



(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)



1-0043928

(51)^{2020.01} C12N 15/77; C12P 13/00; C12N 9/04

(13) B

(21) 1-2020-01402

(22) 08/03/2019

(86) PCT/KR2019/002708 08/03/2019

(87) WO2019/172702 12/09/2019

(30) 10-2018-0028184 09/03/2018 KR

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/12/2020 393A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

(72) CHOI, Sun Hyoung (KR); CHANG, Jin Sook (KR); KIM, Hyung Joon (KR);
YOON, Byoung Hoon (KR); LEE, Ji Yeon (KR); CHOI, Yunjung (KR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) POLYNUCLEOTIT PHÂN LẬP CÓ HOẠT TÍNH CỦA TRÌNH TỰ KHỞI ĐỘNG
VÀ VI SINH VẬT THUỘC CHI CORYNEBACTERIUM CHỨA
POLYNUCLEOTIT NÀY

(21) 1-2020-01402

(57) Sáng chế đề cập đến polynucleotit mới có hoạt tính của trình tự khởi động, vector và vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa polynucleotit này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất L-axit amin sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, phương pháp điều chế chế phẩm lên men sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* và chế phẩm lên men thu được từ phương pháp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến trình tự khởi động mới và phương pháp sản xuất L-axit amin sử dụng trình tự khởi động này, và cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến polynucleotit mới có hoạt tính của trình tự khởi động, vectơ và vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa polynucleotit này, phương pháp sản xuất L-axit amin bằng cách sử dụng vi sinh vật này, và chế phẩm lên men.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit L-glutamic là axit amin tiêu biểu được tạo ra bởi quá trình lên men và có vị riêng, duy nhất, và do đó nó là axit amin quan trọng được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực thực phẩm cũng như trong lĩnh vực y tế và các lĩnh vực thức ăn chăn nuôi khác.

Phương pháp điển hình sản xuất axit L-glutamic được biết đến bao gồm phương pháp lên men bằng cách sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Brevibacterium* hoặc *Corynebacterium* và vi khuẩn dạng coryne bao gồm chủng đột biến của chúng (Amino Acid Fermentation, Gakkai Shuppan Center: 195-215, 1986) hoặc sử dụng *Escherichia coli* hoặc vi sinh vật thuộc các chi *Bacillus*, *Streptomyces*, *Penicillium*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Pantoea*, v.v. (các patent Mỹ số 3,220,929 và 6,682,912). Khi axit L-glutamic được tạo ra thông qua quá trình lên men vi sinh vật, ngoài axit L-glutamic, các vật liệu khác nhau bao gồm các axit hữu cơ được trộn lẫn trong sản phẩm lên men.

Các axit hữu cơ này là các hợp chất hữu cơ có tính axit, và bao gồm axit lactic, axit axetic, axit formic, axit xitric, axit oxalic, axit uric, v.v. Các axit hữu cơ trong thực phẩm có vị chua và ngon (umami), và có tác dụng ngăn cản sự phân hủy bằng cách làm giảm độ pH của thực phẩm. Axit lactic thường được biết là chiếm tỷ lệ lớn nhất trong số các axit hữu cơ được tạo ra thông qua quá trình lên men vi sinh vật.

Tuy nhiên, nếu tỷ lệ của axit lactic được tạo ra bởi quá trình lên men mà cao hơn thì vị chua trong sản phẩm lên men được tạo ra tăng lên, và kết quả là, có thể làm giảm

sự ngon miệng. Do đó, cần phải điều chỉnh lượng axit lactic tạo ra trong sản phẩm lên men thông qua quá trình lên men vi sinh vật.

Từ tình trạng kỹ thuật này, các tác giả đã nỗ lực làm giảm sự sản sinh của axit hữu cơ trong vi sinh vật tạo ra axit L-glutamic. Kết quả là, các tác giả đã phát triển polynucleotit mới có hoạt tính của trình tự khởi động theo sáng chế, và đã phát hiện ra rằng polynucleotit này có thể làm tăng sự sản sinh của axit L-glutamic ở chủng nêu trên và nó có thể làm giảm sự sản sinh của axit lactic, nhờ vậy hoàn thành sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất polynucleotit có hoạt tính của trình tự khởi động, trong đó nucleotit 37 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng G.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất vector chứa polynucleotit này; và gen mã hoá protein đích được liên kết hoạt động với polynucleotit này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa polynucleotit này; và gen mã hoá protein đích được liên kết hoạt động với polynucleotit này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp tạo ra chất đích, bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong môi trường; và thu hồi chất đích từ môi trường.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm lên men, bao gồm bước làm lên men bằng cách nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong môi trường.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm lên men được điều chế bằng phương pháp nêu trên.

Giải pháp kỹ thuật

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Đồng thời, mỗi sự mô tả và phương

án được đề cập trong bản mô tả này có thể được áp dụng cho các mô tả và phương án khác. Nghĩa là, tất cả sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được đề cập trong bản mô tả này đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, các mô tả cụ thể được đề cập dưới đây không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Để đạt được các mục đích nêu trên, một khía cạnh của sáng chế đề xuất polynucleotit có hoạt tính của trình tự khởi động, trong đó nucleotit 37 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng G.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 2” có thể đề cập đến một phần của trình tự khởi động của gen mã hoá lactat dehydrogenaza (LDH).

Cụ thể, thuật ngữ “lactat dehydrogenaza” đề cập đến enzym tạo ra lactat, tức là, axit lactic, bằng cách sử dụng pyruvat làm cơ chất, và có thể được sử dụng luân phiên với tên “LDH” trong bản mô tả này. Đặc biệt, gen mã hoá lactat dehydrogenaza có thể bao gồm trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3, và protein của nó có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, nhưng không giới hạn ở trình tự này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự khởi động” đề cập đến trình tự ngược dòng của nucleotit không dịch mã của vùng mã hoá, chứa miền liên kết polymeraza và có hoạt tính khởi động phiên mã cho gen đích của trình tự khởi động thành ARN thông tin, nghĩa là, miền ADN mà polymeraza liên kết vào để bắt đầu quá trình phiên mã gen, và có thể nằm trên vùng 5' của khu vực bắt đầu quá trình phiên mã ARN thông tin. Cụ thể, gen đích của trình tự khởi động này có thể là gen mã hoá lactat dehydrogenaza, nhưng không giới hạn ở gen này.

Polynucleotit theo sáng chế là một polynucleotit trong đó trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 2, nghĩa là, trình tự khởi động của gen mã hoá lactat dehydrogenaza, bị đột biến. Đặc biệt, đột biến này có thể là đột biến thế T, là nucleotit 37 của trình tự nêu trên, bằng G. Theo đó, polynucleotit này có thể chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1.

Cụ thể, thuật ngữ “biến đổi” đề cập đến sự thay đổi kiểu hình mà ổn định di truyền hoặc ổn định không di truyền, và có thể được đề cập luân phiên với “đột biến” trong bản mô tả này.

Cụ thể, polynucleotit này có thể có hoạt tính của trình tự khởi động bị biến đổi (tăng lên hoặc giảm xuống) so với hoạt tính của polynucleotit, không chứa biến đổi polynucleotit này. Theo đó, có thể điều chỉnh sự biểu hiện của gen đích được liên kết hoạt động với polynucleotit này và hoạt tính của protein được mã hoá bởi gen đích (tăng lên hoặc giảm xuống), và còn có thể điều hoà sự biểu hiện của các gen khác ngoài gen đích.

Để đạt được mục đích của sáng chế, polynucleotit này có thể là polynucleotit làm giảm hoạt tính của lactat dehydrogenaza.

Ngoài ra, polynucleotit này có thể là polynucleotit làm tăng lượng tạo ra của axit L-glutamic và/hoặc làm giảm lượng tạo ra của axit lactic.

Lactat dehydrogenaza được biết rằng là có liên quan đến sự sản sinh của axit lactic, nhưng mối quan hệ của nó với sự sản sinh của axit L-glutamic là chưa được biết đến và các tác giả đã xác định được mối quan hệ này. Cụ thể, các tác giả đã lần đầu tiên xác nhận được sự giảm hoạt tính của lactat dehydrogenaza do sự biến đổi trong trình tự khởi động của lactat dehydrogenaza, cũng như hiệu quả làm tăng lượng tạo ra của axit L-glutamic và làm giảm lượng tạo ra của axit lactic do sự giảm hoạt tính này.

Ở đây, “axit L-glutamic” hoặc “L-glutamat” đề cập đến loại axit amin và được phân loại là axit amin không thiết yếu. Axit L-glutamic được biết đến là chất dẫn truyền thần kinh kích thích phổ biến nhất trong hệ thần kinh trung ương. Ngoài ra, vì axit L-glutamic có vị ngon (umami), nên mononatri glutamat (MSG) được phát triển từ axit amin này và được sử dụng rộng rãi làm chất tăng hương vị. Axit amin này thường được tạo ra thông qua quá trình lên men vi sinh vật tạo ra axit L-glutamic.

Ngoài ra, thuật ngữ “axit lactic” là loại axit hữu cơ có vị chua. Hơn nữa, axit lactic được sử dụng làm chất tạo vị chua cho chiết xuất trái cây, sirô, và nước ngọt uống được, và được sử dụng để ngăn cản sự sinh sôi của vi khuẩn làm phân huỷ trong giai đoạn đầu của quá trình lên men rượu. Axit lactic thường được tạo ra bởi quá trình lên men ở vi sinh vật tạo ra axit lactic. Ngoài ra, nếu tạo ra quá nhiều axit lactic, chất lượng của sản phẩm lên men có thể bị huỷ hoại do vị chua quá mức, và do đó nồng độ của axit lactic cần phải được điều chỉnh phù hợp trong quá trình nuôi cấy.

Cụ thể, polynucleotit này có thể là polynucleotit chứa của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1.

Ngoài ra, trình tự nucleotit theo sáng chế có thể được biến đổi bằng các phương pháp gây đột biến đã biết, như tiến hoá định hướng, gây đột biến định hướng điểm, v.v.

Do đó, polynucleotit này có thể gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit có độ tương đồng với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 bằng ít nhất 60%, đặc biệt là ít nhất 70%, đặc biệt hơn là ít nhất 80%, và đặc biệt hơn nữa là ít nhất 83%, 84%, 88%, 90%, 93%, 95%, hoặc 97%. Rõ ràng là trình tự polynucleotit có độ tương đồng như vậy, thì phần được loại bỏ, biến đổi, thay thế, hoặc bổ sung, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế, miễn sao trình tự polynucleotit tạo ra có hoạt tính sinh học gần như tương đương hoặc tương ứng với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương đồng” có thể chỉ mức độ phù hợp với trình tự nucleotit đã cho, và có thể được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm (%). Theo sáng chế, trình tự tương đồng có hoạt tính giống hệt hoặc tương tự với trình tự nucleotit đã cho được thể hiện dưới dạng “% tương đồng”. Sự tương đồng với trình tự nucleotit có thể được xác định bằng, ví dụ, thuật toán BLAST (xem Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5873(1993) hoặc FASTA (xem Pearson, *Methods Enzymol.*, 183, 63, 1990). Dựa vào thuật toán này, các chương trình có tên là BLASTN hoặc BLASTX đã được phát triển (xem <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt” đề cập đến các điều kiện cho phép việc lai đặc hiệu giữa các polynucleotit. Ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt được mô tả cụ thể trong tài liệu (ví dụ, J. Sambrook et al.). Ví dụ, điều kiện nghiêm ngặt này có thể bao gồm các điều kiện trong đó các gen có độ tương đồng cao (ví dụ, 60% hoặc hơn, đặc biệt là 90% hoặc hơn, đặc biệt hơn là 95% hoặc hơn, đặc biệt hơn nữa là 97% hoặc hơn, và đặc biệt hơn nữa là 99% hoặc hơn) có thể lai với nhau, trong khi các gen có độ tương đồng thấp hơn không thể lai với nhau; hoặc các điều kiện lai southern thông thường (tức là, điều kiện rửa 1 lần, và đặc biệt là 2 hoặc 3 lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, 0,1% SDS, đặc biệt là ở 60°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS; và đặc biệt hơn là ở 68°C, 0,1×SSC, 0,1% SDS). Việc lai đòi hỏi hai nucleotit có trình tự bổ sung, dù có thể có sự không phù hợp giữa các bazơ tùy vào sự khắt khe của việc lai. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ của

nucleotit có khả năng được lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin là bổ sung với thymine và xytosin là bổ sung với guanin. Do đó, sáng chế có thể còn bao gồm các trình tự gần như giống nhau cũng như các đoạn polynucleotit được phân lập bổ sung với toàn bộ trình tự.

Đặc biệt, polynucleotit có độ tương đồng có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các điều kiện lai bao gồm bước lai ở giá trị T_m bằng 55°C và sử dụng các điều kiện đã được mô tả trên đây. Ngoài ra, giá trị T_m có thể bằng 60°C , 63°C , hoặc 65°C , nhưng không giới hạn ở các nhiệt độ này. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể điều chỉnh phù hợp giá trị T_m theo mục đích của họ. Độ nghiêm ngặt phù hợp để lai các polynucleotit này phụ thuộc vào độ dài và mức độ bổ sung của các polynucleotit này, và các biến đổi là được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem Sambrook et al., supra, 9,50-9,51, 11,7-11,8).

Cụ thể, thuật ngữ “chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1” có nghĩa là, khi sử dụng enzym giới hạn, thì không loại trừ việc thêm, loại bỏ, và/hoặc đột biến của nucleotit, có thể xảy ra trong quá trình liên kết với gen đích khi polynucleotit tương ứng được nối với gen đích và được sử dụng làm trình tự khởi động.

Ví dụ, polynucleotit có hoạt tính của trình tự khởi động chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 có thể được bao gồm không giới hạn miễn sao nó chứa trình tự nucleotit có hoạt tính của trình tự khởi động theo sáng chế và được lai trong điều kiện nghiêm ngặt với trình tự bổ sung đến toàn bộ hoặc một phần trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1.

Ngoài ra, polynucleotit theo sáng chế có thể là được liên kết hoạt động với gen mã hoá protein đích.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự điều hòa biểu hiện gen” đề cập đến trình tự chứa polynucleotit theo sáng chế và có khả năng biểu hiện gen đích được liên kết hoạt động với polynucleotit này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được liên kết hoạt động” có nghĩa là polynucleotit theo sáng chế có hoạt tính của trình tự khởi động được liên kết chức năng với trình tự gen để khởi động và làm trung gian quá trình phiên mã gen đích. Việc liên kết hoạt động với trình tự gen có thể đạt được bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen

đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và việc cắt và gắn ADN đặc hiệu điểm có thể được tiến hành bằng cách sử dụng enzym giới hạn và ligaza đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, nhưng không giới hạn ở enzym giới hạn và ligaza này.

Ngoài ra, trình tự điều hòa biểu hiện gen theo sáng chế có thể còn chứa trình tự điều khiển bất kỳ để điều hòa quá trình phiên mã của các gen ngoài các ngoài trình tự khởi động để tiến hành quá trình phiên mã gen, cũng như trình tự mã hoá vị trí liên kết ribosom ARN thông tin phù hợp, ADN, v.v. để điều hòa việc kết thúc phiên mã và dịch mã.

Ví dụ, ngoài các trình tự khởi động, trình tự điều hòa phù hợp cho sinh vật tiền nhân có thể còn chứa các vị trí liên kết ribosom, nhưng không giới hạn ở các vị trí này. Polynucleotit theo sáng chế có hoạt tính của trình tự khởi động có thể bao gồm trình tự điều hòa sự biểu hiện gen được mô tả trên đây, như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo sáng chế, gen đích đề cập đến gen mã hoá protein đích có biểu hiện được điều hòa bởi vi sinh vật.

Ví dụ, gen này có thể là gen có liên quan đến quá trình tạo ra của sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm axit amin (axit glutamic, v.v.), axit hữu cơ (axit lactic, v.v.), và các sự kết hợp của chúng, nhưng không giới hạn ở các sản phẩm này. Đặc biệt, gen này có thể là gen mã hoá enzym có liên quan đến quá trình sinh tổng hợp của axit amin (axit glutamic, v.v.) và/hoặc gen mã hoá enzym có liên quan đến quá trình sinh tổng hợp của axit hữu cơ (axit lactic, v.v.), nhưng không giới hạn ở các gen này. Đặc biệt hơn, gen này có thể là gen mã hoá lactat dehydrogenaza (LDH), nhưng không giới hạn ở gen này. Trình tự của gen mã hoá LDH có thể dễ dàng thu được bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này thông qua cơ sở dữ liệu đã biết như GenBank của Viện Y tế quốc gia (NIH: National Institutes of Health).

Ví dụ, trình tự điều hòa biểu hiện gen theo sáng chế được liên kết hoạt động với trình tự gen mã hoá LDH, và do đó lượng tạo ra của axit glutamic ở vi sinh vật có thể được tăng lên và lượng tạo ra của axit lactic có thể được giảm xuống.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vector chứa gen nêu trên; polynucleotit nêu trên; và gen mã hoá protein đích được liên kết hoạt động với polynucleotit này.

Polynucleotit là như được mô tả trên đây.

Cụ thể, protein đích có thể là lactat dehydrogenaza (LDH).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” đề cập đến phân tử ADN nhân tạo có vật liệu di truyền có khả năng biểu hiện gen đích ở vật chủ phù hợp, và đề cập đến cấu trúc ADN chứa polynucleotit hoặc trình tự điều hòa biểu hiện gen phù hợp; và trình tự nucleotit của gen mã hoá protein đích được liên kết hoạt động với trình tự điều hòa.

Vector được sử dụng trong bản mô tả này không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có thể được biểu hiện trong tế bào chủ, và vector bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để biến nạp vào tế bào chủ. Ví dụ về vector thông thường có thể bao gồm plasmit tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmit, virus, và thể thực khuẩn.

Ví dụ, vector thể thực khuẩn hoặc vector cosmit, *pWE15*, *M13*, *λLB3*, *λBL4*, *λIXII*, *λASHII*, *λAPII*, *λt10*, *λt11*, *Charon4A*, *Charon21A*, v.v. có thể được sử dụng; và vector plasmit, các vector dựa trên *pBR*, *pUC*, *pBluescriptII*, *pGEM*, *pTZ*, *pCL*, *pET*, v.v. có thể được sử dụng.

Ngoài ra, trình tự khởi động nội sinh trong nhiễm sắc thể có thể được thay thế bằng polynucleotit theo sáng chế có hoạt tính của trình tự khởi động thông qua vector chèn vào nhiễm sắc thể trong tế bào chủ. Ví dụ, các vector *pECCG117*, *pDZ*, *pACYC177*, *pACYC184*, *pCL*, *pUC19*, *pBR322*, *pMW118*, *pCC1BAC*, *pCES208*, *pXMJ19*, v.v. có thể được sử dụng, nhưng không giới hạn ở các vector này.

Ngoài ra, việc chèn polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể là đạt được bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng tái tổ hợp tương đồng.

Vì vector theo sáng chế có thể được chèn vào nhiễm sắc thể bằng cách gây ra tái tổ hợp tương đồng, nên chỉ thị chọn lọc có thể được bao gồm thêm để xác nhận việc chèn gen thành công vào nhiễm sắc thể. Chỉ thị chọn lọc để sàng lọc tế bào được biến nạp bằng vector, nói cách khác, để xác định liệu polynucleotit đã được chèn vào hay chưa. Có thể sử dụng các chỉ thị tạo ra các kiểu hình chọn lọc được như tính kháng thuốc, dinh dưỡng thụ động, tính kháng các chất độc, hoặc sự biểu hiện của các protein trên bề mặt. Trong môi trường được xử lý bằng chất chọn lọc, chỉ tế bào biểu hiện chỉ thị chọn

lọc mới có thể sống sót, hoặc tế bào thể hiện kiểu hình khác biệt, và do đó các tế bào được biến nạp thành công có thể được lựa chọn thông qua phương pháp này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến việc đưa vector chứa polynucleotit hoặc trình tự điều hòa biểu hiện gen và gen mã hoá protein đích vào tế bào chủ để biểu hiện gen này trong tế bào chủ. Ngoài ra, miễn là gen đích có thể được biểu hiện trong tế bào chủ, việc polynucleotit được biến nạp và gen mã hoá protein đích có nằm trên nhiễm sắc thể của tế bào chủ hay nằm bên ngoài nhiễm sắc thể là không quan trọng, và cả hai trường hợp này đều được bao gồm.

Phương pháp biến nạp có thể bao gồm tất cả các phương pháp đưa trình tự điều hòa biểu hiện gen và gen mã hoá protein đích vào tế bào, và có thể được tiến hành bằng cách chọn kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này tùy vào tế bào chủ. Ví dụ, kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp có thể được chọn trong số các kỹ thuật bao gồm xung điện, kết tủa canxi phosphat (CaPO_4), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), vi tiêm, kỹ thuật polyetylen glycol (PEG), kỹ thuật DEAE-dextran, kỹ thuật liposom cation, và kỹ thuật lithi axetat-DMSO, nhưng không giới hạn ở các kỹ thuật này.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa polynucleotit nêu trên; và gen mã hoá gen đích được liên kết hoạt động với polynucleotit này.

Polynucleotit và gen mã hoá gen đích được liên kết hoạt động với polynucleotit này là như được mô tả trên đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vi sinh vật” bao gồm tất cả vi sinh vật kiểu hoang và vi sinh vật tự nhiên hoặc đã được biến đổi di truyền một cách nhân tạo, và nó có thể là vi sinh vật có cơ chế tăng cường hoặc suy yếu cụ thể do sự chèn vào của gen ngoại lai hoặc sự tăng cường hoặc suy giảm hoạt tính của gen nội sinh.

Theo sáng chế, vi sinh vật này có thể bao gồm polynucleotit nêu trên, cụ thể là polynucleotit và/hoặc gen mã hoá gen đích được liên kết hoạt động với polynucleotit này. Theo cách khác, vi sinh vật này có thể chứa polynucleotit nêu trên hoặc trình tự điều hòa biểu hiện gen và vector chứa polynucleotit này hoặc trình tự điều hòa biểu hiện gen và gen mã hoá protein đích, nhưng không giới hạn ở các thành phần này. Ngoài ra, polynucleotit, gen mã hoá protein đích, và vector có thể được đưa vào vi sinh vật bằng

cách biến nạp, nhưng không giới hạn ở biến nạp. Ngoài ra, miễn là gen này có thể được biểu hiện trong vi sinh vật, thì việc polynucleotit này và gen mã hoá protein đích có nằm trên nhiễm sắc thể hay nằm bên ngoài nhiễm sắc thể là không quan trọng.

Để đạt được các mục đích của sáng chế, vi sinh vật chứa polynucleotit này và gen mã hoá protein đích có thể là vi sinh vật có lượng tạo ra của axit L-glutamic tăng lên và lượng tạo ra của axit lactic giảm xuống.

Ví dụ, vi sinh vật này có thể có polynucleotit nêu trên trong đó hoạt tính của lactat dehydrogenaza bị suy giảm.

Theo sáng chế, vi sinh vật có thể được bao gồm không giới hạn miễn là nó là vi sinh vật trong đó polynucleotit theo sáng chế có hoạt tính của trình tự khởi động được đưa vào để nó hoạt động như trình tự khởi động.

Cụ thể, vi sinh vật này có thể là vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*; cụ thể hơn có thể là *Corynebacterium glutamicum* hoặc *Corynebacterium flavum*; và cụ thể nhất có thể là *Corynebacterium glutamicum*, nhưng không giới hạn ở các vi sinh vật này.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra chất đích, bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong môi trường; và thu hồi chất đích từ môi trường.

Polynucleotit và vi sinh vật là như được mô tả trên đây.

Theo sáng chế, chất đích có thể là axit amin. Cụ thể, axit amin có thể là axit amin kiểu L trừ khi có quy định khác, và có thể là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, threonin, serin, xystein, glutamin, methionin, aspartat, asparagin, axit glutamic, lysin, arginin, histidin, phenylalanin, tyrosin, tryptophan, prolin, và sự kết hợp của các axit amin này, nhưng không giới hạn ở các axit amin này.

Cụ thể hơn, axit amin có thể là axit glutamic, nhưng không giới hạn ở axit amin này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nuôi cấy” đề cập đến việc nuôi cấy vi sinh vật trong các điều kiện môi trường được kiểm soát nhân tạo. Theo sáng chế, phương

pháp để sản xuất chất đích sử dụng vi sinh vật với polynucleotit này có thể được tiến hành bằng phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đặc biệt, việc nuôi cấy có thể được tiến hành trong quy trình theo mẻ hoặc quy trình liên tục như quy trình cung cấp theo mẻ hoặc quy trình cung cấp theo mẻ lặp lại, nhưng không giới hạn ở các quy trình này. Môi trường được sử dụng để nuôi cấy phải thỏa mãn các yêu cầu của chủng cụ thể được sử dụng. Môi trường nuôi cấy phù hợp để sử dụng trong nuôi cấy chủng *Corynebacterium* là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, Manual of Methods for General Bacteriology by the American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981).

Các nguồn cacbon có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy có thể là sacarit và các cacbohydrat như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza; dầu và lipit như dầu đậu nành, dầu hạt hướng dương, dầu lạc, và dầu dừa; các axit béo như axit palmitic, axit steric, axit linoleic; các rượu như glyxerol và etanol; và các axit hữu cơ như axit axetic. Các vật liệu này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với nhau, nhưng không giới hạn ở đó.

Ví dụ về các nguồn nitơ có thể được sử dụng bao gồm pepton, chiết xuất nấm men, canh thang, chiết xuất mạch nha, rượu ngô ngâm, bột đậu nành và ure, hoặc các hợp chất vô cơ như amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với nhau, nhưng không giới hạn ở đó.

Các nguồn phospho có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy có thể bao gồm dikali hydro phosphat, kali dihydro phosphat, hoặc các muối chứa natri tương ứng. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể chứa các muối kim loại cần thiết cho sự phát triển của tế bào, và có thể là được bổ sung với các vật liệu cần thiết cho sự phát triển, như các axit amin và vitamin ngoài các vật liệu trên đây. Ngoài ra, các tiền chất phù hợp cho môi trường nuôi cấy có thể được sử dụng. Các chất thô trên đây có thể được cung cấp đủ vào môi trường nuôi cấy theo mẻ hoặc liên tục.

Trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật, độ pH của mẫu nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng hợp chất bazơ phù hợp như natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac, hoặc hợp chất axit như axit phosphoric hoặc axit sulfuric. Việc tạo bọt có thể được điều chỉnh bằng chất chống bọt như polyglycol este của axit béo. Điều kiện ưa khí của môi trường

nuôi cấy có thể được duy trì bằng cách đưa vào oxy hoặc hỗn hợp khí chứa oxy (ví dụ, không khí).

Nhiệt độ của (môi trường) mẫu nuôi cấy thường có thể từ 20°C đến 45°C, cụ thể là từ 25°C đến 40°C. Việc nuôi cấy có liên tục cho đến khi thu được lượng tạo ra mong muốn của chất đích, cụ thể là trong khoảng thời gian từ 10 giờ đến 160 giờ.

Việc thu hồi chất đích từ (môi trường) mẫu nuôi cấy có thể được tiến hành bằng phương pháp tách thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Có thể sử dụng các phương pháp như ly tâm, lọc, sắc ký, tạo tinh thể, v.v. làm phương pháp tách. Ví dụ, dịch nổi thu được bằng cách ly tâm môi trường nuôi cấy ở tốc độ thấp để loại bỏ sinh khối có thể có thể được tách bằng sắc ký trao đổi ion, nhưng không giới hạn ở phương pháp này. Trong phương án thay thế, chất đích có thể được thu hồi mà không cần đến quy trình tinh chế bổ sung, bằng thực hiện các quy trình tách tế bào vi khuẩn từ (môi trường) sản phẩm nuôi cấy và lọc. Trong phương án thay thế khác, chất đích có thể được thu hồi, và bước thu hồi này có thể còn bao gồm quy trình tinh chế.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm lên men, bao gồm bước làm lên men bằng cách nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* trong môi trường.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm lên men được điều chế bằng phương pháp nêu trên.

Polynucleotit và vi sinh vật là như được mô tả trên đây, và bước nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường là cũng như được mô tả trên đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chế phẩm lên men” đề cập đến chế phẩm thu được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế trong môi trường. Ngoài ra, chế phẩm lên men này có thể bao gồm chế phẩm trong dạng lỏng hoặc bột thu được sau khi nuôi cấy vi sinh vật sau khi hậu xử lý phù hợp. Cụ thể, quy trình hậu xử lý phù hợp có thể bao gồm, ví dụ, quy trình nuôi cấy vi sinh vật, quy trình loại bỏ tế bào vi khuẩn, quy trình cô đặc, quy trình lọc, và quy trình trộn các chất mang, và có thể còn bao gồm quy trình làm khô. Trong một số trường hợp, quy trình hậu xử lý này có thể không bao gồm quy trình tinh chế. Chế phẩm lên men, thu được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế, được đặc trưng bởi lượng tạo ra của axit glutamic được tăng lên trong khi lượng

tạo ra của axit lactic bị giảm xuống, nhờ vậy khiến nó có thể tạo ra vị tối ưu.

Ngoài ra, “chế phẩm lên men” không loại trừ các sản phẩm gia vị (ví dụ, sản phẩm súp bột, sản phẩm gia vị ăn nhẹ, v.v.) chứa chế phẩm này dưới dạng lỏng hoặc bột. Ngoài ra, “chế phẩm lên men” không loại trừ các trường hợp trong đó chất thu được bằng quy trình không lên men hoặc chất khác thu được bằng quy trình phi tự nhiên cũng được bao gồm, miễn là chế phẩm này thu được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế được bao gồm ở đây.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Trình tự khởi động mới theo sáng chế có thể được đưa vào vi sinh vật tạo ra axit amin, nhờ đó làm tăng lượng tạo ra của axit amin trong vi sinh vật và làm giảm lượng tạo ra của axit hữu cơ. Đặc biệt, khi axit L-glutamic được tạo ra bằng cách sử dụng trình tự khởi động mới theo sáng chế, các lượng của axit L-glutamic và axit hữu cơ trong sản phẩm lên men được điều chỉnh để cải thiện hương vị và sự ngon miệng của sản phẩm lên men.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết với các phương án ví dụ kèm theo. Tuy nhiên, các phương án ví dụ được đề cập ở đây chỉ có mục đích minh họa và không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Chọn lọc chủng đột biến để làm giảm sự sản sinh của axit lactic

Ví dụ 1-1: Tạo đột biến ngẫu nhiên bằng chiếu xạ tia UV

Corynebacterium glutamicum kiểu hoang (ATCC13869) được cấy vào đĩa trên môi trường dinh dưỡng chứa thạch và được nuôi cấy ở 30°C trong 16 giờ, để chọn lọc các chủng đột biến cải thiện sự sản sinh của axit L-glutamic, là sản phẩm đích của quá trình lên men, và giảm sự sản sinh của axit lactic, là axit làm giảm sự ngon miệng của sản phẩm lên men. Hàng trăm khuẩn lạc thu được từ đó được chiếu xạ bằng tia UV ở nhiệt độ phòng để tạo đột biến ngẫu nhiên trên bộ gen của chủng này.

Ví dụ 1-2: Thử nghiệm về độ chuẩn lên men của chủng đột biến và chọn lọc chủng

Dưới đây, tiến hành thử nghiệm về độ chuẩn lên men của các chủng đột biến, đã

được tạo đột biến ngẫu nhiên.

Từng khuẩn lạc được cấy chuyển trong môi trường dinh dưỡng, và sau đó được nuôi cấy trong môi trường lên men trong 5 giờ. Tiếp theo, 25% tween 40 được thêm vào từng môi trường với nồng độ 0,4%, và sau đó từng khuẩn lạc được nuôi cấy lại trong 32 giờ.

Môi trường dinh dưỡng:

Glucosa 1%, nước thịt 0,5%, polypepton 1%, natri clorua 0,25%, chiết xuất nấm men 0,5%, thạch 2%, ure 0,2%, pH 7,2

Môi trường lên men:

Đường thô 6%, canxi cacbonat 5%, amoni sulfat 2,25%, kali monophosphat 0,1%, magie sulfat 0,04%, sắt sulfat (10 mg/L), biotin (0,3 mg/L), thiamin hydroclorua (0,2 mg/L)

Mỗi khuẩn lạc được nuôi cấy trong các điều kiện nêu trên, và sau đó chọn ra các chủng đột biến tạo ra axit L-glutamic với lượng bằng hoặc lớn hơn lượng được tạo ra bởi *Corynebacterium glutamicum* kiểu hoang (ATCC13869). Ngoài ra, đối với các chủng đột biến được chọn, nồng độ của axit L-glutamic được đo bằng YSI, và nồng độ của axit lactic được đo bằng HPLC. Các nồng độ đo được của axit L-glutamic và axit lactic được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

Chủng	Axit L-glutamic (g/L)	Axit lactic (g/L)
ATCC13869	14,5	1,5
ATCC13869-m1	15,1	1,2
ATCC13869-m2	14,0	0,7
ATCC13869-m3	17,7	1,5
ATCC13869-m4	13,9	2,0
ATCC13869-m5	14,4	1,8
ATCC13869-m6	16,7	0,9
ATCC13869-m7	18,8	0,4
ATCC13869-m8	16,2	0,7
ATCC13869-m9	18,9	0,1
ATCC13869-m10	12,4	2,1
ATCC13869-m11	13,8	2,1
ATCC13869-m12	15,7	1,4
ATCC13869-m13	15,3	0,8
ATCC13869-m14	16,4	1,0
ATCC13869-m15	17,2	1,1
ATCC13869-m16	18,2	0,7

Dựa trên Bảng 1, “ATCC13869-m7” và “ATCC13869-m9” được chọn làm các chủng có lượng axit L-glutamic được tạo ra tăng và lượng axit lactic được tạo ra giảm so với các lượng của axit L-glutamic và axit lactic được tạo ra từ chủng kiểu hoang.

Ví dụ 2: Xác nhận đột biến bằng cách giải trình tự gen

Để xác nhận sự đột biến gen trong các chủng đột biến, gen của các chủng ATCC13869-m7 và ATCC13869-m9 được so sánh với các gen của chủng kiểu hoang.

Kết quả là, các chủng ATCC13869-m7 và ATCC13869-m9 được phát hiện ra là chứa cùng đột biến ở một vị trí cụ thể trong vùng trình tự khởi động của gen mã hoá lactat dehydrogenaza.

Cụ thể, ATCC13869-m7 và ATCC13869-m9 được xác nhận là chứa đột biến mà trong đó nucleotit 37, T, trong trình tự của vùng trình tự khởi động nêu trong SEQ ID NO: 2 được thay thế bằng G. Vùng trình tự khởi động nêu trong SEQ ID NO: 2 được xác nhận là trình tự thường được bao gồm trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, cụ thể hơn, *Corynebacterium glutamicum* kiểu hoang (ATCC13032, ATCC13869, và ATCC14067).

Do đó, trong các ví dụ 3 và 4, các nỗ lực được tiến hành để xác nhận liệu đột biến nêu trên có ảnh hưởng đến các lượng tạo ra của axit glutamic và axit lactic trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* hay không.

Ví dụ 3: Tạo ra chủng có đột biến đích và xác nhận lượng tạo ra của axit lactic

Ví dụ 3-1: Tạo ra chủng có đột biến đích

Tiến hành tạo ra chủng đột biến có đột biến đích đã được xác nhận trong ví dụ 2. Cụ thể, để đưa đột biến này vào *Corynebacterium glutamicum* kiểu hoang ATCC13869 và ATCC13032 (nghĩa là, để thay thế nucleotit 37 của trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 bằng G), oligonucleotit theo chiều nghịch đảo có độ dài 75-mer, chứa đột biến đích, được thiết kế.

Cụ thể, oligonucleotit (30 µg) nêu trong SEQ ID NO: 5 được biến nạp vào các chủng *Corynebacterium glutamicum* kiểu hoang ATCC13869 và ATCC13032 bằng cách sử dụng phương pháp xung điện (Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52:541-545), và sau đó thêm vào môi trường lỏng phức hợp (1 mL). Tiếp theo, sản phẩm tạo ra được nuôi cấy ở 30°C trong 30 phút trong khi lắc ở 160 vòng mỗi phút (rpm). Sau đó, môi trường nuôi cấy được ủ trong đá trong 10 phút, được ly tâm 4000 vòng mỗi phút ở 4°C trong 10 phút, và sau đó dịch nổi được loại bỏ để thu tế bào vi sinh vật. Tiếp theo, 1 mL dung dịch glyxerol 10% (4°C) được thêm vào và trộn, và sau đó sản phẩm tạo ra được ly tâm 4000 vòng mỗi phút ở 4°C trong 10 phút. Dịch nổi được loại bỏ và sau đó tế bào vi sinh vật được rửa. Quy trình này được lặp lại một lần nữa để rửa lại tế bào vi sinh vật, và dung dịch glyxerol 10% (4°C và 0,1 mL) được thêm vào để tạo ra các chủng cho lần biến nạp tiếp theo. Sau đó, quy trình biến nạp được lặp lại 10 lần với oligonucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5 bằng cách sử dụng the phương pháp xung điện được mô tả trên đây, và sau đó sản phẩm tạo ra được cấy lên đĩa trên môi trường đĩa phức hợp để thu các

khuẩn lạc (Nat. Protoc., 2014 Oct; 9(10): 2301-16).

Kết quả của phân tích trình tự gen của các khuẩn lạc thu được, đã xác nhận rằng đột biến đích đã được đưa vào các chủng. Ngoài ra, các chủng có đột biến đích được đặt tên là “ATCC13869::ldh-pro-1mt” và “ATCC13032::ldh-pro-1mt”.

Ví dụ 3-2: Xác nhận lượng tạo ra của axit lactic

Các chủng đột biến ATCC13869::ldh-pro-1mt và ATCC13032::ldh-pro-1mt, được tạo ra trong ví dụ 3-1, và các chủng *Corynebacterium glutamicum* kiểu hoang ATCC13869 và ATCC13032 của chúng được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1-2.

Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, đo nồng độ của axit L-glutamic và axit lactic trong từng môi trường. Các nồng độ đo được của axit L-glutamic và axit lactic được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Chủng	Axit L-glutamic (g/L)	Axit lactic (g/L)
ATCC13869	14,5	1,5
ATCC13869::ldh-pro-1mt	19,2	0,0
ATCC13032	8,2	2,7
ATCC13032::ldh-pro-1mt	10,8	0,3

Như được thể hiện trong Bảng 2, đã xác nhận rằng nồng độ của axit L-glutamic được tạo ra bởi chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869::ldh-pro-1mt, có đột biến đích, là lớn hơn khoảng 4,7 g/L (khoảng 32%) so với nồng độ của axit L-glutamic được tạo ra bởi chủng *Corynebacterium glutamicum* kiểu hoang ATCC13869. Mặt khác, chủng *Corynebacterium glutamicum* kiểu hoang ATCC13869 đã tạo ra 1,5 g/L axit lactic, nhưng không đo được axit lactic trong môi trường nuôi cấy chủng ATCC13869::ldh-pro-1mt.

Ngoài ra, đã xác nhận rằng nồng độ của axit L-glutamic được tạo ra bởi chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032::ldh-pro-1mt, có đột biến đích, là lớn hơn khoảng 2,6 g/L (khoảng 32%) so với nồng độ của axit L-glutamic được tạo ra bởi chủng

Corynebacterium glutamicum kiểu hoang ATCC13032. Mặt khác, chủng *Corynebacterium glutamicum* kiểu hoang ATCC13032 đã tạo ra 2,7 g/L axit lactic, nhưng chỉ đo được lượng rất nhỏ của axit lactic (0,3 g/L) trong môi trường nuôi cấy chủng ATCC13032::ldh-pro-1mt.

Do đó, xác nhận rằng đột biến nêu trên đã làm tăng sự sản sinh của axit L-glutamic và làm giảm sự sản sinh của axit lactic trong vi sinh vật.

Ngoài ra, chủng ATCC13869::ldh-pro-1mt được đặt tên là CA02-9209 và được lưu giữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM: Korean Culture Center of Microorganism), là cơ quan lưu giữ quốc tế theo hiệp ước Budapest, vào ngày 28 tháng 2 năm 2018, và được đặt số truy cập là KCCM12227P.

Ví dụ 4: Xác nhận hoạt tính enzym và lượng axit lactic được tạo ra ở chủng KFCC11074 có đột biến đích

Ví dụ 4-1: Tạo ra vector có đột biến đích

Để xác nhận liệu rằng đột biến đích có thể hiện cùng hiệu quả ở các chủng có sự sản sinh tăng của axit glutamic, ngoài các chủng kiểu hoang, đột biến này còn được đưa vào chủng KFCC11074 (patent Hàn Quốc số 10-0292299), được biết đến là chủng tạo ra axit glutamic.

Cụ thể, vector thay thế gen được tạo ra để thay thế nucleotit 37 của trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, được bao gồm trong chủng này, bằng G. Các đoạn gen để tạo ra vector này được thu bằng PCR sử dụng ADN trong bộ gen của ATCC13869 làm đoạn khuôn. Dựa vào thông tin về các gen và các trình tự liên kề của *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13869) được đăng ký trong Viện sức khỏe quốc gia GenBank (NIH GenBank: National Institutes of Health GenBank), các đoạn mồi chứa các polynucleotit từ SEQ ID NO: 6 đến SEQ ID NO: 9 được tạo ra.

Sau khi biến tính ở 95°C trong 5 phút, PCR được tiến hành với tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện sau đây: biến tính ở 95°C trong 20 giây, gắn mồi ở 55°C trong 20 giây, và polyme hoá ở 72°C trong 30 giây. Dưới đây, phản ứng polyme hoá được tiến hành ở 72°C trong 5 phút. Cụ thể hơn, thu được polynucleotit (500 bp) được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 và

polynucleotit (500 bp) được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9. Hai đoạn ADN tạo ra, được cắt bằng các enzym giới hạn BamHI và SalI, được nối vào vector *pDZ* (patent Hàn Quốc số 10-0924065 và công bố quốc tế số 2008-033001), bằng cách sử dụng enzym dung hợp, và nhờ vậy tạo ra vector thay thế gen. Vector tạo ra được đặt tên là “*pDZ-ldh-pro-1mt*”. Thông tin về các trình tự đoạn mồi được sử dụng để tạo ra vector này được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

SEQ ID NO:	Đoạn mồi	Trình tự (từ 5' đến 3')
6	ldh-pro-1mt-AF	CGGTACCCGGGGATCCTGTGGGTGGCGTTGTA
7	ldh-pro-1mt-AR	CTTTGTTACACCTTTACTTATGCCCGATTATGT
8	ldh-pro-1mt-BF	GTAAAGGTGTAACAAAGGAATCCGGGCACAAGC
9	ldh-pro-1mt-BR	ATGCCTGCAGGTCGACCCACACTGCGTAGGTC

Ví dụ 4-2: Tạo ra KFCC11074 có đột biến đích và xác nhận lượng tạo ra của axit lactic

Vector thay thế gen được tạo ra trong ví dụ 4-1, được đưa vào chủng KFCC11074 để tạo ra “KFCC11074::ldh-pro-1mt”, là chủng tạo ra axit glutamic có đột biến đích. Từng chủng *Corynebacterium glutamicum* KFCC11074, không có đột biến đích, và chủng KFCC11074::ldh-pro-1mt được nuôi cấy theo cách giống như trong ví dụ 1-2.

Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, nồng độ của axit L-glutamic và axit lactic trong từng môi trường được đo lại. Các nồng độ đo được của axit L-glutamic và axit lactic được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Chủng	Axit L-glutamic (g/L)	Axit L-lactic (g/L)
KFCC11074	9,1	22,5
KFCC11074::ldh-pro-1mt	17,1	6,5

Như được thể hiện trong Bảng 4, đã xác nhận rằng nồng độ của axit L-glutamic được tạo ra bởi chủng *Corynebacterium glutamicum* KFCC11074::ldh-pro-1mt, có đột biến đích, là lớn hơn khoảng 8 g/L (khoảng 88%) so với nồng độ của axit L-glutamic

được tạo ra bởi chủng *Corynebacterium glutamicum* KFCC11074, không có đột biến đích.

Mặt khác, đã xác nhận rằng nồng độ của axit lactic được tạo ra bởi chủng KFCC11074::ldh-pro-1mt là thấp hơn 17 g/L so với nồng độ của axit lactic được tạo ra bởi chủng *Corynebacterium glutamicum* KFCC11074, không có đột biến đích.

Tức là, đã xác nhận lại một lần nữa là đột biến đích đã làm tăng sự sản sinh của axit L-glutamic trong vi sinh vật và làm giảm sự sản sinh của axit lactic.

Ví dụ 4-3: Xác nhận hoạt tính enzym LDH của KFCC11074 có đột biến đích

Vì đã xác nhận được cơ chế cho việc giảm sự sản sinh của axit lactic ở chủng KFCC11074::ldh-pro-1mt, được tạo ra trong ví dụ 4-2, và vì đã xác nhận rằng đột biến đích được bao gồm trong trình tự khởi động của lactat dehydrogenaza (LDH), nên việc tiến hành xác định hoạt tính của lactat dehydrogenaza, là enzym tạo ra axit lactic, phụ thuộc vào đột biến này.

Cụ thể là, hoạt tính của enzym này được đánh giá bằng cách dưới đây. Đầu tiên, tế bào được nuôi cấy trong môi trường #3 (25 mL), có thành phần như dưới đây, trong bình (250 mL) với 200 vòng mỗi phút ở 30°C trong 6 giờ. Sau đó, dịch nổi được loại bỏ bằng cách làm kết tủa tế bào ở 4000 vòng mỗi phút trong 10 phút, và việc rửa tế bào được lặp lại 3 lần bằng cách sử dụng 20 mM Tris-HCl (25 mL, pH 7,5). Sau khi rửa, dịch nổi được loại bỏ, và tế bào được tái huyền phù bằng cách sử dụng 15% chất đệm glyxerol (2 mL) trong 20 mM Tris (pH 7,5) để chiết tế bào. Tế bào đã tái huyền phù (1 mL) được đặt vào ống hạt và được làm đồng nhất 6 lần trong điều kiện 46/30 giây bằng cách sử dụng thiết bị làm đồng nhất. Dưới đây, sản phẩm tạo ra được ly tâm 13000 vòng mỗi phút ở 4°C trong 20 phút.

Môi trường #3:

Glucosa 2%, polypepton 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, KH_2PO_4 0,52%, K_2HPO_4 1,07%, chiết xuất nấm men 1%, ure 0,15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, d-biotin (1,8 mg/L), thiamin-HCl (9 mg/L), muối canxi của axit pantothenic (9 mg/L), niaxinamit (60 mg/L)

Sau đó, thử nghiệm Bradford được tiến hành để xác nhận và chuẩn hoá nồng độ của protein được bao gồm trong dịch nổi (mẫu) thu được từ ống hạt. Với việc tham chiếu

đến các Bảng 5 và 6 dưới đây, thử nghiệm Bradford đã tạo ra đường cong chuẩn và đã xác nhận nồng độ của mẫu. Cụ thể, 1x chất phản ứng thử nghiệm protein Biorad (980 μL) được thêm vào mẫu có tổng thể tích 20 μL và sau đó được xoáy để đo độ hấp thụ ở 595 nm trong khoảng 3 phút.

Bảng 5

STD và lấy mẫu chiết					
mg/mL	0	0,025	0,05	0,1	0,2
BSA (1 mg/mL) (μL)	0	0,5	1	2	4
Đệm chiết (μL)	20	19,5	19	18	16
Tổng thể tích (μL)	20	20	20	20	20

Bảng 6

Dịch chiết tế bào	Độ pha loãng 1:10	Độ pha loãng 1:5	Độ pha loãng 1:20	Độ pha loãng 1:50
Dịch chiết tế bào (μL)	2	4	(1/10)10	(1/10)4
Đệm chiết (μL)	18	16	10	16
Tổng thể tích (μL)	20	20	20	20

Dưới đây, thử nghiệm về hoạt tính của lactat dehydrogenaza trong các chủng KFCC11074 và KFCC11074::ldh-pro-1mt được tiến hành bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng, tỷ lệ thành phần của dung dịch phản ứng được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây. Ngoài ra, 30 mM natri pyruvat được sử dụng làm chất khởi động. Ngoài ra, hoạt tính của lactat dehydrogenaza trong hai chủng này, được đo dưới các điều kiện trong Bảng 8, được thể hiện trong Bảng 9 dưới đây.

Bảng 7

Dung dịch phản ứng	Cho mỗi 1 phản ứng
0,2 M Tris-HCl pH 7,5 (μL)	500
30 mM natri pyruvat (μL)	100
6,6 mM NADH (μL)	50
Dịch chiết tế bào (mg/mL)	178 μg
DDW	Đến 1 mL

Bảng 8

Cuvet		10 mm	
Bước sóng		340	nm
Đơn vị		U	
Hệ số		-1	
Vị trí thập phân		3	
Nhiệt độ		Bật	
	Nhiệt độ	25	°C
Quy trình đo		Hồi quy tuyến tính	
	Độ trễ	00:01	Phút:giây
	Thời gian đo	1:30	Phút:giây
	Khoảng cách	00:8	Phút:giây
Tự động in		Tắt	

Bảng 9

Chủng	Hoạt tính LDH (U)
KFCC11074	0,398
KFCC11074::ldh-pro-1mt	0,150

Như được thể hiện trong Bảng 9, đã xác nhận rằng hoạt tính của lactat dehydrogenaza bị giảm đi trong các chủng có đột biến đích.

Nghĩa là, đã xác nhận rằng đột biến này đã làm giảm hoạt tính của lactat

dehydrogenaza trong vi sinh vật, nhờ vậy làm giảm sự sản sinh của axit lactic.

Tóm lại, polynucleotit theo sáng chế là trình tự khởi động của lactat dehydrogenaza chứa đột biến thay thế một nucleotit đơn, và do đó polynucleotit này có thể làm suy giảm hoạt tính của lactat dehydrogenaza trong các chủng kiểu hoang hoặc các chủng tạo ra axit glutamic thông qua hoạt tính của trình tự khởi động đột biến; kết quả là, làm tăng sự sản sinh của axit glutamic, là sản phẩm đích của quá trình lên men, và còn, làm giảm sự sản sinh của axit lactic, là axit làm giảm sự ngon miệng của sản phẩm lên men. Theo đó, polynucleotit theo sáng chế có thể được sử dụng hiệu quả trong các lĩnh vực công nghiệp khác nhau để tạo ra axit glutamic với hiệu suất cao.

Từ phần mô tả trên đây, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế có liên quan, sẽ có thể hiểu rằng sáng chế có thể được bộc lộ trong các dạng cụ thể khác mà không làm thay đổi các khái niệm kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Về vấn đề này, các phương án ví dụ được đề cập ở đây chỉ có mục đích minh họa và không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngược lại, sáng chế được dự định là không chỉ bao gồm các phương án ví dụ này mà còn bao gồm các dạng thay thế, các dạng cải biến, các dạng tương đương, và các phương án khác mà có thể được bao gồm trong phạm vi của sáng chế như được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ.

Số truy cập

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

Số truy cập: KCCM12227P

Ngày lưu giữ: Ngày 28 tháng 2 năm 2018

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polynucleotit phân lập có hoạt tính của trình tự khởi động, chứa nucleotit SEQ ID NO: 2, trong đó nucleotit thứ 37 được thay thế bằng G.
2. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó polynucleotit này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1.
3. Polynucleotit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó polynucleotit này được liên kết hoạt động với gen mã hoá protein đích.
4. Vector chứa polynucleotit theo điểm 1 hoặc điểm 2; và gen mã hoá protein đích được liên kết hoạt động với polynucleotit này.
5. Vector theo điểm 4, trong đó protein đích là lactat dehydrogenaza.
6. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, chứa polynucleotit theo điểm 1; và gen mã hoá protein đích được liên kết hoạt động với polynucleotit này.
7. Vi sinh vật theo điểm 6, trong đó polynucleotit chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1.
8. Vi sinh vật theo điểm 6, trong đó protein đích là lactat dehydrogenaza.
9. Vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* này là *Corynebacterium glutamicum*.
10. Phương pháp sản xuất chất đích, bao gồm các bước:

nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8 trong môi trường; và

thu hồi chất đích từ môi trường nuôi cấy.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó chất đích là axit amin.
12. Phương pháp điều chế chế phẩm lên men, bao gồm bước làm lên men bằng cách nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8 trong môi trường.
13. Chế phẩm lên men được điều chế bằng phương pháp theo điểm 12.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> CJ CheilJedang Corporation
- <120> POLYNUCLEOTIT PHÂN LẬP CỐ HOẠT TÍNH CỦA TRÌNH TỰ KHỞI ĐỘNG VÀ VI SINH VẬT THUỘC CHI CORYNEBACTERIUM CHỨA POLYNUCLEOTIT NÀY
- <130> OPA18460
- <150> KR 10-2018-0028184
- <151> 2018-03-09
- <160> 9
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 44
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Vùng trình tự khởi động LDH
- <400> 1
 tgggtctgacc acatttttcgg acataatcgg gcataagtaa aggt
 44
- <210> 2
- <211> 44
- <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum
- <400> 2
 tgggtctgacc acatttttcgg acataatcgg gcataattaa aggt
 44
- <210> 3
- <211> 945
- <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum
- <400> 3
 atgaaagaaa ccgtcggtaa caagattgtc ctcatgtggcg caggcgatgt cggagttgca
 60
 tacgcatatg cactgatcaa ccaaggcatg gcagaccacc ttgcgatcat cgacattgat
 120
 gaaaagaaac tcgaaggcaa cgtcaaggac ttaaaccatg gtgttgtgtg ggccgattcc
 180
 cgcacccgcg tcactaaggg aacctacgct gactgcgaag acgcagccat ggttggtcatt
 240
 tgtgccggcg cagcccaaaa gccaggcgag acccgccctcc agctgggtgga caaaaacgtc
 300

aagattatga aatccatcgt cggcgatgtc atggacagcg gattcgacgg catcttcctc
360

gtggcggtcca acccagtgga taccctgacc tacgcagtgt ggaaattctc cggcttgga
420

tggaaccgcg tgatcggctc cggaactgtc ctggactccg ctagattccg ctacatgctc
480

ggcgaactct atgaagtggc accaagctcc gtccacgcct acatcatcgg cgaacacgga
540

gacaccgaac ttccagtcct gtcctccgcg accatcgccg gcgtatcgct tagccgaatg
600

ctggacaaaag acccagagct tgagggccgt ctagagaaaa ttttcgaaga caccgcgac
660

gctgcctatc acattatcga cgccaagggc tccacttcct acggcatcgg catgggtctt
720

gctcgcatca cccgcgcaat cctacaaaac caagacgttg cagtcccagt ctctgcactg
780

ctccacgggtg aatacgggtga ggaagacatc tacatcggca ccccagctgt ggtgaaccgc
840

cgaggcatcc gccgcgttgt cgaactagaa atcacccgacc acgagatgga acgcttcaag
900

cattccgcaa ataccctgcg cgaaattcag aagcagttct tctaa
945

<210> 4
<211> 314
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 4
Met Lys Glu Thr Val Gly Asn Lys Ile Val Leu Ile Gly Ala Gly Asp
1 5 10 15

Val Gly Val Ala Tyr Ala Tyr Ala Leu Ile Asn Gln Gly Met Ala Asp
20 25 30

His Leu Ala Ile Ile Asp Ile Asp Glu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Val
35 40 45

Lys Asp Leu Asn His Gly Val Val Trp Ala Asp Ser Arg Thr Arg Val
50 55 60

Thr Lys Gly Thr Tyr Ala Asp Cys Glu Asp Ala Ala Met Val Val Ile
65 70 75 80

Cys Ala Gly Ala Ala Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Gln Leu Val
85 90 95

Asp Lys Asn Val Lys Ile Met Lys Ser Ile Val Gly Asp Val Met Asp
100 105 110

Ser Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Val Ala Ser Asn Pro Val Asp Ile
 115 120 125
 Leu Thr Tyr Ala Val Trp Lys Phe Ser Gly Leu Glu Trp Asn Arg Val
 130 135 140
 Ile Gly Ser Gly Thr Val Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Met Leu
 145 150 155 160
 Gly Glu Leu Tyr Glu Val Ala Pro Ser Ser Val His Ala Tyr Ile Ile
 165 170 175
 Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Leu Ser Ser Ala Thr Ile
 180 185 190
 Ala Gly Val Ser Leu Ser Arg Met Leu Asp Lys Asp Pro Glu Leu Glu
 195 200 205
 Gly Arg Leu Glu Lys Ile Phe Glu Asp Thr Arg Asp Ala Ala Tyr His
 210 215 220
 Ile Ile Asp Ala Lys Gly Ser Thr Ser Tyr Gly Ile Gly Met Gly Leu
 225 230 235 240
 Ala Arg Ile Thr Arg Ala Ile Leu Gln Asn Gln Asp Val Ala Val Pro
 245 250 255
 Val Ser Ala Leu Leu His Gly Glu Tyr Gly Glu Glu Asp Ile Tyr Ile
 260 265 270
 Gly Thr Pro Ala Val Val Asn Arg Arg Gly Ile Arg Arg Val Val Glu
 275 280 285
 Leu Glu Ile Thr Asp His Glu Met Glu Arg Phe Lys His Ser Ala Asn
 290 295 300
 Thr Leu Arg Glu Ile Gln Lys Gln Phe Phe
 305 310

<210> 5
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligonucleotit

<400> 5
 caagagcttg tgcccggatt cctttgttac acctttactt atgcccgatt atgtccgaaa
 60
 atgtggtcag accaa
 75

<210> 6
 <211> 32
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 6

cggtacccgg ggatcctgtg ggtggcggtg ta
32

<210> 7

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 7

ctttgttaca cctttactta tgcccgatta tgt
33

<210> 8

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 8

gtaaaggtgt aacaaaggaa tccgggcaca agc
33

<210> 9

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 9

atgcctgcag gtcgaccac actgcgtagg tc
32