



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

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

(11)



1-0038974

(51)⁸ C12N 15/77; C12P 13/08

(13) B

(21) 1-2018-00344

(22) 27/06/2016

(86) PCT/KR2016/006833 27/06/2016

(87) WO2017/007159 12/01/2017

(30) 10-2015-0095528 03/07/2015 KR

(45) 26/02/2024 431

(43) 26/04/2018 361A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) LEE Peter (KR); KIM Hyung Joon (KR); CHOI Hyang (KR); RYU Song Gi (KR);
LEE Sang Mok (KR).

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

(54) VI SINH VẬT SẢN XUẤT L-LYSIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-LYSIN
BẰNG CÁCH SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản xuất L-lysine và phương pháp sản xuất L-lysine bằng cách sử dụng vi sinh vật này. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, được cải biến để hoạt tính của protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt so với hoạt tính nội sinh của nó; và phương pháp sản xuất L-lysine bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản xuất L-lysine và phương pháp sản xuất L-lysine bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit L-amino, đặc biệt là L-lysine, được sử dụng trong thức ăn gia súc, các chất điều trị cho người hoặc ngành công nghiệp mỹ phẩm chủ yếu được sản xuất nhờ quá trình lên men bằng cách sử dụng chủng thuộc chi *Corynebacterium* hoặc chủng thuộc chi *Escherichia*. Do đó, nhiều nghiên cứu đang được thực hiện để phát triển các chủng sản xuất L-lysine với hiệu suất cao và công nghệ lên men chúng. Tuy nhiên, nghiên cứu về việc kiểm soát quá trình phân giải tế bào, mà có thể làm giảm hiệu suất trong các giai đoạn sau của quá trình lên men, vẫn chưa có đủ.

Trong khi đó, đã biết hydrolase của thành tế bào là enzyme làm suy biến thành tế bào vi khuẩn, và có mặt trong tất cả các vi sinh vật có peptidoglycan (Rice KC and Bayles KW *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008. 72: 85-109). Mặc dù nghiên cứu về hydrolase của thành tế bào đã được thực hiện ở nhiều loại vi khuẩn khác nhau, vẫn chưa biết cơ chế kiểm soát chính xác chúng.

Mô hình cho cơ chế phân giải tế bào xảy ra trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật gần đây đã được đề cập đến trong phết cầu (Mellroth P et al., *J Biol Chem* 2012. 287: 11018-29). Cụ thể, khi các tế bào chịu các tác động khác nhau, hoạt tính của hydrolase của thành tế bào có trên thành bên ngoài của tế bào gia tăng, do đó bắt đầu phân hủy thành tế bào. Khi các tế bào được hòa tan do sự hoạt động liên tục của hydrolase của thành tế bào này, hydrolase của thành tế bào có trong tế bào chất sẽ tiếp xúc với phần bên ngoài của tế bào. Đã có thông báo rằng các tế bào xung quanh được hòa tan khi một loạt quá trình xảy ra liên tục làm cho lượng hydrolase của thành tế bào vượt quá ngưỡng bên ngoài của tế bào. Tuy nhiên, vẫn chưa biết về sự tương quan giữa mức phân giải của tế bào đã được tạo ra trong quá trình nuôi cấy bằng cách lên men và sự sản xuất axit amin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã nỗ lực nghiên cứu liên tục nhằm tìm ra tính trạng hữu hiệu

có khả năng làm tăng khả năng sản xuất L-lysine ở vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, mà đại diện là chủng sản xuất L-lysine. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã xác định được rằng khả năng sản xuất L-lysine tăng khi gen mã hóa protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào bị thiếu hụt và sự tăng hiệu suất lysine bị ảnh hưởng khi một gen bổ sung mã hóa protein có chức năng tương tự bị thiếu hụt, nhờ đó đã tạo ra sáng chế này.

Theo một mục đích, sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất L-lysine.

Theo một mục đích khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất L-lysine bằng cách sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, mà sản xuất L-lysine.

Vi sinh vật theo sáng chế là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, được cải biến để hoạt tính của protein liên quan đến quá trình thủy phân thành tế bào bị giảm hoặc bị bất hoạt so với hoạt tính nội sinh của nó. Nghĩa là, vi sinh vật theo sáng chế là chủng vi sinh vật mới làm tăng hiệu suất trong giai đoạn sau của quá trình lên men, và do đó được dùng làm mô hình vi sinh vật mới thuộc chi *Corynebacterium*, mà sản xuất L-lysine, nhờ đó tạo ra vi sinh vật có khả năng sản xuất L-lysine với hiệu suất cao. Theo đó, L-lysine đã được tạo ra có thể được dùng không chỉ cho thức ăn gia súc hoặc phụ gia thức ăn gia súc mà còn cho các sản phẩm khác nhau như thực phẩm dùng cho người, phụ gia thực phẩm, thuốc, v.v.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để đạt được các mục đích nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* sản xuất L-lysine, được cải biến để hoạt tính của protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào bị bất hoạt so với hoạt tính nội sinh của nó.

Thuật ngữ “protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein liên quan có khả năng thủy phân thành tế bào ở vi khuẩn sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*. Protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào có thể là hydrolase liên kết với thành tế bào hoặc N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án này.

Như được mô tả nêu trên, khi protein có hoạt tính của protein liên quan có khả năng thủy phân thành tế bào ở vi sinh vật, protein và trình tự gen có thể thu được từ cơ sở dữ liệu đã biết. Ngoài ra, Genbank của NCBI, v.v. có thể được sử dụng làm ví dụ về cơ

sở dữ liệu đã biết này, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án này.

Hydrolaza liên kết với thành tế bào có thể là protein mã hóa gen NCgl1480, protein mã hóa gen NCgl2107, hoặc protein mã hóa gen NCgl2108 có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, cụ thể là từ *Corynebacterium glutamicum*, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án này. Theo một ví dụ cụ thể, hydrolaza liên kết với thành tế bào có thể chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3, nhưng có thể bao gồm trình tự protein có hoạt tính nêu trên mà không giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, trình tự nucleotit bất kỳ có thể được chứa trong đó mà không giới hạn phạm vi của sáng chế miễn là nó là trình tự nucleotit mã hóa protein có hoạt tính hydrolaza liên kết với thành tế bào. Theo một ví dụ cụ thể, protein này có thể là protein được mã hóa bởi trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, hoặc SEQ ID NO.7, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án này.

N-axetylmuramoyl-L-alanin amidaza có thể là protein mã hóa gen NCgl2986 có nguồn gốc từ vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, cụ thể là từ *Corynebacterium glutamicum*. Cụ thể là, N-axetylmuramoyl-L-alanin amidaza có thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4, nhưng trình tự axit amin bất kỳ của protein có hoạt tính nêu trên có thể cũng bao gồm mà không giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, trình tự nucleotit bất kỳ có thể cũng bao gồm mà không giới hạn phạm vi của sáng chế chừng nào trình tự nucleotit mã hóa protein có hoạt tính của N-axetylmuramoyl-L-alanin amidaza. Ví dụ, nó có thể là protein được mã hóa bởi trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.8, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án này.

Sáng chế có thể bao gồm mỗi protein được mô tả nêu trên mà không giới hạn phạm vi của sáng chế, ngoài trình tự axit amin được đại diện bởi SEQ ID NO.5, trình tự axit amin bất kỳ mà có mức tương đồng với các trình tự axit amin nêu trên là 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, và còn tốt hơn nữa là 97% hoặc cao hơn, chừng nào trình tự axit amin mã hóa protein có hiệu quả về cơ bản là bằng hoặc tương đương với mỗi protein. Ngoài ra, hiển nhiên là protein cải biến bất kỳ có mức tương đồng được mô tả nêu trên có thể nằm trong phạm vi của sáng chế, mặc dù protein có thể có trình tự axit amin bị khuyết đoạn, cải biến, thay thế, hoặc thêm đoạn một phần.

Ngoài ra, cũng có thể bao gồm gen mã hóa mỗi protein theo sáng chế mà không

giới hạn phạm vi của sáng chế, ngoài trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO.S, trình tự gen bất kỳ mã hóa protein mà có mức tương đồng với mỗi trình tự trong số các trình tự nucleotit nêu trên là 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, còn tốt hơn nữa là 98% hoặc cao hơn, và tốt nhất là 99% hoặc cao hơn, chừng nào trình tự gen mã hóa protein có hiệu quả về cơ bản là bằng hoặc tương đương với mỗi protein. Ngoài ra, hiển nhiên là trình tự nucleotit bất kỳ có các mức tương đồng nêu trên có thể nằm trong phạm vi của sáng chế, mặc dù trình tự này có thể bị khuyết đoạn, cải biến, thay thế, hoặc thêm đoạn một phần.

Khi sử dụng trong bản mô tả này, “mức tương đồng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức tương tự về trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin của gen ghi mã cho protein. Khi mức tương đồng đủ cao, các sản phẩm của gen tương ứng có thể là giống nhau hoặc có hoạt tính tương tự. Tức là, nó dùng để chỉ tỷ lệ đồng nhất giữa hai gốc polynucleotit hoặc polypeptit. Sự tương ứng về trình tự giữa một gốc này với một gốc khác có thể được xác định bằng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, tính đồng nhất có thể được xác định bằng cách sắp hàng thông tin trình tự của hai phân tử polynucleotit hoặc hai phân tử polypeptit trực tiếp bằng cách sử dụng chương trình máy tính sẵn có và có khả năng sắp hàng thông tin trình tự. Chương trình máy tính có thể là BLAST (NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlign™ (DNASTAR Inc), v.v.. Ngoài ra, mức tương đồng có thể được xác định bằng cách lai hóa polynucleotit trong điều kiện tạo thành sợi kép ổn định ở các vùng tương đồng và sau đó phân cắt sợi đã lai hóa bằng nucleaza đặc hiệu sợi đơn để xác định kích cỡ của phần đã phân cắt.

Thuật ngữ “hoạt tính nội sinh” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hoạt tính protein ở trạng thái trước khi vi sinh vật bị cải biến hoặc ở trạng thái nguyên thể.

Thuật ngữ “hoạt tính của enzym được cải biến để bất hoạt so với hoạt tính nội sinh của nó” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hoạt tính mà gen mã hóa enzym không được biểu hiện ở tất cả so với chủng đại hoặc chủng trước khi cải biến, hoặc dùng để chỉ việc giảm hoặc việc loại bỏ hoạt tính ngay cả khi gen được biểu hiện.

Thuật ngữ “sự bất hoạt hoạt tính so với hoạt tính nội sinh của nó” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc giảm hoặc khử bỏ hoạt tính khi so sánh với hoạt tính đã có ở trạng thái tự nhiên của nó hoặc trạng thái trước khi cải biến. Giảm là khái niệm dùng để chỉ trường hợp khi hoạt tính của enzym bị giảm so với hoạt tính đã có ban đầu của vi sinh

vật do sự cải biến ở gen mã hóa enzym, trường hợp khi mức biểu hiện của toàn bộ enzym là thấp hơn so với mức biểu hiện của chủng vi sinh vật tự nhiên hoặc chủng trước khi cải biến, hoặc kết hợp của chúng.

Thuật ngữ “khử bỏ hoạt tính” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trường hợp khi gen mã hóa enzym không được biểu hiện ở toàn bộ so với hoạt tính của chủng tự nhiên hoặc chủng trước khi cải biến, và/hoặc dùng để chỉ trường hợp khi gen được biểu hiện nhưng không có hoạt tính.

Phương pháp cải biến để bất hoạt hoạt tính enzym có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về các phương pháp này có thể bao gồm phương pháp thay thế gen mã hóa enzym trên nhiễm sắc thể bằng gen đột biến để hoạt tính enzym có thể được giảm, bao gồm trường hợp khi hoạt tính enzym được loại bỏ; phương pháp đưa cải biến vào trình tự điều hòa sự biểu hiện của gen mã hóa enzym trên nhiễm sắc thể; phương pháp thay thế trình tự điều hòa sự biểu hiện của gen mã hóa enzym bằng trình tự có hoạt tính yếu hoặc không có hoạt tính; phương pháp làm khuyết đoạn một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa enzym trên nhiễm sắc thể; phương pháp đưa vào oligonucleotit đối nghĩa (ví dụ, ARN đối nghĩa), để ức chế sự dịch mã từ mARN thành enzym nhờ gắn kết bổ thể với sản phẩm phiên mã của gen trên nhiễm sắc thể; phương pháp tạo ra sự gắn của ribosom mà không thể thực hiện được bằng cách tạo thành cấu trúc thứ cấp bằng cách bổ sung nhân tạo trình tự Shine-Dalgarno (SD) và trình tự bổ thể của nó ở đầu vào của trình tự SD của gen mã hóa enzym; phương pháp thao tác bằng di truyền quá trình phiên mã ngược (RTE), mà bổ sung gen tăng cường để được phiên mã ngược trên đầu kết thúc 3' của khung đọc mở (open reading frame - ORF) của trình tự tương ứng, v.v., và cũng bao gồm hỗn hợp của chúng, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án này.

Đặc biệt, phương pháp làm khuyết đoạn một phần hoặc toàn bộ gen mã hóa enzym có thể được thực hiện bằng cách thay thế polynucleotit, mà mã hóa protein đích nội sinh trong nhiễm sắc thể nhờ vector để cài xen nhiễm sắc thể vào vi sinh vật, với polynucleotit hoặc gen đánh dấu mà có một phần trình tự axit nucleic bị khuyết đoạn. Ví dụ, phương pháp làm khuyết đoạn gen bằng cách tái tổ hợp tương đồng có thể được sử dụng.

Thuật ngữ “một phần”, mặc dù nó có thể thay đổi tùy thuộc vào loại polynucleotit, có thể dùng để chỉ cụ thể 1 nucleotit đến 300 nucleotit, cụ thể hơn là 1 nucleotit đến 100

nucleotit, và thậm chí cụ thể hơn là 1 nucleotit đến 50 nucleotit, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án này.

Thuật ngữ “tái tổ hợp tương đồng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự tái tổ hợp gen xảy ra thông qua sự bắt chéo tại locut của sợi gen có mức tương đồng đột biến.

Theo phương án cụ thể, protein được bất hoạt bằng cách tái tổ hợp tương đồng.

Đặc biệt là, phương pháp cải biến trình tự điều hòa sự biểu hiện có thể được thực hiện bằng cách gây ra sự cải biến trên trình tự điều hòa sự biểu hiện thông qua sự khuyết đoạn, sự cài xen, sự thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn trình tự axit nucleic của trình tự điều hòa sự biểu hiện, hoặc kết hợp của chúng; hoặc có thể được thực hiện bằng cách thay thế trình tự bằng gen tăng cường yếu hơn. Trình tự điều hòa sự biểu hiện bao gồm gen tăng cường, trình tự điều khiển, trình tự mã hóa vị trí gắn kết ribosom, và trình tự điều hòa sự kết thúc quá trình phiên mã và dịch mã.

Ngoài ra, phương pháp cải biến gen trình tự trên nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng cách làm cải biến trong trình tự bằng cách gây khuyết đoạn, cài xen, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn trình tự gen, hoặc kết hợp các phương pháp này để làm giảm tiếp hoạt tính enzym; hoặc bằng cách thay thế trình tự bằng trình tự gen được cải thiện để có hoạt tính bổ sung yếu hơn hoặc bằng gen trình tự được cải thiện không có hoạt tính.

Thuật ngữ “vi sinh vật sản xuất L-lysin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chủng vi sinh vật có khả năng sản xuất L-lysin bằng cách lên men. Ví dụ, nó bao gồm chủng có khả năng làm tăng hiệu suất của L-lysin bằng cách làm cải biến trình tự nhờ thao tác bằng di truyền theo sáng chế để hoạt tính của protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt so với hoạt tính nội sinh của nó; và bằng cách điều hòa sự phân giải tế bào để tạo ra lysin, mà xảy ra trong quá trình lên men, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án này.

Theo sáng chế, vi sinh vật sản xuất L-lysin có thể bao gồm tất cả các vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, mà có khả năng được cải biến để hoạt tính của protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt so với hoạt tính nội sinh của nó. Ví dụ, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Brevibacterium flavum*, hoặc *Brevibacterium fermentum* có thể được

sử dụng, nhưng vi sinh vật không chỉ giới hạn ở đó. Ví dụ, *Corynebacterium glutamicum* có thể được sử dụng cho vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*. Vi sinh vật đã cải biến thuộc chi *Corynebacterium* khác biệt ở chỗ có khả năng sản xuất L-lysin tăng so với vi sinh vật không được cải biến để hoạt tính của protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt so với hoạt tính nội sinh của nó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất L-lysin, bao gồm: (i) nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, được cải biến để hoạt tính của protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt so với hoạt tính nội sinh của nó; và (ii) thu hồi L-lysin từ môi trường nuôi cấy hoặc vi sinh vật.

Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, mà có khả năng sản xuất L-lysin tăng, là như được mô tả nêu trên.

Thuật ngữ “môi trường nuôi cấy” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc nuôi cấy vi sinh vật trong các điều kiện môi trường nhân tạo có kiểm soát. Theo sáng chế, phương pháp nuôi cấy L-lysin bằng cách sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã biết rộng rãi trong lĩnh vực này. Cụ thể là, ví dụ về môi trường nuôi cấy bao gồm quy trình theo mẻ và quy trình theo mẻ nạp liệu hoặc quy trình theo mẻ nạp liệu lặp lại theo cách liên tục, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án này.

Môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy phải thỏa mãn các yêu cầu đối với chủng đặc biệt theo cách thích hợp (ví dụ, Manual of Methods for genral Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981). Nguồn cacbon mà có thể được sử dụng theo sáng chế có thể bao gồm đường và hydrat cacbon như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza; các dầu và chất béo như dầu đậu tương, dầu hoa hướng dương, dầu thầu dầu, và dầu dừa; các axit béo như axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic; các rượu như glyxerol và etanol; và axit hữu cơ như axit gluconic, axit axetic, và axit pyruvic, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án này. Các chất này có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng hỗn hợp. Nguồn nitơ mà có thể được sử dụng theo sáng chế có thể bao gồm pepton, dịch chiết nấm men, dịch chiết thịt, dịch chiết mạch nha, nước ngâm ngô, bánh đậu tương khử béo, và các hợp chất ure hoặc vô cơ như amoni sulfat, clorua amoni, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án này. Các nguồn nitơ này cũng có thể được sử

dùng một mình hoặc ở dạng hỗn hợp. Nguồn phospho mà có thể được sử dụng theo sáng chế có thể bao gồm kali dihydro phosphat hoặc đikali hydro phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án này. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể chứa muối kim loại như magie sulfat hoặc sắt sulfat, mà cần cho sự sinh trưởng. Cuối cùng, ngoài các chất được mô tả nêu trên, các yếu tố sinh trưởng thiết yếu như axit amin và vitamin có thể được sử dụng. Ngoài ra, các tiền chất thích hợp có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy. Các chất này có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy theo mẻ hoặc theo cách liên tục. Nhiều phương pháp nuôi cấy như vậy đã được bộc lộ, ví dụ, trong tài liệu chuyên ngành ("Biochemical Engineering" by James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp 138-176).

Các hợp chất bazơ như natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac, hoặc các hợp chất axit như axit phosphoric hoặc axit sulfuric có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy theo cách thích hợp để điều chỉnh độ pH của môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, chất chống tạo bọt như polyglycol este của axit béo có thể được sử dụng để ức chế sự tạo thành bọt. Để duy trì môi trường nuôi cấy ở trạng thái hiếu khí, khí oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ, không khí) có thể là được phun vào môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy có thể thường nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C, nhưng có thể được thay đổi tùy thuộc vào các điều kiện. Việc nuôi cấy có thể diễn ra liên tục cho đến khi lượng tối đa của axit amin L mong muốn được tạo ra, và thường đạt được trong khoảng thời gian từ 10 giờ đến 160 giờ. L-Lysin có thể được giải phóng vào môi trường nuôi cấy hoặc được chứa trong các tế bào.

Phương pháp sản xuất L-lysin theo sáng chế có thể bao gồm bước thu hồi lysin từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy. Các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này như ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, HPLC, v.v., có thể được sử dụng cho phương pháp thu hồi L-lysin từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy, nhưng phương pháp này không chỉ giới hạn ở đó.

Bước thu hồi có thể bao gồm quy trình tinh chế.

Trong phần dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết kết hợp với các phương án được lấy làm ví dụ. Tuy nhiên, các phương án được lấy làm ví dụ được đề cập trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng

ché.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Thiết kế thư viện thể đột biến ngẫu nhiên bằng cách sử dụng gen nhảy

Để thu được gen làm tăng hiệu suất lysin, thư viện vector được tạo ra bằng phương pháp sau. Plasmid thu được bằng cách sử dụng kit EZ-Tn5™<R6K_{ori}/KAN-2>Tnp Transposome™ (Epicentre) được biến nạp bằng cách sử dụng chủng KCCM11016P (vi sinh vật đã được định danh là KFCC10881 và được lưu giữ lại tại tổ chức lưu giữ quốc tế theo Hiệp ước Budapest, và sau đó được định danh theo số hiệu lưu giữ là KCCM11016P; Patent Hàn Quốc số 10-0159812) làm chủng gốc, và sau đó dàn mỏng trên đĩa môi trường tự nhiên chứa kanamycin (25 mg/L) để thu được khoảng 20,000 khuẩn lạc.

Đĩa môi trường tự nhiên (độ pH bằng 7,0)

10g glucoza, 10g pepton, 5g dịch chiết thịt bò, 5g dịch chiết nấm men, 18,5g canh thang não tim, 2,5g NaCl, 2 g ure, 91g sorbitol, 20g aga (tính theo 1L nước cất)

Ví dụ 2: Sàng lọc thư viện thể đột biến ngẫu nhiên bằng cách sử dụng gen nhảy

Mỗi 20.000 khuẩn lạc thu được trong ví dụ 1 được cấy vào môi trường chọn lọc (300 μ L), và được nuôi cấy trong đĩa 96 lỗ sâu ở 32°C ở tốc độ 1000 vòng/phút trong khoảng 24 giờ. Phương pháp ninhydrin được sử dụng để phân tích lượng L-lysine được tạo ra trong môi trường nuôi cấy (Moore, S., Stein, W. H., *Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids*. *J. Biol. Chem.* 1948, 176, 367-388). Khi hoàn thành việc nuôi cấy, dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy (10 μ L) và dung dịch phản ứng ninhydrin (190 μ L) được phản ứng ở 65°C trong 30 phút. Sau đó, độ hấp phụ được đo ở bước sóng 570 nm bằng cách sử dụng phổ quang kế, và khoảng 60 loại khuẩn lạc được chọn làm chủng cải biến có độ hấp phụ cao so với mẫu đối chứng, KCCM11016P. Các khuẩn lạc khác có độ hấp phụ tương tự hoặc giảm so với độ hấp phụ của mẫu đối chứng, chủng KCCM11016P.

60 loại của chủng đã chọn được nuôi cấy theo cách giống như nêu trên, và phản ứng ninhydrin được thực hiện lặp lại. Do đó, 10 chủng đứng đầu có khả năng sản xuất L-lysine tăng so với chủng KCCM11016P được chọn.

Môi trường chọn lọc (pH 8,0)

10g glucoza, 5,5g amoni sulfat, 1,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,8g KH_2PO_4 , 16,4g K_2HPO_4 , 100 μg biotin, 1000 μg thiamin HCl, 2000 μg canxi pantothenat, 2000 μg nicotinamit (tính theo 1L nước cất)

Ví dụ 3: Phân tích khả năng sản xuất L-lysin của các chủng đột biến ngẫu nhiên đã chọn

Để chọn lọc cuối cùng các chủng có khả năng sản xuất L-lysin tăng, thử nghiệm về hiệu suất được thực hiện trong bình cầu bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy dưới đây cho 10 loại của chủng được chọn trong ví dụ 2. 10 loại của chủng và mẫu đối chứng được cấy trong bình cầu ngăn góc (250mL) chứa môi trường nhân giống dưới đây (25mL), và được nuôi cấy kết hợp lắc ở nhiệt độ 30°C và tốc độ bằng 200 vòng/phút trong 20 giờ. Môi trường nhân giống và môi trường sản xuất có các thành phần sau. Khi hoàn thành việc nuôi cấy, nồng độ L-lysin trong dung dịch môi trường nuôi cấy được phân tích bằng cách sử dụng HPLC, và nồng độ L-lysin của mỗi chủng đột biến được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

Môi trường nhân giống (độ pH bằng 7,0)

20g glucoza, 10g pepton, 5g dịch chiết nấm men, 1,5g ure, 4g KH_2PO_4 , 8g K_2HPO_4 , 0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg biotin, 1000 μg thiamin HCl, 2000 μg canxi pantothenat, 2000 μg nicotinamit (tính theo 1L nước cất)

Môi trường sản xuất (độ pH bằng 7,0)

100g glucoza, 40g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5g protein đậu tương, 5g chất rắn ngô ngâm, 3g ure, 1g KH_2PO_4 , 0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg biotin, 1000 μg thiamin HCl, 2000 μg canxi pantothenat, 3000 μg nicotinamit, 30g CaCO_3 (tính theo 1L nước cất)

Bảng 1: Nồng độ L-Lysin của 10 chủng đột biến được chọn

	Chủng	L-Lysin (g/L)			
		Mê 1	Mê 2	Mê 3	Trung bình
Đối chứng	KCCM11016P	42,5	42,8	42,7	42,7
1	KCCM11016P/mt-1	48,8	48,9	48,5	48,7
2	KCCM11016P/mt-2	43,0	43,1	43,4	43,2
3	KCCM11016P/mt-3	42,7	43,1	42,9	42,9
4	KCCM11016P/mt-4	44,9	45,1	45,3	45,1
5	KCCM11016P/mt-5	44,3	44,1	44,0	44,1
6	KCCM11016P/mt-6	42,4	42,9	42,8	42,7

7	KCCM11016P/mt-7	43,8	43,2	43,7	43,6
8	KCCM11016P/mt-8	47,2	46,9	47,1	47,1
9	KCCM11016P/mt-9	44,1	44,4	44,2	44,2
10	KCCM11016P/mt-10	43,1	43,7	43,2	43,3

Trong số 10 thể đột biến đã chọn nêu trên, KCCM11016P/mt-1 và KCCM11016P/mt-8 cuối cùng được chọn làm chủng có khả năng sản xuất L-lysin được tăng một cách đáng kể.

Ví dụ 4: Xác nhận gen liên quan đến khả năng sản xuất L-lysin trong chủng được chọn cuối cùng và chọn lọc các gen ứng viên bổ sung

Trong ví dụ này, đã nỗ lực nhận diện các gen mà thiếu hụt do sự cài xen ngẫu nhiên gen nhảy từ chủng được chọn cuối cùng trong ví dụ 3. ADN bộ gen của KCCM11016P/mt-1 và KCCM11016P/mt-8 được chiết và sau đó được phân cắt. Sau đó, sản phẩm thu được được nối, biến nạp vào DH5a *E. coli*, và sau đó được dàn mỏng trên môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Sau khi chọn lọc 20 loại khuẩn lạc biến nạp, thu được các plasmit chứa phần gen chưa biết, và trình tự nucleotit được phân tích bằng cách sử dụng các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.10 trong kit EZ-Tn5™ <R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome™ (Bảng 2). Do đó, đã xác nhận rằng mỗi gen NCgl2108 và NCgl2986 được bất hoạt trong chủng đột biến.

Bảng 2

	Trình tự	SEQ ID NO.
Đoạn mồi của kit	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	9
Đoạn mồi của kit	CTACCCTGTGGAACACCTACATCT	10

Gen NCgl2108 và NCgl2986 được xác định là thiếu hụt trong chủng đột biến được chọn trong ví dụ 3 có mặt nội sinh trong *Corynebacterium*, và do đó đã xác định được là protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào.

Dựa trên các kết quả chọn lọc, 2 loại protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào ở chủng đột biến ngẫu nhiên bằng cách sử dụng gen nhảy, cho thấy sự thiếu hụt gen tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào sẽ có hiệu quả trong việc làm tăng khả năng sản xuất L-lysin. Do đó, tra cứu được thực hiện tại Trung tâm thông tin Công nghệ sinh học quốc gia (National Center for Biotechnology Information - NCBI) đối với gen tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào ngoài gen NCgl2108 và NCgl2986.

Kết quả của tra cứu là gen NCgl1480 và NCgl2107, có mặt nội sinh trong

Corynebacterium, được chọn bổ sung làm protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào. Do đó, để xác nhận liệu sự khuyết đoạn của gen NCgl1480 và NCgl2107 có tác động đến khả năng sản xuất L-lysin, các gen này được chọn làm gen ứng viên khuyết đoạn bổ sung.

Ví dụ 5: Thiết kế các plasmid tái tổ hợp để bất hoạt các gen NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, và NCgl2986

Trong ví dụ này, để xác nhận liệu sự bất hoạt của các gen NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, và NCgl2986 có tác động đến sự sản xuất L-lysin, các plasmid tái tổ hợp để làm khuyết đoạn các gen NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, và NCgl2986 được chọn trong ví dụ 4 trên nhiễm sắc thể của chủng sản xuất L-lysin ở *Corynebacterium* được tạo ra.

Dựa trên trình tự nucleotit được thông báo tại Viện Y tế GenBank quốc gia Mỹ (NIH Genbank), thu được trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, và SEQ ID NO.4 của NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, và NCgl2986, cũng như trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, và SEQ ID NO.8 mã hóa chúng. Để tạo ra các đoạn gen, trong đó khung đọc mở của mỗi gen NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, và NCgl2986 được làm khuyết đoạn bên trong, các đoạn mỗi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 đến SEQ ID NO.14 đối với NCgl1480, SEQ ID NO.15 đến SEQ ID NO.18 đối với NCgl2107, SEQ ID NO.19 đến SEQ ID NO.22 đối với NCgl2108, và SEQ ID NO.23 đến SEQ ID NO.26 đối với NCgl2986 được tạo ra dựa trên các trình tự SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, và SEQ ID NO.8 nêu trên. Các trình tự của chúng được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Đoạn mỗi	Trình tự	SEQ ID NO.
Đoạn mỗi NCgl1480	CCGGGGATCCTCTAGAACCTTGAAACTTCCACTC	11
Đoạn mỗi NCgl1480	CTCCTGACGAACTATTTCAAATCCCCTATCAACCTC	12
Đoạn mỗi NCgl1480	CACCGAGGTAAATTGCCATGCAAGCGCAATCAACGC	13
Đoạn mỗi NCgl1480	GCAGGTCTGACTCTAGAAACCACACATTATCGATC	14
Đoạn mỗi NCgl2107	CCGGGGATCCTCTAGAGCACAGGGCACCCCTGTTG	15
Đoạn mỗi NCgl2107	CTCCTGACGAACTATTTCAAATCCCCTATCAACCTC	16
Đoạn mỗi NCgl2107	GAGGTTGATAGGGGATTTGAAATAGTTCGTCAGGAG	17
Đoạn mỗi NCgl2107	GCAGGTCTGACTCTAGAAACCACACATTATCGATC	18
Đoạn mỗi NCgl2108	CCGGGGATCCTCTAGAGAACCCTTAGTAGTTGGG	19
Đoạn mỗi NCgl2108	GTAATCCAAGGAGTGCTCACCCACTGATGAAACTCC	20
Đoạn mỗi NCgl2108	GGAGTTTCATCAGTGGGTGAGCACTCCTTGGATTAC	21

Đoạn mồi NCgl2108	GCAGGTCGACTCTAGACGAGCCTCAATATCAATC	22
Đoạn mồi NCgl2986	CCGGGGATCCTCTAGATTAGGAGAAACCATGAGC	23
Đoạn mồi NCgl2986	ATCAGTCAGAACTGCCAGGACTGCAGTAAGAATACC	24
Đoạn mồi NCgl2986	GGTATTCTTACTGCAGTCCTGGCAGTTCTGACTGAT	25
Đoạn mồi NCgl2986	GCAGGTCGACTCTAGAGTTGAGGCGTTTGGATAC	26

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 làm khuôn mẫu cùng với cặp trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO.11 và SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.15 và SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 và SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.19 và SEQ ID NO.20, SEQ ID NO.21 và SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 và SEQ ID NO.24, và SEQ ID NO.25 và SEQ ID NO.26, làm đoạn mồi (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, a Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories). PCR được thực hiện trong các điều kiện sau: 30 chu trình, mỗi chu trình bao gồm làm biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 50°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút.

Do đó, thu được hai cặp đoạn ADN có chiều dài 319 bp và 410 bp (lần lượt là NCgl11480-A và NCgl11480-B) chứa các vùng xuôi chiều và ngược chiều của gen NCgl11480; hai cặp đoạn ADN có chiều dài 324 bp và 300 bp (lần lượt là NCgl2107-A và NCgl2107-B) chứa các vùng xuôi chiều và ngược chiều của gen NCgl2107; hai cặp đoạn ADN có chiều dài 381 bp và 377 bp (lần lượt là NCgl2108-A và NCgl2108-B) chứa các vùng xuôi chiều và ngược chiều của gen NCgl2108; và hai đoạn ADN có chiều dài 356 bp và 374 bp (lần lượt là NCgl2986-A và NCgl2986-B) chứa các vùng xuôi chiều và ngược chiều của gen NCgl2986. Đoạn ADN được khuếch đại bằng PCR được tiếp hợp với plasmit pDZ (Patent Hàn quốc số 10-0924065) bằng cách sử dụng Kit Infusion Cloning (Invitrogen), biến nạp vào *E. coli* DH5 α , và sau đó được dàn mỏng trên môi trường rắn LB chứa kanamycin (25 mg/L). Sau khi chọn lọc, khuẩn lạc được biến nạp với các plasmit trong đó các gen mong muốn được cài xen nhờ PCR, các plasmit thu được bằng cách sử dụng phương pháp chiết plasmit đã biết thông thường trong lĩnh vực này. Các plasmit thu được như vậy lần lượt được gọi là pDZ- Δ NCgl11480, pDZ- Δ NCgl2107, pDZ- Δ NCgl2108, và pDZ- Δ NCgl2986. Ở pDZ- Δ NCgl11480, đoạn gen có chiều dài 1672 bp của gen NCgl11480 được làm khuyết đoạn; ở pDZ- Δ NCgl2107, đoạn gen có chiều dài 1026 bp của gen NCgl2107 được làm khuyết đoạn; ở pDZ- Δ NCgl2108, đoạn gen có chiều dài 576 bp của gen NCgl2108 được làm khuyết đoạn; và ở pDZ- Δ NCgl2986, đoạn gen có chiều dài 1092 bp của gen NCgl2986 được làm khuyết đoạn.

Ví dụ 6: Thiết kế và đánh giá chủng đã được bất hoạt gen protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào có nguồn gốc từ chủng sản xuất lysin KCCM11016P

Dựa trên KCCM11016P, chủng sản xuất L-lysine đại diện thuộc chi *Corynebacterium*, chủng đã được bất hoạt gen protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được chọn từ các chủng nêu trên được thiết kế và đánh giá về hiệu suất lysine của nó.

Mỗi plasmid trong số 4 plasmid tái tổ hợp (pDZ- Δ NCgl1480, pDZ- Δ NCgl2107, pDZ- Δ NCgl2108, và pDZ- Δ NCgl2986) được tạo ra trong ví dụ 5 được biến nạp vào *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P bằng phương pháp xung điện, và chủng có gen đích được bất hoạt bằng cách tái tổ hợp tương đồng được tạo ra bằng phương pháp PCR. Các chủng đã được bất hoạt thu được lần lượt được đặt tên là KCCM11016P:: Δ NCgl1480, KCCM11016P:: Δ NCgl2107, KCCM11016P:: Δ NCgl2108, và KCCM11016P:: Δ NCgl2986.

Mỗi chủng trong số 4 chủng và chủng đối chứng được cấy trong bình cầu ngăn góc (25mL) chứa 25mL môi trường nhân giống sau, và được nuôi cấy kết hợp lắc ở nhiệt độ 30°C và tốc độ bằng 200 vòng/phút trong 20 giờ. Sau đó, môi trường nhân giống (1mL) được cấy trong bình cầu ngăn góc (1mL) chứa 24mL môi trường sản xuất sau, và được nuôi cấy kết hợp lắc ở 37°C và tốc độ bằng 200 vòng/phút trong 96 giờ. Thành phần của môi trường nhân giống và môi trường sản xuất là như sau.

Môi trường nhân giống (độ pH bằng 7,0)

20g glucoza, 10g (NH₄)₂SO₄, 10g pepton, 5g dịch chiết nấm men, 1,5g ure, 4g KH₂PO₄, 8g K₂HPO₄, 0,5g MgSO₄·H₂O, 100μg biotin, 1000μg thiamin HCl, 2000μg canxi-pantothenat, 2000μg nicotinamit (tính theo 1L nước cất)

Môi trường sản xuất (độ pH bằng 7,0)

100g glucoza, 40g (NH₄)₂SO₄, 2,5g đậu tương protein, 5g chất rắn ngô ngâm, 3g ure, 1g KH₂PO₄, 0,5g MgSO₄·H₂O, 100μg biotin, 1000μg thiamin HCl, 2000μg canxi-pantothenat, 3000μg nicotinamit, 30g CaCO₃ (tính theo 1L nước cất)

Khi hoàn thành việc nuôi cấy, nồng độ L-lysine được phân tích bằng cách sử dụng HPLC, và các nồng độ được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây. Các kết quả trong Bảng 4 là các kết quả về ba thử nghiệm lặp lại, và hiệu suất được đánh giá tính theo giá trị trung

bình.

Bảng 4

	Lysin (g/L)			
	Mề 1	Mề 2	Mề 3	Trung bình
KCCM11016P	42,7	42,6	43,0	42,8
KCCM11016P- Δ NCgl1480	44,3	44,1	44,0	44,1
KCCM11016P- Δ NCgl2107	45,1	44,9	45,2	45,1
KCCM11016P- Δ NCgl2108	48,1	48,3	48,0	48,1
KCCM11016P- Δ NCgl2986	49,3	49,1	49,2	49,2

Do đó, như được thể hiện trong Bảng 4 nêu trên, hiệu suất lysin của chủng trong đó mỗi gen trong số các gen NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, và NCgl2986 được bất hoạt được tăng lên lần lượt 3,2%, 5,4%, 13%, và 15%, so với hiệu suất lysin của chủng gốc KCCM11016P.

Các kết quả này cho thấy rằng khả năng sản xuất L-lysin có thể được cải thiện bằng cách làm bất hoạt protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào, mà có thể tạo ra sự dung hợp tế bào ở vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Do đó, các thử nghiệm được thực hiện như dưới đây để xác định các tác động tương tự có thể có trong trường hợp các protein liên quan đến quá trình thủy phân của tế bào được bất hoạt ở các vi sinh vật khác nhau thuộc chi *Corynebacterium*.

Ví dụ 7: Thiết kế và đánh giá chủng đã được bất hoạt protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào có nguồn gốc từ chủng sản xuất L-lysin KCCM10770P

Để kiểm tra các ảnh hưởng của việc làm bất hoạt protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào ở chủng sản xuất L-lysin *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P (Patent Hàn quốc số 10-0924065) có quá trình sinh tổng hợp lysin tăng cường là tương tự với các kết quả thử nghiệm của ví dụ 6, chủng trong đó mỗi protein trong số 4 protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt được tạo ra theo cách giống như được mô tả trong ví dụ 6. Chủng đã tạo ra được đặt tên là KCCM10770P:: Δ NCgl1480, KCM10770P:: Δ NCgl2107, KCCM10770P:: Δ NCgl2108, và KCM10770P:: Δ NCgl2986. Khả năng sản xuất L-lysin được so sánh giữa các chủng này.

Để so sánh hiệu suất lysin của chủng nêu trên, chủng và chủng đối chứng được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 6. Khi hoàn thành việc nuôi cấy, nồng độ

L-lysine được phân tích bằng cách sử dụng HPLC được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây. Các kết quả trong Bảng 5 là các kết quả về ba thử nghiệm lặp lại, và hiệu suất được đánh giá tính theo giá trị trung bình.

Bảng 5

	Lysine (g/L)			
	Mề 1	Mề 2	Mề 3	Trung bình
KCCM10770P	46,0	46,3	46,1	46,1
KCCM10770P- Δ NCgl1480	47,3	47,1	47,0	47,1
KCCM10770P- Δ NCgl2107	48,0	48,2	48,1	48,1
KCCM10770P- Δ NCgl2108	51,7	51,9	51,6	51,7
KCCM10770P- Δ NCgl2986	53,1	52,9	52,1	52,7

Do đó, như được thể hiện trong Bảng 5 nêu trên, hiệu suất lysine của chủng có mỗi gen trong số các gen NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, và NCgl2986 được bất hoạt được tăng lên lần lượt 2,2%, 4,3%, 12,1%, và 14,2%, so với hiệu suất lysine của chủng gốc KCCM10770P.

Do đó, đã thấy rằng ở *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P (Patent Hàn quốc số 10-0924065), khả năng sản xuất L-lysine cũng có thể được cải thiện bằng cách làm bất hoạt protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào theo cách giống như trong ví dụ 6.

Ví dụ 8: Thiết kế và đánh giá về chủng đã được bất hoạt protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào có nguồn gốc từ chủng sản xuất L-lysine KCCM11347P

Để kiểm tra các ảnh hưởng của việc làm bất hoạt của protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào ở chủng sản xuất L-lysine *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P (vi sinh vật đã được đặt tên là KFCC10750 và được lưu giữ lại tại Tổ chức lưu giữ quốc tế theo Hiệp ước Budapest, và sau đó được đặt tên theo số hiệu lưu giữ là KCCM11347P; patent Hàn quốc số 10-0073610) được tạo ra bằng cách cải biến nhân tạo, chủng có mỗi protein trong số 4 protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt được tạo ra theo cách giống như mô tả trong ví dụ 6. Chủng đã tạo ra được đặt tên là KCCM11347P:: Δ NCgl1480, KCCM11347P:: Δ NCgl2107, KCCM11347P:: Δ NCgl2108, và KCCM11347P:: Δ NCgl2986. Khả năng sản xuất L-lysine được so sánh giữa các chủng này.

Để so sánh hiệu suất lysine của chủng nêu trên, chủng và chủng đối chứng được

nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 6. Khi hoàn thành việc nuôi cấy, nồng độ L-lysine được phân tích bằng cách sử dụng HPLC, và được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây. Các kết quả trong Bảng 6 là các kết quả về ba thử nghiệm lặp lại, và hiệu suất được đánh giá tính theo giá trị trung bình.

Bảng 6

	Lysin (g/L)			
	Mê 1	Mê 2	Mê 3	Trung bình
KCCM11347P	38,2	38,6	38,3	38,4
KCCM11347P- Δ NCgl1480	39,0	39,4	39,1	39,2
KCCM11347P- Δ NCgl2107	39,1	39,5	39,3	39,3
KCCM11347P- Δ NCgl2108	39,8	40,2	39,9	42,9
KCCM11347P- Δ NCgl2986	39,9	40,3	40,1	43,9

Do đó, như được thể hiện trong Bảng 6 nêu trên, hiệu suất lysine của chủng trong đó mỗi gen trong số các gen NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, và NCgl2986 được bất hoạt lần lượt tăng 2%, 2,4%, 11,7%, và 14,4%, so với hiệu suất lysine của chủng gốc KCCM11347P.

Do đó, đã thấy rằng ở *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P (Patent Hàn quốc số 10-0073610), khả năng sản xuất L-lysine cũng có thể được cải thiện bằng cách làm bất hoạt protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào theo cách giống như trong ví dụ 6 và 7.

Ví dụ 9: Thiết kế và đánh giá về chủng đã được bất hoạt protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào có nguồn gốc từ chủng sản xuất L-lysine CJ3P

Để kiểm tra các ảnh hưởng của việc làm bất hoạt của protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào ở *Corynebacterium glutamicum* CJ3P (Binder et al. Genome Biology 2012, 13:R40), mà tạo ra L-lysine bằng cách đưa vào 3 dạng cải biến [pyc(P458S), hom(V59A), và lysC(T311I)] ở *Corynebacterium glutamicum* dạng đại, là tương tự với các kết quả thử nghiệm của ví dụ 6, 7, và 8, chủng trong đó mỗi protein trong số 4 protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt được điều chế theo cách giống như mô tả trong ví dụ 6. Chủng đã tạo ra được đặt tên là CJ3P:: Δ NCgl1480, CJ3P:: Δ NCgl2107, CJ3P:: Δ NCgl2108, và CJ3P:: Δ NCgl2986. Khả năng sản xuất L-lysine được so sánh giữa các chủng này.

Để so sánh hiệu suất lysine của chủng nêu trên, các chủng này và chủng đối chứng

được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 6. Khi hoàn thành việc nuôi cấy, nồng độ L-lysine được phân tích bằng cách sử dụng HPLC được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây. Các kết quả trong Bảng 7 là các kết quả về ba thử nghiệm lặp lại, và hiệu suất được đánh giá tính theo giá trị trung bình.

Bảng 7

	Lysin (g/L)			Trung bình
	Mê 1	Mê 2	Mê 3	
CJ3P	7,8	8,0	7,9	7,9
CJ3P- Δ NCgl1480	8,3	8,0	8,1	8,1
CJ3P- Δ NCgl2107	8,0	7,9	8,1	8,0
CJ3P- Δ NCgl2108	8,8	8,9	9,0	8,9
CJ3P- Δ NCgl2986	9,1	9,2	9,2	9,2

Do đó, như được thể hiện trong Bảng 7 nêu trên, hiệu suất lysine của chủng có mỗi gen trong số các gen NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, và NCgl2986 được bất hoạt lần lượt tăng 3%, 1,3%, 12,7%, và 16%, so với hiệu suất lysine của chủng gốc CJ3P.

Do đó, đã thấy rằng ở *Corynebacterium glutamicum* CJ3P, khả năng sản xuất L-lysine cũng có thể được cải thiện bằng cách làm bất hoạt protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào theo cách giống như trong ví dụ 6, 7, và 8.

Ví dụ 10: Thiết kế và đánh giá về chủng đã được bất hoạt đồng thời protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào có nguồn gốc từ chủng sản xuất L-lysine KCCM11016P

Sau khi xác nhận từ các ví dụ nêu trên rằng khả năng sản xuất L-lysine tăng khi mỗi protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt ở chủng sản xuất L-lysine *Corynebacterium*, việc xác định được thực hiện để xem liệu khả năng sản xuất L-lysine có tăng lên khi 2 protein liên quan được bất hoạt đồng thời.

Vì vậy, thử nghiệm sau được thực hiện để khẳng định tác dụng của việc làm bất hoạt đồng thời protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào ở chủng sản xuất L-lysine *Corynebacterium*. Chủng có hai dạng gen protein (NCgl2108 và NCgl2986) tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào, mà có hiệu quả cao trong việc làm tăng khả năng sản xuất L-lysine khi mỗi protein thiếu hụt, được bất hoạt đồng thời được tạo ra theo cách giống như trong ví dụ 6. Chủng đã tạo ra được đặt tên là KCCM11016P:: Δ NCgl2108/ Δ NCgl2986. Khả năng sản xuất L-lysine được so sánh.

Để so sánh khả năng sản xuất L-lysine của các chủng nêu trên, các chủng này và chủng đối chứng được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 6. Khi hoàn thành việc nuôi cấy, nồng độ L-lysine được phân tích bằng cách sử dụng HPLC được thể hiện trong Bảng 8 dưới đây. Các kết quả trong Bảng 8 là các kết quả về ba thử nghiệm lặp lại, và hiệu suất được đánh giá tính theo giá trị trung bình.

Bảng 8

	Lysine (g/L)			
	Mé 1	Mé 2	Mé 3	Trung bình
KCCM11016P	43,4	43,1	43,2	43,2
KCCM11016P- Δ NCgl2108/ Δ NCgl2986	52,6	52,4	52,7	52,6

Do đó, như được thể hiện trong Bảng 8, hiệu suất lysine của chủng có gen NCgl2108 và NCgl2986 được bất hoạt đồng thời được tăng lên 21,6%, so với hiệu suất lysine của chủng gốc KCCM11016P.

Kết quả này cho thấy rằng khả năng sản xuất L-lysine có thể được cải thiện ngay cả khi không những một protein mà cả hai hoặc nhiều protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt đồng thời ở vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Về mặt này, chủng nêu trên, KCCM11016P- Δ NCgl2986, được đặt tên là CA01-2292. CA01-2292 được lưu giữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (the Korean Culture Center of Microorganisms - KCCM), Viện lưu giữ quốc gia, theo Hiệp ước Budapest, và sau đó được đặt tên theo số hiệu lưu giữ là KCCM11627P.

Dựa trên các kết quả này, đã xác nhận rằng chủng sản xuất L-lysine có tác dụng làm tăng khả năng sản xuất L-lysine bằng cách điều hòa sự phân giải tế bào trong quá trình lên men có protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt so với hoạt tính nội sinh của chúng. Ngoài ra, cũng đã khẳng định rằng khả năng sản xuất L-lysine có thể được cải thiện khi không những một mà cả hai hoặc nhiều protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt đồng thời, nhờ đó tạo ra chủng sản xuất L-lysine mới.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả có dựa vào các phương án minh họa cụ thể, người có hiểu biết trong lĩnh vực mà sáng chế có liên quan cần phải hiểu rằng sáng chế có thể được thể hiện theo các hình thức cụ thể khác mà không tách rời khỏi phạm vi kỹ thuật hoặc đặc tính cơ bản của sáng chế. Vì vậy, các phương án được mô tả nêu trên được xem là minh họa tất cả các khía cạnh và không giới hạn phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, phạm

vi của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải ở phần mô tả chi tiết sáng chế, và cần phải hiểu rằng toàn bộ các cải biến hoặc cải biến bắt nguồn từ nghĩa và phạm vi của sáng chế và các dạng tương đương của nó cũng nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có khả năng sản xuất L-lysin được gia tăng so với vi sinh vật chưa được cải biến, vi sinh vật này được cải biến để hoạt tính của protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào được bất hoạt so với hoạt tính nội sinh của nó.
2. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó protein tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào là ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm các protein chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.4.
3. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.
4. Phương pháp sản xuất L-lysin, bao gồm các bước (i) nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 trong môi trường nuôi cấy; và (ii) thu hồi L-lysin từ môi trường nuôi cấy này hoặc vi sinh vật này.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

```

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION
<120> VI SINH VẬT SẢN XUẤT L-LYSIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-LYSIN BẰNG CÁCH SỬ DỤNG VI SINH VẬT
NÀY
<130> OPA16081
<150> KR 10-2015-0095528
<151> 2015-07-03
<160> 26
<170> KopatentIn 2.0
<210> 1
<211> 604
<212> PRT
<213> Corynebacterium
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(604)
<223> NCg11480
<400> 1
Met Thr Arg Ala Leu Ile Ala Leu Ala Val Ser Gly Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15
Ser Met Thr Pro Ala Val Ala Gln Pro Gln Asn Pro Asp Asp Ala Ala
20 25 30
Ile Ala Gln Ala Glu Glu Asn Val Ser Ala Gly Asp Gly Glu Val Ala
35 40 45
Arg Leu Ala Gly Ser Leu Ser Ser Thr Asp Ala Glu Ile Asn Arg Val
50 55 60
Glu Leu Glu Met Gly Ala Leu Arg Glu Glu Val Asn Lys Ser Leu Val
65 70 75 80
Asp Leu His Asp Ala Gln Ala Ile Ala Glu Gln Ala Arg Gln Asp Ala
85 90 95
Leu Ala Ala Lys Lys Asp Leu Asp Asp Ser Gln Ala Gln Ile Glu Ala
100 105 110
Ala Gln Glu Arg Leu Asp Glu Ile Ser Arg Ala Ala Tyr Arg Gln Asn
115 120 125
Gly Thr Ser Lys Gly Leu Ser Gly Ile Ser Gly Asn Gly Asn Ser Glu
130 135 140
Asp Ala Leu Asp Arg Gln Thr Tyr Leu Arg Thr Ser Ala Glu Lys Gln
145 150 155 160
Gln Ala Ala Val Glu Glu Leu Asp Arg Leu Arg Thr Glu Asn Ala Asn
165 170 175
Lys Glu Ser Val Leu Arg Gln Ala Arg Ile Val Ala Glu Gln Arg Glu
180 185 190
Ala Glu Ala Val Glu Lys Gln Val Gln Thr Glu Ala Ala Ile Ala Ala
195 200 205
Asn Ser Glu Gln Leu Asn Val Leu Thr Asn Asn Arg Ser Thr Leu Val
210 215 220
Ala Gln Arg Asp Gly Ala Glu Arg Asn Leu Ala Ile Ala Arg Ala Gln
225 230 235 240
Ala Asp Asn Leu Gln Gly Gln Arg Ala Glu Tyr Glu Glu Phe Gln Gln
245 250 255
Ala Glu Gln Ala Arg Ile Gln Ala Glu Ala Glu Ala Gln Ala Ala Ala
260 265 270
Glu Glu Lys Arg Arg Ala Asp Glu Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala Glu
275 280 285
Ala Gln Glu Ala Ala Gln Gln Ala Gln Ala Ala Glu Glu Ala Gln Ala
290 295 300
Ala Gln Ala Ala Glu Thr Ala Gln Ala Gln Ala Ala Gln Ala Ala Glu
305 310 315 320
Thr Gln Ala Ala Gln Ala Ala Gln Ala Gln Ala Glu Ala Asn Asp Arg
325 330 335
Ala Ala Ala Gln Gln Arg Ala Ala Glu Ala Gln Ala Ala Ala Glu Gln
340 345 350
Ala Gln Arg Glu Ala Asp Ala Gln Ala Ala Asn Asp Ala Gln Ala Gln
355 360 365
Ala Leu Arg Glu Gln Ala Leu Thr Ala Ala Ser Ile Ala Ala Ala Ala
370 375 380
Leu Ile Ala Ala Ser Gln Ser Ser His Ala Thr Thr Gln Asn Pro Tyr
385 390 395 400
Pro Thr Asp Glu Asp Ala Asp Pro Thr Asp Ile Ala Asp Ile Gln Gly
405 410 415
Pro Thr Gln Pro Gly Thr Gly Glu Ser Gly Asp Ser Gln Ser Asn Ser
420 425 430
Ser Asp Asn Asp Ser Thr Gly Asn Asp Ser Thr Gly Ser Asp Ser Ser
435 440 445
Asp Ser Asp Ser Ser Gly Asn Asp Ser Ser Glu Val Ile Ser Gly Asp
450 455 460
Arg Ser Ala Gln Ile Glu Thr Val Ile Ala Arg Ala Met Ser Gln Leu

```

```

465          470          475          480
Gly Val Gln Tyr Ala Trp Gly Gly Gly Asn Ala Asn Gly Pro Thr Leu
          485          490          495
Gly Ile Arg Asp Gly Gly Val Ala Asp Ser Tyr Gly Asp Tyr Asn Lys
          500          505          510
Val Gly Phe Asp Cys Ser Gly Leu Thr Leu Tyr Ala Phe Ala Gly Val
          515          520          525
Gly Ile Ser Leu Pro His Tyr Thr Gly Tyr Gln Tyr Gln His Gly Thr
          530          535          540
Lys Val Ser Pro Ser Glu Met Gln Arg Gly Asp Leu Ile Phe Tyr Gly
          545          550          555          560
Pro Gly Ala Ser Gln His Val Ala Ile Tyr Leu Gly Asp Gly Gln Met
          565          570          575
Ile Glu Ala Pro Asn Ser Gly Ser Val Val Lys Ile Ser Pro Val Arg
          580          585          590
Trp Ser Gly Met Thr Glu Ser Val Val Arg Leu Ile
          595          600
<210> 2
<211> 349
<212> PRT
<213> Corynebacterium
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(349)
<223> NCgl2107
<400> 2
Met Asn Glu Val Asp Arg Gly Phe Leu Lys Met Phe Gly Arg Arg Trp
  1          5          10          15
Val Ser Val Val Ala Ser Cys Val Ile Ala Ser Thr Leu Ile Leu Val
          20          25          30
Pro Ser His Ser Gly Ala Glu Glu Val Asp Gln Leu Ile Ala Asp Ile
          35          40          45
Glu His Val Ser Gln Glu Thr Ser Ala Gln Asn Glu Glu Val Lys Gln
          50          55          60
Leu Glu Ile Asp Ile Glu Ala Arg Glu Val Thr Ile Lys Glu Val Gln
          65          70          75          80
Glu Gln Ser Val Ser Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Gln Ala Ser Glu Asn
          85          90          95
Val Glu Ala Tyr Arg Ser Glu Ile Asn Arg Ile Ala Gln Ala Lys Tyr
          100          105          110
Arg Gly Thr Val Thr Asp Pro Leu Ser Ile Ala Val Ser Ala Glu Asp
          115          120          125
Pro Gln Asn Val Ile Asp Arg Met Ser Tyr Leu Ser Thr Leu Thr Lys
          130          135          140
Ser Thr Ser Asp Val Val Glu Ser Leu Asn Ala Glu Thr Glu Lys Ser
          145          150          155          160
Ala Glu Ala Val Tyr Gln Ala Asn Arg Thr Lys Ala Glu Ala Glu Phe
          165          170          175
Gln Leu Gly Gln Leu Lys Val Arg Gln Ala Glu Leu Glu Ser Glu Lys
          180          185          190
Glu Ala Leu Asp Gly Arg Lys Ser Glu Ile Arg Asp Arg Val Asp Ala
          195          200          205
Leu Thr Pro Gln Glu Arg Glu Met Trp Val Ala Lys Asn Gly Pro Leu
          210          215          220
Asp Ile Asp Leu Thr Asp Leu Leu Gly Leu Ser Ala Ala Thr Ser Gly
          225          230          235          240
Ala Val Asp Ala Ala Leu Ser Lys Leu Gly Ser Pro Tyr Gly Trp Gly
          245          250          255
Gly Ile Gly Pro Asn Glu Phe Asp Cys Ser Gly Leu Ile Tyr Trp Ala
          260          265          270
Tyr Gln Gln Met Gly Lys Thr Leu Pro Arg Thr Ser Gln Ala Gln Met
          275          280          285
Ala Gly Gly Thr Pro Val Ser Arg Asp Glu Leu Gln Pro Gly Asp Val
          290          295          300
Ile Gly Tyr Tyr Pro Gly Ala Thr His Val Gly Leu Tyr Ile Gly Asp
          305          310          315          320
Gly Lys Ile Val His Ala Ser Asp Tyr Gly Ile Pro Val Gln Val Val
          325          330          335
Ser Val Asp Ser Ala Pro Phe Tyr Gly Ala Arg Arg Tyr
          340          345
<210> 3
<211> 209
<212> PRT
<213> Corynebacterium
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(209)
<223> NCgl2108
<400> 3

```

Met Gly Lys His Arg Arg Asn Asn Ser Asn Ala Thr Arg Lys Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Ala Ser Ala Val Ala Leu Gly Ala Thr Ala Ala Ile Ala Ser Pro
 20 25 30
 Ala Gln Ala Ala Glu Val Val Pro Gly Thr Gly Ile Ser Val Asp
 35 40 45
 Ile Ala Gly Ile Glu Thr Thr Pro Gly Leu Asn Asn Val Pro Gly Ile
 50 55 60
 Asp Gln Trp Ile Pro Ser Leu Ser Ser Gln Ala Ala Pro Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Ala Ala Val Ile Asp Ala Pro Ala Ala Gln Ala Ala Pro Ala Ala Ser
 85 90 95
 Thr Gly Gln Ala Ile Val Asp Ala Ala Arg Thr Lys Ile Gly Ser Pro
 100 105 110
 Tyr Gly Trp Gly Ala Thr Gly Pro Asn Ala Phe Asp Cys Ser Gly Leu
 115 120 125
 Thr Ser Trp Ala Tyr Ser Gln Val Gly Lys Ser Ile Pro Arg Thr Ser
 130 135 140
 Gln Ala Gln Ala Ala Gln Gly Thr Pro Val Ala Tyr Ser Asp Leu Gln
 145 150 155 160
 Ala Gly Asp Ile Val Ala Phe Tyr Ser Gly Ala Thr His Val Gly Ile
 165 170 175
 Tyr Ser Gly His Gly Thr Val Ile His Ala Leu Asn Ser Ser Thr Pro
 180 185 190
 Leu Ser Glu His Ser Leu Asp Tyr Met Pro Phe His Ser Ala Val Arg
 195 200 205

Phe

<210> 4
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium
 <220>
 <221> Peptit
 <222> (1)..(414)
 <223> NCgl2986
 <400> 4

Met Asp Glu Leu Tyr Pro Leu Ile Ile Leu Asn Met Asn Asp Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Arg Val Ser Lys Val Leu Arg Val Gly Asp Arg Ser Pro Arg Val
 20 25 30
 Ala Glu Val Arg Thr Thr Leu Ala Arg Leu Gly Val Ile Glu Gly Tyr
 35 40 45
 Ser Arg Glu Met Ser Ala Lys Thr Glu Ser Gln Lys Phe His Glu Glu
 50 55 60
 Glu Thr Leu Phe Asp Glu Glu Leu Ser Leu Ser Ile Lys Ser Phe Gln
 65 70 75 80
 Gln Ala Arg Gly Val Val Pro Ser Gly Leu Ile Asp Asp Pro Thr Leu
 85 90 95
 Arg Ala Ile Arg Glu Ala Ser Tyr Thr Leu Gly Thr Arg Val Leu Ala
 100 105 110
 Tyr Gln Pro Gly Asn Gln Leu Val Gly Asp Asp Val Val Glu Ile Gln
 115 120 125
 Ser His Leu Gln Glu Leu Gly Phe Tyr Ala Asp Arg Val Asp Gly His
 130 135 140
 Phe Gly Glu Leu Thr His Lys Ala Val Met Asn Tyr Gln Leu Asn Tyr
 145 150 155 160
 Gly Met Gln Val Asp Gly Ile Cys Gly Pro Asp Thr Ile Arg Ala Leu
 165 170 175
 Ser Arg Leu Gly Leu Arg Ile Lys Gly Gly Ser Ala Gln Ala Ile Arg
 180 185 190
 Glu Arg Glu Arg Met Arg Asn Ala Gly Pro Arg Leu Ala Gly Lys Arg
 195 200 205
 Val Val Ile Asp Pro Ala Leu Gly Gly Ser Asn Lys Gly Gln Ile Val
 210 215 220
 Lys Gly Pro Tyr Gly Glu Ile Ser Glu Glu Glu Ile Leu Trp Asp Leu
 225 230 235 240
 Ala Thr Arg Leu Glu Gly Arg Met Ile Ala Thr Gly Met Glu Thr Ile
 245 250 255
 Leu Ser Arg Pro His Met Asp Asp Pro Ser Ser Arg Asp Arg Ala Ser
 260 265 270
 Ile Ala Asn Ala Phe Gly Ala Asp Leu Met Leu Ser Leu His Cys Asp
 275 280 285
 Ser Tyr Pro Asn Glu Lys Ala Asn Gly Val Ala Ser Phe Tyr Phe Gly
 290 295 300
 Ser Glu Asn Gly Thr Asn Ser Leu Thr Gly Glu Thr Leu Ser Ala Tyr
 305 310 315 320
 Ile Gln Lys Glu Ile Val Ala Arg Thr Pro Leu Asn Asn Cys Gly Ser
 325 330 335
 His Ala Arg Thr Trp Asp Leu Leu Arg Leu Thr Arg Met Pro Met Val

340 345 350
 Glu Val Val Thr Gly Tyr Leu Thr Asn Pro Asp Asp Leu Ala Val Leu
 355 360 365
 Thr Asp Pro Gln Met Arg Asp His Ile Ala Glu Ala Ile Val Val Ala
 370 375 380
 Val Lys Arg Leu Tyr Leu Leu Asp Glu Glu Ala Gln Pro Lys Thr Gly
 385 390 395 400
 Thr Phe Lys Phe Ser Glu Leu Leu Gln Ser Glu Gln Ala Gly
 405 410
 <210> 5
 <211> 1815
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium
 <220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(1815)
 <223> NCg11480
 <400> 5
 ttgaccaggg cggttgattgc gcttgcagta agcggagctt tgcttagttc catgactccg 60
 gcggtggcgc agccacagaa tccggatgac gcagccattg cacaggcaga ggaaatggt 120
 tcggcgggcg atggggaagt cgccgcctg gcaggatctt tgtccagcac tgacgcggaa 180
 attaacgcgc tcgagctgga aatgggtgct ctgctgaag aagtgaacaa gtccctcgtg 240
 gatttgcatg atgcgcaggc aatcgccgag caggcccccc aagatgcact tgcagccaag 300
 aaggatctcg atgattctca agcgcagatc gaagcagccc aagagcgctt tgatgagatt 360
 tcacgtgcag cgtatcgcca aaacggaacc tccaaggggc ttccaggcat ctggggcaat 420
 ggaaattctg aagatgcgct agatcgctcag acttacctgc gaaccagtgc ggaaaagcag 480
 caggcagctg ttgaagagct tgatcgctc cgtacggaaa acgccaacaa ggaatcgggtg 540
 ttgcgccagg cccgcctcgt tgctgagcag cgtgaggcgg aagccgtcga aaagcaagtc 600
 cagacgcagg ctgcaattgc cgcaaacagc gagcagctca atgtcttgac taacaatcgc 660
 agtaccttgg ttgccccagcg tgatggggct gagcgcaact tggccatcgc tcgtgcgcag 720
 gcggataatc tgcaaggtca gcgtgctgag tacgaggaat tccagcaggc agagcaggct 780
 cgcattccagg cggaagcggg agctcaggct gctgcggagg agaagcgtcg tgccgatgag 840
 gctgtctcac aggcagccgc tgaagctcaa gaagctgccc agcaagctca ggcggcggag 900
 gaagcccaag ccgcgcaagc agctgagaca gcacaagccc aagccgcgca agctgcggaa 960
 acccaagctg cacaagcgcg gcaagctcag gcagaagcga atgatcgtgc cgcgcgcaa 1020
 cagcgtgctg cagaggctca agcagcagcg gaacaggcgc aacgtgaggc tgacgctcag 1080
 gcggccaacg atgccaagc tcaggcactg cgtgaacagg cgtcaccgc agcctccatc 1140
 gctgcggctg ctctaattgc ggcgagccag tccagccatg ccaactacta aaatccttac 1200
 ccaactgagc atgacgcggg tccgaccgat attgcggaca tccaaggccc aacgcagcca 1260
 ggtacgggtg agtctggaga ttccagagc aactccagcg acaacgattc cacaggcaac 1320
 gattccacag gctctgactc ttccagattca gattcctccg gcaacgattc ttcagagggtt 1380
 atttcggcgc atcgttccgc tcagattgag actgtgattg cgcgcgccat gagccagttg 1440
 ggtgtgcagt acgacgggg ttgcggtaac gctaattgcc caactctggg tatccgtgac 1500
 ggtggcgtgg cggactctta cggcgattac aacaagggtg gcttcgactg ctctggactg 1560
 acctgttatg cgtttgcggg tgtgggaatt tcaacttcctc actacacggg ctaccagtac 1620
 cagcagcgca ccaaggtgtc gccttctgag atgcaacgtg gcgatctgat cttctatggt 1680
 ccggagcgtg ctacgacggt ggcaatttac ctcggtgatg gtcagatgat tgaggctccg 1740
 aattcgggtt ctgtcgtgaa gatttctcct gttcgctgga gcggaatgac cgagagcgtg 1800
 gtacgcctca tttag 1815
 <210> 6
 <211> 1050
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium
 <220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(1050)
 <223> NCg12107
 <400> 6
 ttgaatgagg ttgatagggg atttttgaag atgtttggtc gccgttgggt gagcgttgtg 60
 gcgtcatgtg ttatcgcaag cacgctgatt ctggtgcctt cgattccgg tcggaggaa 120
 gtcgatcaac tgattgctga tatcgagcat gtctctcagg aaacgtctgc ccagaatgag 180
 gaagtcaaac agcttgagat tgatattgag gctcgtgagg tcacgatcaa ggaagttcag 240
 gagcagtcgg taagctaccg tgaggcggct gatcaagcat cggagaatgt cgaagcttat 300
 cgttcgggag tcaatcggat cgctcaggcg aagtatcgtg gcacagtcac ggatcctttg 360
 agcattgcgg tgtctgcaga agatccacaa aacgtgattg atcggatgag ctacctttca 420
 acgttgacta agtccactag tgatgtggtt gaatccctca acgcggagac tgagaagtcc 480
 gcagaagctg tgtatcaagc aaaccgtact aaggcggaa cggagttcca gttggggcag 540
 ctgaaggtac gccacggcga gcttgaatc gaaaaggaa cattggatgg tcgaaaatcg 600
 gagatccgag accgggtgga tgccctgacg ccacaggagc gggaaatgtg ggttgctaag 660
 aatggtccat tggacattga tctgactgat ttgcttggtc tttccgctgc gacttcgggt 720
 gcggtggatg ctgccttgtc taagttggga agcccttatg gttgggggtg cattggccca 780
 aatgagtttg attgctcagg tttgatctat tggcgctatc agcagatggg taagactttg 840
 ccacgtactg ctcaagctca gatggctggc ggaacgccgg tgagcagaga tgagctgcag 900
 cctgcgatg tcaattggata ttaccagggt gctactcacg tgggactgta tattggggac 960
 ggaaagattg tgcacgcctc agactacgga atccctgtgc aggtggatc tggtgattca 1020
 gcaccgtttt atggtgcgcg tcgctactaa 1050
 <210> 7
 <211> 630
 <212> ADN

```

<213> Corynebacterium
<220>
<221> Gen
<222> (1)..(630)
<223> NCg12108
<400> 7
gtgggtaagc accgtcgcaa caattcaaac gcaactcgca aggctgtagc agcatctgca 60
gttgcgcttg gagcaaccgc agctatcgcc tccccagcac aggcagctga ggttgttgtt 120
cctggcaccg gaatcagcgt tgacatcgct ggcacgaga ccactccagg tcttaacaac 180
gttcaggaa tcgatcagtg gatcccttcc cttagcagcc aggcagctcc tactgtttac 240
gcagccgtca ttgatgcacc tgcagcacag gctgcacctg cagcaagcac cggtcaggca 300
atcggtgatg cagcgcgcac caagattggt tccccatacg gttggggtgc taccggctct 360
aacgctttcg actgctccgg ccttacctca tgggcataca gccagggttg caagtccatc 420
ccagctacct ccagggtca ggtgcacag ggcacccttg ttgcttactc tgaccttcag 480
gctggcgaca tcgttgcgtt ctactccggc gctaccacag ttggtatcta ctccggccac 540
ggcaccgtta tccacgcact gaacagcagc acccctctgt ctgagcactc cttggattac 600
atgccattcc actctgcagt tcgtttctaa 630
<210> 8
<211> 1245
<212> ADN
<213> Corynebacterium
<220>
<221> Gen
<222> (1)..(1245)
<223> NCg12986
<400> 8
gtggatgaac tatatccatt gataattttg aacatgaatg atggaaggag cagggtgtct 60
aaagtcctga gagggtggca tgcagcccg cgctggcag aagtgcgcac tacgctcgct 120
cgctcggtg tgattgaagg ctattccagg gagatgtctg caaagacaga atcccagaag 180
ttccacgaag aagagacgct ttctgacgaa gaactcagcc tcagcatcaa gtcattccag 240
caagctcgag gagtgcgttc ctccgggctt attgacgacc ccacctgcg cgcaatccgc 300
gaagcctcct acacctggtg aaccgcgtg ctggcctacc agcccgga caagcttgtt 360
ggtgacgacg ttgtagaaat ccaatcccat ctccaagagc tcggcttcta cgccgacctg 420
gtggatggac attttggcga gctcacacac aaagctgtga tgaactacca actcaactac 480
ggcatgcagg tagacggcat ctgtggcctt gacaccatcc gtgcgctgtc ccgacttggt 540
ctgcgcatac aggttggctc tgcctaaagt atccgtgaac gcgaacgcat gcgcaatgca 600
ggccacacgtc ttgctggcaa gcgtgtggtc attgatcctg cgcttggggg ctccaacaag 660
ggtcagatcg tgaaggccc ctacgggtgag atctctgagg aagaaatcct ctgggatttg 720
gccaccgcgc tggaaaggtc catgatcgca acaggcatgg aaaccattct gtcgcgcccg 780
cacatggatg atcccagcag ccgtgatcgc gcgtcgatcg cgaatgcttt cggcgctgac 840
ctcatgctga gcctgcactg cgattcctac ccgaatgaaa aagctaacgg cgtggccagc 900
ttctacttcg gttcggaaaa cggcaccaac tccttgaccg gtgaaacgct ctccgcgtac 960
atccaaaaag agatcgttgc ccgcacccca ctgaacaact gtggcagcca tgcccgctac 1020
tggtgatctgc tgcgcctcac gcgcattgccc atgggtggaag ttgtcaccgg ttacctcacc 1080
aaccocgatg acctggcagt tctgactgat ccacaaatgc gtgatcacat tgccgaagcc 1140
atcggtgtcg ccgtcaagcg cctgtacctc cttgatgagg aagcacagcc caagaccgga 1200
accttcaagt tctctgagct gttgcaatca gacgagctg gctaa 1245
<210> 9
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi của kit
<400> 9
acctacaaca aagctctcat caacc 25
<210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi của kit
<400> 10
ctaccctgtg gaacacctac atct 24
<210> 11
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi NCg11480
<400> 11
ccggggatcc tctagaacct tgaaacttcc actc 34
<210> 12
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi NCg11480
<400> 12
ctcctgacga actattttcaa atcccctatc aacctc 36

```

```

<210> 13
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi NCg11480
<400> 13
caccgaggta aattgccatg caagcgcaat caacgc 36
<210> 14
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi NCg11480
<400> 14
gcaggtcgac tctagaaacc acacattatc gatc 34
<210> 15
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi NCg12107
<400> 15
ccggggatcc tctagagcac agggcaccctc tgttg 35
<210> 16
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi NCg12107
<400> 16
ctcctgacga actatttcaa atcccctatc aacctc 36
<210> 17
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi NCg12107
<400> 17
gaggttgata ggggatttga aatagttcgt caggag 36
<210> 18
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi NCg12107
<400> 18
gcaggtcgac tctagaaacc acacattatc gatc 34
<210> 19
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi NCg12108
<400> 19
ccggggatcc tctagagaac ccttagtagt tggg 34
<210> 20
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi NCg12108
<400> 20
gtaatccaag gagtgctcac ccactgatga aactcc 36
<210> 21
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi NCg12108
<400> 21
ggagtttcat cagtgggtga gcactccttg gattac 36
<210> 22
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi NCg12108
<400> 22

```

```

gcagggtcgac tctagacgag cctcaatata aatc 34
<210> 23
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn môi NCgl2986
<400> 23
cgggggatcc tctagattag gagaaaccat gagg 34
<210> 24
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn môi NCgl2986
<400> 24
atcagtcaga actgccagga ctgcagtaag aatacc 36
<210> 25
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn môi NCgl2986
<400> 25
ggtattctta ctgcagtcct ggcagttctg actgat 36
<210> 26
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn môi NCgl2986
<400> 26
gcagggtcgac tctagagttg aggcgtttgg atac 34

```