



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0051725
(51)^{2020.01} C12N 15/52; C12N 15/74; C12P 13/08; (13) B
C12N 15/63

(21) 1-2021-04254 (22) 21/12/2012
(62) 1-2014-02398
(86) PCT/KR2012/011328 21/12/2012 (87) WO2013/095071 27/06/2013
(30) 10-2011-0139527 21/12/2011 KR
(45) 25/09/2025 450 (43) 25/10/2021 403A
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea
(72) LEE, Kwang Ho (KR); LIM, Sang Jo (KR); MOON, Jun Ok (KR); JANG, Jae Woo
(KR); PARK, Su Jin (KR); PARK, Sang Hee (KR).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-LYSIN

(21) 1-2021-04254

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất L-lysin, bao gồm các bước: thay thế bộ ba mã hóa khởi đầu của polynucleotit mã hóa aspartat kinaza (LysC) trong vi sinh vật bằng ATG; nuôi cấy vi sinh vật này; và thu hồi L-lysin từ sinh vật đã nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy lỏng, và trong đó vi sinh vật này là *Corynebacterium* sp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất L-lysin, bao gồm các bước: thay thế bộ ba mã hóa khởi đầu của polynucleotit mã hóa aspartat kinaza (LysC) trong vi sinh vật bằng ATG; nuôi cấy vi sinh vật này; và thu hồi L-lysin từ viny vật đã nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy lỏng, và trong đó vi sinh vật này là *Corynebacterium* sp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chủng của chi *Corynebacterium*, đặc biệt là *Corynebacterium glutamicum*, là vi sinh vật gram dương, được sử dụng phổ biến để sản xuất L-lysin. L-lysin được sử dụng làm thức ăn cho động vật, thuốc và mỹ phẩm dùng cho người, và được sản xuất bằng cách lên men chủng *Corynebacterium*.

Thông thường, chủng của chi *Corynebacterium* có các gen sinh tổng hợp lysin tăng cường và phương pháp sản xuất L-lysin bằng cách sử dụng chủng này đó được biết đến. Ví dụ, Patent Mỹ số 6,746,855 bộc lộ phương pháp sản xuất L-lysin bằng cách nuôi cấy *Corynebacterium* có sự biểu hiện tăng cường của gen *lysE* (gen mang export lysin), và các gen bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm gen *dapA*, gen *lysC*, gen *pyc* và gen *dapB*.

Phương pháp khác là khuếch đại các gen trong con đường sinh tổng hợp lysin hoặc cải biến gen khởi đầu. Ví dụ, các đơn patent Hàn quốc số 2009-0082702 và 2009-0084099 mô tả phương pháp sản xuất L-lysin bằng cách đưa gen khởi đầu cải biến là *ddh* và *lysC-asd* operon vào *Corynebacterium*. Đơn patent Hàn quốc số 2008-0025355 mô tả phương pháp cải thiện khả năng sản sinh lysin bằng cách khuếch đại số bản sao của các gen trong con đường sinh tổng hợp lysin, là các gen *aspB*, *lysC*, *asd*, *dapA*, *dapB*, *lysA*, và *pyc*, trong thể nhiễm sắc.

Đồng thời, bộ ba mã hóa khởi đầu được nhận biết bởi các ribosom để khởi đầu quá trình dịch mã trong thể nhiễm sắc thường là ATG. Quá trình dịch mã này có thể được kiểm soát theo bộ ba mã hóa khởi đầu của gen, và trình tự của bộ ba mã hóa khởi đầu có vai trò quan trọng trong quá trình điều hòa hoạt tính protein. Tuy nhiên, trong khi ATG là bộ ba mã hóa khởi đầu phổ biến trong số các gen sinh tổng hợp lysin có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, thì bộ ba mã hóa khởi đầu của các gen *lysC* và *pyc* là GTG,

và là TTG đối với gen *tkt* trên con đường pentoza phosphat chứa bộ ba mã hóa khởi đầu TTG (tài liệu viện dẫn: J. Biotechnol., 104: 5-

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã tìm cách cải thiện khả năng sản sinh lysin, và kết quả là đã phát hiện thấy rằng bộ ba mã hóa khởi đầu của các gen *lysC*, *tkt* và *pyc* thể đại có thể được thay thế bằng ATG để tăng cường hoạt tính của aspartat kinaza, transketolaza và pyruvat carboxylaza so với hoạt tính nội sinh của chúng.

Mục đích của sáng chế là đề cập đến phương pháp sản xuất L-lysin. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các phương án sau:

1. Phương pháp sản xuất L-lysin, bao gồm các bước: thay thế bộ ba mã hóa khởi đầu của polynucleotit mã hóa aspartat kinaza (LysC) trong vi sinh vật bằng ATG; nuôi cấy vi sinh vật này; và thu hồi L-lysin từ viny vật đã nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy lỏng, và trong đó vi sinh vật này là *Corynebacterium* sp.
2. Phương pháp theo phương án 1, trong đó vi sinh vật *Corynebacterium* sp. là *Corynebacterium glutamicum*.
3. Phương pháp theo phương án 1, trong đó trước khi thay thế bằng ATG, bộ ba mã hóa khởi đầu của polynucleotit mã hóa aspartat kinaza (LysC) là GTG.
4. Phương pháp theo phương án 1, trong đó polynucleotit mã hóa aspartat kinaza (LysC) có bộ ba mã hóa khởi đầu được thay thế bằng ATG được thể hiện bằng trình tự nucleotit SEQ ID NO.16.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polynucleotit cải biến mã hóa aspartat kinaza (EC:2.7.2.4; sau đây được gọi là LysC), transketolaza (EC:2.2.1.1; sau đây được gọi là Tkt) hoặc pyruvat carboxylaza (EC:6.4.1.1; sau đây được gọi là Pyc), trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu của polynucleotit này được thay thế bằng ATG.

Mỗi polynucleotit mã hóa aspartat kinaza, transketolaza hoặc pyruvat carboxylaza cũng có thể bao gồm đoạn thể, đoạn khuyết, đoạn cài xen hoặc đoạn bổ sung một phần vào polynucleotit, với điều kiện là mỗi polynucleotit trong số chúng có hoạt tính enzym, và có thể có độ tương đồng bằng 70% hoặc lớn hơn, đặc biệt là bằng 80% hoặc lớn hơn,

tốt hơn là bằng 90% hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là 95% hoặc lớn hơn, và tốt nhất là có độ tương đồng bằng 100% so với polynucleotit đã biết.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “độ tương đồng (đồng nhất)” có nghĩa là mức độ giống nhau giữa các trình tự nucleotit của gen *lysC*, *tkt* hoặc *pyc* thể dại và các trình tự nucleotit của gen cải biến tương ứng của chúng, tức là gen *lysC*, gen *tkt* hoặc gen *pyc* cải biến, trong đó một phần polynucleotit được thay thế, khuyết, chèn vào hoặc được bổ sung.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “bộ ba mã hóa khởi đầu” có nghĩa là 3 nucleotit tương ứng với điểm bắt đầu dịch mã khi trình tự mã hóa của ARN thông tin được dịch mã thành protein. Nói chung, các bộ ba mã hóa khởi đầu tìm thấy trong thể nhiễm sắc của các vi sinh vật là ATG (AUG trên ARN thông tin), GTG (GUG trên ARN thông tin) và TTG (UUG trên ARN thông tin), và chúng có mặt với tỷ lệ 62,5%~66,5%, 23,1%~24,3% và 10,3%~13,2% theo kết quả phân tích của toàn bộ trình tự bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* (tài liệu viện dẫn: Handbook of *Corynebacterium glutamicum*, 40p, Lothar Eggeling & Michael Bott, 2005).

Trong số các gen sinh tổng hợp lysin có nguồn gốc từ *Corynebacterium* đã biết đến nay, *lysC* và *pyc* có bộ ba mã hóa khởi đầu là GTG, và *tkt* có bộ ba mã hóa khởi đầu là TTG. Bộ ba mã hóa khởi đầu của các gen này không phải là ATG, được xem là đặc điểm độc nhất của *Corynebacterium*.

Polynucleotit cải biến theo sáng chế khác biệt ở chỗ bộ ba mã hóa khởi đầu của các gen *lysC*, *tkt* hoặc *pyc* này được thay thế bằng ATG, và các tác giả sáng chế là những người đầu tiên cải biến các polynucleotit bằng bộ ba mã hóa khởi đầu này. Chi tiết hơn, bộ ba mã hóa khởi đầu GTG của polynucleotit mã hóa aspartat kinaza (LysC) hoặc pyruvat carboxylaza (Pyc) được thay thế bằng ATG, và bộ ba mã hóa khởi đầu TTG của polynucleotit mã hóa transketolaza (Tkt) được thay thế bằng ATG theo sáng chế. Đặc biệt hơn, trình tự của các gen *lysC*, *tkt*, và *pyc* là SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14, và SEQ ID NO.15 tương ứng, trình tự của các gen có bộ ba mã hóa khởi đầu đã thay thế bằng ATG được thể hiện bằng SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17, và SEQ ID NO.18 tương ứng.

Việc thế bazơ của các bộ ba mã hóa khởi đầu có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết bất kỳ trong lĩnh vực này, ví dụ, tạo đột biến ở vị trí cụ thể, tái tổ hợp đồng nhất, nhưng chỉ không giới hạn ở các phương pháp này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vectơ bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit cải biến là các polynucleotit cải biến mã hóa aspartat kinaza, transketolaza hoặc pyruvat carboxylaza, trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu của polynucleotit này được thay thế bằng ATG.

Các polynucleotit cải biến có bộ ba mã hóa khởi đầu đã thay thế là ATG và mã hóa aspartat kinaza, transketolaza hoặc pyruvat carboxylaza, được bao gồm trong vectơ theo sáng chế, có thể bao gồm các polynucleotit này trong đó một phần polynucleotit được thay thế, khuyết, chèn vào hoặc được bổ sung, với điều kiện là chúng có hoạt tính enzym, và có thể có độ tương đồng bằng 70% hoặc lớn hơn, đặc biệt là bằng 80% bằng lớn hơn, tốt hơn là bằng 90% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là bằng 95% hoặc lớn hơn, và tốt nhất là có độ tương đồng bằng 100%.

Tiếp theo, các polynucleotit cải biến có bộ ba mã hóa khởi đầu đã thay thế là ATG và mã hóa aspartat kinaza, transketolaza hoặc pyruvat carboxylaza, được bao gồm trong vectơ theo sáng chế, cũng có thể bao gồm chỉ một phần gen mã hóa aspartat kinaza, transketolaza hoặc pyruvat carboxylaza, với điều kiện là chúng có bộ ba mã hóa khởi đầu đã thay thế là ATG.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “vectơ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ cấu trúc ADN chứa trình tự bazơ được liên kết điều khiển với trình tự đối chứng thích hợp, để biểu hiện gen đích trong vật chủ thích hợp. Các trình tự đối chứng có thể bao gồm gen khởi đầu để khởi đầu quá trình phiên mã, trình tự điều khiển nhất định để kiểm soát quá trình phiên mã này, trình tự mã hóa vị trí gắn kết ribosom thích hợp trên ARN thông tin, và trình tự để kiểm soát quá trình kết thúc phiên mã và dịch mã. Vectơ được sử dụng trong sáng chế là không bị giới hạn cụ thể, và có thể là vectơ bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, với điều kiện là nó có thể được tái tạo trong vật chủ. Ví dụ, vectơ có thể là plasmit, hạt thể thực khuẩn, hoặc đoạn chèn vào bộ gen, và đặc biệt là pDZ (Patent Hàn quốc số 10-0924065), nhưng không giới hạn ở các loại này. Ngay khi được biến nạp vào vật chủ thích hợp, vectơ có thể được tạo bản sao hoặc có chức năng độc lập của bộ gen vật chủ, hoặc có thể được hợp nhất vào bộ gen của chính nó.

Đặc biệt, trình tự nucleotit (SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15) bao gồm bộ ba mã hóa khởi đầu của các gen *lysC*, *tkt* hoặc *pyc* thu được, và dựa trên trình tự này, các đoạn môi có bộ ba mã hóa khởi đầu đã thay thế là ATG được tổng hợp. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các đoạn môi và ADN nhiễm sắc thể của chủng sản sinh L-lysin làm khuôn, để thu được ADN với một đầu được thay thế bằng ATG. Từ đó, mảnh ADN thu được này được tách dòng vào vector để thu được vector tái tổ hợp cuối cùng. Đặc biệt hơn, theo sáng chế, các vector pDZ-*lysC*(ATG), pDZ-*tkt*(ATG) và pDZ-*pyc*(ATG) lần lượt được tạo ra.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vi sinh vật bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit cải biến có bộ ba mã hóa khởi đầu đã thay thế là ATG và mã hóa các enzym được chọn từ nhóm gồm aspartat kinaza, transketolaza và pyruvat carboxylaza, và tiếp đó cải thiện mức độ dịch mã của ARN thông tin đã được phiên mã từ các polynucleotit vào protein, làm hoạt tính của một hoặc nhiều enzym được tăng cường hơn so với hoạt tính nội sinh của chúng. Vi sinh vật theo sáng chế có thể có hoạt tính tăng cường của aspartat kinaza, transketolaza hoặc pyruvat carboxylaza bằng cách sử dụng các polynucleotit cải biến ở dạng kết hợp gồm một, hai, hoặc ba polynucleotit, trong đó các polynucleotit cải biến này mã hóa các enzym tương ứng và được thay thế bằng ATG nằm trên bộ ba mã hóa khởi đầu.

Để tiến hành thay thế ATG đối với bộ ba mã hóa khởi đầu của các gen đích trên thể nhiễm sắc của vi sinh vật, các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ, các trình tự bộ ba mã hóa khởi đầu của các gen nội sinh *lysC*, *tkt* và *pyc* ở vi sinh vật có thể được thay thế trên thể nhiễm sắc. Theo cách khác, các gen tương ứng có các trình tự bộ ba mã hóa khởi đầu đã thay thế có thể được đưa vào vi sinh vật dưới dạng plasmit.

Vi sinh vật có thể là chủng bất kỳ, với điều kiện là nó có khả năng sản sinh L-lysin. Đặc biệt, nó có thể là vi sinh vật *Corynebacterium* sp. hoặc *Brevibacterium* sp. Ví dụ về các vi sinh vật *Corynebacterium* sp. hoặc *Brevibacterium* sp. bao gồm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869. Hơn nữa, các biến thể sản sinh L-lysin hoặc các chủng có nguồn gốc từ đó, ví dụ,

Corynebacterium glutamicum KCCM11016P (vi sinh vật này được mô tả dưới dạng KFCC10881, và được lưu trữ tại Cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế (International Depositary Authority) theo Hiệp định Budapest với số truy nhập KCCM11016P, Patent Hàn quốc số 10-0159812, Patent Hàn quốc số 10-0397322) và *Corynebacterium glutamicum* KFCC 11001, có thể là bao hàm. Cụ thể hơn nữa, nó có thể là *Corynebacterium glutamicum* với số truy nhập KCCM11016P.

Đặc biệt, *Corynebacterium glutamicum* với số truy nhập KCCM11016P được biến nạp với vector bao gồm polynucleotit mã hóa aspartat kinaza, transketolaza hoặc pyruvat carboxylaza trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu được thay thế bằng ATG, để thu được tái tổ hợp *Corynebacterium glutamicum*. Đặc biệt hơn, vector pDZ-lysC(ATG), pDZ-*tk*t(ATG) hoặc pDZ-*pyc*(ATG) lần lượt được đưa vào *Corynebacterium glutamicum* với số truy nhập KCCM11016P để thu được từng loại *Corynebacterium glutamicum* tái tổ hợp.

Hơn nữa, vi sinh vật có thể được biến nạp với vector bao gồm hai hoặc nhiều polynucleotit của các polynucleotit mã hóa aspartat kinaza, transketolaza hoặc pyruvat carboxylaza và có bộ ba mã hóa khởi đầu đã thay thế là ATG. Đặc biệt, vector pDZ-*tk*t(ATG) bao gồm gen chứa bộ ba mã hóa khởi đầu đã được thay thế bằng ATG và mã hóa transketolaza, được biến nạp vào *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P-lysC, trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu GTG của *lysC* được thay thế bằng ATG, và trong quá trình trao đổi chéo thứ hai, các bộ ba mã hóa khởi đầu của *lysC* và *tk*t trên thể nhiễm sắc được thay thế bằng ATG để thu được *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P-lysC-*tk*t. Hơn nữa, vector pDZ-*pyc*(ATG) bao gồm polynucleotit chứa bộ ba mã hóa khởi đầu đã được thay thế bằng ATG và mã hóa pyruvat carboxylaza, được biến nạp vào KCCM11016P-lysC, trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu GTG của *lysC* được thay thế bằng ATG, và trong quá trình trao đổi chéo thứ hai, các bộ ba mã hóa khởi đầu của *lysC* và *pyc* trên thể nhiễm sắc được thay thế bằng ATG để thu được KCCM11016P-lysC-*pyc*. Hơn nữa, vector pDZ-*tk*t(ATG) được biến nạp vào KCCM11016P-lysC-*pyc* như đó được điều chế nêu trên, trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu GTG của *lysC* và *pyc* được thay thế bằng ATG, và trong quá trình trao đổi chéo thứ hai, các bộ ba mã hóa khởi đầu của *lysC*, *pyc* và *tk*t trên thể nhiễm sắc được thay thế bằng ATG để thu được KCCM11016P-lysC-*pyc*-*tk*t. Có thể khẳng định được rằng các bộ ba mã hóa khởi đầu của *lysC*, *pyc* và *tk*t có thể cũng có thể được thay thế bằng ATG trong

chủng sản sinh lysin khác thuộc *Corynebacterium glutamicum*, KFCC10750 (vi sinh vật này được bộc lộ dưới dạng KFCC10750, được lưu trữ lại ở Cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế theo Hiệp định Budapest với số truy nhập KCCM11347P, Patent Hàn quốc số 10-0073610), KCCM10770P (Patent Hàn quốc số 10-0924065), CJ3P (Genome Biology 2012, 13:R40) theo cùng một cách. Các kết quả này gợi ý rằng các polynucleotit cải biến theo sáng chế có thể được đưa một cách ổn định vào các chủng khác nhau thuộc *Corynebacterium* sp., từ đó làm tăng khả năng sản sinh L-lysin.

Đặc biệt, KCCM11016P-lysC-pyc-tkt biến nạp, thu được bằng cách đưa các vector pDZ-lysC(ATG), pDZ-tkt(ATG) và pDZ-pyc(ATG) bao gồm polynucleotit mã hóa aspartat kinaza, transketolaza và pyruvat carboxylaza vào *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, được gọi là *Corynebacterium glutamicum* CA01-2059, và được lưu trữ vào 2 tháng 5 năm 2011 ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc (the Korean Culture Center of Microorganisms) (sau đây, được viết tắt là “KCCM”), là Cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế theo Hiệp định Budapest, với số truy nhập KCCM11188P. Nó được lưu trữ bởi Cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế theo Hiệp định Budapest.

Vi sinh vật theo sáng chế khác biệt ở chỗ bộ ba mã hóa khởi đầu của các gen thể đại mã hóa các enzym nêu trên được thay thế bằng ATG, và do đó, vi sinh vật này có hoạt tính của aspartat kinaza, transketolaza và pyruvat carboxylaza tăng cường hơn so với hoạt tính nội sinh của chúng, thu được từ quá trình cải thiện đồng kể về mức độ dịch mã của ARN thông tin đã được phiên mã từ các gen *lysC*, *tkt* và *pyc* vào các protein.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “hoạt tính nội sinh” có nghĩa là hoạt tính của enzym trong vi sinh vật nguyên thể, và ví dụ, hoạt tính của aspartat kinaza, transketolaza hoặc pyruvat carboxylaza trong vi sinh vật nguyên thể thuộc *Corynebacterium* sp. Thuật ngữ “hoạt tính nội sinh tăng cường” có nghĩa là hoạt tính cũn được cải thiện hơn so với hoạt tính của enzym nguyên thể.

Đặc biệt, khi hoạt tính aspartat kinaza của chủng trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu của gen *lysC* được thay thế bằng ATG được so sánh với hoạt tính của chủng KCCM11016P gốc, thì quan sát thấy hoạt tính aspartat kinaza cao hơn gấp 2,73 lần (bảng 4). Hơn nữa, khi hoạt tính transketolaza của chủng trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu của gen *tkt* được thay thế bằng ATG được so sánh với hoạt tính của chủng KCCM11016P gốc, thì quan sát thấy hoạt tính transketolaza cao hơn gấp 3,5 lần (bảng 5). Hơn nữa, khi

hoạt tính pyruvat carboxylaza của chủng trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu của gen *pyc* được thay thế bằng ATG được so sánh với hoạt tính của chủng KCCM11016P gốc, thì quan sát thấy hoạt tính pyruvat carboxylaza cao hơn gấp 1,89 lần (bảng 6).

Nhận thấy rằng khả năng sản sinh L-lysin của vi sinh vật có thể được tăng lên bằng cách cải thiện hoạt tính của aspartat kinaza, transketolaza, pyruvat carboxylaza hoặc dạng kết hợp của chúng.

Theo sáng chế, lượng L-lysin đó tạo ra trong các chủng sản sinh L-lysin là *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P-lysC, KCCM11016P-tkt, KCCM11016P-pyc, KCCM11016P-lysC-tkt, KCCM11016P-lysC-pyc, và KCCM11016P-lysC-pyc-tkt được xác định, và do đó, chúng có khả năng sản sinh L-lysin cải thiện đồng kể hơn so với chủng KCCM11016P gốc (bảng 7). Ngoài ra, chủng sản sinh lysin khác thuộc *Corynebacterium glutamicum*, KFCC10750 (Patent Hàn quốc số 10-0073610), KCCM10770P (Patent Hàn quốc số 10-0924065), và CJ3P (Genome Biology 2012, 13:R40), trong đó các bộ ba mã hóa khởi đầu của *lysC*, *pyc* và *tkt* được thay thế bằng ATG, có khả năng sản sinh L-lysin cải thiện đồng kể so với chủng gốc (các Bảng 8~10). Các kết quả này gợi ý về vi sinh vật có một loại polynucleotit cải biến mã hóa LysC, Tkt, hoặc Pyc, hoặc có hai loại polynucleotit cải biến mã hóa enzym, hoặc có ba loại polynucleotit cải biến mã hóa enzym và có bộ ba mã hóa khởi đầu đã thay thế bằng ATG trên thể nhiễm sắc, cũng có khả năng sản sinh L-lysin cải thiện hơn đồng kể so với vi sinh vật thể đại có bộ ba mã hóa khởi đầu GTG hoặc TTG.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất L-lysin, bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật như nêu trên; và bước thu hồi L-lysin từ vi sinh vật đó nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy lỏng.

Để tiến hành nuôi cấy, các phương pháp tạo ra L-lysin khác nhau bằng cách sử dụng vi sinh vật đó được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Việc nuôi cấy có thể được tiến hành theo phương pháp đã biết rộng rãi, và các điều kiện nuôi cấy, bao gồm nhiệt độ, thời gian, độ pH của môi trường, v.v. có thể được kiểm soát một cách thích hợp. Việc mô tả chi tiết quá trình nuôi cấy được đưa ra trong tài liệu sau [Chmiel; Bioprozesstechnik 1. Einfuhrung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991), và Storhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)]. Hơn nữa, việc nuôi cấy có thể bao gồm nuôi

cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, và nuôi cấy theo mẻ bổ sung. Đặc biệt, quá trình nuôi cấy theo mẻ, mẻ bổ sung hoặc mẻ bổ sung lặp lại có thể được vận hành theo cách liên tục, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các quy trình này.

Để sử dụng trong quá trình nuôi cấy, môi trường cần thỏa mãn yêu cầu về chủng cụ thể đã dùng. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật thuộc *Corynebacterium* sp. là đã biết (ví dụ, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981). Nguồn cacbon cần sử dụng có thể bao gồm sacarit và các hydrat cacbon như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột và xenluloza; các dầu và lipit như dầu đỗ tương, dầu hạt hướng dương, dầu thầu dầu và dầu dừa; các axit béo như axit palmitic, axit stearic, axit linoleic; các rượu như glyxerol và etanol; và axit hữu cơ như axetic axit. Các chất này có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp. Nguồn nitơ cần sử dụng có thể bao gồm pepton, dịch chiết nấm men, dịch chiết lỏng từ thịt, dịch chiết mạch nha, dịch lỏng ngâm ngô, đậu tương và ure, hoặc các hợp chất vụ cơ như amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat và amoni nitrat. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc ở dạng kết hợp. Nguồn phospho cần sử dụng có thể bao gồm đikali hydro phosphat, kali dihydro phosphat, và các muối natri tương ứng. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể chứa các muối kim loại như magie sulfat hoặc sắt sulfat, là cần thiết để phát triển. Cuối cùng, các chất dinh dưỡng thiết yếu như axit amin và vitamin có thể được sử dụng ngoài các chất nêu trên. Ngoài ra, các tiền chất nêu trên có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Các vật liệu này có thể được bổ sung một cách thích hợp vào môi trường nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy mẻ hoặc liên tục.

Giá trị pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng hợp chất bazơ như natri hydroxit, kali hydroxit, và amoniac hoặc hợp chất axit như axit phosphoric hoặc axit sulfuric. Quá trình tạo bọt có thể ngăn cản được bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt như polyglycol este của axit béo. Môi trường nuôi cấy được duy trì trong điều kiện yếm khí bằng cách đưa oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ, không khí) vào môi trường này. Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy thường nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C. Quá trình nuôi cấy được duy trì cho đến khi tạo ra được lượng axit L-amin tối đa. Về mặt này, thời gian đạt đến lượng tối đa này thường nằm trong khoảng từ 10 giờ đến 160 giờ. Sau khi tạo ra, L-lysin có thể được đưa vào môi trường nuôi cấy hoặc có thể giữ trong các tế bào.

Hơn nữa, phương pháp sản xuất L-lysin theo sáng chế bao gồm bước thu hồi L-lysin từ vi sinh vật đó nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy lỏng. Phương pháp thu hồi L-lysin từ vi sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy lỏng là đã biết rộng rãi trong lĩnh vực này. Ví dụ về phương pháp thu hồi L-lysin có thể bao gồm lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh và HPLC, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Trong các ví dụ, vector tái tổ hợp để thay thế ATG đối với bộ ba mã hóa khởi đầu GTG hoặc TTG của gen *lysC* mã hóa aspartat kinaza, gen *tkt* mã hóa transketolaza, và gen *pyc* mã hóa pyruvat carboxylaza có nguồn gốc từ chủng sản sinh lysin - *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, được tạo ra. Vector được biến nạp vào chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P để thu được chủng có bộ ba mã hóa khởi đầu đã thay thế trên thể nhiễm sắc, nhờ đó tạo ra chủng có khả năng sản sinh lysin cải thiện.

Chủng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P được sử dụng theo sáng chế là chủng, có tính bền với S-(2-aminoethyl) cystein (sau đây được gọi là AEC) và là chủng rò homoserin, được điều chế bằng cách gây đột biến nhân tạo sử dụng *Corynebacterium glutamicum* thể đại (ATCC 13032) làm chủng gốc (được bộc lộ là KFCC10881. Xem Patent Hàn quốc số 10-0159812 và Patent Hàn quốc số 10-0397322). Hơn nữa, chủng KFCC10750 là chủng *Corynebacterium glutamicum* sản sinh L-lysin, là sinh vật dinh dưỡng thụ động homoserin và bền với chất tương tự L-leuxin, 4-azaleuxin và không sinh rifampicin, đó được điều chế bằng cách gây đột biến nhân tạo (Patent Hàn quốc số 10-0073610), chủng KCCM10770P là chủng sản sinh L-lysin có nguồn gốc từ KCCM11016P, duy trì hai bản sao của 6 loại gen cấu thành nòng cốt con đường sinh tổng hợp lysin trên thể nhiễm sắc (Patent Hàn quốc số 10-0924065), và chủng CJ3P là chủng *Corynebacterium glutamicum*, có khả năng sản sinh L-lysin bằng cách đưa mỗi thể đột biến trong số các thể đột biến P458S, V59A, và T311I vào ba loại gen *pyc*, *hom*, và *lysC* thể đại, dựa trên bản mô tả của Binder và cộng sự (Genome Biology 2012, 13:R40).

Ví dụ 1: Cấu trúc vector tái tổ hợp (pDZ-lysC(ATG)) có bộ ba mã hóa khởi đầu ATG đã được thay thế trong *lysC* có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* và điều chế chủng có bộ ba mã hóa khởi đầu đã được thay thế pDZ (xem Patent Hàn quốc số 10-0924065) được sử dụng làm vector cơ bản cho vector tái tổ hợp, được cấu trúc như sau.

(1) Cấu trúc vector tái tổ hợp pDZ-lysC(ATG)

Để thu được gen *lysC* có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, ADN nhiễm sắc thể của chủng sản sinh lysin (*Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P) được điều chế bằng cách gây đột biến nhân tạo được sử dụng làm khuôn. Dựa vào ngân hàng gen ở Viện sức khỏe Hoa Kỳ (the U.S. National Institutes of Health, ngân hàng gen NIH), trình tự nucleotit (SEQ ID NO.13) chứa vùng bộ ba mã hóa khởi đầu của gen *lysC* (Số truy cập NCBI NC_003450, Ncg10247) thu được, và dựa trên trình tự này, hai cặp đoạn mồi (bảng 1, SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.4) để thay thế bộ ba mã hóa khởi đầu GTG bằng ATG được tổng hợp.

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của KCCM11016P làm khuôn và các đoạn mồi của Bảng 1 dưới đây. ADN polymeaza PfuUltraTM High-Fidelity (Stratagene) được sử dụng làm polymeaza, và PCR được thực hiện 30 vòng thoái biến ở 96°C trong 30 giây; tiến hành ủ ở 55°C trong 30 giây; và polyme hóa ở 72°C trong 30 giây. Hai mảnh ADN thu được như vậy được tách dòng vào vector pDZ đó được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng In-Fusion PCR (Clontech), và cuối cùng, vector tái tổ hợp pDZ-lysC(ATG) được tạo cấu trúc.

(2) Điều chế chủng

Từ đó, vector pDZ-lysC(ATG) đó được tạo cấu trúc được biến nạp vào KCCM11016P bằng phương pháp xung điện (bằng cách sử dụng phương pháp biến nạp theo Appl. Microbiol.Biotechnol. (1999) 52:541-545), và sau đó các chủng, trong đó gen được chèn vào thể nhiễm sắc bằng cách tái tổ hợp đồng nhất, được chọn trong môi trường lựa chọn chứa 25 mg/L kanamycin. Đoạn cài xen thể nhiễm sắc thành công của vector được xác nhận bằng màu xanh da trời của các khuẩn lạc trên rắn môi trường chứa X-gal (5-brom-4-clo-3-indolyl-(β -D-galactosit). Chủng chứa đoạn cài xen thể nhiễm sắc thứ nhất được nuôi cấy đồng thời lắc (30°C, 8 giờ) trong môi trường dinh dưỡng. Sau đó, chủng đó nuôi cấy được pha loãng theo dãy trong khoảng từ 10^{-4} đến 10^{-10} , và môi

trường đó pha loãng được phủ lên môi trường rắn chứa X-gal. Hầu hết các khuẩn lạc có màu xanh da trời, trong khi đó các khuẩn lạc màu trắng cũng có mặt với nồng độ thấp. Bằng cách lựa chọn các khuẩn lạc màu trắng, các chủng trong đó trình tự nucleotit ở vùng bộ ba mã hóa khởi đầu của *lysC* được thay thế bằng cách trao đổi chéo lần thứ hai được chọn. Việc thế nucleotit của bộ ba mã hóa khởi đầu trong chủng đó chọn cuối cùng được xác nhận bằng PCR nhờ sử dụng các đoạn mồi có các trình tự SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.4 và sau đó bằng cách phân tích trình tự nucleotit của vị trí đích.

Bảng 1

Đoạn mồi	Trình tự nucleotit	SEQ ID NO.
lysC/ATG/FX	CCGGGGATCCTCTAGActtagggagccatcttttgg	1
lysC/ATG/R	CCAGGGCCATCTTTGTGC	2
lysC/ATG/F	GCACAAAGATGGCCCTGG	3
lysC/ATG/RX	GCAGGTCGACTCTAGAAGTGACATCAACAATGCGTG	4

Ví dụ 2: Cấu trúc vector tái tổ hợp (pDZ-tkt(ATG)) có bộ ba mã hóa khởi đầu ATG đã thay thế trên tkt có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* và điều chế chủng có bộ ba mã hóa khởi đầu đã thay thế

Có hai bộ ba mã hóa mong muốn làm bộ ba mã hóa khởi đầu trên trình tự của gen tkt. Dựa trên khoảng cách từ RBS (vị trí gắn kết ribosomo) và các protein học, bộ ba mã hóa ngược dòng được xác định là bộ ba mã hóa khởi đầu theo sáng chế.

(1) Cấu trúc vector tái tổ hợp pDZ-tkt(ATG)

Để thu được gen *tkt* có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, ADN nhiễm sắc thể của KCCM11016P được sử dụng làm khuôn. Dựa vào ngân hàng gen ở Viện sức khỏe Hoa Kỳ (NIH GenBank), trình tự nucleotit (SEQ ID NO.14) chứa vùng bộ ba mã hóa khởi đầu của gen tkt (Số truy cập NCBI NC_003450, Ncgl1512) thu được, và dựa trên trình tự này, hai cặp đoạn mồi (bảng 2, SEQ ID NO.5-SEQ ID NO.8) để thay thế bộ ba mã hóa khởi đầu TTG bằng ATG được tổng hợp.

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của KCCM11016P làm khuôn và các đoạn mồi của bảng sau đây 2 trong các điều kiện của ví dụ 1-1. Hai mảnh ADN thu được như vậy được tách dòng vào vector pDZ được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng In-Fusion PCR (Clontech), và cuối cùng, vector tái tổ hợp pDZ-tkt(ATG) được tạo cấu trúc.

(2) Điều chế chủng

Từ đó, vector pDZ-tkt(ATG) đó được tạo cấu trúc được biến nạp vào chủng KCCM11016P sản sinh lysin theo cùng cách như được nêu trong ví dụ 1-2, và KCCM11016P-tkt, trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu của *tkt* trên thể nhiễm sắc được thay thế bằng ATG bằng cách trao đổi chéo lần thứ hai, thu được. Việc thế nucleotit của bộ ba mã hóa khởi đầu của gen cuối cùng được xác nhận bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi của các SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.8 và sau đó bằng cách phân tích trình tự nucleotit của vị trí đích.

Bảng 2

Đoạn mồi	Trình tự nucleotit	SEQ ID NO.
tkt/ATG/FX	CCG GGG ATC <u>CTC TAG A</u> GAA ATA GAT GGG TGT AGA CG	5
tkt/ATG/R4	GTGACAGCGTCATGGTGGTCAAT	6
tkt/ATG/F4	ATTGACCACC <u>ATG</u> ACGCTGTCAC	7
tkt/ATG/RX	GCA GGT CGA <u>CTC TAG A</u> CGC AGA GCC TTC AGG TCA TC	8

Ví dụ 3: Cấu trúc vector tái tổ hợp (pDZ-pyc(ATG)) có bộ ba mã hóa khởi đầu ATG đã thay thế ở *pyc* có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* và điều chế chủng có bộ ba mã hóa khởi đầu đã thay thế

(1) Cấu trúc vector tái tổ hợp pDZ-pyc(ATG)

Để thu được gen *pyc* có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, ADN nhiễm sắc thể của KCCM11016P được sử dụng làm khuôn. Dựa vào ngân hàng gen ở Viện sức khỏe Hoa Kỳ (NIH GenBank), trình tự nucleotit (SEQ ID NO.15) chứa vùng bộ ba mã hóa khởi đầu của gen *pyc* (Số truy cập NCBI NC_003450, Ncgl0659) thu được, và dựa trên cơ sở trình tự này, hai cặp đoạn mồi (bảng 3, SEQ ID NO.9-SEQ ID NO.12) để thay thế bộ ba mã hóa khởi đầu GTG bằng ATG được tổng hợp.

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của KCCM11016P làm khuôn và các đoạn mồi của bảng 3 trong các điều kiện của ví dụ 1-1. Hai mảnh ADN thu được như vậy được tách dòng vào vector pDZ được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng In-Fusion PCR (Clontech), và cuối cùng, vector tái tổ hợp pDZ-pyc(ATG) được tạo cấu trúc.

(2) Điều chế chủng

Từ đó, vector pDZ-pyc(ATG) được tạo cấu trúc được biến nạp vào chủng KCCM11016P sản sinh lysin theo cùng cách như được nêu trong ví dụ 1-2, và KCCM11016P-pyc, trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu của *pyc* trên thể nhiễm sắc được

thay thế bằng ATG bằng cách trao đổi chéo lần thứ hai, thu được. Việc thế nucleotit của bộ ba mã hóa khởi đầu của gen cuối cùng được xác nhận bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi của SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.12 và sau đó bằng cách phân tích trình tự nucleotit của vị trí đích.

Bảng 3

Đoạn mồi	Trình tự nucleotit	SEQ ID NO.
pyc/ATG/FX	CCGGGGATCCTCTAGATTTTGGGGAAAA GTGCAAAG	9
pyc/ATG/R	GAGTCGACA TAGAGTAAT	10
pyc/ATG/F	ATTACTCTAaTGTCGACTC	11
pyc/ATG/RX	GCAGGTCGACTCTAGAGGGGCATTTTCAGACAGGAAG	12

Ví dụ 4: Xác định hoạt tính enzym aspartat kinaza ở chủng có bộ ba mã hóa khởi đầu ATG đã thay thế trong gen *lysC*

Các tế bào trong pha hàm số mũ được thu gom bằng cách ly tâm (5000 vòng/phút, 15 phút) và được rửa ba lần bằng dung dịch đệm Tris.HCl 0,1% (độ pH = 8,0), và sau đó được tạo hỗn dịch trong cùng một dung dịch đệm để độ đục ở 610 nm bằng 160. Các tế bào này được phá vỡ trong 6 phút bằng cách sử dụng máy phá tế bào bằng vi hạt sau khi các hạt thủy tinh được bổ sung ở nồng độ hỗn dịch bằng 1,25g/1,5mL. Dịch nổi được thu gom bằng cách ly tâm (15000 vòng/phút, 20 phút), và được định lượng về hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford (Bradford, M.M 1976. Anal. Biochem. 72:248-254) và được sử dụng làm dung dịch protein thụ để xác định hoạt tính enzym của aspartat kinaza (LysC). Để định lượng hoạt tính enzym của LysC, khoảng 0,05mL dung dịch protein thụ được bổ sung vào dung dịch phản ứng chứa 0,1M Tris.HCl (độ pH = 8,0), 0,01M magie clorua (MgCl₂), 0,6M hydroxylamin.HCl (độ pH = 7,0), 4mM ATP, và 0,2M aspartat để bắt đầu phản ứng. Hỗn hợp này được cho phản ứng ở 30°C trong 30 phút, và dung dịch ngừng (10% FeCl₂, 3,3% TCA, HCl 0,7N) được bổ sung để kết thúc phản ứng. Dịch nổi được thu gom bằng cách ly tâm, và độ hấp phụ ở 540nm được đo. Đơn vị (U) của hoạt tính enzym LysC được xác định bằng nmol của aspartat hydroxamat đó được tạo ra bởi 1mg protein trong 1 phút.

Nhận thấy rằng chủng KCCM11016P-lysC có hoạt tính LysC cao hơn gấp 2,73 lần so với hoạt tính của chủng gốc KCCM11016P (bảng 4).

Bảng 4

Hoạt tính enzym LysC

Chủng	Hoạt tính enzym (Lần)
	LysC
KCCM11016P	1,00
KCCM11016P-lysC	2,73

Ví dụ 5: Xác định hoạt tính enzym transketolaza ở chủng có bộ ba mã hóa khởi đầu ATG đã thay thế trong gen *tkt*

Các tế bào trong pha hàm số mũ được thu gom bằng cách ly tâm (5000 vòng/phút, 15 phút) và được rửa ba lần bằng dung dịch đệm Tris.HCl 0,1% (độ pH = 7,5), và sau đó được tạo hỗn dịch trong cùng một dung dịch đệm để độ đục ở 610 nm bằng 160. Các tế bào được phá vỡ trong 6 phút bằng cách sử dụng máy phá tế bào bằng vi hạt sau khi các hạt thủy tinh được bổ sung ở 1,25g/1,5mL hỗn dịch. Dịch nổi được thu gom bằng cách ly tâm (15000 vòng/phút, 20 phút), và được định lượng hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford và được sử dụng làm dung dịch protein thụ để xác định hoạt tính enzym của transketolaza (Tkt). Để định lượng hoạt tính enzym của Tkt, dung dịch protein thụ được bổ sung vào dung dịch phản ứng chứa 0,1M Tris.HCl (độ pH = 7,5), 10mM D-R5P, 2mM D-Xu5P, 10 μ M ThDP, 1,2mM MgCl₂, 100 μ M NADH, 1 đơn vị triosephosphat isomeraza, 1 đơn vị glyxerol-3-phosphat dehydroaza trên 1mL để bắt đầu phản ứng. Hỗn hợp được cho phản ứng ở 30°C trong 20~30 phút, và độ hấp phụ ở 340 nm được đo. Đơn vị (U) của hoạt tính enzym Tkt như được xác định bằng lượng (mg) enzym xúc tác quá trình tạo ra 1 μ mol glyxeraldehyt 3-phosphat trong 1 phút, và hoạt tính đặc hiệu như được xác định dưới dạng đơn vị/mg (Biochem.J. (2004)382, 759-767).

Nhận thấy rằng chủng KCCM11016P-tkt có hoạt tính Tkt cao hơn gấp 3,5 lần so với hoạt tính của chủng KCCM11016P gốc (bảng 5).

Bảng 5

Hoạt tính enzym Tkt

Chủng	Hoạt tính enzym (Lần)
	Tkt
KCCM11016P	1,00
KCCM11016P-tkt	3,5

Ví dụ 6: Xác định hoạt tính enzym pyruvat carboxylaza ở chủng có bộ ba mã hóa khởi đầu ATG đã thay thế ở gen *pyc*

Các tế bào trong pha hàm số mũ được thu gom bằng cách ly tâm (5000 vòng/phút, 15 phút) và được rửa hai lần bằng dung dịch đệm 50 mM Tris.HCl (độ pH = 6,3) chứa

50mM natri clorua (NaCl), và sau đó được tạo hỗn dịch trong dung dịch đệm HEPES 100mM (độ pH = 7,5) chứa 20% glyxerol. CTAB được bổ sung vào hỗn dịch để đạt được nồng độ 0,3%, và để trên băng trong 1 phút. Các tế bào được thu gom bằng cách ly tâm (5000 vòng/phút 10 phút) và sau đó được tạo hỗn dịch trong dung dịch đệm Tris.HCl 100mM (độ pH = 7,3). Hàm lượng protein được định lượng bằng phương pháp Bradford và sử dụng làm dung dịch protein thụ để xác định hoạt tính enzym pyruvat carboxylaza (Pyc). Để định lượng hoạt tính enzym Pyc, dung dịch protein thụ được bổ sung vào dung dịch phản ứng chứa 25mM NaHCO₃, 5mM MgCl₂, 3mM pyruvat, và 4mM ATP để bắt đầu phản ứng. Hỗn hợp này được cho phản ứng ở 30°C trong 1,5 phút, và 80µL dung dịch ngừng (30% ợ-axit phosphoric) được bổ sung để kết thúc phản ứng. Dịch nổi được thu gom bằng cách ly tâm (12.000 vòng/phút, 15 phút, 4°C). 50µL dịch nổi, 150 mM Tris.HCl (pH 7,8), 150 µM NADH, và 2,5 U lactat dehydroaza được bổ sung trên 1mL và độ hấp phụ ở 340nm được xác định ở 37°C. Đơn vị (U) của hoạt tính enzym Pyc được xác định bằng nmol lactat được tạo ra bởi 1 mg protein trong 1 phút.

Nhận thấy rằng chủng KCCM11016P-pyc có hoạt tính Pyc cao gấp 1,89 lần so với chủng KCCM11016P gốc (bảng 6).

Bảng 6

Hoạt tính enzym Pyc

Chủng	Hoạt tính enzym (Lần)
	Pyc
KCCM11016P	1,00
KCCM11016P-pyc	1,89

Ví dụ 7: Phát triển chủng có nguồn gốc KCCM11016P có bộ ba mã hóa khởi đầu ATG đã thay thế ở hai hoặc nhiều gen của các gen *lysC*, *tkt*, và *pyc*

Vector tái tổ hợp pDZ-lysC(ATG) pDZ-tkt(ATG) pDZ-pyc(ATG) được điều chế ở ví dụ 1, 2, và 3 được sử dụng, và quy trình điều chế là như sau.

Vector pDZ-tkt(ATG) được biến nạp vào KCCM11016P-lysC của ví dụ 1, trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu GTG của *lysC* được thay thế bằng ATG, và trong quá trình trao đổi chéo thứ hai, các bộ ba mã hóa khởi đầu của *lysC* và *tkt* trên thể nhiễm sắc được thay thế bằng ATG để thu được KCCM11016P-lysC-tkt. Việc thể nucleotit của bộ ba mã hóa khởi đầu của gen cuối cùng được xác nhận bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn môi có SEQ ID NO.5 và 8 và sau đó bằng cách phân tích trình tự nucleotit của vị trí đích.

Theo cùng cách như được nêu trong ví dụ 1, vector pDZ-pyc(ATG) được biến nạp vào KCCM11016P-lysC của ví dụ 1, trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu GTG của *lysC* được thay thế bằng ATG, và trong quá trình trao đổi chéo thứ hai, các bộ ba mã hóa khởi đầu của *lysC* và *pyc* trên thể nhiễm sắc được thay thế bằng ATG để thu được KCCM11016P lysC-pyc. Việc thế nucleotit của bộ ba mã hóa khởi đầu của gen cuối cùng được xác nhận bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có SEQ ID NO.9 và 12 và sau đó bằng cách phân tích trình tự nucleotit của vị trí đích.

Vector pDZ-*tk*t(ATG) được biến nạp vào KCCM11016P-lysC-pyc của ví dụ này, trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu GTG của *lysC* và *pyc* được thay thế bằng ATG, và trong quá trình trao đổi chéo thứ hai, các bộ ba mã hóa khởi đầu của *lysC*, *pyc* và *tk*t trên thể nhiễm sắc được thay thế bằng ATG để thu được KCCM11016P-lysC-pyc-*tk*t. Việc thế nucleotit của bộ ba mã hóa khởi đầu của gen cuối cùng được xác nhận bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.8 và sau đó bằng cách phân tích trình tự nucleotit của vị trí đích.

Việc kết hợp các gen nêu trên chỉ nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của của việc kết hợp các gen này không dự định nhằm giới hạn ở các cách kết hợp này.

Ví dụ 8: Sản xuất lysin ở chủng có bộ ba mã hóa khởi đầu ATG đã thay thế

KCCM11016P-lysC, KCCM11016P-*tk*t, KCCM11016P-pyc, KCCM11016P-lysC-*tk*t, KCCM11016P-lysC-pyc, KCCM11016P-lysC-pyc-*tk*t cuối cùng được điều chế trong ví dụ 1, 2, 3, và 7 được nuôi cấy để sản sinh L-lysine bằng phương pháp dưới đây.

Chủng KCCM11016P và KCCM11016P-lysC, KCCM11016P-*tk*t, KCCM11016P-pyc, KCCM11016P-lysC-*tk*t, KCCM11016P-lysC-pyc, KCCM11016P-lysC-pyc-*tk*t gốc được nhiễm vào các bình cầu có màng ngăn ở góc 250mL tương ứng chứa 25mL môi trường hạt sẽ được mô tả dưới đây, và các chủng thu được được nuôi cấy ở 30°C kèm theo lắc ở 200 vòng/phút trong 20 giờ. 1mL môi trường lỏng nuôi cấy hạt thu được được gây nhiễm vào bình cầu có màng ngăn ở góc 250mL chứa 24mL môi trường sản sinh sẽ được mô tả dưới đây, và được nuôi cấy ở 30°C đồng thời lắc (200 vòng/phút) trong 120 giờ.

Sau khi hoàn thành việc nuôi cấy, tiến hành định lượng L-lysin đó tạo ra bằng HPLC. Các kết quả xác định L-lysin trong môi trường nuôi cấy lỏng chứa KCCM11016P và KCCM11016P-lysC, KCCM11016P-tkt, KCCM11016P-pyc, KCCM11016P-lysC-tkt, KCCM11016P-lysC-pyc, KCCM11016P-lysC-pyc-tkt được thể hiện trong bảng sau đây 7.

Bảng 7

Chủng	Lysin (g/L)		
	Mề 1	Mề 2	Mề 3
KCCM11016P	45,2	44,7	45,6
KCCM11016P-lysC	47,5	46,2	47,9
KCCM11016P-tkt	47,4	48,5	47,0
KCCM11016P-pyc	47,9	46,3	47,8
KCCM11016P-lysC-tkt	49,7	49,3	49,2
KCCM11016P-lysC-pyc	50,1	48,9	49,6
KCCM11016P-lysC-pyc-tkt	50,7	50,2	51,1

Môi trường hạt (độ pH = 7,0)

20g đường thô, 10g pepton, 5g dịch chiết nấm men, 1,5g ure, 4 g KH_2PO_4 , 8g K_2HPO_4 , 0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg biotin, 1000 μg thiamin-HCl, 2000 μg canxi-pantotenat, 2000 μg nicotin amit (trong 1L nước cất)

Môi trường sản sinh (độ pH = 7,0)

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

Như được thể hiện trong bảng 7, nhận thấy rằng *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P-lysC, KCCM11016P-tkt, KCCM11016P-pyc, KCCM11016P-lysC-tkt, và KCCM11016P-lysC-pyc có bộ ba mã hóa khởi đầu ATG đã thay thế có khả năng sản sinh L-lysin tăng 4~9%, so với chủng gốc KCCM11016P. Cụ thể, nhận thấy thấy KCCM11016P-lysC-pyc-tkt đó đưa toàn bộ ba gen vào có khả năng sản sinh L-lysin tăng cao 12%, so với chủng gốc KCCM11016P.

Ví dụ 9: Phát triển chủng có nguồn gốc KFCC10750 có bộ ba mã hóa khởi đầu ATG đã thay thế ở các gen *lysC*, *tkt*, và *pyc* và so sánh khả năng sản sinh lysin

Để kiểm tra xem liệu việc thế các bộ ba mã hóa khởi đầu bằng ATG trong các gen *lysC*, *pyc*, và *tkt* cũng có ảnh hưởng đến khả năng sản sinh lysin ở các chủng sản sinh

lysine khác thuộc *Corynebacterium glutamicum* hay không, các chủng sản sinh L-lysine *Corynebacterium glutamicum* KFCC10750 (Patent Hàn quốc số 10-0073610) đó được đưa toàn bộ ba gen vào, có hiệu quả làm tăng khả năng sản sinh lysine mỹ mãn nhất ở ví dụ 8 để điều chế chủng tái tổ hợp, được gọi là KFCC10750-lysC-pyc-tkt. Chủng đó nuôi cấy theo cùng cách như được nêu trong ví dụ 8, và nồng độ L-lysine được phân tích (bảng 8).

Bảng 8

Chủng	Lysine (g/L)		
	Mé 1	Mé 2	Mé 3
KFCC10750	38,3	38	38,5
KFCC10750-lysC-pyc-tkt	44,1	43,8	44,5

Như được thể hiện trong bảng 8, *Corynebacterium glutamicum* KFCC10750-lysC-pyc-tkt đó được đưa toàn bộ ba gen vào có khả năng sản sinh lysine tăng 15% so với chủng gốc KFCC10750.

Ví dụ 10: Phát triển chủng có nguồn gốc KCCM10770P có bộ ba mã hóa khởi đầu ATG đã thay thế ở các gen *lysC*, *tkt*, *pyc* s và so sánh khả năng sản sinh lysine

chủng sản sinh L-lysine *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P khác (Patent Hàn quốc số 10-0924065) được đưa toàn bộ ba gen vào có hiệu quả tăng cường khả năng sản sinh lysine mỹ mãn nhất ở ví dụ 8 để điều chế chủng tái tổ hợp, được gọi là KCCM10770P-lysC-pyc-tkt. Chủng được nuôi cấy theo cùng cách như được nêu trong ví dụ 8, và nồng độ L-lysine được phân tích (bảng 9).

Bảng 9

Chủng	Lysine (g/L)		
	Mé 1	Mé 2	Mé 3
KCCM10770P	47,8	47,2	47,5
KCCM10770P-lysC-pyc-tkt	52,8	52,8	52,4

Như được thể hiện trong bảng 9, *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P-lysC-pyc-tkt đó được đưa toàn bộ ba gen vào, có tác dụng làm tăng khả năng sản sinh lysine 11%, được so sánh với chủng KCCM10770P gốc.

Ví dụ 11: Phát triển CJ3P chủng có nguồn gốc có bộ ba mã hóa khởi đầu ATG đã thay thế ở các gen *lysC*, *tkt*, *pyc* và so sánh khả năng sản sinh lysine

Chủng sản sinh L-lysin *Corynebacterium glutamicum* CJ3P (Binder et al. Genome Biology 2012, 13:R40) khác nữa đó được đưa toàn bộ ba gen vào, có tác dụng làm tăng khả năng sản sinh lysin mỹ mãn nhất ở ví dụ 8 để điều chế chủng tái tổ hợp, được gọi là CJ3P-lysC-pyc-tkt. Chủng này được nuôi cấy theo cùng cách như nêu trong ví dụ 8, và nồng độ L-lysin được phân tích (bảng 10).

Bảng 10

Chủng	Lysin (g/L)		
	Mề 1	Mề 2	Mề 3
CJ3P	8,3	8	8,4
CJ3P-lysC-pyc-tkt	9,7	9,6	10,0

Như được thể hiện trong bảng 10, *Corynebacterium glutamicum* CJ3P-lysC-pyc-tkt đó đưa toàn bộ ba gen vào có khả năng sản sinh lysin tăng 18% so với chủng CJ3P gốc.

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật *Corynebacterium* sp. có khả năng sản sinh L-lysin cải thiện, trong đó bộ ba mã hóa khởi đầu của một hoặc nhiều gen mã hóa aspartat kinaza, transketolaza, hoặc pyruvat carboxylaza được thay thế để tăng cường hoạt tính của các enzym tương ứng, so với hoạt tính nội sinh của chúng trong vi sinh vật nguyên thể.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất L-lysin, bao gồm các bước: thay thế bộ ba mã hóa khởi đầu của polynucleotit mã hóa aspartat kinaza (LysC) trong vi sinh vật bằng ATG; nuôi cấy vi sinh vật này; và thu hồi L-lysin từ sinh vật đã nuôi cấy hoặc môi trường nuôi cấy lỏng, và trong đó vi sinh vật này là *Corynebacterium* sp.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật *Corynebacterium* sp. là *Corynebacterium glutamicum*.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trước khi thay thế bằng ATG, bộ ba mã hóa khởi đầu của polynucleotit mã hóa aspartat kinaza (LysC) là GTG.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polynucleotit mã hóa aspartat kinaza (LysC) có bộ ba mã hóa khởi đầu được thay thế bằng ATG được thể hiện bằng trình tự nucleotit SEQ ID NO.16.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	CJ CHEILJEDANG CORPORATION	
<120>	PHUONG PHAP SAN XUAT L-LYSIN	
<130>	OPA12190-VN-D1	
<150>	KR10-2011-0139527	
<151>	2011-12-21	
<160>	18	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi lysC/ATG/FX	
<400>	1	
	ccggggatcc tctagactta gggagccatc ttttgg	36
<210>	2	
<211>	18	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi lysC/ATG/R	
<400>	2	
	ccagggccat ctttgtgc	18
<210>	3	
<211>	18	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi lysC/ATG/F	
<400>	3	
	gcacaaagat ggccctgg	18
<210>	4	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi lysC/ATG/RX	
<400>	4	
	gcaggtcgac tctagaagtg acatcaacaa tgcgtg	36
<210>	5	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi tkt/ATG/FX	
<400>	5	
	ccggggatcc tctagagaaa tagatgggtg tagacg	36
<210>	6	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi tkt/ATG/R4	
<400>	6	
	gtgacagcgt catggtggtc aat	23
<210>	7	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi tkt/ATG/F4	
<400>	7	
	attgaccacc atgacgctgt cac	23
<210>	8	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi tkt/ATG/RX	
<400>	8	
	gcaggtcgac tctagacgca gagccttcag gtcac	36
<210>	9	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	


```

<220>
<223>   Đoạn mỗi pyc/ATG/FX
<400>   9
ccgggggatcc tctagatttt ggggaaaagt gcaaag          36
<210>   10
<211>   19
<212>   ADN
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Đoạn mỗi pyc/ATG/R
<400>   10
gagtcgacat tagagtaat          19
<210>   11
<211>   19
<212>   ADN
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Đoạn mỗi pyc/ATG/F
<400>   11
attactctaa tgctgactc          19
<210>   12
<211>   36
<212>   ADN
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Đoạn mỗi pyc/ATG/RX
<400>   12
gcaggtcgac tctagagggc attttcagac aggaag          36
<210>   13
<211>   1266
<212>   ADN
<213>   Corynebacterium glutamicum lysC
<400>   13
gtggcccttg tcgtacagaa atatggcggt tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga          60
aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc          120
tcgcgaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt          180
ccgccagctc gtgaaatgga tatgtccttg actgctgggt agcgtatttc taacgctctc          240
gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct          300
ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg          360
gtgctgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtttaat          420
aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtggtt ctgacaccac tgcagttgcg          480
ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgat          540
accgctgacc cgcgcctcgt tcctaagtca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa          600
atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttggctg tgcgcagtgt tgaatacgt          660
cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg          720
attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttacggg tgtcgcaacc          780
gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg          840
aagggttttc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatgggtct gcagaacgtc          900
tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc          960
cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaaa tgtgctttac          1020
gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtggt          1080
accgcagagt tcattggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc          1140
tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca          1200
ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga          1260
cgctaa          1266
<210>   14
<211>   2094
<212>   ADN
<213>   Corynebacterium glutamicum tkt
<400>   14
ttgacgtgtg cacctgaact tcaggcgctc actgtacgca attaccctc tgattggtcc          60
gatgtggaca ccaaggctgt agacactggt cgtgtcctcg ctgcagacgc tgtagaaaac          120
tgtggctccg gccaccagg caccgcaatg agcctggctc ccttgcata cacctgttac          180
cagcgggtta tgaacgtaga tccacaggac accaactggg caggccgtga ccgcttcgtt          240
ctttctgtg gccactctc tttgaccag tacatccagc tttacttggg tggattcggc          300
cttgagatgg atgacctgaa ggctctgcgc acctgggatt ccttgacccc aggcaccct          360
gagtaccgcc acaccaaggg cgttgagatc accactggcc ctcttggcca gggctctgca          420
tctgcagttg gtagggccat ggctgctcgt cgtgagcgtg gcctattcga cccaaccgct          480
gctgaggcgg aatccccatt cgaccaccac atctacgtca ttgcttctga tggtagcctg          540
caggaagggt tcacctctga ggcacctcc atcgtggca cccagcagct gggcaacctc          600
atcgtgttct gggatgacaa ccgcattccc atcgaagaca aactgagat cgctttcaac          660
gaggacgttg ttgctcgtta caaggcttac ggctggcaga ccattgaggt tgaaggctggc          720
gaggacgttg cagcaatcga agctgcagtg gctgaggcta agaaggacac caagcgacct          780
accttcaccc cgtttcgcac catcatcggc ttcccagctc caactatgat gaacaccggt          840
gctgtgcacg gtgctgctct tggcgagctg gaggttgacg caaccaagac tgagcttgga          900
ttcgatcctg aggtcactt cgcgatcgac gatgaggtta tcgctcacac ccgctccctc          960
gcagagcgcg ctgcacagaa gaaggctgca tggcaggtca agttcgatga gtgggcagct          1020
gccaaccctg agaacaaggc tctgttcgat cgcctgaact cccgtgagct tccagcgggc          1080
tacgtgagcg agctcccaac atgggatgca gatgagaagg gcgtcgcaac tcgtaaggct          1140

```

```

tccgaggctg cacttcaggc actgggcaag acccttcctg agctgtgggg cggttccgct 1200
gacctcgacg gttccaacaa caccgtgatc aagggtcccc ctctcttcgg ccctgagtc 1260
atctccaccg agacctgtgtc tgctgagcct tacggccgta acctgcactt cggtatccgt 1320
gagcacgcta tgggatccat cctcaacggc atttccctcc acgggtggcac ccgcccatac 1380
ggcggaacct tcctcatctt ctccgactac atgcgtcctg cagttcgtct tgcagctctc 1440
atggagaccg acgcttacta cgtctggacc cagactcca tcggtctggg cgaagatggc 1500
ccaaccaccg agcctgttga aaccttggct gcactgcgcg ccatcccagg tctgtccgtc 1560
ctgcgtcctg cagatgcgaa cgagaccgcc caggcttggg ctgcagcact tgagtacaag 1620
gaaggcccta aggttcttgc actgaccgcc cagaacgttc ctgttctgga aggcaccaag 1680
gagaaggctg ctgaaggcgt tcgcccgggt ggctacgtcc tgggtgaggg ttccaaggaa 1740
acccagatg tgatcctcat gggctccggc tcgaggttcc agcttgcaat taacgctgcg 1800
aaggctctgg aagctgaggg cgttgagct cgcgttgttt ccgttccctt catggattgg 1860
ttccaggagc aggacgcaga gtacatcgag tccgttctgc ctgcagctgt gaccgctcgt 1920
gtgtctgttg aagctggcat cgcaatgcct tggtagcgct tcttgggcac ccagggccgt 1980
gctgtctctc ttgagcactt cgggtcctct cgggattacc agacctgtt tgagaagttc 2040
ggcatcacca ccgatgcagt cgtggcagcg gccaaaggact ccattaacgg ttaa 2094
<210> 15
<211> 3423
<212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum pyc
<400> 15
gtgtcgactc acacatcttc aacgcttcca gcattcaaaa agatcttggg agcaaaccgc 60
ggcgaaatcg cggtcogtgc tttcogtgc gactcgaaa ccggtgcagc caccgtagct 120
atttaccccc gtgaagatcg gggatcattc caccgctctt ttgcttctga agctgtccgc 180
attggtaccg aaggctcacc agtcaaggcg tacttgaca tcgatgaaat tatcggtgca 240
gctaaaaaag ttaaagcaga tgccatttac ccgggatacg gcttctctgtc tgaaaatgcc 300
cagcttgccc gcgagtgtgc ggaaaacggc attactttta ttggcccaac ccagagggtt 360
cttgatctca ccggtgataa gtctcgcgcg gtaaccgccc cgaagaaggc tggctcgcca 420
gttttgccgg aatccacccc gagcaaaaac atcgatgaga tcgttaaaaag cgtgaaggc 480
cagacttacc ccatctttgt gaaggcagtt gccgggtggtg cgggacgcgg tatgcgtttt 540
gttgcttcac ctgatgagct tcgcaaatga gcaacagaag catctcgtga agctgaagcg 600
gctttcggcg atggcgcggt atatgtcgaa cgtgctgtga ttaaccctca gcatattgaa 660
gtgcagatcc ttggcgatca cactggagaa gttgtacacc tttatgaacg tgactgctca 720
ctgcagcgctc gtcacaaaaa agttgtcgaa attgcgccag cacagcattt ggatccagaa 780
ctgcgtgatc gcatltgtgc ggtatgcaga aagtctctgc gctccattgg ttaccagggc 840
gcgggaaccg ttgaattctt ggtcgatgaa aagggaacc cagctctcat cgaaatgaac 900
ccacgtatcc aggttgagca caccgtgact gaagaagtca ccgaggtgga cctggtgaag 960
gcgcagatgc gcttggtctgc ttggtgcaacc ttgaaggaaat tgggtctgac ccaagataag 1020
atcaagaccc accgtgcagc actgcagtgc cgcataacca cgggaagatcc aaacaacggc 1080
ttccgccagc ataccggaa cttaccggcg tacgcctcac caggcgagc tggcggtcgt 1140
cttgacggtg cagctcagct cgggtggcga atcaccgcac actttgactc catgctggtg 1200
aaaatgacct gccgtggttc cgactttgaa actgctgttg ctcggtgaca gcgcgcgttg 1260
gctgagttca ccgtgtctgg ttgtgcaacc aacattggtt tcttgctgac gttgctgcgg 1320
gaagaggact tcacttccaa gcgcacgcc accgattcca ttgcccagca ccgcacctc 1380
cttcaggctc cactgctga tgatgagcag ggacgcaccc tggattactt gccagatgtc 1440
accgtgaaca agcctcatgg ttgtcgctca aaggatgttg cagctcctat cgataagctg 1500
cctaacatca aggatctgcc actgccacgc ggttcccggt accgcctgaa gcagcttggc 1560
ccagcccgct ttgctcgtag tctccgtgag caggacgcac ttgacgttac tgataccacc 1620
ttccgcgatg cacaccagtc tttgcttgcg acccgagtc gctcattcgc actgaagcct 1680
gcggcagagg ccgtcgcaaa gctgactcct gagcttttgt ccgtggaggc ctggggcggc 1740
gcgacctacg atgtggcgat gcgtttcttc tttaggagtc cgtgggacag gctcgacgag 1800
ctgcgcgagg cgtatcgcaa tgaacacatt cagatgctgc ttccgcggcg caacaccgtg 1860
ggatacaccc cgtaccagaa ctccgtctgc cgcgcgtttg ttaaggaaagc tgccagctcc 1920
ggcgtggaca tcttcgcgat cttcgacgcg cttaacgcag tctcccagat gcgtccagca 1980
atcgacgcag tccttgagac caacaccgcg gtacccgagg tggctatggc ttattctggt 2040
gatctctctg atccaaatga aaagctctac accctggatt actacctaaa gatggcagag 2100
gagatcgtea agtctggcgc tcacatcttg gccattaagg atatggctgg tctgcttcgc 2160
ccagctcgcg taaccaagct ggtcaccgca ctgcgccgtg aattcgatct gccagtgcac 2220
gtgcacaccc acgacactgc ggggtggccag ctggcaacct accttgctgc agctcaagct 2280
ggtgcagatg ctggtgacgg tgcttcgcga ccactgtctg gcaaccctc ccagccatcc 2340
ctgtctgcca ttgttgctgc attcgcgcac acccgctcgc ataccggttt gagectcgag 2400
gctgtttctg acctcgagcc gtactgggaa gcagtgcgcg gactgtacct gccatttgag 2460
tctggaaccc caggeccaac cggctcgcgtc taccgccacg aaatcccagg cggacagttg 2520
tccaacctgc gtgcacagg caccgcactg ggcttgcgg atcgtttcga actcatcgaa 2580
gacaactacg cagccgttaa tgagatgctg ggacgcccac ccaaggtcac cccatcctcc 2640
aagggtgttg gcgacctcgc actccacctc gttggtgcgg gtgtggatcc agcagacttt 2700
gctgccgatc caaaaaagta cgacatccca gactctgtca tcgcgttccct gcgcggcgag 2760
cttggttaac ctccaggttg ctggccagag ccactgcgca ccgcgcact ggaaggccgc 2820
tccgaaggca aggcacctct gacggaagtt cctgaggaag agcaggcgca cctcgacgct 2880
gatgattcca aggaacgtcg caatagcctc aaccgcctgc tgttcccgaa gccaaaccgaa 2940
gagttcctcg agcaccgtcg ccgcttcggc aacacctctg cgttgatga tcgtgaattc 3000
ttctacggcc tggtcgaagg cgcgagact ttgatccgcc tgccagatgt gcgcacccca 3060
ctgcttgttc gcctggatgc gatctctgag ccagacgata aggttatgct caatgttgtg 3120
gccaacgtca accggccagat ccgcccgaat cgtgtgcgtg accgctccgt tgagtctgtc 3180
accgcaaccg cagaaaaagg agattcctcc aacaagggcc atgttgctgc accattcgct 3240
ggtgttgta cctgtactgt tgctgaaggt gatgaggtca aggttgaga tgcagtcgca 3300
atcatcgagg ctatgaagat ggaagcaaca atcactgctt ctgttgacgg caaaatcgat 3360
cgcgttgtgg ttctgctgc aacgaagggt gaaggtggcg acttgatcgt cgtcgtttcc 3420
taa 3423

```

<210> 16
 <211> 1266
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> lysC với bộ ba mã hóa khởi đầu được thay thế
 <400> 16
 atggcccttg tcttacagaa atatggcggt tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60
 aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120
 tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180
 ccgccagctc gtgaaatgga tatgtcctg actgctgggt agcgtatttc taacgctctc 240
 gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300
 ggtgtgtctc ccaccgagcg ccaccgaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcgt 360
 gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtttaat 420
 aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtgttggtt ctgacaccac tgcagttgctg 480
 ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat 540
 accgtgacc cgcgcacatcgt tcctaatacga cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600
 atgctggaac ttgtgtcgtt tggtccaag attttgggtg tgcgcagtgt tgaatacgtc 660
 cgtgcattca atgtgccact tcgctacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720
 attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgcgcaacc 780
 gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgctg 840
 aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900
 tcttctgtag aagaccggcact caccgacatc accttcaact gccctcgctc cgacggccgc 960
 cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaaa tgtgctttac 1020
 gacgaccagg tcggcaaatg ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccagggtgtt 1080
 accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140
 tctgagattc aggtttccgt gctgatccgt gaagatgac tggtatgtgc tgcacgtgca 1200
 ttgcatgagc agttccagct gggcgggcga gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260
 cgctaa 1266
 <210> 17
 <211> 2094
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> tkt với bộ ba mã hóa khởi đầu được thay thế
 <400> 17
 atgacgtgt cactcgaact tcaggcgctc actgtacgca attaccctc tgattggctc 60
 gatgtggaca ccaaggctgt agacactgtt cgtgtcctcg ctgcagacgc tgtagaaaac 120
 tgtggctccg gccaccagg caccgcaatg agcctggctc cccttgcata cacttgtagc 180
 cagcgggtta tgaacgtaga tccacaggac accaactggg caggccgtga ccgcttcgtt 240
 ctttcttctg gccactcctc tttgacccag tacatccagc tttacttggg tggattcggc 300
 cttgagatgg atgacctgaa ggctctgcgc acctgggatt ccttgacccc aggacaccct 360
 gagtaccgcc acaccaaggg cgttgagatc accactggcc ctcttgcca gggctctgca 420
 tctgcagttg gtatggccat ggctgctcgt cgtgagcgtg gcctattcga cccaaccgct 480
 gctgaggggc aatccccatt cgaccaccac atctacgtca ttgcttctga tggtagcctg 540
 caggaagggt tcacctctga ggcacacctc atcgctggca ccagcagct gggcaacctc 600
 atcgtgttct gggatgacaa ccgcactctc atcgaagaca acactgagat cgttttcaac 660
 gaggacgttg ttgctcgtta caaggcttac ggctggcaga ccattgaggt tgaggctggc 720
 gaggacgttg cagcaatcga agctgcagtg gctgaggcta agaaggacac caagcgacct 780
 accttcatcc gcgttcgcac catcatcgcc ttccagctc caactatgat gaacaccggt 840
 gctgtgcacg gtgctgctct tggcgagcgt gaggttgca caaccaagac tgagcttgga 900
 ttcatcctg aggtcactt cgcgatcgac gatgaggtta tcgctcacac ccgctccctc 960
 gcagagcgcg ctgcacagaa gaaggctgca tggcaggta agttcgatga gtgggcagct 1020
 gccaaccctg agaacaaggc tctgttcgat cgctgaact ccctgagct tccagcgggc 1080
 tacgtgacg agctcccaac atgggatgca gatgagaagg gcgtcgcaac tcgtaaggct 1140
 tccgagctg cacttcaggc actgggcaag acccttctg agctgtgggg cggttccgct 1200
 gacctcgag gttccaacaa caccgtgatc aagggtccc cttccttcgg cctgagctc 1260
 atctccacg agacctggct tgctgagcct tacggcgtga acctgcact cggtatccgt 1320
 gagcacgcta tgggatccat cctcaacggc atttccctcc acggtggcact ccgcccatac 1380
 ggcggaacct tctcatctt ctccgactac atcgctcctg cagttcgtct tgcagctctc 1440
 atggagaccg acgcttacta cgtctggacc cagactcca tcggtctggg cgaagatggc 1500
 ccaaccacc agcctgttga aaccttggct gcactgcgcg ccacccagg tctgtccgtc 1560
 ctgcgtcctg cagatgcgaa cgagaccgcc caggcttggg ctgcagcact tgagtacaag 1620
 gaaggcccta aggttcttgc actgaccgcg cagaacgttc ctgttctgga aggcaccaag 1680
 gagaaggctg ctgaaggcgt tcgccgggt ggctacgtcc tgggtgaggg ttccaaggaa 1740
 accccagatg tgatcctcat gggctccggc tccgaggttc agcttgacgt taacgctgctg 1800
 aaggctctg aagctgaggg cgttgacagt cgcgttgtt ccgttccttg catggattgg 1860
 ttccaggagc aggcacgaga gtacatcgag tccgttctgc ctgcagctgt gaccgctcgt 1920
 gtgtctgttg aagctggcat cgcaatgcct tggtagcgt tcttgggcac ccagggccgt 1980
 gctgtctccc ttgagcaact cgggtcttct gcgattacc agaccctgt tgagaagttc 2040
 ggcatcacca ccgatgcagt cgtggcagcg gccaaaggact ccattaacgg ttaa 2094
 <210> 18
 <211> 3423
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> pyc với bộ ba mã hóa khởi đầu được thay thế
 <400> 18
 atgtcgactc acacatcttc aacgcttcca gcattcaaaa agatcttgggt agcaaaccgc 60

ggcgaaatcg	cggtccgtgc	tttccgtgca	gcactcgaaa	ccggtgcagc	cacggtagct	120
atttaccccc	gtgaagatcg	gggatcattc	caccgctctt	ttgcttctga	agctgtccgc	180
atttggtaccg	aaggctcacc	agtcaaggcg	tacctggaca	tcgatgaaat	tatcggtgca	240
gctaaaaaag	ttaaagcaga	tgccatttac	ccgggatacg	gcttccctgtc	tgaaaatgcc	300
cagcttgccc	gcgagtggtc	ggaaaacggc	attactttta	ttggcccaac	cccagagggt	360
cttgatctca	ccggtgataa	gtctcgcgcg	gtaaccgccc	cgaagaaggc	tggtctgcca	420
gttttggcgg	aatccacccc	gagcaaaaaa	atcgatgaga	tcgttaaaag	cgctgaaggc	480
cagacttacc	ccatctttgt	gaaggcagtt	gccggtggtg	gcggacgcgg	tatgcgtttt	540
gttgcttcac	ctgatgagct	tcgcaaatta	gcaacagaag	catctcgtga	agctgaagcg	600
gctttcggcg	atggcgcggt	atatgtcgaa	cgtgctgtga	ttaaccctca	gcataattgaa	660
gtgcagatcc	ttggcgatca	cactggagaa	gttgtaaccc	tttatgaacg	tgactgctca	720
ctgcagcgtc	gtcaccaaaa	agttgtcgaa	attgcgccag	cacagcattt	ggatccagaa	780
ctgcgtgatc	gcatttggtc	ggatgcagta	aagttctgcc	gctccattgg	ttaccagggc	840
gcgggaaccg	tggaattctt	ggtcgatgaa	aagggcgaacc	acgtcttcat	cgaatgaac	900
ccacgtatcc	aggctgagtc	caccgtgact	gaagaagtca	ccgaggtgga	cctggtgaag	960
gcgcagatgc	gcttggtgtc	tggtgcaacc	ttgaaggaat	tggtgtctgac	ccaagataag	1020
atcaagaccc	acggtgcagc	actgcagtcg	cgcatcacca	cgaagatcc	aaacaacggc	1080
ttccgcccg	ataccggaac	tatcacccgc	taccgctcac	caggcggagc	tggtcgttct	1140
cttcaggttc	cacctgctga	cggtggcgaa	atcacccgac	actttgactc	catgctggtg	1200
aaaatgacct	gccgtggttc	cgactttgaa	actgctgttg	ctcgtgcaca	gcgcgcgttg	1260
gctgagtcca	ccgtgtctgg	tggtgcaacc	aacattggtt	tcttgctgtc	gttgctgcgg	1320
gaagaggact	tcacttccaa	gcgcacgtcc	accggattca	ttgcgatcca	cccgcacctc	1380
cttcaggctc	cactcagctc	tgatgagcag	ggacgcaccc	tggtattactt	ggcagatgtc	1440
accgtgaaca	agcctcatgg	tgtgcgtcca	aaggatgttg	cagctcctat	cgataagctg	1500
cctaacatca	aggatctgcc	actgccacgc	ggttcccgtg	accgcctgaa	gcagcttgcc	1560
ccagcccgct	ttgctcgtga	tctccgtgag	caggacgcac	tggtcagttac	tgataccacc	1620
ttccgcgatg	cacaccagtc	tttgccttgc	accgcagtc	gctcattcgc	actgaagcct	1680
gcggcagagg	ccgtcgcaaa	gctgactcct	gagcttttgt	ccgtggaggc	ctggggcgcc	1740
gcgacctacg	atgtggcgat	gcgtttcctc	tttgaggatc	cgtgggacag	gctcgacgag	1800
ctgcgcgagg	cgatgcgcaa	tgtaaacatt	cagatgctgc	ttcgcggccg	caacaccgtg	1860
ggatacaccc	cgtaccaga	ctccgtctgc	cgcgcgtttg	ttaaggaaag	tgccagctcc	1920
ggcgtggaca	tcttccgat	cttcgacgcg	cttaacgacg	tctcccagat	gcgtccagca	1980
atcgacgcag	tcttgagac	caacaccgcg	gtagccgagg	tggtctatgg	ttattctggt	2040
gatctctctg	atccaaatga	aaagctctac	accctggatt	actacctaaa	gatggcagag	2100
gagatcgta	agtctggcgc	tcacatcttg	gccattaaag	atatggctgg	tctgcttcgc	2160
ccagctgcgg	taaccaagct	gtgtaccgca	ctgcgcgtg	aattcgatct	gccagtgcac	2220
gtgcacaccc	acgacactgc	gggtggccag	ctggcaacct	actttgctgc	agctcaagct	2280
ggtgcagatg	ctgttgacgg	tgcttccgca	ccactgtctg	gcaccacctc	ccagccatcc	2340
ctgtctgcca	ttgttgctgc	attcgcgcac	accgctcgcg	ataccggttt	gagcctcgag	2400
gctgtttctg	acctcgagcc	gtactgggaa	gcagtgcgcg	gactgtacct	gccatttgag	2460
tctggaaccc	caggcccaac	cggtcgcgtc	taccgccacg	aaatcccagg	cggacagttg	2520
tccaacctgc	gtgcacaggc	caccgcactg	ggccttgccg	atcgtttcga	actcatcgaa	2580
gacaactacg	cagccgttaa	tgagatgctg	ggacgcccaa	ccaagggtcac	cccatcctcc	2640
aaggttgttg	gcgacctcgc	actccacctc	gttggtgcgg	gtgtggatcc	agcagacttt	2700
gctgccgatc	cacaaaagta	cgacatccca	gactctgtca	tcgcgttctc	gcgcggcgag	2760
cttggttaacc	ctccagggtg	ctggccagag	ccactgcgca	cccgcgcact	ggaaggccgc	2820
tccgaaggca	aggcacctct	gacggaagtt	cctgaggaag	agcaggcgca	cctcgacgct	2880
gatgattcca	aggaacgtcg	caatagcctc	aaccgcctgc	tgttcccgaa	gccaaccgaa	2940
gagttcctcg	agcacctcgc	ccgcttcggc	aacacctctg	cgctggatga	tcgtgaattc	3000
ttctacggcc	tggtcgaaag	ccgcgagact	ttgatccgcc	tgccagatgt	gcgcacccca	3060
ctgcttggtc	gcctggatgc	gatctctgag	ccagacgata	agggtatgcg	caatgttggtg	3120
gccaacgtca	acggccagat	ccgcccaatg	cgtgtgcgtg	accgctccgt	tgagtctgtc	3180
accgcaaccg	cagaaaaggc	agattcctcc	aacaagggcc	atgttgctgc	accattcgct	3240
ggtgttgta	ccgtgactgt	tgctgaaggt	gatgaggtca	aggctggaga	tcgagtcgca	3300
atcatcgagg	ctatgaagat	ggaagcaaca	atcactgctt	ctgttgacgg	caaaatcgat	3360
cgcgttgttg	ttcctgctgc	aacgaagggtg	gaagggtggcg	acttgatcgt	cgtcgtttcc	3420
taa						3423