường hợp.

Theo sáng chế, có thể xác nhận rằng sự bất hoạt của protein nêu trên liên quan tới hoạt tính của các nucleotit purin.

Theo sáng chế, sự bất hoạt có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ của phương pháp bao gồm: 1) phương pháp xóa toàn bộ hoặc một phần gen mã hóa protein; 2) phương pháp sửa đổi trình tự kiểm soát biểu hiện để giảm biểu hiện của gen mã hóa protein; 3) phương pháp sửa đổi trình tự gen mã hóa protein sao cho hoạt tính protein bị loại bỏ hoặc yếu đi; 4) phương pháp đưa vào oligonucleotit đối nghĩa (ví dụ, ARN đối nghĩa) liên kết bổ sung để phiên mã gen mã hóa protein; 5) phương pháp làm cho không thể thực hiện gắn kết

ribosom bằng cách tạo thành cấu trúc thứ cấp nhờ thêm trình tự được bổ sung với trình tự Shine-Dalgarno (SD), ở đầu trước của trình tự SD của gen mã hóa protein; 6) phương pháp của kỹ thuật phiên mã ngược (reverse transcription engineering: RTE), trong đó, vùng khởi động (promoter) phiên mã ngược được thêm vào đầu 3' của khung đọc mở (open reading frame: ORF) của trình tự polynucleotit của gen mã hóa protein, v.v.; và sự bất hoạt có thể được thực hiện bằng cách kết hợp các phương pháp trên, nhưng các phương pháp không bị giới hạn ở đây.

Cụ thể là, phương pháp xóa toàn bộ hay một phần gen mã hóa protein có thể được thực hiện bằng cách thay thế polynucleotit mã hóa protein đích nội sinh trong nhiễm sắc thể với polynucleotit hoặc gen chỉ thị có trình tự nucleotit bị xóa một phần sử dụng vectơ để chèn vào nhiễm sắc thể trong vi sinh vật. Ví dụ của phương pháp xóa toàn bộ hoặc một phần polynucleotit, phương pháp xóa polynucleotit bằng cách tái tổ hợp tương đồng có thể được sử dụng, nhưng phương pháp không bị giới hạn ở đây.

Ngoài ra, phương pháp xóa toàn bộ hoặc một phần của gen có thể thực hiện như đột biến được đưa vào trong gen sử dụng ánh sáng (ví dụ, tia tử ngoại) hoặc hóa học, và chủng trong đó gen đích bị xóa được lựa chọn từ các đột biến thu được. Phương pháp xóa gen nêu trên bao gồm phương pháp kỹ thuật tái tổ hợp ADN. Trong kỹ thuật tái tổ hợp ADN, ví dụ, có thể là phương pháp trong đó tái tổ hợp tương đồng xảy ra bằng cách đưa trình tự nucleotit hoặc vectơ chứa trình tự nucleotit tương đồng với gen đích vào vi sinh vật.

Ngoài ra, trình tự nucleotit hoặc vectơ đưa vào có thể bao gồm chỉ thị chọn lọc tính trội, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Ngoài ra, phương pháp sửa đổi trình tự kiểm soát biểu hiện có thể thực hiện bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Như các ví dụ của phương pháp, sự sửa đổi trình tự kiểm soát biểu hiện có thể được thực hiện bằng cách tạo đột biến trong trình tự polynucleotit bằng cách xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ, hoặc kết hợp tất cả các phương pháp để làm suy yếu hoạt tính của trình tự kiểm soát biểu hiện, hoặc bằng cách thay thế trình tự polynucleotit với trình tự polynucleotit có hoạt tính yếu hơn. Trình tự kiểm soát biểu hiện có thể gồm vùng khởi động (promoter), trình tự mở đầu, trình tự mã hóa vị trí gắn ribosom, các trình tự kiểm soát kết thúc phiên mã và dịch mã, v.v., nhưng trình tự kiểm soát biểu hiện không bị

giới hạn ở đây.

Ngoài ra, phương pháp sửa đổi trình tự gen có thể được thực hiện bằng cách đưa đột biến vào trong trình tự gen bằng cách xóa, chèn, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ, hoặc kết hợp các phương pháp nêu trên để làm giảm hoạt tính của protein; hoặc bằng cách thay thế trình tự gen bằng trình tự gen cải tiến để có hoạt tính yếu hoặc trình tự gen cải tiến không có hoạt tính, nhưng phương pháp sửa đổi trình tự gen không bị giới hạn ở đây.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ "vi sinh vật sản sinh nucleotit purin" hoặc "vi sinh vật có khả năng sản sinh nucleotit purin" đề cập đến vi sinh vật tự nhiên có khả năng sản sinh nucleotit purin; hoặc vi sinh vật trong đó khả năng sản sinh nucleotit purin không được biểu hiện ở chủng bố mẹ. Cụ thể là, vi sinh vật có thể là vi sinh vật trong đó protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, protein họ WhiB, hoặc điều chỉnh phiên mã WhiB bị bất hoạt, do đó có khả năng sản sinh nucleotit purin.

Theo sáng chế, "vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*" có thể gồm tất cả các vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*. Cụ thể là, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium stationis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium phocae*, *Corynebacterium flavescens*, *Corynebacterium humireducens*, *Corynebacterium halotolerans*, *Corynebacterium pollutisoli*, *Corynebacterium marinum*, *Corynebacterium freiburgense*, *Corynebacterium cystitidis*, *Corynebacterium durum*, *Corynebacterium pilosum*, hoặc *Corynebacterium testudinoris*, và tốt hơn là *Corynebacterium stationis*, nhưng vi sinh vật không bị giới hạn ở đây.

Trong khi đó, mặc dù đã được biết rằng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể sản xuất các nucleotit purin, vi sinh vật có khả năng sản sinh nucleotit thấp đáng kể và gen tác động lên cơ chế sản sinh hoặc nguyên lý của cơ chế chưa được biết. Theo đó, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản sinh nucleotit purin của sáng chế đề cập tới vi sinh vật chủng hoang dại của chính chi *Corynebacterium*; vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong đó hoạt tính của gen liên kết với cơ chế sản sinh nucleotit purin được tăng cường hay bị bất hoạt, do đó cải thiện khả năng sản sinh nucleotit purin; hoặc vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong đó hoạt tính của gen ngoại sinh được đưa vào hoặc tăng cường, do đó cải thiện khả năng sản sinh nucleotit purin. Cụ thể là, vi sinh

vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium stationis* trong đó con đường sinh tổng hợp các nucleotit purin được tăng cường, và sự tăng cường có thể nghĩa là hoạt tính của protein liên quan con đường sinh tổng hợp được tăng cường. Ngoài ra, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể là *Corynebacterium stationis* trong đó hoạt tính của protein liên quan đến con đường thoái hóa của các nucleotit purin hoặc tiền chất của chúng bị bất hoạt.

Cụ thể, trong trường hợp nucleotit purin là 5'-inoxin monophosphat (IMP), các ví dụ của protein liên quan đến con đường sinh tổng hợp các nucleotit purin có thể bao gồm ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm amidophosphoriboxyltransferaza (*PurF*), phosphoriboxylamin-glyxin ligaza (PurD), phosphoriboxylglyxinamit formyltransferaza (PurN), phosphoriboxylformylglyxinamidin synthaza (PurL), AIR synthetaza (FGAM cyclase), phosphoriboxylaminoimiđazol carboxylaza, phosphoriboxylaminoimidazolexucxinocarboxamid synthaza, adenyloxucxinat lyaza (ADSL), phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferaza, và inosin monophosphat synthaza.

Ngoài ra, trong trường hợp nucleotit purin là 5'-xanthosin monophosphat (XMP), các ví dụ của protein trong đó hoạt tính được tăng cường có thể còn IMP đehyđrogenaza, ngoài nhóm chứa các protein nêu trên.

Ngoài ra, trong trường hợp nucleotit purin là 5'-guanosin monophosphat (GMP), các ví dụ của protein trong đó hoạt tính được tăng cường có thể còn IMP đehyđrogenaza và/hoặc GMP synthaza, ngoài nhóm chứa các protein nêu trên.

Ngoài ra, trong trường hợp nucleotit purin là 5'-ađenylic axit (AMP), các ví dụ của protein trong đó hoạt tính được tăng cường có thể còn adenylxucxinat synthaza (purA), ngoài nhóm chứa các protein nêu trên.

Cụ thể hơn là, protein liên quan đến con đường sinh tổng hợp các nucleotit purin có thể là amidophoshoboxyltransferaza (*PurF*), nhưng protein không giới hạn ở đây.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất các nucleotit purin bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật nêu trên theo sáng chế trong môi trường.

Phương pháp sản xuất có thể còn bao gồm bước thu hồi các nucleotit purin.

Vi sinh vật và các nucleotit purin được mô tả ở trên.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ "nuôi cấy" nghĩa là vi sinh vật được phát triển trong các điều kiện môi trường được kiểm soát nhân tạo và phù hợp. Theo sáng chế, quy trình nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể được thực hiện sử dụng phương pháp đã biết rộng rãi trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Cụ thể là, nuôi cấy có thể thực hiện liên tục trong quy trình theo mẻ, quy trình theo mẻ bổ sung, quy trình theo mẻ bổ sung lặp lại, nhưng quy trình nuôi cấy không bị giới hạn ở đây.

Bước của nuôi cấy vi sinh vật có thể được thực hiện trong nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, nuôi cấy theo mẻ bổ sung, v.v., đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, nhưng bước nuôi cấy vi sinh vật không bị giới hạn cụ thể tại đây. Môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác được sử dụng cho nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, nhưng bất kỳ môi trường được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật thông thường có thể được sử dụng. Cụ thể là, vi sinh vật theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí trong môi trường thông thường chứa nguồn cacbon phù hợp, nguồn nitơ, nguồn phospho, hợp chất vô cơ, axit amin, và/hoặc vitamin, v.v., trong khi điều chỉnh nhiệt độ, độ pH, v.v.. Môi trường nuôi cấy chủng *Corynebacterium* đã biết (ví dụ, các phương pháp sử dụng cho vi khuẩn học bởi Hiệp hội Vi khuẩn học Hoa Kỳ, Washington D.C., Mỹ, 1981).

Nguồn cacbon có thể được sử dụng trong môi trường bao gồm sacarit và hyđrat cacbon (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, rỉ đường và xenluloza), dầu và chất béo (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hạt hướng dương, dầu đậu phộng và dầu dừa), axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit stearic và axit linoleic), rượu (ví dụ, glyxerol và etanol), axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic), v.v.. Các nguyên liệu này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Nguồn nitơ có thể có thể được sử dụng trong môi trường bao gồm pepton, dịch chiết nấm men, nước thịt, chiết xuất mạch nha, rượu ngô, bột đậu nành và ure, hoặc hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sunfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat và amoni nitrat), v.v.. Nguồn nitơ có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp, nhưng không bị giới hạn ở đây.

Nguồn phospho có thể được sử dụng trong môi trường có thể gồm kali đihyđrogen phosphat, đikali hyđrogen phosphat, và muối chứa natri tương ứng. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể gồm muối kim loại (ví dụ, magie sunfat hoặc sắt sunfat) cần thiết cho

sinh trưởng. Cuối cùng, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm nguyên liệu kích thích sinh trưởng (ví dụ, các axit amin và vitamin), ngoài các nguyên liệu ở trên. Ngoài ra, các tiền chất phù hợp cho môi trường nuôi cấy có thể được sử dụng. Các nguyên liệu thô ở trên có thể được thêm vào chế độ nuôi cấy theo mẻ hoặc chế độ nuôi cấy liên tục trong quy trình nuôi cấy bằng phương pháp phù hợp cho môi trường nuôi cấy.

Độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh trong thời gian nuôi cấy vi sinh vật sử dụng hợp chất bazơ (ví dụ, natri hyđroxit, kali hyđroxit, và amoni) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sunfuric) theo cách thức phù hợp. Ngoài ra, việc tạo bọt có thể được ngăn chặn bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt (ví dụ, este polyglycol axit béo). Ngoài ra, oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ, không khí) có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy để duy trì trạng thái hiếu khí của môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy thường được duy trì ở 20°C đến 45°C, và tốt hơn là, 25°C đến 40°C. Quy trình nuôi cấy có thể là liên tục cho đến khi thu được lượng L-axit amin mong muốn, và tốt hơn là, từ 10 đến 160 giờ.

Các nucleotit purin sản xuất bởi quy trình nuôi cấy ở trên có thể được giải phóng vào môi trường hoặc vẫn còn bên trong tế bào.

Phương pháp sản xuất các nucleotit purin theo sáng chế, sau bước nuôi cấy, có thể còn bao gồm bước thu hồi các nucleotit purin từ vi sinh vật hoặc môi trường.

Thu hồi các nucleotit purin có thể được thực hiện bằng các phương pháp thông thường đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Như phương pháp thu hồi, ly tâm, lọc, sắc kí trao đổi anion, tinh thể hóa, v.v. có thể được sử dụng. Ví dụ, môi trường nuôi cấy có thể ly tâm ở tốc độ thấp để loại bỏ sinh khối và dịch nổi thu được có thể tách được thông qua sắc ký trao đổi ion, nhưng phương pháp thu hồi không bị giới hạn ở đây, và các nucleotit purin mong muốn có thể được thu hồi từ vi sinh vật nuôi cấy hoặc môi trường bằng phương pháp phù hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Bước thu hồi có thể còn bao gồm quy trình tách và/hoặc quy trình tinh sạch.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, trong đó vi sinh vật có protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 bị bất hoạt, để tăng sản xuất nucleotit purin.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp tăng sản xuất các nucleotit purin

bao gồm bước bất hoạt protein gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 theo sáng chế trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Thuật ngữ "nucleotit purin", "protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1", "bất hoạt" và "vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*" được mô tả ở trên.

Các ví dụ của sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các phương án ví dụ. Tuy nhiên, các phương án ví dụ chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1: Điều chế vectơ tái tổ hợp cho mục đích bất hoạt protein họ WhiB

Protein họ WhiB được lựa chọn là protein đích được bất hoạt để tăng khả năng sản sinh nucleotit purin.

Ví dụ 1-1: Chọn lọc protein họ WhiB của *Corynebacterium stationis*

Protein họ WhiB được sàng lọc từ bộ gen của chủng hoang dại *Corynebacterium stationis* ATCC 6872, và trong số các gen trong bộ gen, một kiểu gen được coi là có liên quan đến sản sinh nucleotit purin được lựa chọn. Dựa vào các trình tự nucleotit được báo cáo cho Ngân hàng Gen NIH (Viện Sức khỏe Quốc gia-National Institutes of Health) (Hoa Kỳ), gen được xác nhận rằng là điều chỉnh phiên mã, WhiB.

Ví dụ 1-2: Điều chế đoạn gen mã hóa protein cho bất hoạt protein họ WhiB

Các gen nhiễm sắc thể của chủng ATCC 6872 là chủng hoang dại của *Corynebacterium stationis*, được tách chiết sử dụng kit tách chiết ADN tổng số G-spin (Intron, Cat. No 17045). Sau đó, phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction: PCR) được thực hiện sử dụng các gen nhiễm sắc thể là mạch khuôn.

Sau đó, để bất hoạt protein họ WhiB, các hoạt tính nội sinh của các protein được loại bỏ hoàn toàn bằng cách xóa các gen mã hóa các protein này, hoặc mức độ biểu hiện của các protein đã được giảm tối đa bằng cách làm yếu các gen mã hóa các protein này.

Cụ thể là, các hoạt tính nội sinh của các gen trên được loại bỏ sử dụng vectơ điều chế theo ví dụ 1-2-1, và mỗi codon khởi đầu nội sinh (tức là, ATG) của chủng nêu trên được thay thế với GTG hoặc TTG sử dụng vectơ điều chế theo ví dụ 1-2-2. Đã biết rằng codon GTG hoặc TTG có hiệu suất biểu hiện protein thấp hơn so với codon ATG.

Ví dụ 1-2-1: Điều chế vectơ để xóa gen mã hóa protein họ WhiB

Để điều chế vectơ cho mục đích xóa gen mã hóa protein họ WhiB, mỗi đoạn gen (xóa-A và xóa-B) được thu được bằng cách thực hiện PCR sử dụng ADN bộ gen của chủng ATCC 6872 làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4 và cặp mồi SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6, tương ứng. Cụ thể, PCR được thực hiện trong các điều kiện như sau: biến tính ở 94°C trong 5 phút; 25 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút; và kéo dài ở 72°C trong 7 phút.

Kết quả là, hai đoạn polynucleotit (tức là, đoạn xóa A 1.026 bp và đoạn xóa B 1.044 bp) có thể thu được. PCR chồng lặp được thực hiện sử dụng hai đoạn làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 6, và do đó sản phẩm PCR 2.050 bp (sau đây, gọi là "đoạn xóa") được thu.

Đoạn xóa thu được được xử lý với enzym giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA, Hoa Kỳ) và được nối với vectơ pDZ, được xử lý với cùng enzym giới hạn, sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA, Hoa Kỳ). Gen đã điều chế được biến nạp vào *E. coli* DH5α, và các thể biến nạp được chọn lọc trên môi trường LB chứa kanamyxin, và sau đó ADN được thu sử dụng kit ADN tổng số plasmit ADN-spin (iNtRON).

Vectơ được điều chế bằng phương pháp nêu trên, nhằm mục đích để xóa gen mã hóa protein họ WhiB, được đặt tên là "xóa -pDZ".

Ví dụ 1-2-2: Điều chế vectơ để giảm biểu hiện của protein họ WhiB

Để điều chế vectơ với mục đích làm yếu gen mã hóa protein họ WhiB, mã khởi đầu chủng ATCC 6872 (tức là, ATG) được sửa đổi thành TTG hoặc GTG.

Trước tiên, để điều chế chủng trong đó codon khởi đầu được sửa đổi thành TTG, mỗi đoạn gen (alt-A và alt-B có condon khởi đầu được sửa đổi thành TTG hoặc GTG) được thu bằng cách thực hiện PCR sử dụng ADN bộ gen của chủng ATCC 6872 làm mạch khuôn với cùng cặp mồi SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 và cặp mồi SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10, tương ứng. Kết quả là, có thể thu được hai polynucleotit (tức là, đoạn alt-A 974 bp và đoạn alt-B 982 bp). PCR chồng lặp được thực hiện sử dụng hai đoạn đó làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 10, và do

đó, sản phẩm PCR 1.955 bp (sau đây, gọi là "đoạn alt") được thu.

Ngoài ra, để điều chế chủng trong đó codon khởi đầu được sửa đổi thành GTG, mỗi đoạn gen (alt-A và alt-B) được thu bằng cách thực hiện phản ứng PCR sử dụng ADN bộ gen của chủng ATCC 6872 làm mạch khuôn với cặp mồi SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 11 và cặp mồi SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 10, tương ứng. Kết quả là, thu được hai polynucleotit (tức là, đoạn alt-A 974 bp và đoạn alt-B 982 bp). PCR chồng lặp được thực hiện sử dụng hai đoạn đó làm mạch khuôn cùng với cặp mồi SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 10, và do đó, sản phẩm PCR 1.955 bp (sau đây, gọi là "đoạn alg") được thu.

Trong khi đó, các điều kiện của mỗi phản ứng PCR đều giống nhau như sau: biến tính ở 94°C trong 5 phút; 25 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ để gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 2 phút; và kéo dài ở 72°C trong 7 phút.

Các đoạn gen thu được được xử lý với enzym giới hạn XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA, Hoa Kỳ) và được nối với vectơ pDZ, đã được xử lý với cùng enzym giới hạn sử dụng T4 ligaza (New England Biolabs, Beverly, MA, HOA KỲ). Mỗi gen đã điều chế được biến nạp vào *E. coli* DH5α, và các thể biến nạp được lựa chọn trên môi trường LB chứa kanamyxin, và sau đó ADN được thu hồi sử dụng kit ADN tổng số plasmit ADN-spin (iNtRON).

Các vectơ điều chế bằng phương pháp nêu trên, mục đích làm yếu gen mã hóa protein họ WhiB, được đặt tên là "pDZ-alt" và "pDZ-alg", tương ứng.

Trong khi đó, trình tự của các đoạn mồi sử dụng cho điều chế các vectơ được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

SEQ ID NO: 3	TGCTCTAGA GATCTAGCACGCCTAAAGAGTCG
SEQ ID NO: 4	GTAGGTGTCCGCCTGAGTTG
SEQ ID NO: 5	CAACTCAGGCGGACACCTAC TCACTAACTGGGCTGATTATCTCG
SEQ ID NO: 6	TGCTCTAGAGGTGCCCTTCATCATCAGGT
SEQ ID NO: 7	CGC GGA TCC CAGCCATTAGGTAAGGTGCTTG
SEQ ID NO: 8	AGAGGCGTATTCACGCTCTG

SEQ ID NO: 9	CAGAGCGTGAATACGCCTC TTGAGATTATGTGTGGATAAGCAGAAG
SEQ ID NO: 10	CGC GGA TCC CGAGGATACAAAGCCCACGA
SEQ ID NO: 11	CGAGGCGTATTCACGCTCTG
SEQ ID NO: 12	CAGAGCGTGAATACGCCTC GTGAGATTATGTGTGGATAAGCAGAAG

Ví dụ 2: Điều chế chủng trong đó protein họ WhiB bị bất hoạt, sử dụng chủng hoang dại sản sinh các nucleotit purin và đánh giá khả năng sản sinh nucleotit purin của chúng

Ví dụ 2-1: Điều chế chủng, trong đó protein họ WhiB bị bất hoạt, sử dụng chủng có nguồn gốc hoang dại sản sinh XMP trong số các nucleotit purin.

Hai loại vectơ (tức là, pDZ-alt và pDZ-alg) được điều chế theo ví dụ 1 được biến nạp riêng lẻ từng vectơ vào chủng *Corynebacterium stationis* KCCM-10530 (patent Hàn Quốc số 10-0542568) bằng phương pháp điện biến nạp, và trước tiên các khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường chọn lọc chứa kanamyxin (25 mg/L) được chọn lọc.

Sau đó, các chủng trong đó gen mã hóa protein họ WhiB bị xóa hoặc codon khởi đầu bị sửa đổi thành dạng suy yếu (tức là, ATG→TTG hoặc ATG→GTG), được thu thông qua quá trình trao đổi chéo thứ cấp sử dụng sự tương đồng giữa gen nội sinh của các chủng và các polynucleotit chứa trong các vectơ nêu trên.

Trong khi đó, chủng trong đó gen mã hóa protein họ WhiB bị xóa được lựa chọn sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 6. Khi PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi trên, chủng hoang dại tạo ra đoạn 1.680 bp, còn trong chủng xóa gen, đoạn 1.414 bp được tìm thấy.

Ngoài ra, chủng trong đó gen mã hóa protein họ WhiB bị làm yếu được lựa chọn trên cơ sở PCR bắt cặp không đặc hiệu. Đột biến 'ATG→TTG' được lựa chọn sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 6, trong khi đột biến 'ATG→GTG' được lựa chọn sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 6. Vì mỗi đoạn mồi SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15 bao gồm T hoặc G ở đầu tận cùng 3' thay vì A như trình tự nucleotit của chủng hoang dại, các đoạn PCR được cho phép phát hiện chỉ khi chúng đột biến. Các chủng được xác nhận trước tiên bởi PCR bắt cặp không đặc hiệu được xác nhận cuối cùng thông qua phân tích trình tự của gen.

Cuối cùng, các chủng thu được bằng phương pháp trên được đặt tên như sau: chủng trong đó gen mã hóa protein họ WhiB bị xóa được đặt tên là "CN02-1545"; chủng trong đó gen trên bị suy yếu do thay đổi của codon khởi đầu thành dạng TTG được đặt tên là "CJX-1546"; và chủng trong đó gen trên bị suy yếu do thay đổi của codon khởi đầu thành dạng GTG được đặt tên là "CJX-1547".

Trong khi đó, các trình tự của các đoạn mồi được sử dụng để điều chế các chủng được thể hiện trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

SEQ ID NO: 13	CATGTTGTTGCCCTCGGAATC
SEQ ID NO: 14	CGTGAATACGCCTCT
SEQ ID NO: 15	CGTGAATACGCCTCG

Trong khi đó, chủng CN02-1545 được ký gửi vào ngày 07 tháng 11 năm 2017 tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM- Korean Culture Center of Microorganisms), Cơ quan Đăng ký Quốc tế theo Hiệp ước Budapest, với số đăng ký KCCM12152P.

Ví dụ 2-2: Đánh giá khả năng sản sinh XMP của chủng trong đó protein họ WhiB bị bất hoạt

Để đánh giá khả năng sản sinh XMP của chủng *Corynebacterium stationis* KCCM-10530, sản sinh XMP trong số các nucleotit purin, và các chủng CN02-1545, CJX-1546, và CJX-1547 được điều chế trong ví dụ 2-1, phương pháp nuôi cấy mô tả dưới đây được sử dụng.

Môi trường nuôi cấy giống dưới đây (5 mL) được đưa vào từng ống kiểm tra (đường kính: 18 mm) được hấp khử trùng theo phương pháp thông thường, được cấy với chủng sử dụng, và nuôi cấy lắc ở 30°C, 180 vòng/phút trong 18 giờ. Kết quả được sử dụng làm dung dịch nuôi cấy giống. Trong dụng cụ lên men, môi trường chính và môi trường vô trùng thêm vào được hấp khử trùng riêng theo phương pháp thông thường, và đưa vào bình Erlenmeyer 500 mL để lắc, được hấp khử trùng trước, trong lượng 29 mL và 10 mL, tương ứng, thực bào với dung dịch nuôi cấy giống (1 mL) và nuôi cấy trong 72 giờ. Tốc độ vòng quay được điều chỉnh ở 200 vòng/phút và nhiệt độ được điều chỉnh thành 30°C.

Thành phần môi trường được sử dụng như sau. Lượng XMP sản xuất được đo bằng phương pháp sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (High performance liquid chromatography: HPLC) sau khi hoàn thành nuôi cấy, và kết quả được thể hiện trong bảng 3 bên dưới. Nồng độ tích lũy của XMP được biểu thị là "5'-natri xanthylat·$7H_2O$".

Môi trường giống bình XMP

Glucoza 30 g/L, pepton 15 g/L, cao nấm men 15 g/L, NaCl 2,5 g/L, ure 3 g/L, adenin 150 mg/L, guanin 150 mg/L, độ pH 7,2

Môi trường sản xuất bình XMP (môi trường chính)

Glucoza 60 g/L, magie sunfat 10 g/L, canxi clorit 10 mg/L, sắt sunfat 20 mg/L, mangan sunfat 10 mg/L, kẽm sunfat 10 mg/L, đồng sunfat 1 mg/L, biotin 100 µg/L, thiamin 5 mg/L, adenin 30 mg/L, guanin 30 mg/L, độ pH 7,2

Môi trường sản xuất bình XMP (môi trường khử trùng bổ sung)

Kali đihyđrogen phosphat 10 g/L, đikali hyđrogen phosphat 10 g/L, ure 7 g/L, amoni sunfat 5 g/L

Bảng 3

Số chủng	XMP (g/L)	Năng suất (g/L/giờ)
KCCM10530	11,8	0,148
CN02-1545	13,1	0,191
CJX-1546	12,3	0,188
CJX-1547	12,5	0,198

Cụ thể, trong bảng 3, năng suất tương ứng với lượng XMP sản xuất trong đơn vị 1 giờ tại thời điểm 48 giờ sau khi hoàn thành nuôi cấy.

Như thể hiện ở bảng 3, đã xác nhận rằng chủng bố mẹ (tức là, chủng KCCM10530) sản xuất XMP ở nồng độ 11,8 g/L sau khi hoàn thành nuôi cấy bình; chủng CN02-1545 cho thấy lượng XMP sản xuất tăng 1,3 g/L; chủng CJX-1546 cho thấy lượng XMP sản xuất tăng 0,5 g/L; và chủng CJX-1547 cho thấy lượng XMP sản xuất tăng 0,7 g/L. Các kết quả đã xác nhận rằng lượng XMP sản xuất của các chủng trên được tăng tương ứng 11%, 4% và 6% so với chủng bố mẹ.

Ngoài ra, trong khi chủng bố mẹ (tức là, chủng KCCM10530) cho thấy năng suất 0,148 g/L/giờ, chủng CN02-1545 cho thấy năng suất là 0,191 g/L/giờ, chủng CJX-1546

cho thấy năng suất là 0,188 g/L/giờ, và chủng CJX-1547 cho thấy năng suất là 0,198 g/L/giờ. Các kết quả đã xác nhận rằng năng suất XMP của các chủng trên tăng tương ứng là 29%, 27% và 34% so với chủng bố mẹ.

Những kết quả trên cho thấy rằng khi protein họ WhiB theo sáng chế bị bất hoạt trong chủng, sản lượng nucleotit purin được tăng thêm.

Ví dụ 3: Điều chế chủng trong đó protein họ WhiB bị bất hoạt, sử dụng chủng đột biến sản sinh nucleotit purin, trong đó gen của con đường sinh tổng hợp purin được tăng cường, và đánh giá khả năng sản sinh nucleotit purin của chúng

Ví dụ 3-1: Điều chế chủng trong đó protein họ WhiB bị bất hoạt, sử dụng chủng đột biến sản sinh XMP trong các nucleotit purin

Chủng trong đó gen mã hóa protein họ WhiB bị bất hoạt, được điều chế sử dụng chủng sản sinh XMP, trong đó gen của con đường sinh tổng hợp purin được tăng cường. Cụ thể là, chủng sản sinh XMP, trong đó gen của con đường sinh tổng hợp purin được tăng cường là chủng sửa đổi KCCM-10530 với *PurF* được tăng cường, là chủng trong đó condon khởi đầu của gen *purF* (tức là, GTG) được chuyển thành ATG. Chủng KCCM-10530 trong đó gen của con đường sinh tổng hợp purin, *purF*, được tăng cường, được đặt tên là CJX-1544 [KCCM-10530_*purF*(g1a)]. Chủng CJX-1544 [KCCM-10530_*purF*(g1a)] được biến nạp với vectơ xóa pDZ, là vectơ tái tổ hợp điều chế trong ví dụ 1, bằng phương pháp điện biến nạp. Các khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường chọn lọc chứa kanamyxin (25 mg/L) được lựa chọn trước tiên.

Sau đó, chủng trong đó gen mã hóa protein họ WhiB bị xóa được thu hồi thông qua quá trình trao đổi chéo thứ cấp sử dụng sự tương đồng giữa gen nội sinh của chủng trên và polynucleotit chứa trong vectơ nêu trên. Trong khi đó, chủng trong đó gen mã hóa protein họ WhiB bị xóa được thu hồi theo cùng phương thức như ví dụ 2 sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 6.

Cuối cùng, chủng trong đó gen mã hóa protein họ WhiB bị xóa, được thu hồi bằng phương pháp nêu trên, được đặt tên là "CJX-1553".

Ví dụ 3-2: Đánh giá khả năng sản sinh XMP trong các nucleotit purin của chủng trong đó gen mã hóa protein họ WhiB bị bất hoạt

Để đo khả năng sản sinh XMP của chủng CJX-1544 trong đó gen của con đường

sinh tổng hợp purin (tức là, *purF*) được tăng cường, và chủng CJX-1552 điều chế trong ví dụ 3-1, phương pháp nuôi cấy như trong ví dụ 2-2 được sử dụng. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, lượng XMP sản sinh trong mỗi chủng được đo bằng phương pháp sử dụng HPLC, và các kết quả được thể hiện trong bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Số chủng	XMP (g/L)	Năng suất (g/L/giờ)
CJX-1544	14,0	0,183
CJX-1553	15,5	0,212

Cụ thể, trong bảng 4, năng suất tương ứng với lượng XMP sản xuất trong đơn vị 1 giờ ở thời điểm 48 giờ sau khi hoàn thành nuôi cấy.

Như thể hiện trong bảng 4, đã xác nhận rằng lượng XMP sản xuất ở chủng CJX-1553 được tăng 1,5 g/L so với chủng bố mẹ (tức là, CJX-1544) trong đó nhân tố con đường sinh tổng hợp purin được tăng cường. Kết quả trên xác nhận rằng lượng XMP sản sinh ở chủng CJX-1553 được cải thiện 10,7% so với chủng bố mẹ (tức là, CJX-1544)

Ngoài ra, đã xác nhận rằng chủng bố mẹ (tức là, CJX-1544) thể hiện năng suất là 0,183 g/L/giờ và chủng CJX-1553 thể hiện năng suất là 0,212 g/L/giờ. Kết quả trên xác nhận rằng năng suất XMP của chủng CJX-1553 được cải thiện là 16% so với chủng bố mẹ (tức là, CJX-1544).

Ví dụ 4: Điều chế chủng, trong đó protein họ WhiB bị bất hoạt, sử dụng chủng hoang dại sản sinh nucleotit purin, và đánh giá khả năng sản sinh nucleotit purin của chúng

Ví dụ 4-1: Điều chế chủng trong đó protein họ WhiB bị bất hoạt sử dụng chủng nguồn gốc hoang dại sản sinh IMP trong số các nucleotit purin

Hai loại vectơ (tức là, pDZ-alt và pDZ-alg) điều chế theo ví dụ 1 được biến nạp riêng lẻ từng vectơ vào chủng *Corynebacterium stationis* KCCM-10610 (patent Hàn Quốc số 10-0588577) bằng phương pháp điện biến nạp, và các khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường chọn lọc chứa kanamyxin (25 mg/L) được lựa chọn trước tiên.

Sau đó, các chủng trong đó codon khởi đầu của gen mã hóa protein họ WhiB bị biến đổi thành dạng suy yếu (tức là, ATG→TTG hoặc ATG→GTG), được thu thông qua quá trình trao đổi chéo thứ cấp sử dụng sự tương đồng giữa gen nội sinh của chủng

và các polynucleotit chứa trong các vectơ trên.

Chủng trong đó gen mã hóa cho protein họ WhiB bị làm suy yếu được lựa chọn trên cơ sở PCR bắt cặp không đặc hiệu. Đột biến 'ATG→TTG' được lựa chọn sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 6, trong khi đó đột biến 'ATG→GTG' được lựa chọn sử dụng cặp mồi SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 6. Vì mỗi đoạn mồi SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15 chứa T hoặc G ở đầu tận cùng 3' thay vì A, là trình tự nucleotit của chủng hoang dại, các đoạn PCR được cho phép phát hiện chỉ khi chúng đột biến. Các chủng được xác nhận đầu tiên bởi PCR bắt cặp không đặc hiệu được xác nhận cuối cùng thông qua phân tích trình tự của gen.

Cuối cùng, các chủng thu hồi bằng phương pháp trên được đặt tên như sau: tức là, chủng trong đó gen mã hóa protein họ WhiB bị làm yếu vì thay đổi codon mở đầu thành dạng TTG được đặt tên là "CJ-2078"; và chủng trong đó gen trên bị làm yếu do thay đổi codon khởi đầu thành dạng GTG được đặt tên là "CJI-2077".

Ví dụ 4-2: Đánh giá khả năng sản sinh IMP trong các nucleotit purin của chủng trong đó protein họ WhiB bị bất hoạt

Để đo khả năng sản sinh IMP của chủng *Corynebacterium stationis* KCCM-10610, là chủng sản sinh IMP trong các nucleotit purin, và các chủng CJI-2078 và CJI-2077 điều chế trong ví dụ 4-1, phương pháp nuôi cấy mô tả ở trên được sử dụng.

Môi trường nuôi cấy giống dưới đây (5 mL) được đưa vào từng ống kiểm tra hấp khử trùng (đường kính: 18 mm), nuôi cấy lắc ở 30° trong 24 giờ, và kết quả được sử dụng làm dung dịch nuôi cấy giống. Môi trường sản xuất (29 ml) được đưa vào trong bình Erlenmeyer 250 mL để lắc, được hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút, và được cấy với dung dịch nuôi cấy giống (2 mL) và nuôi cấy trong 4 đến 5 ngày. Các điều kiện nuôi cấy như sau: tốc độ vòng quay được đặt ở 170 vòng/phút, nhiệt độ đượcđặt ở 30°C và độ pH điều chỉnh thành 7,5.

Các thành phần môi trường sử dụng như sau. Lượng IMP sản xuất được đo bằng phương pháp sử dụng HPLC sau khi hoàn thành nuôi cấy, và các kết quả được thể hiện trong bảng 5.

Môi trường nuôi cấy giống IMP

Glucoza 10 g/L, pepton 10 g/L, cao thịt 10 g/L, cao nấm men10 g/L, NaCl 2,5 g/L,

adenin 100 mg/L, guanin 100 mg/L, độ pH 7,2

Môi trường sản xuất bình IMP

Muối natri glutamat 1 g/L, amoni clorit 10 g/L, magie sunfat 12 g/L, canxi clorit 0,1 g/L, sắt sunfat 20 mg/L, mangan sunfat 20 mg/L, kẽm sunfat 20 mg/L, đồng sunfat 5 mg/L, L-xystein 23 mg/L, alanin 24 mg/L, axit nicotinic 8 mg/L, biotin 45 µg/L, thiamin HCl 5 mg/L, adenin 30 mg/L, axit phosphoric (85%) 19 g/L, glucoza 26 g/L, fructoza 14 g/L (bổ sung)

Bảng 5

Số chủng	IMP (g/L)
KCCM-10610	11,2
CJI-2078	11,7
CJI-2077	11,4

Như thể hiện trong bảng 5 ở trên, đã xác nhận rằng lượng IMP sản xuất được tăng là 0,5 g/L ở chủng CJI-2078 và là 0,2 g/L ở chủng CJI-2077, so với chủng bố mẹ chúng (tức là, KCCM-10610). Các kết quả xác nhận rằng lượng IMP sản xuất được cải thiện ở các chủng tương ứng là 4,5% và 1,8% so với chủng bố mẹ chúng.

Ví dụ 5: Điều chế chủng trong đó protein họ WhiB bị bất hoạt sử dụng chủng đột biến sản sinh nucleotit purin, trong đó gen của con đường sinh tổng hợp purin được tăng cường, và đánh giá khả năng sản sinh nucleotit purin của chúng

Ví dụ 5-1: Điều chế chủng trong đó protein họ WhiB bị bất hoạt, sử dụng chủng đột biến sản sinh IMP trong các nucleotit purin

Chủng trong đó protein họ WhiB bị bất hoạt, được điều chế sử dụng chủng sản sinh IMP, trong đó gen của con đường sinh tổng hợp purin được tăng cường. Cụ thể là, chủng sản sinh IMP, trong đó gen của con đường sinh tổng hợp purin được tăng cường, là chủng sửa đổi KCCM-10610 có *PurF* (tức là, gen của con đường sinh tổng hợp purin) được tăng cường, là chủng trong đó codon khởi đầu của gen *purF* (tức là, GTG) được chuyển thành ATG. Chủng KCCM-10610 trong đó gen của con đường sinh tổng hợp purin, *purF*, được tăng cường, được đặt tên là CJI-1964[KCCM-10610_*purF*(g1a)]. Chủng CJI-1964[KCCM-10610_*purF*(g1a)] được biến nạp với hai vectơ (tức là, pDZ-alt và pDZ-alg) điều chế trong ví dụ 1, bằng điện biến nạp, và các chủng trong đó codon khởi đầu của gen mã hóa protein họ WhiB được sửa đổi thành dạng suy yếu (tức là,

ATG→TTG hoặc ATG→GTG), được thu hồi theo cách thức tương tự như trong ví dụ 4-1.

Cuối cùng, các chủng thu hồi bằng phương pháp trên được đặt tên như sau: tức là, chủng trong đó gen mã hóa protein họ WhiB bị suy yếu do thay đổi của codon khởi đầu thành dạng TTG được đặt tên là "CJI-2081", và chủng trong đó gen nêu trên bị suy yếu do thay đổi của codon khởi đầu thành dạng GTG được đặt tên là "CJI-20080".

Ví dụ 5-2: Đánh giá khả năng sản sinh IMP trong các nucleotit purin của chủng trong đó protein họ WhiB bị bất hoạt

Để đo khả năng sản sinh của chủng CJI-1964, trong đó gen của con đường sinh tổng hợp purin được tăng cường, và các chủng CJI-2081 và CJI-20080 điều chế trong ví dụ 5-1, sử dụng phương pháp nuôi cấy như trong ví dụ 4-2. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, lượng IMP sản xuất trong mỗi chủng được đo bằng phương pháp sử dụng HPLC, và các kết quả được thể hiện trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

Số chủng	IMP (g/L)
CJI-1964	11,4
CJI-2081	12,3
CJI-2080	12,1

Như thể hiện trong bảng 6, đã xác nhận rằng lượng IMP sản xuất tăng là 0,9 g/L ở chủng CJI-2081 và là 0,7 g/L ở chủng CJI-2080 so với chủng bố mẹ chúng (tức là, CJI-1964). Các kết quả đã xác nhận rằng lượng IMP sản xuất được cải thiện trong các chủng tương ứng là 7,8% và 6,1% so với chủng bố mẹ chúng.

Tức là, đã xác nhận rằng khi điều chỉnh phiên mã protein họ WhiB bị bất hoạt trong chủng, chủng có thể sản sinh các nucleotit purin năng suất cao hơn so với chủng bố mẹ hoặc các vi sinh vật không sửa đổi khác. Ngoài ra, các kết quả chỉ ra rằng khi protein họ WhiB bị bất hoạt trong chủng, chủng có thể sản sinh các nucleotit purin năng suất cao hơn so với chủng bố mẹ hoặc các vi sinh vật không sửa đổi khác.

Thông qua phần mô tả ở trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng của sáng chế sẽ có thể hiểu rằng sáng chế có thể được thể hiện dưới các hình thức cụ thể khác mà không thay đổi các nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Do đó, các phương án ưu tiên được mô tả ở đây chỉ nhằm mục đích minh

họa và không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngược lại, sáng chế không chỉ bao gồm các phương án ưu tiên khác mà còn bao gồm nhiều phương án, sửa đổi, tương đương và các phương án khác có thể nằm trong nguyên lý kỹ thuật và phạm vi bảo hộ của sáng chế như đã được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật *Corynebacterium stationis* sản sinh nucleotit purin, trong đó vi sinh vật này có protein chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 bị bất hoạt.

2. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó nucleotit purin ít nhất là một nucleotit purin được lựa chọn từ 5'-inosin monophosphat (IMP), 5'-xanthosin monophosphat (XMP), 5'-guanosin monophosphat (GMP), và 5'-ađenylic axit (AMP).

3. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó trong *Corynebacterium stationis*, con đường sinh tổng hợp nucleotit purin được tăng cường.

4. Vi sinh vật theo điểm 3, trong đó sự tăng cường con đường sinh tổng hợp nucleotit purin là tăng cường hoạt tính của protein amidophosphoribosyltransferaza (*PurF*).

5. Phương pháp sản xuất nucleotit purin bao gồm nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium stationis* theo điểm bất kỳ từ 1 đến 4 trong môi trường.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó nucleotit purin ít nhất là một nucleotit purin được lựa chọn từ 5'-inosin monophosphat (IMP), 5'-xanthosin monophosphat (XMP), 5'-guanosin monophosphat (GMP), và 5'-ađenylic axit (AMP).

7. Phương pháp theo điểm 5, trong đó phương pháp này còn bao gồm thu hồi nucleotit purin từ *Corynebacterium stationis* được nuôi cấy hoặc môi trường sau khi nuôi cấy.

8. Phương pháp tăng cường sản xuất nucleotit purin bao gồm bất hoạt protein gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> VI SINH VẬT *CORYNEBACTERIUM STATIONIS* SẢN SINH NUCLEOTIT PURIN, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT NUCLEOTIT PURIN, VÀ PHƯƠNG PHÁP TĂNG CƯỜNG SẢN XUẤT NUCLEOTIT PURIN

<130> OPA18458

<150> PCT/KR2019/001117
<151> 2019-01-25

<160> 15

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
<211> 121
<212> PRT
<213> Corynebacterium sp.

<400> 1
Met Arg Leu Cys Val Asp Lys Gln Lys Glu Arg Gln Met Thr Val Ser
1 5 10 15

Leu Lys Met Ser Thr Gln Ala Asp Thr Tyr Asn Ala Thr Thr Pro Glu
20 25 30

Arg Gly Glu Trp Val Thr Gln Ala Lys Cys Arg Asn Gly Asp Pro Asp
35 40 45

Ala Leu Phe Val Arg Gly Ala Glu Gln Arg Lys Ala Ala Val Ile Cys
50 55 60

Arg His Cys Pro Val Leu Asn Glu Cys Arg Ala Asp Ala Leu Asp Asn
65 70 75 80

Arg Val Glu Phe Gly Val Trp Gly Gly Leu Thr Glu Arg Gln Arg Arg
85 90 95

Ala Leu Leu Arg Lys Asn Pro His Ile Thr Asn Trp Ala Asp Tyr Leu
100 105 110

Ala Gln Gly Gly Glu Leu Glu Gly Ile
115 120

<210> 2
<211> 366
<212> ADN
<213> Corynebacterium sp.

<400> 2
atgagattat gtgtggataa gcagaaggag cgccagatga ccgtgagctt gaagatgtca 60

actcaggcgg acacctacaa tgcgacaacc ccagaacgcg gggagtgggt gacgcaagct 120

aagtgtcgaa atggtgaccc tgatgcactt tttgtgcgcg gtgcggagca gcgtaaagct 180

gccgttattt gccgtcactg tcctgtcctt aatgaatgtc gagcagatgc tctagataac 240

cgcgtggaat tcggtgtctg gggcggacta actgagcgcc agcgccgtgc gttgctgcgc 300

aaaaacccac acatcactaa ctgggctgat tatctcgccc aaggtggaga actagaagga 360

atctaa 366

<210> 3
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 3
tgctctagag atctagcacg cctaaagagt cg 32

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 4
gtaggtgtcc gcctgagttg 20

<210> 5
<211> 44
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 5
caactcaggc ggacacctac tcactaactg ggctgattat ctcg 44

<210> 6
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 6
tgctctagag gtgcccttca tcatcaggt 29

<210> 7
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 7
cgcggatccc agccattagg taaggtgctt g 31

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 8
agaggcgtat tcacgctctg 20

<210> 9
<211> 46
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 9
cagagcgtga atacgcctct tgagattatg tgtggataag cagaag 46

<210> 10
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 10
cgcggatccc gaggatacaa agcccacga 29

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 11
cgaggcgtat tcacgctctg 20

<210> 12
<211> 46
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 12
cagagcgtga atacgcctcg tgagattatg tgtggataag cagaag 46

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 13
catgttgttg ccctcggaat c 21

<210> 14
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 14
cgtgaatacg cctct 15

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

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 15
cgtgaatacg cctcg 15