



(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)



1-0047342

(51)^{2019.01} C12N 15/77; C12P 13/04; C12N 9/14; (13) B
C07K 14/34; C12N 9/10

(21) 1-2020-01104

(22) 27/03/2019

(86) PCT/KR2019/003568 27/03/2019

(87) WO2019/190193 03/10/2019

(30) 10-2018-0035156 27/03/2018 KR

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/12/2020 393A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

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

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

(54) VI SINH VẬT CÓ NĂNG SUẤT GLYXIN TĂNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT GLYXIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(21) 1-2020-01104

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật có năng suất glyxin tăng và phương pháp sản xuất chế phẩm lên men sử dụng vi sinh vật, và cụ thể hơn, đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có năng suất glyxin tăng do việc đưa đột biến vào HisG, phương pháp sản xuất chế phẩm lên men chứa glyxin và axit glutamic sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, và chế phẩm lên men.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật có năng suất glyxin tăng và phương pháp sản xuất chế phẩm lên men sử dụng vi sinh vật này, và cụ thể hơn, đến vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có năng suất glyxin tăng nhờ đưa đột biến vào HisG, phương pháp sản xuất chế phẩm lên men chứa glyxin và axit glutamic sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, và chế phẩm lên men này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit amin kiểu L là các khối cấu trúc cơ sở của các protein và được sử dụng làm nguyên liệu quan trọng như làm các nguyên liệu dược, chất phụ gia thực phẩm, thức ăn động vật, chất bổ sung dinh dưỡng, thuốc diệt loài gây hại, thuốc diệt khuẩn, v.v. Trong số này, axit glutamic kiểu L là axit amin đại diện được tạo ra nhờ quá trình lên men và có vị đặc trưng riêng (vị umami), và do đó là axit amin quan trọng được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực thực phẩm cũng như lĩnh vực y tế và các lĩnh vực thức ăn cho động vật khác. Ngoài ra, glyxin được sử dụng chủ yếu làm chất tăng hương vị trong công nghiệp thực phẩm bởi vị ngọt của nó, và được sử dụng làm cùng với chất tăng hương vị tự nhiên để tăng cường vị. Hơn thế nữa, glyxin cũng được sử dụng vì hoạt tính chống oxy hóa, tác dụng đệm, v.v. của nó, và trong y tế, nó được sử dụng trong dung dịch truyền, antacid, chế phẩm multi-axit amin, và chất bổ sung dinh dưỡng.

Phương pháp sản xuất axit amin thông thường bao gồm phương pháp lên men sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Brevibacterium* hoặc *Corynebacterium* (Amino Acid Fermentation, Gakkai Shuppan Center: 195-215, 1986) hoặc sử dụng *Escherichia coli* hoặc vi sinh vật thuộc chi *Bacillus*, *Streptomyces*, *Penicillium*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Pantoea*, v.v. (Patent Mỹ số 3,220,929 và 6,682,912). Ngoài ra, các axit amin này cũng được sản xuất bằng phương pháp công nghiệp sử dụng quy trình tổng hợp như phương pháp axit monocloaxetic, phương pháp Strecker, v.v.

Ngoài ra, nhiều nghiên cứu khác nhau đã được thực hiện để sản xuất các axit amin một cách hiệu quả; ví dụ, đã có những cố gắng để phát triển các vi sinh vật hoặc các công nghệ quy trình lên men để sản xuất axit amin với hiệu suất cao. Đặc biệt, các

phương pháp tiếp cận cụ thể nhằm đến nguyên liệu đích đã được phát triển, như tăng cường sự biểu hiện của các gen mã hóa enzym liên quan đến sự sinh tổng hợp các axit amin ở chủng thuộc chi *Corynebacterium* hoặc xóa gen không cần thiết cho việc sinh tổng hợp các axit amin (Patent Hàn Quốc số 10-0924065 và 1208480). Ngoài các phương pháp này ra, phương pháp loại bỏ gen không liên quan đến việc sản xuất axit amin và phương pháp loại bỏ gen mà chức năng sản xuất axit amin của chúng chưa được biết cụ thể cũng được sử dụng. Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu phát triển các phương pháp nghiên cứu để sản xuất hiệu quả các axit amin với hiệu suất cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã cố gắng phát triển phương pháp có khả năng sản xuất đồng thời một vài axit amin, và kết quả là, họ đã khẳng định rằng khi hoạt tính HisG của vi sinh vật có khả năng sản xuất axit glutamic được tăng cường so với hoạt tính này ở chủng gốc của nó, khả năng sản xuất glyxin có thể được cải thiện trong khi vẫn duy trì khả năng sản xuất axit glutamic, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Giải quyết vấn đề

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có năng suất glyxin tăng, trong đó hoạt tính của ATP phosphoribosyltransferaza (HisG) được tăng cường.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm lên men chứa glyxin và axit glutamic, gồm bước lên men bằng cách nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm lên men được tạo ra từ phương pháp nêu trên.

Hiệu quả có lợi

Vì đột biến HisG theo sáng chế có thể được đưa vào vi sinh vật và sản xuất đồng thời axit glutamic và glyxin, nó có thể được sử dụng hiệu quả để sản xuất các axit amin. Ngoài ra, sáng chế có thể cải thiện vị và vị ngon của sản phẩm lên men bằng cách điều chỉnh lượng của axit glutamic và glyxin trong sản phẩm lên men để tạo ra canh lên men và ứng dụng của nó trong các sản phẩm gia vị.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ trong sáng chế có thể được áp dụng cho các phần mô tả và phương án khác. Tức là, tất cả các kết hợp của các thành phần khác nhau được bộc lộ trong sáng chế đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, các mô tả cụ thể được bộc lộ dưới đây không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Để đạt được mục đích nêu trên, một khía cạnh của sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có năng suất glyxin tăng, trong đó hoạt tính của ATP phosphoribosyltransferaza (HisG) được tăng cường.

Cụ thể, vi sinh vật có năng suất glyxin tăng, trong đó, trong ATP phosphoribosyltransferaza, axit amin thứ 233 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 được thế bằng histidin (H), có thể được đề xuất.

Ngoài ra, cụ thể là, vi sinh vật có năng suất glyxin tăng, trong đó, trong ATP phosphoribosyltransferaza, axit amin thứ 233 và 235 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 lần lượt được thế bằng histidin (H) và glutamin (Q), có thể được đề xuất.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “ATP phosphoribosyltransferaza”, mà còn được gọi là “HisG”, chỉ enzym liên quan đến con đường tổng hợp histidin. Con đường tổng hợp histidin gồm tổng cộng 9 enzym (HisG-HisE-HisI-HisA-HisH-HisB-HisC-HisN-HisD), và HisG tạo nên bước đầu tiên của con đường này.

Đã được biết là HisG liên quan đến việc sản xuất histidin, nhưng mối quan hệ của nó với việc sản xuất glyxin là chưa biết và được xác định lần đầu tiên bởi các tác giả sáng chế. Cụ thể hơn, các tác giả sáng chế đã lần đầu tiên xác nhận rằng lượng sản xuất glyxin có thể được tăng lên bằng cách tăng cường hoạt tính của HisG. Cụ thể, HisG là đối tượng của sự ức chế phản hồi bởi sản phẩm histidin, và theo sáng chế, đột biến được đưa vào trong đó ức chế phản hồi histidin được giải phóng, và kết quả là, tác dụng làm tăng lượng sản xuất glyxin và duy trì lượng axit glutamic lần đầu tiên được xác định bởi các tác giả sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “sự tăng cường hoạt tính HisG” nghĩa là hoạt tính của enzym HisG được tăng so với hoạt tính nội sinh có ở vi sinh vật

thuộc chi *Corynebacterium* ở trạng thái tự nhiên của nó. Ví dụ về các phương pháp làm tăng hoạt tính HisG có thể bao gồm: (i) phương pháp làm tăng số lượng bản sao trình tự nucleotit mã hóa enzym bằng phương pháp chèn thêm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa HisG vào nhiễm sắc thể, hoặc bằng phương pháp đưa polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa HisG vào hệ vector, v.v.; (ii) phương pháp tăng cường gen khởi đầu của gen *hisG* (ví dụ, thay thế bằng gen khởi đầu mạnh hơn, đưa đột biến lên gen khởi đầu, v.v.); (iii) phương pháp sửa đổi enzym với hoạt tính mạnh hơn bằng đột biến gen, v.v.

Cụ thể, theo sáng chế, axit amin thứ 233 của trình tự axit amin HisG được nêu trong SEQ ID NO: 4 (nghĩa là, glyxin) có thể được thế bằng histidin; hoặc trong trình tự axit amin HisG được nêu trong SEQ ID NO: 4, axit amin thứ 233 (nghĩa là, glyxin) có thể được thế bằng histidin và axit amin thứ 235 (nghĩa là, threonin) có thể được thế bằng glutamin. Theo đó, vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa HisG biến đổi như được mô tả ở trên có thể làm tăng đáng kể năng suất glyxin trong khi vẫn duy trì năng suất axit glutamic mà không gây tác dụng bất lợi lên nó. Sự tăng năng suất glyxin có thể có nghĩa là năng suất glyxin được tăng so với vi sinh vật có HisG mà không có cải biến theo sáng chế (nghĩa là, HisG không có đột biến nêu trên).

Theo phương án khác, gen khởi đầu của enzym HisG có thể được sửa đổi thông qua việc gây đột biến hoặc thế cho gen khởi đầu mạnh hơn gen khởi đầu tự nhiên. Gen khởi đầu đã được cải thiện hoặc gen khởi đầu khác loại với đột biến thay thế nucleotit có thể được liên kết thay vì gen khởi đầu enzym nội sinh, và ví dụ về gen khởi đầu khác loại có thể bao gồm gen khởi đầu *cj7*, gen khởi đầu *lysCPI*, gen khởi đầu *EF-Tu*, gen khởi đầu *groEL*, gen khởi đầu *aceA*, gen khởi đầu *aceB*, v.v., nhưng gen khởi đầu khác loại không bị giới hạn ở các gen này.

Ngoài ra, do gen *hisG* gồm gen *hisE* và operon, hoạt tính của enzym HisG có thể được tăng cường bởi sự biểu hiện quá của *hisG* thông qua việc gây đột biến hoặc thay thế trình tự gen khởi đầu của gen *hisEG*. Cụ thể hơn, hoạt tính của enzym HisG có thể được tăng cường sử dụng gen khởi đầu mạnh hơn so với gen khởi đầu tự nhiên được tạo ra bởi việc gây đột biến trong trình tự gen khởi đầu của gen *hisEG*, trong đó trong trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1, các nucleotit thứ 53 và 55 được thế bằng T; hoặc các nucleotit thứ 53 và 55 được thế bằng T và nucleotit thứ 60 được thế bằng G. Xem xét tài liệu về các nghiên cứu về trình tự gen khởi đầu của

Corynebacterium glutamicum (*Microb Biotechnol.* 2013 Mar; 6(2): 103–117), có thể phát hiện vị trí của nhiều điểm khởi đầu phiên mã (TSP) và gen khởi đầu bằng cách đọc trình tự ARN (RNA-seq). Như vậy, các tác giả sáng chế đã xác nhận trình tự gen khởi đầu của gen *hisEG* thông qua các thử nghiệm RNA-seq trên chủng ATCC13869, và ngoài ra, đã nỗ lực tạo ra sự biểu hiện quá của trình tự gen khởi đầu của gen *hisEG* thông qua việc gây đột biến gen khởi đầu tự nhiên của nó. Làm phương pháp sửa đổi gen khởi đầu tự nhiên, trình tự nucleotit ở các vị trí –35 và –10 từ vùng gen khởi đầu của *Corynebacterium glutamicum* có thể được sửa đổi sao cho trình tự gen khởi đầu được sửa đổi đến gần với trình tự liên ứng hơn. Cụ thể, khi trình tự ở vùng –10 (hộp TATA) từ trình tự gen khởi đầu của gen *hisEG* được sửa đổi để đến gần với trình tự liên ứng, gen khởi đầu có thể được sửa đổi thành gen khởi đầu mạnh hơn so với gen khởi đầu tự nhiên.

Cụ thể, ATP phosphoribosyltransferaza, được bao gồm trong vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium*, có thể gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

Ngoài ra, các trình tự axit amin theo sáng chế có thể được sửa đổi bằng các phương pháp gây đột biến đã biết, như tiến hóa có định hướng, đột biến hướng vị trí, v.v.

Do đó, ATP phosphoribosyltransferaza có thể bao gồm HisG gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6 ít nhất 60%, cụ thể là ít nhất 70%, cụ thể hơn là ít nhất 80%, và cụ thể hơn nữa là ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 88%, ít nhất 90%, ít nhất 93%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 97%. Rõ ràng là trình tự axit amin bất kỳ có độ tương đồng như vậy, trong đó một phần của trình tự bị xóa, được sửa đổi, được thay thế, hoặc được thêm vào, cũng đều nằm trong phạm vi của sáng chế, miễn là trình tự axit amin thu được có hoạt tính sinh học gần như tương đương hoặc tương ứng với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

Cụ thể, thuật ngữ “axit glutamic kiểu L” hoặc “L-glutamat” chỉ loại axit amin được phân loại là axit amin không thiết yếu. Axit glutamic kiểu L được biến là chất dẫn truyền thần kinh kích thích phổ biến nhất trong hệ thần kinh trung ương. Ngoài ra, do axit glutamic kiểu L có vị umami, mononatri glutamat (MSG) đã được phát triển từ đó

và được sử dụng rộng rãi làm chất tăng hương vị. Nó thường được tạo ra thông qua sự lên men vi sinh vật sản xuất axit glutamic kiểu L.

Ngoài ra, thuật ngữ “glyxin” chỉ axit amin có dạng tinh thể không màu và vị ngọt. Glyxin được sử dụng chủ yếu làm chất tăng hương vị cho thực phẩm, và trong y tế, nó được sử dụng trong dung dịch truyền, antacid, chế phẩm multi-axit amin, và chất bổ sung dinh dưỡng. Nói chung, glyxin thu được bằng phương pháp tổng hợp công nghiệp như phương pháp axit monocloaxetic, phương pháp Strecker, v.v. Tuy nhiên, có điều bất tiện là do hỗn hợp của axit amin kiểu D và kiểu L được sản xuất khi axit amin được tạo ra sử dụng phương pháp tổng hợp, cần thiết phải thực hiện phân giải quang học. Do đó, cần phải tạo ra glyxin bằng phương pháp lên men mà có nhiều ưu điểm, nghĩa là, các điều kiện phản ứng là ôn hòa, việc sản xuất hàng loạt là khả thi trong khoảng thời gian ngắn, quy trình thân thiện với môi trường, và nguyên liệu được sản xuất ra có khả năng phân hủy sinh học.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “độ tương đồng” có thể chỉ ra mức độ bất cặp với trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit xác định, và có thể được biểu diễn dưới dạng phần trăm (%). Theo sáng chế, trình tự tương đồng có hoạt tính giống hoặc tương tự với trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit xác định được biểu diễn dưới dạng “% độ tương đồng”. Độ tương đồng với trình tự axit amin hoặc 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 BLAST này, các chương trình BLASTN và BLASTX đã được phát triển (xem <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt” chỉ các điều kiện cho phép sự lai cụ thể giữa các polynucleotit. Điều kiện nghiêm ngặt này được mô tả cụ thể trong tài liệu (ví dụ, J. Sambrook *et al.*). Ví dụ, điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm các điều kiện trong đó gen có độ tương đồng cao (ví dụ, 60% hoặc cao hơn, cụ thể là 90% hoặc cao hơn, cụ thể hơn là 95% hoặc cao hơn, cụ thể hơn nữa là 97% hoặc cao hơn, và cụ thể hơn nữa là 99% hoặc cao hơn) có thể lai với nhau, trong khi đó các gen có độ tương đồng với nhau thấp không thể lai với nhau; hoặc các điều kiện dùng cho phương pháp lai Southern thông thường (nghĩa là, các điều kiện để rửa một lần, và cụ thể là hai hoặc ba lần ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 60°C, 1×SSC, SDS 0,1%, cụ thể là ở 60°C, 0,1×SSC, SDS 0,1%; và cụ thể hơn là ở 68°C, 0,1×SSC, SDS

0,1%). Phương pháp lai đòi hỏi là hai nucleotit cần có trình tự bổ sung, mặc dù sự bất cặp sai giữa các bazơ có thể xảy ra tùy vào mức độ nghiêm ngặt của phép lai. Thuật ngữ “bổ sung” được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các bazơ nucleotit mà có thể lai với nhau. Ví dụ, đối với ADN, adenosin bổ sung cho thymin và xytosin bổ sung cho guanin. Do đó, sáng chế cũng có thể bao gồm các trình tự nucleotit gần như tương tự cũng như các mảnh polynucleotit được phân lập bổ sung với toàn bộ trình tự.

Cụ thể, polynucleotit có độ tương đồng có thể được phát hiện sử dụng các điều kiện lai bao gồm bước lai ở giá trị T_m bằng 55°C ở các điều kiện được mô tả ở trên. Ngoài ra, giá trị T_m có thể là 60°C , 63°C , hoặc 65°C , nhưng không bị giới hạn ở đó. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể điều chỉnh thích hợp giá trị T_m theo mục đích của nó. Độ nghiêm ngặt thích hợp khi lai các polynucleotit phụ thuộc vào chiều dài và mức độ bổ sung của các polynucleotit, và các biến số là đã biết trong lĩnh vực này (xem Sambrook *et al.*, *supra*, 9.50–9.51, 11.7–11.8).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “vi sinh vật” bao gồm tất cả trong số vi sinh vật kiểu dại và vi sinh vật biến đổi gen tự nhiên hoặc nhân tạo, và nó có thể là vi sinh vật có cơ chế làm yếu hoặc tăng cường cụ thể do sự cài xen gen ngoại sinh hoặc sự tăng cường hoặc làm yếu hoạt tính của gen nội sinh.

Theo sáng chế, vi sinh vật có thể bao gồm ATP phosphoribosyltransferaza. Ngoài ra, ATP phosphoribosyltransferaza có thể được đưa vào vi sinh vật bằng cách biến nạp thông qua vectơ, nhưng phương pháp biến nạp không bị giới hạn ở đó. Hơn nữa, không cần quan tâm xem gen mã hóa HisG được định vị trên nhiễm sắc thể hay bên ngoài nhiễm sắc thể miễn là HisG có thể được biểu hiện ở vi sinh vật.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “vectơ” là phân tử ADN nhân tạo có vật liệu di truyền có khả năng biểu hiện gen mục tiêu ở vật chủ thích hợp, và có thể chỉ cấu trúc ADN bao gồm trình tự nucleotit của gen mã hóa HisG.

Vectơ được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có thể được biểu hiện ở tế bào chủ, và vectơ bất kỳ đã biết trong lĩnh vực đều có thể được sử dụng để biến nạp vào tế bào chủ. Ví dụ về vectơ thông thường có thể bao gồm các plasmit, cosmit, virut, và thực khuẩn thể tự nhiên hoặc tái tổ hợp.

Ví dụ, dùng làm vectơ thực khuẩn thể hoặc vectơ cosmit, pWE15, M13, λ LB3, λ BL4, λ IXII, λ ASHII, λ APII, λ t10, λ t11, Charon4A, Charon21A, v.v. có thể được sử

dụng; và làm vector plasmit, các vector gốc pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET, v.v. có thể được sử dụng.

Ngoài ra, polynucleotit mã hóa HisG theo sáng chế có thể được đưa vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ thông qua vector để cài xen 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 các vector không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, việc cài xen polynucleotit vào nhiễm sắc thể có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, bằng sự tái tổ hợp đồng nhất.

Do vector theo sáng chế có thể được cài xen vào nhiễm sắc thể bằng cách gây ra sự tái tổ hợp đồng nhất, gen đánh dấu chọn lọc có thể cũng được bao gồm để xác nhận sự cài xen thành công của gen vào nhiễm sắc thể. Gen đánh dấu chọn lọc là để sàng lọc các tế bào được biến nạp với vector, nói cách khác, để xác định xem polynucleotit có được cài xen hay không. Các gen đánh dấu mà tạo ra các kiểu hình chọn lọc như tính kháng thuốc, hiện tượng dinh dưỡng thụ động, tính kháng chất gây độc, hoặc sự biểu hiện của các protein bề mặt có thể được sử dụng. Trong môi trường được xử lý với chất chọn lọc, chỉ các tế bào biểu hiện gen đánh dấu chọn lọc có thể sống sót, hoặc các tế bào thể hiện kiểu hình khác, và do đó các tế bào được biến nạp thành công có thể được chọn thông qua phương pháp này.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “biến nạp” chỉ việc đưa vector chứa polynucleotit hoặc gen mã hóa HisG vào tế bào chủ để cho phép sự biểu hiện của gen và HisG ở tế bào chủ. Hơn nữa, miễn là gen mục tiêu có thể được biểu hiện ở tế bào chủ, không cần quan tâm gen được biến nạp nằm trên nhiễm sắc thể của tế bào chủ hay bên ngoài nhiễm sắc thể, và cả hai trường hợp đều được bao gồm.

Phương pháp biến nạp có thể bao gồm tất cả các phương pháp nhằm đưa gen vào tế bào, và có thể được tiến hành bằng cách lựa chọn kỹ thuật chuẩn thích hợp đã biết trong lĩnh vực tùy vào tế bào chủ. Ví dụ, kỹ thuật chuẩn thích hợp có thể được chọn trong số các kỹ thuật đục lỗ 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 kỹ thuật chuẩn thích hợp không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, vi sinh vật có thể là vi sinh vật bất kỳ mà không giới hạn, trong đó HisG theo sáng chế được đưa vào và do đó năng suất glyxin được tăng.

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

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

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chế phẩm lên men thu được từ phương pháp nêu trên.

Chế phẩm lên men có thể là chế phẩm trong đó lượng glyxin được tăng.

Vi sinh vật là như được mô tả ở trên.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “nuôi cấy” chỉ sự nuôi cấy vi sinh vật ở các điều kiện môi trường có kiểm soát nhân tạo. Theo sáng chế, phương pháp sản xuất vật liệu đích sử dụng vi sinh vật có thể được tiến hành bằng phương pháp đã biết rộng rãi trong lĩnh vực. Cụ thể, việc nuôi cấy có thể được tiến hành theo quy trình mẻ hoặc theo quy trình liên tục (ví dụ, quy trình theo mẻ hoặc quy trình theo mẻ lặp lại), nhưng quy trình theo mẻ không bị giới hạn ở đó. Môi trường dùng để nuôi cấy phải thỏa mãn các yêu cầu của chủng cụ thể được sử dụng. Môi trường nuôi cấy thích hợp để sử dụng trong việc nuôi cấy chủng *Corynebacterium* là đã biết trong lĩnh vực (ví dụ, Manual of Methods for General Bacteriology by the American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981).

Nguồn cacbon mà có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy có thể là các sacarit và hydrat cacbon (ví dụ, glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza); dầu và lipid (ví dụ, dầu đậu nành, dầu hạt hướng dương, dầu lạc, và dầu dừa); các axit béo (ví dụ, axit palmitic, axit steric, và axit linoleic); các rượu (ví dụ, glyxerol và etanol); và các axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic). Các nguyên liệu này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp, nhưng cách thức sử dụng không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ về nguồn nitơ mà có thể được sử dụng bao gồm pepton, chất chiết nấm men, nước ép thịt, chất chiết mạch nha, dịch ngâm ngô, bột đậu tương, và ure, hoặc các

hợp chất vô cơ (ví dụ, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat). Các nguồn nitơ này cũng có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp, nhưng cách thức sử dụng không bị giới hạn ở đó.

Nguồn phospho mà 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 sinh trưởng của tế bào. Cuối cùng, ngoài các nguyên liệu nêu trên, nguyên liệu cần thiết cho sự sinh trưởng (ví dụ, axit amin và vitamin) có thể được sử dụng. Ngoài ra, các tiền chất thích hợp cho môi trường nuôi cấy có thể được sử dụng. Các nguyên liệu thô nêu trên có thể được cấp thích hợp vào môi trường nuôi cấy theo mẻ hoặc liên tục.

Trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật, độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng hợp chất bazơ thích hợp (ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, hoặc amoniac) hoặc hợp chất axit (ví dụ, axit phosphoric hoặc axit sulfuric). Việc tạo bọt có thể được điều chỉnh bằng chất chống tạo bọt (ví dụ, este polyglycol axit béo). Điều kiện hiếu khí của môi trường nuôi cấy có thể được duy trì bằng cách đưa vào khí oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ, không khí).

Nhiệt độ của (môi trường) nuôi cấy nhìn chung có thể nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, và cụ thể là từ 25°C đến 40°C. Việc nuôi cấy có thể được tiếp tục cho đến khi thu được lượng sản xuất mong muốn của nguyên liệu đích, và cụ thể là trong khoảng từ 10 đến 160 giờ.

Việc thu hồi nguyên liệu đích từ (môi trường) nuôi cấy có thể được thực hiện bằng phương pháp tách thông thường đã biết trong lĩnh vực. Đối với phương pháp tách, các phương pháp như ly tâm, lọc, sắc ký, kết tinh, v.v. có thể được sử dụng. Ví dụ, chất nổi bề mặt thu được bằng phương pháp ly tâm môi trường nuôi cấy ở tốc độ thấp để lấy sinh khối ra có thể được tách bằng sắc ký trao đổi ion, nhưng phương pháp tách không bị giới hạn ở đó. Theo phương pháp thay thế, nguyên liệu đích có thể được thu hồi bằng cách thực hiện quy trình tách và lọc tế bào vi khuẩn từ (môi trường) sản phẩm nuôi cấy mà không cần quy trình tinh sạch bổ sung. Theo phương pháp thay thế khác, bước thu hồi có thể còn bao gồm quy trình tinh sạch.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “chế phẩm lên men” chỉ chế phẩm thu được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế. Hơn nữa, chế phẩm lên men có

thể bao gồm chế phẩm ở dạng chất lỏng hoặc bột thu được sau khi nuôi cấy vi sinh vật sau đó là quy trình hậu xử lý thích hợp. Cụ thể, quy trình hậu xử lý thích hợp có thể bao gồm, ví dụ, quy trình nuôi cấy vi sinh vật, quy trình lấy 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 sấy khô. Trong một vài trường hợp, quy trình hậu xử lý có thể không bao gồm quy trình tinh sạch. Chế phẩm lên men, thu được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế, chứa lượng glyxin tăng trong khi vẫn duy trì lượng sản xuất axit glutamic nhất định, do đó giúp 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 sản phẩm súp bột, sản phẩm gia vị chia nhỏ, v.v.) chứa chế phẩm ở dạng chất lỏng hoặc bột. Hơn nữa, “chế phẩm lên men” không loại trừ các trường hợp trong đó nguyên liệu thu được bằng quy trình không lên men và/hoặc nguyên liệu khác thu được bằng quy trình không tự nhiên cũng được bao gồm thêm, miễn là chế phẩm thu được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế được chứa trong đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết đi kèm các phương án lấy làm ví dụ. Tuy nhiên, các phương án lấy ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1. Đưa đột biến vào chủng KFCC11074 để làm tăng năng suất glyxin và xác nhận lượng sản xuất axit glutamic và glyxin trong KFCC11074 có đột biến được đưa vào

Ví dụ 1-1: Tạo ra vector có đột biến được đưa vào

Để xác nhận tác dụng tăng cường hoạt tính HisG đến sự tăng năng suất glyxin ở chủng có khả năng sản xuất axit glutamic, chủng có đột biến được cảm ứng trong gen khởi đầu của gen *hisEG* và chủng có đột biến giải phóng ức chế phản hồi histidin được cảm ứng, và năng suất glyxin của các chủng này được kiểm tra.

Trong khi đó, các gen *hisE* và *hisG* bao gồm các operon, và các gen này liên quan đến con đường sinh tổng hợp histidin. Cụ thể, vì HisG bị ức chế phản hồi bởi sản phẩm histidin, các nỗ lực được thực hiện để xác nhận xem năng suất glyxin của các chủng này có thể được tăng khi đột biến giải phóng ức chế phản hồi được đưa vào để làm tăng hoạt tính của gen HisG hay không. Như vậy, các nỗ lực được thực hiện để đưa

mỗi trong số đột biến gen khởi đầu *hisEG* và đột biến giải phóng ức chế phản hồi vào chủng KFCC11074 (Patent Hàn Quốc số 10-0292299), mà được biết là chủng sinh axit glutamic. Cụ thể, vector để thay thế gen được tạo ra để thay thế các nucleotit thứ 53 và 55 của trình tự polynucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1, bao gồm gen khởi đầu *hisEG*, bằng T; và để thay thế các nucleotit thứ 53 và 55 của trình tự polynucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 bằng T và nucleotit thứ 60 của trình tự polynucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 bằng G.

Ngoài ra, các vector để thay thế gen được tạo ra để thay thế axit amin thứ 233 (nghĩa là, glyxin (Gly/G)) của trình tự axit amin của HisG được nêu trong SEQ ID NO: 4 bằng histidin (His/H), và để thay thế axit amin thứ 233 (nghĩa là, glyxin (Gly/G)) và axit amin 235 (nghĩa là, threonin (Thr/T)) của trình tự axit amin của HisG được nêu trong SEQ ID NO: 4 lần lượt bằng histidin (His/H) và glutamin (Gln/Q). Các đoạn gen để tạo ra mỗi vector thay thế thu được bằng PCR sử dụng ADN bộ gen của ATCC13869 làm khuôn. Mỗi cặp đoạn mồi được tạo ra dựa trên thông tin về các gen và các trình tự nucleotit liền kề của *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13869) được đăng ký ở National Institutes of Health GenBank (NIH GenBank).

Để tạo ra các vector để thay thế gen khởi đầu *hisEG*, PCR được thực hiện theo thứ tự sau: (1) làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; (2) tổng cộng 30 chu trình gồm làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, và trùng hợp ở 72°C trong 1 phút; và (3) trùng hợp ở 72°C trong 5 phút. Cụ thể hơn, polynucleotit (500 bp) được khuếch đại sử dụng đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 7 và 8 và polynucleotit (500 bp) được khuếch đại sử dụng đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 9 và 10 thu được. Hai đoạn ADN thu được được nối vào vector pDZ (Patent Hàn Quốc số 10-0924065 và công bố sáng chế quốc tế số WO 2008-033001), đã được cắt bằng enzym giới hạn Sall, sử dụng enzym truyền, và nhờ đó một vector đơn để thay thế hai gen, bao gồm gen khởi đầu *hisEG*, được tạo ra, và vector này được gọi là “**pDZ-hisEG-pro-2mt**”. Ngoài ra, còn thu được polynucleotit 500 bp được khuếch đại sử dụng đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 7 và 11 và polynucleotit 500 bp được khuếch đại sử dụng đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 10 và 12. Hai đoạn ADN thu được được nối vào vector pDZ (Patent Hàn Quốc số 10-0924065 và Công bố quốc tế số WO 2008-033001), đã được cắt bằng enzym giới hạn Sall, sử dụng enzym truyền, và nhờ đó một vector đơn để thay thế một gen, bao gồm gen khởi đầu *hisEG*, được tạo ra, và vector này

được gọi là “**pDZ-hisE-pro-3mt**”. Thông tin về trình tự đoạn môi được sử dụng để tạo ra vector được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Để thay thế axit amin thứ 233 bằng H và thay thế axit amin thứ 233 và thứ 235 lần lượt bằng H và Q, vector để thay thế gen được tạo ra. Cụ thể, PCR được thực hiện theo thứ tự sau: (1) làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; (2) tổng cộng 30 chu trình gồm làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, gắn môi ở 55°C trong 30 giây, và trùng hợp ở 72°C trong 1 phút; và (3) trùng hợp ở 72°C trong 5 phút. Ngoài ra, thu được polynucleotit 722 bp được khuếch đại sử dụng đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 13 và 14 và polynucleotit 798 bp được khuếch đại sử dụng đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 15 và 16. Hai đoạn ADN thu được được nối vào vector pDZ (Patent Hàn Quốc số 10-0924065 và Công bố quốc tế số WO 2008-033001), đã được cắt bằng enzym giới hạn Sall, sử dụng enzym truyền, và nhờ đó một vector đơn 1,5 kbp để thay thế gen, bao gồm polynucleotit chứa đột biến HisG(G233H), được tạo ra, và vector này được gọi là “**pDZ-hisG(G233H)**”. Ngoài ra, thu được polynucleotit 722 bp được khuếch đại sử dụng đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 13 và 17 và polynucleotit 798 bp được khuếch đại sử dụng đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 16 và 18. Hai đoạn ADN thu được được nối vào vector pDZ (Patent Hàn Quốc số 10-0924065 và Công bố quốc tế số WO 2008-033001), đã được cắt bằng enzym giới hạn Sall, sử dụng enzym truyền, và nhờ đó một vector đơn 1,5 kbp để thay thế gen, bao gồm polynucleotit chứa đột biến HisG(G233H/T235Q), được tạo ra, và vector này được gọi là “**pDZ-hisG(G233H/T235Q)**”. Thông tin về trình tự đoạn môi dùng để tạo ra vector được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

SEQ ID NO	Đoạn môi	Trình tự (5' đến 3')
7	hisEG-pro-2mt-AF	GATCCTCTAGAGTCGACTTCGACGAATCCCTCG
8	hisEG-pro-2mt-AR	CGGT <u>ACATTATACCACACA</u> ACAGTTATCAATG
9	hisEG-pro-2mt-BF	GTGGT <u>TATAATGTACCGAGTGA</u> AGACATTTGAC
10	hisEG-pro-2mt-BR	ATGCCTGCAGGTCGACTGATACCCAAATCGAG
11	hisEG-pro-3mt-AR	CGGT <u>CCATTATACCACACA</u> ACAGTTATCAATG
12	hisEG-pro-3mt-BF	GTGGT <u>TATAATGGACCGAGTGA</u> AGACATTTGAC

13	hisG(G233H)-AF	GATCCTCTAGAGTCGACCCCAAACAAGGGCTCGC
14	hisG(G233H)-AR	CGTGCCAGTGGGGATACCGTTGGGTGGG
15	hisG(G233H)-BF	AACCCCAGGCCTATCCCACCCAACGGTATC
16	hisG(G233H)-BR	ATGCCTGCAGGTCGACGCAAGGTTGGCAACAAC
17	hisG(G233H/T235Q)-AR	CGTGCCAGTGGGGATACCTGTGGGTGGG
18	hisG(G233H/T235Q)-BF	AACCCCAGGCCTATCCCACCCACAGGTATC

Ví dụ 1-2: Tạo ra KFCC11074 có đột biến được đưa vào và xác nhận lượng sản xuất axit glutamic và glyxin

Các vector để thay thế gen khởi đầu *hisEG* (nghĩa là, pDZ-hisEG-pro-2mt và pDZ-hisEG-pro-3mt) và các vector để thay thế gen (nghĩa là, pDZ-hisG(G233H) và pDZ-hisG(G233H/T235Q)), mà đã được tạo ra trong Ví dụ 1-1, mỗi vector được đưa vào chủng KFCC11074 bằng đục lỗ điện để tạo ra “KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG”, “KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG”, “KFCC11074_hisG(G233H)”, và “KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)”, là chủng sinh axit glutamic và glyxin có đột biến được đưa vào, một cách tương ứng.

Cụ thể, các chủng này được tạo ra bằng cách biến nạp (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 52: 541–545). Các chủng trong đó vector được chèn lên nhiễm sắc thể bằng phương pháp tái tổ hợp các trình tự đồng nhất được chọn trên môi trường dinh dưỡng thạch aga chứa kanamycin (25 mg/L). Các chủng sơ cấp được chọn được đưa qua bước trao đổi chéo thứ cấp, và mỗi trong số các chủng có hai hoặc ba đột biến mục tiêu được đưa vào được chọn ra. Đột biến (thể) của các chủng biến nạp cuối được xác nhận bằng cách đọc trình tự sau khi thực hiện PCR sử dụng mỗi cặp đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 7 và 10 và cặp đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 13 và 16.

Sau đó, các chủng đã chọn KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG, KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG, KFCC11074_hisG(G233H), và KFCC11074_hisG(G233H/T235Q) được cấy đĩa trên môi trường dinh dưỡng và được nuôi cấy ở 30°C trong 16 giờ. Môi trường lên men (25 mL), được khử trùng trong nồi hấp ở 121°C trong 15 phút, được phân phối vào mỗi bình tam giác Erlenmeyer (250 mL) để lắc, và mỗi chủng được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng được cấy vào đó và

nuôi cấy trong 48 giờ. Điều kiện nuôi cấy được đặt là 200 vòng/phút, 37°C, và pH=8,0. Chế phẩm chứa môi trường dinh dưỡng và môi trường lên men là như sau.

Môi trường dinh dưỡng:

Glucosa 1%, nước ép thịt 0,5%, polypepton 1%, natri clorua 0,25%, chất chiết nấm men 0,5%, aga 2%, ure 0,2%, pH=7,2

Môi trường lên men:

Đường nâu 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)

Sau khi hoàn tất việc nuôi cấy, lượng sản xuất axit glutamic kiểu L và glyxin được đo bằng phương pháp sử dụng HPLC, và kết quả đo được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Chủng	Axit glutamic kiểu L (g/L)	Glyxin (mg/L)
KFCC11074	11,5	165
KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG	11,4	198
KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG	12,0	209
KFCC11074_hisG(G233H)	11,8	210
KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)	12,3	433

Như được thể hiện trong Bảng 2, được xác nhận rằng nồng độ của axit glutamic kiểu L sinh ra bởi mỗi trong số các chủng *Corynebacterium glutamicum* KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG, KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG, KFCC11074_hisG(G233H), và KFCC11074_hisG(G233H/T235Q), có đột biến được đưa vào, là tương tự với nồng độ của axit glutamic kiểu L sinh ra bởi *Corynebacterium glutamicum* chủng KFCC11074 không chứa đột biến.

Mặt khác, được xác nhận rằng nồng độ của glyxin sinh ra bởi mỗi trong số các chủng KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG, KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG, KFCC11074_hisG(G233H), và KFCC11074_hisG(G233H/T235Q) được tăng lần lượt

33 mg/L, 44 mg/L, và 45 mg/L so với nồng độ của glyxin sinh ra bởi chủng KFCC11074. Cụ thể, chủng KFCC11074_hisG(G233H/T235Q) chỉ ra nồng độ glyxin là 268 mg/L, có sự tăng đáng kể.

Tức là, được xác nhận rằng các đột biến, trong đó đột biến gen khởi đầu *hisEG* và đột biến giải phóng ức chế phản hồi HisG được bao gồm, làm tăng đáng kể năng suất glyxin trong khi vẫn duy trì năng suất axit glutamic kiểu L ở các vi sinh vật mà không có ảnh hưởng đáng kể lên nó.

Ví dụ 2. Xác nhận lượng sản xuất axit glutamic và glyxin ở ATCC13869 có đột biến được đưa vào

Để xác nhận xem các đột biến nêu trên có tác dụng làm tăng năng suất glyxin ngay cả ở *Corynebacterium glutamicum* chủng ATCC13869 kiểu dại mà không ảnh hưởng đến năng suất axit glutamic hay không, nỗ lực được thực hiện để tạo ra chủng dựa trên ATCC13869 có đột biến được đưa vào.

Các vector để thay thế gen khởi đầu *hisEG* (nghĩa là, pDZ-*hisEG*-pro-2mt và pDZ-*hisEG*-pro-3mt) và các vector để thay thế gen (nghĩa là, pDZ-*hisG*(G233H) và pDZ-*hisG*(G233H/T235Q)), mà đã được tạo ra ở Ví dụ 1-1, mỗi vector được đưa vào chủng ATCC13869 bằng phương pháp đục lỗ điện để tạo ra “ATCC13869_Pro(2mt)_*hisEG*”, “ATCC13869_Pro(3mt)_*hisEG*”, “ATCC13869_*hisG*(G233H)”, và “ATCC13869_*hisG*(G233H/T235Q)”, lần lượt là các chủng sinh axit glutamic và glyxin có đột biến được đưa vào.

Cụ thể, các chủng này được tạo ra bằng cách biến nạp (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 52: 541–545). Các chủng có vector được cài xen trên nhiễm sắc thể bằng phương pháp tái tổ hợp các trình tự đồng nhất được chọn ra trên môi trường dinh dưỡng aga chứa kanamycin (25 mg/L). Các chủng sơ cấp đã chọn được đưa qua bước trao đổi chéo thứ cấp, và mỗi trong số các chủng có hai hoặc ba đột biến mục tiêu được đưa vào được chọn ra. Đột biến (thể) của chủng biến nạp cuối được xác nhận bằng cách đọc trình tự sau khi thực hiện PCR sử dụng mỗi trong số cặp đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 7 và 10 và cặp đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 13 và 16.

Mỗi khuẩn lạc được cấy chuyển vào môi trường dinh dưỡng và sau đó được nuôi cấy trong môi trường lên men trong 5 giờ. Sau đó, Tween 40 25% được thêm vào mỗi môi trường ở nồng độ 0,4%, và mỗi khuẩn lạc được nuôi cấy lần nữa trong 32 giờ.

Môi trường dinh dưỡng:

Glucosa 1%, nước ép thịt 0,5%, polypepton 1%, natri clorua 0,25%, chất chiết nấm men 0,5%, agar 2%, ure 0,2%, pH=7,2

Môi trường lên men:

Đường nâu 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 ở các điều kiện nêu trên và nồng độ axit glutamic kiểu L được đo bằng cách sử dụng YSI, và nồng độ glyxin được đo sử dụng HPLC. Các nồng độ đo được của axit glutamic kiểu L và glyxin được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Chủng	Axit glutamic kiểu L (g/L)	Glyxin (mg/L)
ATCC13869	13,8	117
ATCC13869_Pro(2mt)_hisEG	13,7	128
ATCC13869_Pro(3mt)_hisEG	14,0	135
ATCC13869_hisG(G233H)	13,5	144
ATCC13869_hisG(G233H/T235Q)	13,7	306

Như được thể hiện trong Bảng 3, được xác nhận rằng nồng độ của axit glutamic kiểu L sinh ra bởi mỗi trong số các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869_Pro(2mt)_hisEG, ATCC13869_Pro(3mt)_hisEG, ATCC13869_hisG(G233H), và ATCC13869_hisG(G233H/T235Q), có đột biến được đưa vào, là tương tự với nồng độ của axit glutamic kiểu L sinh ra bởi *Corynebacterium glutamicum* chủng ATCC13869; tuy nhiên, tất cả các chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869_Pro(2mt)_hisEG, ATCC13869_Pro(3mt)_hisEG, ATCC13869_hisG(G233H), và ATCC13869_hisG(G233H/T235Q) đều thể hiện sự tăng nồng độ glyxin so với *Corynebacterium glutamicum* chủng ATCC13869.

Tức là, được xác nhận lại rằng các đột biến, trong đó đột biến gen khởi đầu

hisEG và đột biến giải phóng ức chế phản hồi HisG được bao gồm, làm tăng đáng kể năng suất glyxin trong khi vẫn duy trì năng suất axit glutamic kiểu L ở các vi sinh vật mà không tác động đáng kể lên nó.

Trong khi đó, các chủng ATCC13869_ hisG(G233H) và ATCC13869_ hisG(G233H/T235Q) được ký gửi ở Trung tâm giống cây vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms - KCCM), là cơ quan lưu giữ quốc tế có thẩm quyền theo Hiệp ước Budapest, ngày 14/3/2019, với tên chủng là “CA02-9216” và “CA02-9217”, và được chỉ định số nộp lưu là “KCCM12458P” và “KCCM12459P”.

Ví dụ 3. Tạo ra chế phẩm lên men để tạo ra sản phẩm gia vị

Như được mô tả ở trên, được xác nhận rằng các chủng trong đó hoạt tính HisG được tăng cường thể hiện sự tăng năng suất glyxin trong khi không có ảnh hưởng đáng kể đến năng suất của axit glutamic kiểu L. Do đó, nỗ lực được thực hiện để tạo ra chế phẩm lên men sử dụng vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* theo sáng chế trong đó hoạt tính HisG được tăng cường.

Ví dụ, thực hiện quy trình điều chế chế phẩm lên men sử dụng axit glutamic, là nguyên liệu gia vị cơ bản, đã biết, làm thành phần hoạt tính, và chủng lên men và quy trình lên men được kiểm soát để tăng tỷ lệ thành phần của các thành phần sản phẩm phụ khác của nguyên liệu gia vị nhằm mục đích làm tăng sự cấu thành vị béo ngậy.

Nỗ lực được thực hiện để tạo ra chế phẩm lên men trong thiết bị lên men 5 L sử dụng các chủng trong đó cả đột biến gen khởi đầu *hisEG* và đột biến giải phóng ức chế phản hồi HisG đều được bao gồm.

Tất cả các thành phần được sử dụng trong chế phẩm môi trường nuôi cấy được sử dụng là các thành phần tương ứng với cấp độ thực phẩm.

Môi trường gieo sơ cấp được điều chế như sau:

Glucoza (1%), Chất chiết nấm men (1%), Pepton (1%), Amoni Sulfat (0,1%), NaCl (0,25%), KH₂PO₄ (0,15%), K₂HPO₄ (0,15%), pH=8,0

Môi trường gieo thứ cấp được điều chế như sau:

Đường nâu hữu cơ (4,6% với độ tinh khiết là 98,5%), Magie Sulfat (0,05%), Chất chiết nấm men (0,5%), KH₂PO₄ (0,2%), Sắt Sulfat (0,002%), Biotin (1 mg/L), Thiamin HCl (2 mg/L), lượng nhỏ chất chống tạo bọt, pH=7,2

Môi trường lên men được điều chế như sau:

Đường nâu hữu cơ (4% với độ tinh khiết là 98,5%), Magie Sulfat (0,03%), Chất chiết nấm men (1%), Axit Phosphoric (0,22%), KOH (0,4%), Biotin (0,2 mg/L), Thiamin HCl (0,6 mg/L), Mangan Sulfat (0,002%), Sắt Sulfat (0,002%), Kẽm Sulfat (0,002%), Đồng Sulfat (0,006%), lượng nhỏ chất chống tạo bọt, pH=7,4

Môi trường gieo sơ cấp (50 mL) được chuyển vào mỗi bình tam giác lắc Erlenmeyer 500 mL, được khử trùng bằng nồi hấp ở 121°C dưới điều kiện áp suất trong 20 phút. Sau đó, mỗi chủng được cấy và ủ đồng thời lắc ở tốc độ quay là 200 vòng/phút, ở 30°C trong từ 5 đến 7 giờ.

Môi trường gieo thứ cấp được tạo ra với lượng 0,25 L trong thiết bị lên men thí nghiệm 1,5 L, được khử trùng bằng nồi hấp ở 121°C dưới điều kiện áp suất trong 20 phút, và làm nguội. Sau đó, môi trường gieo sơ cấp (50 mL) được cấy và ủ ở tốc độ quay là 900 vòng/phút ở 31,5°C trong 15 giờ.

Môi trường lên men được tạo ra với lượng 0,25 L trong thiết bị lên men thí nghiệm 5 L, được khử trùng bằng nồi hấp ở 121°C dưới điều kiện áp suất trong 20 phút, và làm nguội. Sau đó, môi trường gieo thứ cấp (0,26 L) được cấy vào đó và được ủ ở tốc độ quay là 900 vòng/phút ở nhiệt độ từ 30°C đến 34°C.

Trong khi nuôi cấy ở các điều kiện nêu trên, độ pH của quá trình nuôi cấy lên men được điều chỉnh liên tục sử dụng nước amoniac 28% để nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,4 trong quá trình nuôi cấy *Corynebacterium glutamicum*. Khi nồng độ của đường còn lại trong môi trường nuôi cấy còn khoảng từ 0,5% đến 1,5%, đường nâu hữu cơ tiệt trùng được thêm vào thường xuyên để tiếp tục việc nuôi cấy cho đến khi tổng lượng đường được thêm vào đạt đến khoảng từ 30% đến 34% lượng canh lên men.

Bảng 4

Chủng	Kết quả phân tích (g/L)						
	Thành phần hoạt tính			Sản phẩm phụ			
	Chất rắn	Axit glutamic	Glyxin	Axit amin	Axit hữu cơ	Đường dư	Ion
KFCC11074	140,2	64,2	0,18	11,5	3,5	12,0	11,1

KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG	147,3	59,0	2,43	16,4	2,7	15,1	10,7
--	-------	------	------	------	-----	------	------

Kết quả là, như được thể hiện trong Bảng 4 ở trên, được xác nhận rằng mặc dù không có sự khác biệt đáng kể về lượng sản xuất axit glutamic giữa hai chủng, lượng glyxin trong canh lên men được tạo ra bởi chủng *Corynebacterium glutamicum* KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG, trong đó đột biến được đưa vào, được tăng đáng kể.

Ngay cả trong trường hợp khi chế phẩm lên men được tạo ra sử dụng thiết bị lên men 3 kL, không có sự khác biệt đáng kể về lượng sản xuất axit glutamic giữa hai chủng. Tuy nhiên, *Corynebacterium glutamicum* chủng KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG, trong đó đột biến được đưa vào, thể hiện sự tăng đáng kể lượng glyxin so với chủng KFCC11074 (nghĩa là, 0,2 g/L so với 3,2 g/L), mặc dù không có sự khác biệt đáng kể về lượng sản xuất axit glutamic giữa hai chủng (64,2 g/L so với 73 g/L).

Từ những điều nêu trên, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế sẽ có thể hiểu rằng sáng chế có thể bao gồm cả các dạng cụ thể khác mà không làm thay đổi ý đồ kỹ thuật hoặc đặc điểm cơ bản của sáng chế. Về mặt này, các phương án lấy ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngược lại, sáng chế được dự định để bao gồm không chỉ các phương án lấy ví dụ mà cả các thay thế, cải biến, dạng tương đương khác và các phương án khác mà có thể được bao gồm trong ý đồ và phạm vi của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm.

[Số nộp lưu]

Cơ quan lưu giữ: Korean Culture Center of Microorganisms

Số nộp lưu: KCCM12458P

Ngày nộp lưu: 14/3/2019

Cơ quan lưu giữ: Korean Culture Center of Microorganisms

Số nộp lưu: KCCM12459P

Ngày nộp lưu: 14/3/2019

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất glyxin, phương pháp này bao gồm bước lên men bằng cách nuôi cấy vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa ATP phosphoribosyltransferaza (HisG), trong đó axit amin thứ 233 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 được thế bằng histidin (H), hoặc các axit amin thứ 233 và 235 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 lần lượt được thế bằng histidin (H) và glutamin (Q), trong môi trường.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước sản xuất axit glutamic.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó glyxin ở dạng được chứa trong chế phẩm lên men.
4. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu hồi glyxin từ môi trường nuôi cấy.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó năng suất glyxin tăng so với vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có ATP phosphoribosyltransferaza không có phần thế.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó ATP phosphoribosyltransferaza gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* là *Corynebacterium glutamicum*.
8. Chế phẩm khi được sử dụng để sản xuất glyxin, bao gồm vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* chứa ATP phosphoribosyltransferaza (HisG), trong đó axit amin thứ 233 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 được thế bằng histidin (H), hoặc các axit amin thứ 233 và 235 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 lần lượt được thế bằng histidin (H) và glutamin (Q).
9. Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium* có năng suất glyxin tăng, trong đó hoạt tính của ATP phosphoribosyltransferaza (HisG) được tăng cường, và axit amin thứ 233 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 trong ATP phosphoribosyltransferaza (HisG) được thế bằng histidin (H).

10. Vi sinh vật theo điểm 9, trong đó ATP phosphoribosyltransferaza gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 5.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> Vi sinh vật có năng suất glyxin tăng và phương pháp sản xuất glyxin
 sử dụng vi sinh vật này
 <130> OPA19064
 <150> KR 10-2018-0035156
 <151> 2018-03-27
 <160> 18
 <170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 1
 aattattcga ctaatatacct cccccaaca cacattgata actgttgtgt ggaagaatgt 60
 accga 65
 <210> 2
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> gen khởi đầu hisEG

<400> 2
 aattattcga ctaatatacct cccccaaca cacattgata actgttgtgt ggtataatgt 60
 accga 65
 <210> 3
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> gen khởi đầu hisEG

<400> 3
 aattattcga ctaatatacct cccccaaca cacattgata actgttgtgt ggtataatgg 60
 accga 65
 <210> 4
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 4
 Met Leu Lys Ile Ala Val Pro Asn Lys Gly Ser Leu Ser Glu Arg Ala
 1 5 10 15
 Met Glu Ile Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Ala Gly Arg Gly Asp Ser Lys
 20 25 30
 Ser Leu Asn Val Phe Asp Glu Ala Asn Asn Val Glu Phe Phe Phe Leu
 35 40 45
 Arg Pro Lys Asp Ile Ala Ile Tyr Val Ala Gly Gly Gln Leu Asp Leu
 50 55 60
 Gly Ile Thr Gly Arg Asp Leu Ala Arg Asp Ser Gln Ala Asp Val His
 65 70 75 80
 Glu Val Leu Ser Leu Gly Phe Gly Ser Ser Thr Phe Arg Tyr Ala Ala
 85 90 95
 Pro Ala Asp Glu Glu Trp Ser Ile Glu Lys Leu Asp Gly Lys Arg Ile
 100 105 110
 Ala Thr Ser Tyr Pro Asn Leu Val Arg Asp Asp Leu Ala Ala Arg Gly
 115 120 125
 Leu Ser Ala Glu Val Leu Arg Leu Asp Gly Ala Val Glu Val Ser Ile
 130 135 140
 Lys Leu Gly Val Ala Asp Ala Ile Ala Asp Val Val Ser Thr Gly Arg
 145 150 155 160
 Thr Leu Arg Gln Gln Gly Leu Ala Pro Phe Gly Glu Val Leu Cys Thr

```

                165                170                175
Ser Glu Ala Val Ile Val Gly Arg Lys Asp Glu Lys Val Thr Pro Glu
                180                185                190
Gln Gln Ile Leu Leu Arg Arg Ile Gln Gly Ile Leu His Ala Gln Asn
                195                200                205
Phe Leu Met Leu Asp Tyr Asn Val Asp Arg Asp Asn Leu Asp Ala Ala
                210                215                220
Thr Ala Val Thr Pro Gly Leu Ser Gly Pro Thr Val Ser Pro Leu Ala
225                230                235                240
Arg Asp Asn Trp Val Ala Val Arg Ala Met Val Pro Arg Arg Ser Ala
                245                250                255
Asn Ala Ile Met Asp Lys Leu Ala Gly Leu Gly Ala Glu Ala Ile Leu
                260                265                270
Ala Ser Glu Ile Arg Ile Ala Arg Ile
                275                280
<210>      5
<211>      281
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      HisG(G233H)
<400>      5
Met Leu Lys Ile Ala Val Pro Asn Lys Gly Ser Leu Ser Glu Arg Ala
 1                5                10                15
Met Glu Ile Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Ala Gly Arg Gly Asp Ser Lys
                20                25                30
Ser Leu Asn Val Phe Asp Glu Ala Asn Asn Val Glu Phe Phe Phe Leu
                35                40                45
Arg Pro Lys Asp Ile Ala Ile Tyr Val Ala Gly Gly Gln Leu Asp Leu
                50                55                60
Gly Ile Thr Gly Arg Asp Leu Ala Arg Asp Ser Gln Ala Asp Val His
 65                70                75                80
Glu Val Leu Ser Leu Gly Phe Gly Ser Ser Thr Phe Arg Tyr Ala Ala
                85                90                95
Pro Ala Asp Glu Glu Trp Ser Ile Glu Lys Leu Asp Gly Lys Arg Ile
                100                105                110
Ala Thr Ser Tyr Pro Asn Leu Val Arg Asp Asp Leu Ala Ala Arg Gly
                115                120                125
Leu Ser Ala Glu Val Leu Arg Leu Asp Gly Ala Val Glu Val Ser Ile
                130                135                140
Lys Leu Gly Val Ala Asp Ala Ile Ala Asp Val Val Ser Thr Gly Arg
145                150                155                160
Thr Leu Arg Gln Gln Gly Leu Ala Pro Phe Gly Glu Val Leu Cys Thr
                165                170                175
Ser Glu Ala Val Ile Val Gly Arg Lys Asp Glu Lys Val Thr Pro Glu
                180                185                190
Gln Gln Ile Leu Leu Arg Arg Ile Gln Gly Ile Leu His Ala Gln Asn
                195                200                205
Phe Leu Met Leu Asp Tyr Asn Val Asp Arg Asp Asn Leu Asp Ala Ala
                210                215                220
Thr Ala Val Thr Pro Gly Leu Ser His Pro Thr Val Ser Pro Leu Ala
225                230                235                240
Arg Asp Asn Trp Val Ala Val Arg Ala Met Val Pro Arg Arg Ser Ala
                245                250                255
Asn Ala Ile Met Asp Lys Leu Ala Gly Leu Gly Ala Glu Ala Ile Leu
                260                265                270
Ala Ser Glu Ile Arg Ile Ala Arg Ile
                275                280
<210>      6
<211>      281
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      HisG(G233H/T235Q)
<400>      6
Met Leu Lys Ile Ala Val Pro Asn Lys Gly Ser Leu Ser Glu Arg Ala

```

```

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

```

```

<210>      7
<211>      33
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      hisEG-pro-2mt-AF
<400>      7
gatcctctag agtcgacttc gacgaatccc tcg
<210>      8
<211>      32
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      hisEG-pro-2mt-AR
<400>      8
cgggtacatta taccacacaa cagttatcaa tg
<210>      9
<211>      32
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      hisEG-pro-2mt-BF
<400>      9
gtgtgataaat gtaccgagtg aagacatttg ac
<210>      10
<211>      32
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      hisEG-pro-2mt-BR
<400>      10

```

33

32

32

```

atgcctgcag gtcgactgat acccaaatcg ag 32
<210> 11
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hisEG-pro-3mt-AR
<400> 11
cgggtccatta taccacacaa cagttatcaa tg 32
<210> 12
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hisEG-pro-3mt-BF
<400> 12
gtgggtataat ggaccgagtg aagacatttg ac 32
<210> 13
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hisG(G233H)-AF
<400> 13
gatcctctag agtcgacccc aaacaagggc tcgc 34
<210> 14
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hisG(G233H)-AR
<400> 14
cgtgccagtg gggataccgt tgggtggg 28
<210> 15
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hisG(G233H)-BF
<400> 15
aaccgccaggc ctatcccacc caacggtatc 30
<210> 16
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hisG(G233H)-BR
<400> 16
atgcctgcag gtcgacgcaa ggttggaac aac 33
<210> 17
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hisG(G233H/T235Q)-AR
<400> 17
cgtgccagtg gggatacctg tgggtggg 28
<210> 18
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> hisG(G233H/T235Q)-BF
<400> 18
aaccgccaggc ctatcccacc cacaggtatc 30

```