



(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) 
1-0019391

(51)⁷ **C12P 13/00, C12N 15/09**

(13) **B**

(21)	1-2012-02804	(22)	22.02.2011		
(86)	PCT/JP2011/053764	22.02.2011	(87)	WO2011/105344	01.09.2011
(30)	2010-037043	23.02.2010	JP		
	2010-186034	23.08.2010	JP		
(45)	25.07.2018	364	(43)	25.12.2012	297
(73)	TORAY INDUSTRIES, INC. (JP)				
	1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038666, Japan				
(72)	Mimitsuka, Takashi (JP), Suda, Kazumi (JP), Sawai, Hideki (JP)				
(74)	Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)				

(54) **PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CADAVERIN**

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất cadaverin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật tiết ngoại bào lysin decarboxylaza, nhờ đó có thể ức chế việc tạo ra sản phẩm phụ của lysin, cải thiện hiệu suất thu hồi cadaverin so với mức tiêu thụ glucoza so với các phương pháp sản xuất thông thường, và ngoài ra, có thể làm giảm gánh nặng cho bước tinh chế trong quá trình tinh chế cadaverin làm nguyên liệu thô để sản xuất polyamit.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất cadaverin, cụ thể đề cập đến phương pháp sản xuất hiệu quả cadaverin bằng cách cho vi sinh vật sản xuất tiết lysin decarboxylaza.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Polyamit (PA) là nhóm polyme quan trọng được sử dụng làm nguyên liệu thô cho nhiều chất dẻo chuyên dùng trong ngành công nghiệp ô tô, ngành công nghiệp thể thao và ngành công nghiệp hàng thủ công mỹ nghệ, đồ gỗ và quà tặng, và diamin là các thành phần monome nguyên liệu thô quan trọng cho polyamit này. Diamin được ngưng tụ với axit dicarboxylic để tạo thành nhiều polyme khác nhau, và tính chất của các polyme này thay đổi tùy thuộc vào chiều dài mạch của diamin và axit dicarboxylic.

Thông thường, diamin được sản xuất bằng con đường hóa học từ các nguyên liệu có nguồn gốc từ dầu mỏ thông qua axit dicarboxylic ở giai đoạn trung gian, hoặc được sản xuất bằng phản ứng hóa học tách nhóm carboxyl của các axit amin (Tài liệu non - patent 1). Xét đến sự tăng giá dầu mạnh, phương pháp tổng hợp diamin tốt hơn nếu được chuyển sang các phương pháp dựa trên các quy trình công nghệ sinh học như các phản ứng enzym và nuôi cấy vi sinh vật, trong đó có sử dụng các nguồn tài nguyên có thể tái tạo.

Theo khía cạnh này, mối quan tâm gần đây tập trung vào cadaverin là một diamin có thể được sản xuất bằng các quy trình công nghệ sinh học. Cadaverin còn được gọi là 1,5-pentandiamin, và là hợp chất mà có thể là monome nguyên liệu thô cho polyamit. Cadaverin là amin sinh học thường tồn tại trong cơ thể sống và hệ thống sinh tổng hợp của nó đang được

nghiên cứu (xem Tài liệu non - patent 2). Một phần con đường sinh tổng hợp của nó được biết là có liên quan đến lysin decarboxylaza (LDC), một enzym xúc tác cho sự tách nhóm carboxyl của lysin thành cadaverin. Là một gen LDC, gen LDC có nguồn gốc từ *E. coli* (*Escherichia coli*) đã được biết đến (xem Tài liệu non - patent 3).

Các phương pháp công nghệ sinh học thông thường để sản xuất cadaverin dựa trên việc đưa gen LDC vào vi sinh vật, và nhìn chung có thể được phân loại thành phương pháp sản xuất nhờ phản ứng enzym sử dụng lysin làm cơ chất và phương pháp sản xuất cadaverin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật. Ngoài ra, các ví dụ đã biết về phương pháp sản xuất cadaverin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật bao gồm phương pháp sản xuất bằng cách nuôi cấy *E. coli* tái tổ hợp (xem Tài liệu patent 1), phương pháp trong đó khả năng sản xuất lysin của vi khuẩn coryneform, là vi sinh vật sản xuất lysin, được tăng cường thêm (xem Tài liệu patent 2), phương pháp trong đó hệ thống phân hủy cadaverin bị phong bế (xem Tài liệu patent 3) và phương pháp trong đó chất vận chuyển lysin bị phong bế (xem Tài liệu patent 4). Tuy nhiên, có nhiều vấn đề cần được giải quyết, đặc biệt là trong phương pháp sản xuất cadaverin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật, và ví dụ về các vấn đề này bao gồm tạo ra sản phẩm phụ của lysin trong trường hợp giống cấy vi sinh vật được tạo ra bằng cách đưa gen LDC vào vi khuẩn coryneform, là vi sinh vật sản xuất lysin (xem Tài liệu non - patent 4). Việc tạo ra sản phẩm phụ của lysin ngăn cản việc làm tăng hiệu suất thu cadaverin ngay cả khi đã sản xuất thành công tiền chất của nó. Ngoài ra, vì cadaverin cần được tinh chế đến mức tinh khiết cao để sử dụng được làm nguyên liệu thô cho polyamit, nên việc tạo ra sản phẩm phụ của lysin làm tăng gánh nặng cho bước tinh chế cadaverin, điều này gây ra các vấn đề về mặt kinh tế. Các tài liệu kỹ thuật có liên quan

Tài liệu patent

Tài liệu patent 1: JP 2002-223770 A

Tài liệu patent 2: JP 2004-222569 A

Tài liệu patent 3: JP 2009-531042

Tài liệu patent 4: WO2008/092720

Tài liệu non - patent

Tài liệu non - patent 1: Suyama and Kaneo. Yakugaku Zasshi (1965), Vol. 85, pp. 513-533.

Tài liệu non - patent 2: Celia White Tabor and a colleague. Microbiological Reviews (1985), Vol. 49, pp. 81-99.

Tài liệu non - patent 3: Shi-Yuan Meng and a colleague. Journal of Bacteriology (1992), Vol. 174, pp. 2659-2669.

Tài liệu non - patent 4: Takashi Mimitsuka and four colleagues. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry (2007), Vol. 71, pp. 2130-2135.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất cadaverin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật, phương pháp này không để cho lysin là tiền chất của cadaverin lưu lại trong chất lỏng nuôi cấy vi sinh vật khi hoàn thành việc nuôi cấy vi sinh vật.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu kỹ lưỡng phương pháp trong đó lysin không lưu lại trong chất lỏng nuôi cấy khi hoàn thành việc nuôi cấy vi sinh vật, và, kết quả là, đã phát hiện ra rằng, bằng cách nuôi cấy vi sinh vật tiết lysin decarboxylaza ngoại bào, có thể ngăn ngừa việc lysin lưu lại trong chất lỏng nuôi cấy khi hoàn thành việc nuôi cấy vi sinh vật, nhờ đó hoàn thiện sáng chế này. Tức là, sáng chế được tạo thành bởi các điểm từ (1) đến

(6) dưới đây:

(1) Phương pháp sản xuất cadaverin, phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật tiết lysin decarboxylaza ngoại bào.

(2) Phương pháp sản xuất cadaverin theo điểm (1), trong đó lysin được bổ sung vào môi trường để nuôi cấy vi sinh vật.

(3) Phương pháp sản xuất cadaverin theo điểm (1) hoặc (2), trong đó vi sinh vật biểu hiện nội bào protein bao gồm lysin decarboxylaza có peptit tín hiệu tiết, được gắn vào phía đầu N của trình tự axit amin của nó, lysin decarboxylaza này nhờ đó được tiết ngoại bào.

(4) Phương pháp sản xuất cadaverin theo điểm (3), trong đó vi sinh vật có cấu trúc gen bao gồm, theo hướng từ 5' đến 3' của trình tự axit nucleic, trình tự gen khởi đầu có chức năng ở vi sinh vật, trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết và trình tự axit nucleic mã hóa lysin decarboxylaza, cấu trúc gen này cho phép biểu hiện nội bào protein bao gồm lysin decarboxylaza có peptit tín hiệu tiết được gắn vào phía đầu N của trình tự axit amin của nó.

(5) Phương pháp sản xuất cadaverin theo điểm (3) hoặc (4), trong đó peptit tín hiệu tiết là peptit được biểu thị bởi trình tự axit amin được thể hiện trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: từ 13 đến 43.

(6) Phương pháp sản xuất cadaverin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (5), trong đó lysin decarboxylaza có nguồn gốc từ *E. coli*.

(7) Phương pháp sản xuất cadaverin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (6), trong đó vi sinh vật là vi khuẩn coryneform hoặc *E. coli*.
Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, trong phương pháp sản xuất cadaverin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật, lysin không lưu lại trong chất lỏng nuôi cấy khi hoàn thành việc nuôi cấy vi sinh vật, làm cho hiệu suất thu hồi cadaverin so với

mức tiêu thụ glucoza được cải thiện so với các phương pháp sản xuất thông thường, và ngoài ra, có thể làm giảm gánh nặng đối với bước tinh chế trong quá trình tinh chế cadaverin, một nguyên liệu thô để sản xuất polyamit.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất cadaverin bằng cách nuôi cấy vi sinh vật tiết lysin decarboxylaza ngoại bào. Trong bản mô tả này, “việc tiết” ngoại bào lysin decarboxylaza có nghĩa là lysin decarboxylaza được vận chuyển ra bên ngoài vi sinh vật (bên ngoài tế bào) và cuối cùng được đưa sang trạng thái hoàn toàn tự do trong môi trường hoặc chất lỏng nuôi cấy. Trường hợp khi chỉ một phần lysin decarboxylaza tồn tại bên ngoài tế bào và trường hợp khi lysin decarboxylaza liên kết với bề mặt của vi sinh vật này không thuộc trường hợp của thuật ngữ “tiết” trong bản mô tả này.

Đến nay chưa có vi sinh vật nào được biết là tiết lysin decarboxylaza ngoại bào, nhưng có thể làm cho vi sinh vật mong muốn tiết lysin decarboxylaza ngoại bào bằng cách sử dụng kỹ thuật di truyền. Cụ thể hơn, việc tiết lysin decarboxylaza ngoại bào có thể được thực hiện bằng phương pháp làm biểu hiện nội bào của protein bao gồm lysin decarboxylaza có peptit tín hiệu tiết được gắn vào phía đầu N của trình tự axit amin của nó.

Lysin decarboxylaza được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn, và tốt hơn nếu là L-lysin decarboxylaza. Nguồn gốc của lysin decarboxylaza cũng không bị giới hạn, và ví dụ được ưu tiên về lysin decarboxylaza bao gồm các lysin decarboxylaza có nguồn gốc từ *Bacillus halodurans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Selenomonas ruminantium*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces pilosus*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium acidaminophilum*, *Salmonella typhimurium*, *Hafnia alvei*, *Neisseria meningitidis*,

Thermoplasma acidophilum và *Pyrococcus abyssi*. Lysin decarboxylaza tốt hơn nữa nếu là lysin decarboxylaza có nguồn gốc từ *E. coli*, độ an toàn của nó đã được xác nhận. Trình tự axit amin của các lysin decarboxylaza này đã được đăng ký trong cơ sở dữ liệu (GenBank).

Peptit tín hiệu tiết được phát hiện đầu tiên dưới dạng trình tự peptit tín hiệu thực hiện chức năng cho phép tiết protein tiết ngoại bào. Protein tiết nhìn chung được dịch mã dưới dạng prepeptit hoặc prepropeptit và sau đó trở thành protein trưởng thành. Đã biết rằng, sau khi dịch mã protein này dưới dạng prepeptit hoặc prepropeptit, peptit tín hiệu tiết (“phần pre”) được phân cắt bởi proteaza (thường được gọi là peptidaza tín hiệu) để biến đổi peptit này thành peptit trưởng thành hoặc propeptit, propeptit này tiếp tục trải qua sự phân cắt phần pro bởi proteaza để trở thành peptit trưởng thành, sau đó được tiết ra ngoại bào. Đã biết rằng peptit tín hiệu tiết có chức năng cho phép không chỉ tiết ra protein tiết ngoại bào, mà còn tiết ra ngoại bào protein không tiết trong trường hợp khi protein không tiết này được dung hợp với peptit tín hiệu tiết. Theo sáng chế, bằng cách dung hợp lysin decarboxylaza với peptit tín hiệu tiết, có thể làm cho lysin decarboxylaza được tiết ngoại bào một cách hiệu quả.

Peptit tín hiệu tiết được sử dụng theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật khác hoặc vi sinh vật được sử dụng, và tốt hơn nếu peptit tín hiệu tiết có nguồn gốc từ vi sinh vật được sử dụng. Ngoài ra, peptit tín hiệu tiết có thể được sử dụng cho mục đích của sáng chế có thể bao gồm một phần của trình tự axit amin đầu N của protein trưởng thành có trong tự nhiên từ đó peptit này thu được. Ví dụ cụ thể về peptit tín hiệu tiết bao gồm:

peptit tín hiệu tiết như TorA (trimethylamin N-oxidoreductaza) và SufI (chất ức chế của ftsI; chất ức chế ftsI) có nguồn gốc từ *E.coli*; PhoD (phosphoesteraza) và LipA (lipaza) có nguồn gốc từ *Bacillus subtilis*; và

isomaltodextranaza (IMD) có nguồn gốc từ *Arthrobacter globiformis* (xem lần lượt các SEQ ID NO: từ 13 đến 17);

peptit tín hiệu tiết được mô tả trong JP 3711658 B (xem SEQ ID NO:18);

CgR0079, CgR0120, CgR0124, CgR0900, CgR0949, CgR1023, CgR1448, CgR2137, CgR2677, CgR2926, CgR0040, CgR0789, CgR0865, CgR1522, CgR1819, CgR2213, CgR2386 và CgR2535, mà là peptit tín hiệu tiết có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* R được mô tả trong Microbiology (2009), 155, pp. 741-750 (xem lần lượt các SEQ ID NO: từ 19 đến 36);

peptit tín hiệu tiết được mô tả trong JP 9-316095 A (xem SEQ ID NO:37);

peptit tín hiệu cho arpE, là tín hiệu tiết cho subtilisin, được mô tả trong Applied and Environmental Microbiology (1995), 61(4), pp. 1610-1613 (xem SEQ ID NO:38);

peptit tín hiệu tiết được mô tả trong tài liệu: Applied and Environmental Microbiology (2003), 69(1), pp.358-366 (xem SEQ ID NO:39); và

peptit tín hiệu tiết được mô tả trong tài liệu: Trends in Microbiology (2005), 13(4), pp.175-180 (xem các SEQ ID NO: từ 40 đến 43).

Ví dụ về lysin decarboxylaza và peptit tín hiệu tiết còn bao gồm protein có cùng trình tự axit amin như các trình tự được mô tả ở trên ngoại trừ một hoặc một vài axit amin được thế, được làm mất, được cài xen và/hoặc được thêm vào, miễn là chức năng của chúng được duy trì. Thuật ngữ “một vài” ở đây nghĩa là thông thường khoảng từ 1 đến 7, tốt hơn nếu khoảng từ 1 đến 5, đặc biệt tốt hơn nếu khoảng từ 1 đến 2. Mỗi trong số lysin decarboxylaza và peptit tín hiệu tiết có thể là protein có trình tự axit

amin với độ đồng nhất trình tự thông thường không nhỏ hơn 85%, tốt hơn nếu không nhỏ hơn 90%, tốt hơn nữa nếu không nhỏ hơn 95% so với trình tự axit amin ban đầu, miễn là các chức năng của nó được duy trì.

(Các) phần thay thế, (các) phần mất đi, (các) phần cài xen và/hoặc (các) phần thêm vào trong trình tự axit amin được mô tả ở trên tốt hơn nếu là (các) phần thay thế bảo toàn. Ví dụ về phần thay thế bảo toàn của axit amin ban đầu cho một axit amin khác bao gồm phần thay thế của Ala cho Ser hoặc Thr; phần thay thế của Arg cho Gln, His hoặc Lys; phần thay thế của Asn cho Glu, Gln, Lys, His hoặc Asp; phần thay thế của Asp cho Asn, Glu hoặc Gln; phần thay thế của Cys cho Ser hoặc Ala; phần thay thế của Gln cho Asn, Glu, Lys, His, Asp hoặc Arg; phần thay thế của Glu cho Asn, Gln, Lys hoặc Asp; phần thay thế của Gly cho Pro; phần thay thế của His cho Asn, Lys, Gln, Arg hoặc Tyr; phần thay thế của Ile cho Leu, Met, Val hoặc Phe; phần thay thế của Leu cho Ile, Met, Val hoặc Phe; phần thay thế của Lys cho Asn, Glu, Gln, His hoặc Arg; phần thay thế của Met cho Ile, Leu, Val hoặc Phe; phần thay thế của Phe cho Trp, Tyr, Met, Ile hoặc Leu; phần thay thế của Ser cho Thr hoặc Ala; phần thay thế của Thr cho Ser hoặc Ala; phần thay thế của Trp cho Phe hoặc Tyr; phần thay thế của Tyr cho His, Phe hoặc Trp; và phần thay thế của Val cho Met, Ile hoặc Leu.

Ví dụ về phương pháp tái tổ hợp di truyền để cho phép vi sinh vật biểu hiện nội bào protein bao gồm lysin decarboxylaza có peptit tín hiệu tiết được gắn vào phía đầu N của trình tự axit amin của nó bao gồm phương pháp trong đó cấu trúc gen bao gồm, theo hướng từ 5' đến 3' của trình tự axit nucleic, trình tự gen khởi đầu có chức năng ở vi sinh vật, trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết và trình tự axit nucleic mã hóa lysin decarboxylaza được đưa vào vi sinh vật.

Gen khởi đầu được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn, và trình

tự gen khởi đầu bất kỳ nhìn chung có thể được sử dụng miễn là nó có chức năng ở vi sinh vật được sử dụng. Ngoài ra, gen khởi đầu có thể có nguồn gốc từ loài khác. Ví dụ được ưu tiên của gen khởi đầu bao gồm:

gen khởi đầu được bao gồm trong nhiều hệ sinh tổng hợp axit amin khác nhau, như gen khởi đầu của gen glutamat dehydrogenaza được bao gồm trong hệ sinh tổng hợp axit glutamic; gen glutamin synthetaza được bao gồm trong hệ sinh tổng hợp glutamin; gen aspartokinaza được bao gồm trong hệ sinh tổng hợp lysin; gen homoserin dehydrogenaza được bao gồm trong hệ sinh tổng hợp threonin; gen axit axetohydroxy synthetaza được bao gồm trong hệ sinh tổng hợp isoleuxin và valin; gen axit 2-isopropyl malic synthetaza được bao gồm trong hệ sinh tổng hợp leuxin; gen glutamat kinaza được bao gồm trong hệ sinh tổng hợp prolin và arginin; gen phosphoribosyl-ATP pyrophosphorylaza được bao gồm trong hệ sinh tổng hợp histidin; và gen deoxy arabino heptulosonat phosphat (DAHP) synthaza được bao gồm trong hệ sinh tổng hợp các axit amin thơm như tryptophan, tyrosin và phenylalanin;

gen khởi đầu được bao gồm trong hệ sinh tổng hợp các axit nucleic như axit inosinic và axit guanylic, bao gồm gen khởi đầu cho gen phosphoribosyl pyrophosphat (PRPP) amidotransferaza, gen axit inosinic dehydrogenaza và gen axit guanylic synthetaza; và

gen khởi đầu mạnh như gen khởi đầu tac.

Trình tự của các gen khởi đầu này đã được đăng ký trong cơ sở dữ liệu (GenBank).

Trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn miễn là trình tự này có thể được dịch mã thành trình tự tín hiệu tiết đã được mô tả ở trên. Trình tự axit nucleic có thể được xác định bằng cách tham chiếu đến các codon (mã di truyền chuẩn) cho

trình tự axit amin của peptit tín hiệu tiết (xem Horton. Biochemistry, 3rd Edition, Tokyo Kagaku Dojin, p. 526), và, trong quy trình này, trình tự axit nucleic có thể được thiết kế lại với các codon thường được sử dụng trong vi sinh vật được sử dụng theo sáng chế. Ví dụ cụ thể về trình tự axit nucleic này bao gồm:

trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết như TorA (trimethylamin N-oxidoreductaza) và SufI (Chất ức chế của ftsI; chất ức chế ftsI) có nguồn gốc từ *E. coli*; PhoD (phosphoesteraza) và LipA (lipaza) có nguồn gốc từ *Bacillus subtilis*; và isomaltodextranaza (IMD) có nguồn gốc từ *Arthrobacter globiformis* (xem lần lượt các SEQ ID NO: từ 44 đến 48);

trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết được mô tả trong JP 3711658 B (xem SEQ ID NO:49);

trình tự axit nucleic mã hóa CgR0079, CgR0120, CgR0124, CgR0900, CgR0949, CgR1023, CgR1448, CgR2137, CgR2677, CgR2926, CgR0040, CgR0789, CgR0865, CgR1522, CgR1819, CgR2213, CgR2386 và CgR2535, là các peptit tín hiệu tiết có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum* R được mô tả trong tài liệu: Microbiology (2009), 155, pp. 741-750 (xem lần lượt các SEQ ID NO: từ 50 đến 67);

trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết được mô tả trong JP 9-316095 A (xem SEQ ID NO:68);

trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết được mô tả trong tài liệu: Applied and Environmental Microbiology (1995), 61(4), pp. 1610-1613 (xem SEQ ID NO:69);

trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết được mô tả trong tài liệu: Applied and Environmental Microbiology (2003), 69(1), pp.358-366 (xem SEQ ID NO:70); và

trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết được mô tả trong tài

liệu: Trends in Microbiology (2005), 13(4), pp.175-180 (xem các SEQ ID NO: từ 71 đến 74).

Các ví dụ cụ thể về trình tự axit nucleic mã hóa lysin decarboxylaza được sử dụng theo sáng chế bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa lysin decarboxylaza có nguồn gốc từ các sinh vật đã được mô tả ở trên, trình tự axit nucleic này có thể được thiết kế lại dựa trên việc sử dụng codon của vi sinh vật được sử dụng. Trình tự axit nucleic mã hóa lysin decarboxylaza có nguồn gốc từ các sinh vật đã được mô tả ở trên được đăng ký trong cơ sở dữ liệu (GenBank).

Ví dụ về trình tự gen khởi đầu, trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết và trình tự axit nucleic mã hóa lysin decarboxylaza còn bao gồm trình tự axit nucleic mà giống như trình tự tương ứng của chúng ngoại trừ một hoặc một vài axit amin được thay thế, được làm mất đi, được cài xen và/hoặc được thêm vào, miễn là chức năng của chúng được duy trì. Thuật ngữ “một vài” ở đây có nghĩa là thường nằm trong khoảng từ 1 đến 40, tốt hơn nếu khoảng từ 1 đến 30, tốt hơn nữa nếu khoảng từ 1 đến 20, đặc biệt tốt hơn nếu khoảng từ 1 đến 10, tốt nhất nếu khoảng từ 1 đến 5. Ngoài ra, ví dụ về trình tự gen khởi đầu, trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết và trình tự axit nucleic mã hóa lysin decarboxylaza bao gồm trình tự axit nucleic mà lai toàn bộ hoặc một phần với trình tự axit nucleic hoặc với sợi bổ sung của nó trong các điều kiện nghiêm ngặt, miễn là chức năng của chúng được duy trì. Thuật ngữ “polynucleotit lai trong các điều kiện nghiêm ngặt” ở đây có nghĩa là trình tự axit nucleic lai với (các) mẫu dò có một hoặc nhiều trình tự axit nucleic, mỗi trình tự có ít nhất 20, tốt hơn nếu 25, tốt hơn nữa nếu ít nhất 30 trình tự liên tiếp tùy ý được chọn từ trình tự bazơ ban đầu, khi kỹ thuật lai đã biết (Current Protocols I Molecular Biology edit. Ausbel et al., (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-

6,4) hoặc các kỹ thuật tương tự được áp dụng. Điều kiện nghiêm ngặt ở đây có thể đạt được, ví dụ, bằng cách tiến hành lai trong điều kiện có mặt formamit 50% ở nhiệt độ 37°C, ở nhiệt độ 42°C đối với điều kiện nghiêm ngặt hơn, hoặc ở nhiệt độ 65°C đối với điều kiện thậm chí nghiêm ngặt hơn, sau đó là rửa bằng dung dịch 0,1× đến 2×SSC (hỗn hợp của dung dịch ×1 SSC: natri clorua 150 mM, natri xitrat 15 mM). Mỗi trình tự gen khởi đầu, trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết và trình tự axit nucleic mã hóa lysin decarboxylaza có thể là trình tự axit nucleic có độ đồng nhất trình tự thông thường không nhỏ hơn 85%, tốt hơn nếu không nhỏ hơn 90%, tốt hơn nữa nếu không nhỏ hơn 95% so với trình tự gốc. Mỗi trình tự gen khởi đầu, trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết và trình tự axit nucleic mã hóa lysin decarboxylaza có thể thu được từ sinh vật khác với sinh vật chủ ban đầu hoặc bằng cách gây đột biến in vitro hoặc gây đột biến định hướng điểm đối với trình tự axit nucleic thu được từ sinh vật chủ ban đầu, các phương pháp này đã biết rõ với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ngoài trình tự gen khởi đầu, trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết và trình tự axit nucleic mã hóa lysin decarboxylaza, cấu trúc gen được sử dụng theo sáng chế có thể có (các) trình tự điều hòa (gen điều hòa, gen kết thúc và/hoặc các gen tương tự) cần thiết cho sự biểu hiện của lysin decarboxylaza trong tế bào của vi sinh vật ở (các) vị trí thích hợp ở đó (các) trình tự này có thể thực hiện chức năng. Vector có thể được sử dụng cho cấu trúc này không bị giới hạn miễn là vector này có thể thực hiện chức năng ở vi sinh vật, và vector này có thể là vector sao chép ngoài nhiễm sắc thể và tự trị như plasmit, hoặc có thể là vector được kết hợp vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Ngoài ra, gen nhảy nhân tạo hoặc các dạng tương tự cũng có thể được sử dụng. Trong trường hợp khi gen nhảy được sử dụng, gen quan tâm

được đưa vào nhiễm sắc thể bằng cách tái tổ hợp tương đồng hoặc bằng khả năng chuyển vị trí của chính gen nhảy. Việc xây dựng và xác nhận cấu trúc gen được tiến hành theo các kỹ thuật sinh học phân tử đã biết rõ với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, và có thể tham khảo, ví dụ, tài liệu Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D. N. Glovered. 1985); F. M. Ausubel et al. (eds), *Current Protocols in Molecular Biology* (1994) John Wiley & Sons, Inc.; và *PCR Technology: Principles and Application for DNA Amplication*, H. Erlich, ed., Stockton Press.

Phương pháp đưa cấu trúc gen vào vi sinh vật không bị giới hạn, và cấu trúc gen có thể được đưa vào nhờ phương pháp thể nguyên sinh (Gene, (1985), 39, pp. 281-286), phương pháp biến nạp bằng xung điện (Bio/Technology, (1989), 7, 1067-1070) hoặc các phương pháp tương tự.

Theo sáng chế, vi sinh vật tiết ra lysin decarboxylaza ngoại bào tốt hơn nếu là vi sinh vật mà cấu trúc gen có thể được đưa vào bằng cách tái tổ hợp di truyền, và ví dụ cụ thể về vi sinh vật này bao gồm *E. coli* (*Escherichia coli*), *Bacillus subtilis*, nấm, nấm men và vi khuẩn coryneform. Trong số này, *E. coli* và vi khuẩn coryneform, được biết là sản xuất một cách hiệu quả lysin, tiền chất của cadaverin, sẽ được ưu tiên hơn.

Ví dụ cụ thể về *E. coli* có thể được sử dụng bao gồm chủng MC1061, chủng HB101, chủng JM105, chủng JM109, chủng DH5 α và chủng JE5505.

Vi khuẩn coryneform là khuẩn hình que, gram dương ưa khí, và cũng bao gồm vi khuẩn mà trước đây đã được phân loại vào giống *Brevibacterium* nhưng hiện nay được hợp nhất vào giống *Corynebacterium* (Int. J. Syst., Bacteriol., (1981) 41, p. 225). Vi khuẩn coryneform còn bao gồm vi khuẩn thuộc giống *Brevibacterium*, mà rất gần với giống

Corynebacterium. Ví dụ về vi khuẩn coryneform như vậy bao gồm *Corynebacterium acetoacidophylum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium alkanolyticum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium mellessecola*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium herculis*, *Brevivacterium divaricatum*, *Brevivacterium flavum*, *Brevivacterium immariophilum*, *Brevivacterium lactofermentum*, *Brevivacterium roseum*, *Brevivacterium saccharolyticum*, *Brevivacterium thiogenitalis*, *Corynebacterium amoniagenes*, *Brevivacterium album*, *Brevivacterium cerinum* và *Microbacterium amoniaphilum*.

Ví dụ cụ thể về chủng vi khuẩn coryneform tương ứng bao gồm *Corynebacterium acetoacidophylum* ATCC13870, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806, *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC21511, *Corynebacterium callunae* ATCC15991, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13020, ATCC13020 và ATCC13060, *Corynebacterium lilium* ATCC15990, *Corynebacterium mellessecola* ATCC17965, *Corynebacterium efficiens* AJ12340 (số hiệu nộp lưu FERM BP-1539), *Corynebacterium herculis* ATCC13868, *Brevivacterium divaricatum* ATCC14020, *Brevivacterium flavum* ATCC13826, ATCC14067 và AJ12418 (số hiệu nộp lưu FERM BP-2205), *Brevivacterium immariophilum* ATCC14068, *Brevivacterium lactofermentum* ATCC13869, *Brevivacterium roseum* ATCC13825, *Brevivacterium saccharolyticum* ATCC14066, *Brevivacterium thiogenitalis* ATCC19240, *Corynebacterium amoniagenes* ATCC6871 và ATCC6872, *Brevivacterium album* ATCC15111, *Brevivacterium cerinum* ATCC15112 và *Microbacterium amoniaphilum* ATCC15354.

Vi khuẩn coryneform nêu trên có sẵn từ, ví dụ, bộ sưu tập chủng giống của Mỹ (American Type Culture Collection). Tức là, số hiệu nộp lưu trưng ứng được đưa ra đối với mỗi chủng và được mô tả trong bảng mục lục của bộ sưu tập giống chuẩn của Mỹ (American Type Culture Collection), và mỗi chủng có thể thu được bằng cách tham chiếu con số này.

Theo sáng chế, *Corynebacterium glutamicum* tốt hơn nếu được sử dụng trong số các vi khuẩn coryneform nêu trên. *Corynebacterium glutamicum* AJ12036 (số hiệu nộp lưu FERM BP-734) (được nộp lưu ban đầu ở International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology kể từ ngày 26 tháng 3 năm 1984), được tách riêng dưới dạng chủng đột biến có khả năng kháng streptomycin của *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, được giả định là có đột biến trong gen chức năng có liên quan đến việc tiết các protein, và khả năng sản xuất tiết các protein ngoại lai rất cao và cao gấp khoảng từ 2 đến 3 lần so với khả năng của chủng cha mẹ (chủng kiểu dại) về sự tích lũy các protein này dưới các điều kiện nuôi cấy tối ưu. Do đó, *Corynebacterium glutamicum* AJ12036 thích hợp làm vi khuẩn coryneform được làm cho tiết ra lysin decarboxylaza (xem WO02/081694).

Việc tiết lysin decarboxylaza ngoại bào của vi sinh vật tiết lysin decarboxylaza ngoại bào có thể được xác nhận bằng cách nuôi cấy vi sinh vật và ly tâm giống cấy thu được để tách riêng vi sinh vật khỏi dịch nổi nuôi cấy, sau đó xác định hoạt tính lysin decarboxylaza trong dịch nổi nuôi cấy thu được để xác nhận sự có mặt/vắng mặt của lysin decarboxylaza trong đó. Ngoài ra, lượng lysin decarboxylaza ở bên ngoài tế bào có thể được định lượng bằng thử nghiệm sử dụng phản ứng kháng nguyên-kháng thể, như thử nghiệm thấm tách Western hoặc ELISA.

Bằng cách nuôi cấy vi sinh vật tiết lysin decarboxylaza ngoại bào,

cadaverin có thể được sản xuất/tích lũy trong môi trường nuôi cấy.

Ví dụ về phương pháp nuôi cấy có thể được sử dụng bao gồm nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy theo mẻ có cung cấp dinh dưỡng và nuôi cấy liên tục. Trong trường hợp nuôi cấy liên tục, tốt hơn nếu tiến hành việc nuôi cấy liên tục như được mô tả trong JP 2008-104453 A hoặc các tài liệu tương tự.

Để làm môi trường nuôi cấy, có thể sử dụng môi trường dinh dưỡng thông thường bao gồm nguồn cacbon, nguồn nitơ, muối vô cơ và/hoặc các nguồn tương tự. Ví dụ về nguồn cacbon có thể được sử dụng bao gồm các sacarit như glucoza, fructoza, sucroza, maltoza và dịch thủy phân tinh bột; các rượu như etanol; và axit hữu cơ như axit axetic, axit lactic và axit succinic. Ví dụ về nguồn nitơ có thể được sử dụng bao gồm amoniac; muối amoni vô cơ và hữu cơ như amoni clorua, amoni sulfat, amoni cacbonat và amoni axetat; hợp chất hữu cơ chứa nitơ như ure; và chất hữu cơ chứa nitơ như dịch chiết thịt, dịch chiết nấm men, dịch ngâm ngô và dịch thủy phân đậu tương. Ví dụ về muối vô cơ có thể được sử dụng bao gồm kali dihydro phosphat, dikali hydro phosphat, amoni sulfat, natri clorua, magie sulfat và canxi cacbonat. Ngoài ra, nếu cần, các chất dinh dưỡng vi lượng như biotin, thiamin, vitamin B6 và các chất tương tự có thể được bổ sung. Dịch chiết thịt, dịch chiết nấm men, dịch ngâm ngô, axit casamino và các dạng tương tự có thể được sử dụng làm các chất thay thế cho các chất dinh dưỡng vi lượng này.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, lysin có thể được bổ sung sơ bộ vào môi trường nuôi cấy. Trong trường hợp khi lysin được bổ sung sơ bộ vào môi trường nuôi cấy, lysin được bổ sung sơ bộ này được sử dụng làm cơ chất và được biến đổi thành cadaverin trong môi trường nuôi cấy bởi lysin decarboxylaza được tiết ra ngoại bào, vì vậy hiệu quả tạo ra cadaverin có thể được tăng cường. Trong trường hợp khi lysin được bổ

sung sơ bộ vào môi trường nuôi cấy, nồng độ của lysin trong môi trường nuôi cấy không bị giới hạn, và nồng độ của lysin tốt hơn nếu là nồng độ mà ở đó sự sinh trưởng của vi sinh vật không bị ảnh hưởng bất lợi và lysin decarboxylaza không bị ức chế. Cụ thể hơn, nồng độ này tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,01 đến 2 M.

Lysin được bổ sung tốt hơn nếu là L-lysin. Lysin này được bổ sung có thể ở dạng tự do hoặc muối của lysin, và muối của lysin tốt hơn nếu là lysin hydroclorua hoặc lysin dicarboxylat có nguồn gốc từ axit dicarboxylic được mô tả dưới đây. Ví dụ cụ thể được ưu tiên về lysin dicarboxylat bao gồm lysin adipat, lysin sebacat, lysin 1,12-dodecandicarboxylat, lysin succinat, lysin isophtalat và lysin terephtalat, và ví dụ cụ thể được ưu tiên hơn về lysin dicarboxylat bao gồm lysin adipat.

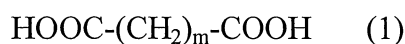
Điều kiện nuôi cấy không bị giới hạn, và việc nuôi cấy được tiến hành trong điều kiện ưa khí, ví dụ, có lắc hoặc bằng cách nuôi cấy có khuấy thông khí sâu. Nhiệt độ nuôi cấy nhìn chung nằm trong khoảng từ 25°C đến 42°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 28°C đến 38°C. Khoảng thời gian nuôi cấy thông thường từ 1 ngày đến 6 ngày.

Tốt hơn nếu sử dụng amoniac, axit clohydric hoặc axit dicarboxylic để điều chỉnh độ pH nuôi cấy, và tốt hơn nữa nếu sử dụng axit dicarboxylic. Tốt hơn nếu sử dụng chất trung hòa để kiểm soát độ pH nuôi cấy nằm trong khoảng từ 5 đến 8, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5. Trạng thái của chất trung hòa không bị giới hạn, và chất trung hòa có thể được sử dụng dưới dạng khí, lỏng, rắn hoặc dung dịch chứa nước. Chất trung hòa đặc biệt tốt hơn nếu là dung dịch nước.

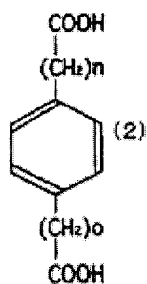
Axit dicarboxylic tốt hơn nếu được sử dụng làm chất trung hòa không bị giới hạn, và axit dicarboxylic tốt hơn nếu là axit dicarboxylic về cơ bản không có nhóm chức khác với hai nhóm carboxylic đã được mô tả ở

trên. Nhóm chức ở đây có nghĩa là nhóm dễ phản ứng mà phản ứng, trong phản ứng trùng hợp polyamit (trong các điều kiện phản ứng trong đó, ví dụ, nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 250 đến 270°C, áp suất nằm trong khoảng từ 10 đến 20 kg/cm², và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 1 đến 5 giờ), với nhóm amino hoặc nhóm carboxyl để gây ra sự phân nhánh của polyme hoặc sự giảm mức độ kết tinh của polyme (đến mức độ kết tinh không lớn hơn 80%). Ví dụ về nhóm chức bao gồm nhóm amino và nhóm carboxyl, và ví dụ khác về nhóm chức bao gồm nhóm axit (ví dụ, nhóm axit sulfonic, nhóm phosphat và nhóm phenolic hydroxyl), nhóm bazơ (ví dụ, nhóm hydrazino), nhóm phân cực proton (ví dụ, nhóm hydroxyl), nhóm phân cắt được (ví dụ, nhóm epoxy và nhóm peroxit) và các nhóm rất dễ phản ứng khác (ví dụ, nhóm isoxyanat). Mặt khác, phân tử thể halogen, phân tử thể thơm, nhóm ete, nhóm este, nhóm amit và các nhóm tương tự không được bao gồm trong nhóm chức trong bản mô tả này vì khả năng phản ứng của chúng thấp.

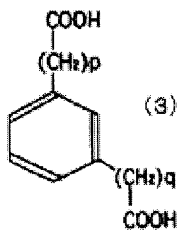
Axit dicarboxylic tốt hơn nữa nếu là axit dicarboxylic được biểu thị bởi công thức chung (1), (2) hoặc (3) dưới đây:



(trong đó trong công thức chung (1), m = từ 0 đến 16).



(trong đó trong công thức chung (2), n, o = từ 0 đến 16).



(trong đó trong công thức chung (3), $p, q =$ từ 0 đến 16).

Axit dicarboxylic tốt hơn nữa nếu là axit adipic, axit sebaxic, axit 1,12-dodecandicarboxylic, axit succinic, axit isophthalic hoặc axit terephthalic.

Cadaverin trong môi trường nuôi cấy tồn tại ở trạng thái tự do hoặc dưới dạng muối của cadaverin. Trong phương pháp thu gom cadaverin trong môi trường nuôi cấy, vi sinh vật trước tiên được loại bỏ khỏi môi trường nuôi cấy. Để làm phương pháp phân tách, phương pháp thông thường đã biết như loại bỏ vi sinh vật bằng cách kết tủa, ly tâm, phân tách bằng cách lọc màng hoặc các phương pháp tương tự được ưu tiên sử dụng.

Để thu gom cadaverin từ môi trường nuôi cấy từ đó vi sinh vật được loại bỏ và chứa cadaverin, cadaverin dicarboxylat có thể được thu gom bằng cách kết tinh như được mô tả trong JP 2009-207495 A. Theo cách khác, cadaverin ở dạng tự do có thể được tinh chế và thu gom bằng cách sử dụng màng NF như được mô tả trong JP 2009-29872 A. Theo cách khác, cadaverin ở dạng tự do có thể được thu gom bằng cách chiết bằng dung môi hữu cơ phân cực sau đó là chưng cất như được mô tả trong JP 2009-28045.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây bằng các ví dụ và ví dụ tham chiếu. Trừ khi có chỉ dẫn khác, tất cả các môi trường, môi trường thạch aga và môi trường nuôi cấy được sử dụng trong các ví dụ và ví dụ so sánh được sử dụng sau khi khử trùng bằng công đoạn khử trùng thông thường (ví dụ, bằng cách khử trùng bằng nồi hấp ở nhiệt độ 121°C trong 30 phút hoặc khử trùng bằng cách lọc qua bộ lọc 0,45 μm).

(Phương pháp phân tích nồng độ của cadaverin và lysin bằng HPLC)

Cột được sử dụng: CAPCELL PAK C18 (Shiseido)

Pha động: dung dịch nước phosphat nồng độ 0,1% (theo khối lượng):axetonitril = 4,5:5,5

Phát hiện: UV 360 nm

Xử lý sơ bộ mẫu: bổ sung 25 µl 1,4-diaminobutan (nồng độ 0,03 M), 150 µl natri hydro cacbonat (nồng độ 0,075 M) và dung dịch chứa 2,4-dinitroflobenzen (nồng độ 0,2 M) trong etanol vào 25 µl mẫu cần được phân tích, và trộn hỗn hợp thu được, sau đó ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Hòa tan phân ước 50 µl của dung dịch phản ứng nêu trên trong 1 ml axetonitril, và ly tâm dung dịch thu được ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó thực hiện phân tích HPLC đối với 10 µl dịch nổi.

Ví dụ tham chiếu 1: Chuẩn bị *Corynebacterium glutamicum* có khả năng sản xuất lysin

Để chuẩn bị *Corynebacterium glutamicum* có khả năng tổng hợp lysin dưới dạng tiền chất của cadaverin, vi khuẩn sản xuất lysin được chuẩn bị bằng cách gây đột biến hiệu quả đối với aspartokinaza. Bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu: Appl. Microbiol. Biotechnol., (2002), 58, pp. 217-223, chủng *Corynebacterium glutamicum* AK-1 (sau đây được gọi là chủng AK-1) được chuẩn bị. Vì sự ức chế ngược aspartokinaza bởi lysin và threonin được làm giảm trong chủng vi khuẩn này, nên lysin có thể được tổng hợp bằng cách nuôi cấy.

Sau đó, chủng AK-1 được thực hiện tái tổ hợp di truyền tiếp để tạo ra vi khuẩn coryneform tiết ra lysin decarboxylaza ngoại bào (Ví dụ 1 và 2) và vi khuẩn coryneform không tiết ra lysin decarboxylaza ngoại bào (Ví dụ so sánh 1).

Ví dụ 1: Tạo ra *Corynebacterium glutamicum* tiết ra lysin decarboxylaza

ngoại bào (Phần 1: Sử dụng con đường Tat)

(1) Tách dòng gen HOM

Homoserin dehydrogenaza được chọn làm locus mà gen lysin decarboxylaza được đưa vào. Gen tương ứng với vùng gồm 300 axit amin từ đầu N của gen HOM được tách dòng. Bằng cách tham chiếu trình tự bazơ của gen HOM (Số hiệu nộp lưu BA000036) đã được đăng ký ở cơ sở dữ liệu (GenBank), đoạn mỗi oligonucleotit (SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2) được tổng hợp. Trong ống vi ly tâm dung tích 0,2 ml, đặt 0,2 µl dung dịch chứa ADN hệ gen được chuẩn bị từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 theo phương pháp thông thường để làm khuôn mẫu khuếch đại, và mỗi chất phản ứng được bổ sung vào ống nêu trên sao cho hỗn hợp thu được, trong thể tích tổng cộng bằng 50 µl, chứa 20 pmol mỗi đoạn mỗi, đệm Tris-HCl pH 8,0 (20 mM), kali clorua (2,5 mM), gelatin (100 µg/ml), mỗi dNTP (50 µM) và LA Taq ADN polymeraza (2 đơn vị) (do Takara Shuzo Co., Ltd. sản xuất). Phản ứng chuỗi polymeraza (sau đây được gọi là PCR) được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị tạo chu kỳ nhiệt do BioRad sản xuất trong điều kiện 30 chu kỳ: làm biến tính ADN ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ủ các đoạn mỗi ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây, và phản ứng kéo dài các đoạn mỗi ADN ở nhiệt độ 72°C trong 3 phút. PCR trong các ví dụ theo sáng chế được tiến hành dưới các điều kiện nêu trên trừ khi có chỉ dẫn khác. Sản phẩm thu được bằng PCR này được điện di trong agarosa nồng độ 1%, và mảnh ADN khoảng 0,9 kb chứa gen HOM được cắt khỏi gel, sau đó là được tinh chế bằng cách sử dụng kit GeneClean (do BIO 101 sản xuất). Mảnh này được cắt bằng enzym giới hạn *EcoRI* và *BamHI*, và mảnh *EcoRI*-*BamHI* 0,9 kb thu được được cài xen vào khoảng trống *EcoRI*/*BamHI* của pHSG298 (do Takara Shuzo Co., Ltd. sản xuất) mà đã được cắt sơ bộ bằng *EcoRI* và *BamHI*, sử dụng bộ kit Ligation Ver. 1 (do

Takara Shuzo Co., Ltd. sản xuất). Plasmid thu được được ký hiệu là pHOM1.

(2) Tạo ra catxet biểu hiện tiết ra LDC

Gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin được chọn làm gen khởi đầu để biểu hiện cấu trúc của LDC trong *Corynebacterium glutamicum*; SufI của *E. coli*, mà việc tiết nó phụ thuộc vào con đường Tat, được chọn làm tín hiệu tiết; và cadA của *E. coli* được chọn làm gen LDC.

Trước tiên, gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin được tách dòng. Bằng cách tham chiếu trình tự bazơ của pHSG299 (Số hiệu nộp lưu M19415) đã được đăng ký ở cơ sở dữ liệu (GenBank), đoạn mỗi oligonucleotit (SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4) được tổng hợp. Sử dụng plasmid pHSG299 làm khuôn mẫu khuếch đại và các oligonucleotit (SEQ ID NO:3) (SEQ ID NO:4) làm bộ các đoạn mồi, PCR được tiến hành để thu được sản phẩm, sản phẩm này sau đó được điện di trong gel agarose nồng độ 1%. Mảnh ADN 0,3 kb chứa vùng gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin được cắt khỏi gel, và được tinh chế bằng cách sử dụng kit GeneClean. Mảnh này được cài xen vào khoảng trống trong vector plasmid pT7blue (do Novagen sản xuất) sử dụng bộ kit Ligation Ver. 1, khoảng trống này đã được tạo ra bằng cách cắt vector này bằng *EcoRV* và bổ sung bazơ T vào đầu 3'. Trong số các plasmid thu được, plasmid mà trở thành mảnh đơn 3,2 kb sau khi bị cắt bằng *HindIII* và *SacII* được ký hiệu là pKMP1.

Sau đó, gen LDC được tách dòng. Bằng cách tham chiếu trình tự bazơ của gen LDC (Số hiệu nộp lưu M76411) đã được đăng ký ở cơ sở dữ liệu (GenBank), đoạn mỗi oligonucleotit (SEQ ID NO:5 và SEQ ID NO:6) được tổng hợp. Sử dụng dung dịch chứa ADN hệ gen được chuẩn bị từ *E. coli* (*Escherichia coli* ATCC10798) theo phương pháp thông thường làm

khuôn mẫu khuếch đại và các oligonucleotit (SEQ ID NO:5 và 6) làm bộ các đoạn mồi, PCR được tiến hành để thu được sản phẩm, sản phẩm này sau đó được điện di trong gel agarosa nồng độ 1%. Mảnh ADN 2,1 kb chứa gen LDC được cắt khỏi gel, và được tinh chế bằng cách sử dụng kit GeneClean. Mảnh này được cài xen vào khoảng trống trong vector plasmit pT7blue sử dụng bộ kit Ligation Ver. 1, khoảng trống này đã được tạo ra bằng cách cắt vector này bằng *EcoRV* và bổ sung bazơ T vào đầu 3'. Trong số các plasmit thu được, plasmit mà trở thành mảnh đơn 4,0 kb sau khi bị cắt bằng *HindIII* và *NcoI* được ký hiệu là pCADA.

Cuối cùng, đoạn mồi oligonucleotit (SEQ ID NO:7) trong đó trình tự bazơ tương ứng với trình tự axit amin của SufI của *E. coli* làm tín hiệu tiết ra được dung hợp với gen LCD được tổng hợp. Đoạn mồi oligonucleotit này được thiết kế sao cho phía 3' của nó có vùng chồng lặp với phía 5' của gen LDC. Sử dụng pCADA làm khuôn mẫu khuếch đại và các oligonucleotit (SEQ ID NO:7 và 6) làm bộ các đoạn mồi, PCR được tiến hành để thu được sản phẩm, sản phẩm này sau đó được điện di trong gel agarosa nồng độ 1%. Mảnh ADN 2,2 kb chứa gen LDC được cắt khỏi gel, và được tinh chế bằng cách sử dụng kit GeneClean (Mảnh gen LDC 1). Ngoài ra, đoạn mồi oligonucleotit (SEQ ID NO:8) trong đó trình tự bazơ tương ứng với trình tự axit amin của SufI của *E. coli* làm tín hiệu tiết được dung hợp với gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin được tổng hợp. Đoạn mồi oligonucleotit này được thiết kế sao cho phía 5' của nó có vùng chồng lặp với phía 3' của gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin. Sử dụng pKMP1 làm khuôn mẫu khuếch đại và các oligonucleotit (SEQ ID NO:3 và 8) làm bộ các đoạn mồi, PCR được tiến hành để thu được sản phẩm, sản phẩm này sau đó được điện di trong gel agarosa nồng độ 1%. Mảnh ADN 0,4 kb chứa gen LDC được cắt khỏi gel,

và được tinh chế bằng cách sử dụng kit GeneClean (mảnh gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin 1).

Sử dụng mảnh gen LDC 1 thu được theo cách như vậy và mảnh gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin 1 làm khuôn mẫu khuếch đại, và đoạn mỗi oligonucleotit được thiết kế để chứa trình tự nhận biết đối với enzym giới hạn *Bam*HI (SEQ ID NO:9) và đoạn mỗi oligonucleotit được thiết kế để chứa trình tự nhận biết đối với enzym giới hạn *Sph*I (SEQ ID NO:10) làm bộ các đoạn môi, PCR được tiến hành để thu được sản phẩm, sản phẩm này sau đó được điện di trong gel agarosa nồng độ 1%. Mảnh ADN 2,6 kb chứa catxet biểu hiện tiết ra LDC được cắt khỏi gel, và được tinh chế bằng cách sử dụng kit GeneClean. Mảnh này được cắt bằng enzym giới hạn *Bam*HI và *Sph*I, và mảnh *Bam*HI-*Sph*I 2,6 kb thu được được cài xen vào khoảng trống *Bam*HI-*Sph*I của pHOM1 mà đã được cắt sơ bộ bằng *Bam*HI và *Sph*I, sử dụng bộ kit Ligation Ver. 1 (do Takara Shuzo Co., Ltd. sản xuất). Plasmid thu được được ký hiệu là pTM65.

(4) Kết hợp pTM65 vào nhiễm sắc thể

Plasmid pTM65 được đưa vào chủng AK-1 bằng kỹ thuật biến nạp bằng xung điện [FEMS Microbiology Letters, 65, p. 299 (1989)], và được chọn lọc trên môi trường aga LB (trypton (10 g/l) (do Bacto sản xuất), dịch chiết nấm men (5 g/l) (do Bacto sản xuất), natri clorua (10 g/l)) được bổ sung kanamycin (25 µg/ml). Từ thể biến nạp đã được chọn lọc theo cách như vậy, dung dịch ADN hệ gen được điều chế theo phương pháp thông thường. Sử dụng ADN hệ gen này làm khuôn mẫu và các oligonucleotit (SEQ ID NO:1) (SEQ ID NO:6) làm bộ các đoạn môi, PCR được tiến hành để thu được sản phẩm, sản phẩm này sau đó được điện di trong agarosa nồng độ 1,0%. Kết quả là, dải đơn 3,5 kb được quan sát thấy. Nhờ dải này, có thể xác định rằng thể biến nạp đã chọn có gen LDC được cài xen ở locus

HOM. Thẻ biến nạp này được ký hiệu là *Corynebacterium glutamicum* AK-1/pTM65 (sau đây được gọi tắt là chủng AK-1/pTM65).

Ví dụ 2: Tạo ra *Corynebacterium glutamicum* tiết lysin decarboxylaza ngoại bào (Phần 1: thông qua con đường Sec)

(1) Tạo ra catxet biểu hiện tiết LDC

Tiếp theo, gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin được chọn làm gen khởi đầu để biểu hiện cấu trúc của LDC trong *Corynebacterium glutamicum*; arpE, là tín hiệu cho việc tiết subtilisin thông qua con đường Sec được chọn làm tín hiệu tiết; và cadA của *E. coli* được chọn làm gen LDC. Tương tự với ví dụ 1, đoạn mỗi oligonucleotit (SEQ ID NO:11) trong đó trình tự bazơ tương ứng với trình tự axit amin của arpE làm tín hiệu tiết được dung hợp với gen LCD được tổng hợp. Đoạn mỗi oligonucleotit này được thiết kế sao cho phía 3' của nó có vùng chồng lặp với phía 5' của gen LDC. Sử dụng pCADA làm khuôn mẫu khuếch đại và các oligonucleotit (SEQ ID NO:11 và SEQ ID NO:6) làm bộ các đoạn môi, PCR được tiến hành để thu được sản phẩm, sản phẩm này sau đó được điện di trong gel agarosa nồng độ 1%. Mảnh ADN 2,2 kb chứa gen LDC được cắt khỏi gel, và được tinh chế bằng cách sử dụng kit GeneClean (Mảnh gen LDC 2).

Tiếp theo, đoạn mỗi oligonucleotit (SEQ ID NO:12) trong đó trình tự bazơ tương ứng với trình tự axit amin của arpE làm tín hiệu tiết được dung hợp với gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin được tổng hợp. Đoạn mỗi oligonucleotit này được thiết kế sao cho phía 5' của nó có vùng chồng lặp với phía 3' của gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin. Sử dụng pKMP1 làm khuôn mẫu khuếch đại và các oligonucleotit (SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:12) làm bộ các đoạn môi, PCR được tiến hành để thu được sản phẩm, sản phẩm này sau đó được điện

di trong gel agarosa nồng độ 1%. Mảnh ADN 0,4 kb chứa gen LDC được cắt khỏi gel, và được tinh chế bằng cách sử dụng kit GeneClean (mảnh gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin 2).

Sử dụng mảnh gen LDC 2 thu được theo cách như vậy và mảnh gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin 2 làm khuôn mẫu khuếch đại, và đoạn mồi oligonucleotit (SEQ ID NO:9) và (SEQ ID NO:10) làm bộ các đoạn mồi, PCR được tiến hành để thu được sản phẩm, sản phẩm này sau đó được điện di trong gel agarosa nồng độ 1,0%. Mảnh ADN 2,6 kb chứa catxet biểu hiện tiết ra LDC được cắt khỏi gel, và được tinh chế bằng cách sử dụng kit GeneClean. Mảnh này được cắt bằng enzym giới hạn *Bam*HI và *Sph*I, và mảnh *Bam*HI-*Sph*I 2,6 kb thu được được cài xen vào khoảng trống *Bam*HI-*Sph*I của pHOM1 mà đã được cắt sơ bộ bằng *Bam*HI và *Sph*I, sử dụng bộ kit Ligation Ver. 1 (do Takara Shuzo Co., Ltd. sản xuất). Plasmid thu được được ký hiệu là pTM66.

(2) Kết hợp pTM66 vào nhiễm sắc thể

Plasmid pTM66 được đưa vào chủng AK-1 bằng kỹ thuật biến nạp bằng xung điện [FEMS Microbiology Letters, 65, p. 299 (1989)], và được chọn lọc trên môi trường aga LB (trypton (10 g/l) (do Bacto sản xuất), dịch chiết nấm men (5 g/l) (do Bacto sản xuất), natri clorua (10 g/l)) được bổ sung kanamycin (25 µg/ml). Từ thể biến nạp đã được chọn lọc theo cách như vậy, dung dịch ADN hệ gen được điều chế theo phương pháp thông thường. Sử dụng ADN hệ gen này làm khuôn mẫu và các oligonucleotit (SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:6) làm bộ các đoạn mồi, PCR được tiến hành để thu được sản phẩm, sản phẩm này sau đó được điện di trong agarosa nồng độ 1,0%. Kết quả là, dải đơn 3,5 kb được quan sát thấy. Nhờ dải này, có thể xác định rằng thể biến nạp đã chọn có gen LDC được cài xen ở locus HOM. Thể biến nạp này được ký hiệu là *Corynebacterium*

glutamicum AK-1/pTM66 (sau đây được gọi tắt là chủng AK-1/pTM66).

Ví dụ so sánh 1: Tạo ra *Corynebacterium glutamicum* không tiết ra lysin decarboxylaza ngoại bào

pKMP1 được cắt bằng *Hind*III và *Nco*I, và sản phẩm thu được được điện di trong agarosa nồng độ 1,2%. Mảnh ADN 0,3 kb chứa vùng gen khởi đầu của gen có khả năng kháng kanamycin được cắt khỏi gel, và được tinh chế bằng cách sử dụng kit GeneClean. Mảnh *Hind*III-*Nco*I thu được theo cách như vậy được cài xen vào khoảng trống *Hind*III/*Nco*I của pCADA mà đã được cắt sơ bộ bằng *Hind*III và *Nco*I, sử dụng bộ kit Ligation Ver. 1. Plasmid thu được được ký hiệu là pTM100.

Sau đó, pTM100 được cắt bằng *Sac*II, và sản phẩm thu được được điện di trong gel agarosa nồng độ 1,0%. Mảnh ADN 2,4 kb chứa catxet biểu hiện LDC được cắt khỏi gel, và được tinh chế bằng cách sử dụng kit GeneClean. Mảnh *Sac*II thu được theo cách như vậy được cài xen vào khoảng trống *Sac*II của pHOM1 mà đã được cắt sơ bộ bằng *Sac*II, sử dụng bộ kit Ligation Ver. 1. Plasmid thu được được ký hiệu là pTM101.

Plasmid pTM101 được đưa vào chủng AK-1 bằng kỹ thuật biến nạp bằng xung điện [FEMS Microbiology Letters, 65, p. 299 (1989)], và được chọn lọc trên môi trường aga LB (trypton (10 g/l) (do Bacto sản xuất), dịch chiết nấm men (5 g/l) (do Bacto sản xuất), natri clorua (10 g/l)) được bổ sung kanamycin (25 µg/ml).

Từ thể biến nạp đã được chọn lọc theo cách như vậy, dung dịch ADN hệ gen được chuẩn bị theo phương pháp thông thường. Sử dụng ADN hệ gen này làm khuôn mẫu và các oligonucleotit (SEQ ID NO:5) (SEQ ID NO:6) làm bộ các đoạn mồi, PCR được tiến hành để thu được sản phẩm, sản phẩm này sau đó được điện di trong agarosa nồng độ 1,0%. Kết quả là, dải đơn 2,1 kb được quan sát thấy. Nhờ dải này, có thể xác định rằng thể

biến nạp đã được chọn có gen LDC được cài xen ở locus HOM. Thể biến nạp này được ký hiệu là *Corynebacterium glutamicum* AK-1/pTM101 (sau đây được gọi tắt là chủng AK-1/pTM101).

Ví dụ 3: Xác nhận sự tiết ngoại bào của hoạt tính lysin decarboxylaza

Mỗi trong số các chủng AK-1/pTM65, chủng AK-1/pTM66 và chủng AK-1/pTM101 được nuôi cấy trong môi trường BY (xem tài liệu: J. Bacteriol., 159, pp. 306-311 (1984)), và môi trường nuôi cấy thu được được tách riêng thành phần vi sinh vật và phần dịch nổi nuôi cấy bằng ly tâm. Vi sinh vật được đồng hóa theo phương pháp thông thường, để tạo ra dịch đồng hóa vi sinh vật. Hoạt tính lysin decarboxylaza trong dịch nổi nuôi cấy và dịch đồng hóa vi sinh vật thu được theo cách như vậy được xác định (xem Biosci. Biotechnol. Biochem., 71, pp. 2130-2135, (2007)). Lấy hoạt tính enzym mà theo đó L-lysine được chuyển hóa thành 1 nmol cadaverin trong 1 phút là 1 U, các kết quả được thể hiện trong Bảng 1 dưới dạng hoạt tính riêng tính trên khối lượng protein.

Bảng 1

Tên vi sinh vật	Hoạt tính lysin decarboxylaza [mU/mg]	
	Dịch đồng hóa vi sinh vật	Dịch nổi nuôi cấy
Chủng AK-1/pTM101	19800	0
Chủng AK-1/pTM65	44900	340
Chủng AK-1/pTM66	57100	550

Vì chủng AK-1/pTM65 và chủng AK-1/pTM66 có hoạt tính lysin decarboxylaza trong dịch nổi nuôi cấy, tức là, ở bên ngoài tế bào, có thể xác nhận rằng lysin decarboxylaza được tiết ra ngoại bào trong các trường hợp này. Ngoài ra, có thể xác nhận rằng tất cả các chủng này đều có hoạt tính lysin decarboxylaza trong dịch đồng hóa vi sinh vật.

Ví dụ 4 và 5, và ví dụ so sánh 2 và 3 (Nuôi cấy vi sinh vật: Trường hợp khi

vi sinh vật là vi khuẩn coryneform)

Nuôi cấy chủng AK-1/pTM65 (Ví dụ 4), chủng AK-1/pTM66 (Ví dụ 5), chủng AK-1/pTM101 (Ví dụ so sánh 2) và chủng AK-1/pTM101 + 20 mg lysin decarboxylaza đã được tinh chế (được điều chế bằng phương pháp được mô tả trong JP 2004-000114 A) (Ví dụ so sánh 3), và các chủng này được so sánh về khả năng sản xuất cadaverin.

Một vòng platin của mỗi chủng được cấy vào 5 ml môi trường BY đã được khử trùng và việc tiên nuôi cấy sơ bộ được tiến hành ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ có lắc. Toàn bộ thể tích của môi trường tiên nuôi cấy sơ bộ thu được được cấy vào 50 ml môi trường giống như trong môi trường tiên nuôi cấy sơ bộ, và việc nuôi cấy sơ bộ được tiến hành ở nhiệt độ 30°C với biên độ lắc là 30 cm ở tốc độ 120 vòng/phút trong 24 giờ. Sau đó, toàn bộ thể tích của môi trường nuôi cấy sơ bộ thu được được cấy vào 950 ml môi trường MMP (môi trường nuôi cấy) được thể hiện trong bảng 2, và việc nuôi cấy được tiến hành trong điều kiện thông khí với không khí đã được khử trùng ở 0,07 vvm ở nhiệt độ 30°C ở tốc độ quay của cánh khuấy là 800 vòng/phút ở độ pH được kiểm soát bằng 6,7 trong 50 giờ. Dung dịch axit nước sulfuric (nồng độ 3 M) và dung dịch nước amoniac (3 M) được sử dụng làm chất trung hòa. Trong ví dụ so sánh 3, 20 mg lysin decarboxylaza đã tinh chế được bổ sung vào lúc bắt đầu nuôi cấy.

Bảng 2

Thành phần môi trường	Nồng độ cuối cùng
	[g/L]
Glucosa	50
(NH ₄) ₂ SO ₄	20
Bacto Pepton	5
KH ₂ PO ₄	2,5
K ₂ HPO ₄	2,75
NaCl	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,05
FeSO ₂ ·7H ₂ O	0,01
MnSO ₄ ·4~6H ₂ O	0,001
Biotin	0,0005
Tiamin·HCl	0,007
L-Homoserin	0,5

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, vi sinh vật được loại bỏ bằng ly tâm ở nhiệt độ 4°C ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó là thu hồi dịch nổi nuôi cấy. Cadaverin và lysin trong dịch nổi nuôi cấy này được phân tích bằng HPLC. Sử dụng “Glucose Test Wako C” (nhãn hiệu đã được đăng ký) (do Wako Pure Chemical Industries, Ltd. sản xuất) để xác định nồng độ glucoza. Tính toán hiệu suất thu hồi cadaverin so với mức tiêu thụ glucoza ((khối lượng cadaverin được tạo ra / khối lượng glucoza đã tiêu thụ) × 100 (%)). Các kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

	Ví dụ so sánh 2	Ví dụ so sánh 3	Ví dụ 4	Ví dụ 5
	AK-1/pTM101	AK-1/pTM101 + Lysin decarboxylaza	AK-1/pTM65 (thông qua con đường Tat)	AK-1/pTM66 (thông qua con đường Sec)
Cadaverin [g/L]	5,6	6,4	7,5	7,1
Lysin [g/L]	1,2	0,0	0,0	0,0
Hiệu suất thu hồi cadaverin so với mức tiêu thụ glucoza [%]	11,2	12,8	15,0	14,2

Kết quả là, trong ví dụ so sánh 2 và 3, có thể thấy rằng việc tạo ra sản phẩm phụ của lysin có thể được làm giảm bằng cách bổ sung lysin decarboxylaza vào bên ngoài tế bào được quan sát thấy. Mặt khác, bằng

cách so sánh giữa ví dụ so sánh 2 và ví dụ 4 và 5, thấy rằng việc tạo ra sản phẩm phụ của lysin có thể được làm giảm một cách rõ rệt bằng cách để cho lysin decarboxylaza tiết ngoại bào. Ngạc nhiên là, mặc dù đã dự đoán rằng việc tăng lượng cadaverin tích lũy và việc tăng hiệu suất thu hồi cadaverin so với mức tiêu thụ glucoza không khác nhau giữa ví dụ so sánh 3 và ví dụ 4 và 5, nhưng có thể xác định được rằng việc nuôi cấy vi sinh vật tiết ra lysin decarboxylaza ngoại bào làm tăng lượng cadaverin tích lũy và hiệu suất thu hồi cadaverin so với mức tiêu thụ glucoza cao hơn, so với trường hợp khi lysin decarboxylaza được bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Ví dụ tham chiếu 2: Tạo ra *E. coli* thiếu hụt lysin decarboxylaza

(1) Làm mất gen lysin decarboxylaza (LDC) ở *E. coli*

Đã biết rằng *E. coli* có gen *cadA* và gen *ldcC* làm các gen LDC. Theo phương pháp được gọi là “kết hợp được điều khiển bởi Red”, được phát triển bởi Datsenko and Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645), gen *cadA* và *ldcC* trong chủng *E. coli* W3110 được làm mất như sau. Trong phương pháp “kết hợp được điều khiển bởi Red”, mỗi oligonucleotit tổng hợp được thiết kế sao cho phía 5' của nó có phần của gen quan tâm và phía 3' của nó có phần của gen có khả năng kháng chất kháng sinh được sử dụng làm đoạn mồi để thu được sản phẩm PCR, sau đó sản phẩm này có thể được sử dụng để tạo cấu trúc bằng một bước cho chủng thiếu hụt gen. Ngoài ra, việc sử dụng FLP recombinaza có nguồn gốc từ nấm men, gen có khả năng kháng chất kháng sinh được kết hợp vào chủng thiếu hụt gen có thể được loại bỏ.

(1-1) Làm mất gen *cadA*

Sử dụng plasmit pKD3 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645) để làm khuôn mẫu cho PCR. pKD3 là plasmit được sản xuất bằng cách cài xen FRT (đích nhận biết FLP recombinaza), là trình

tự nhận biết của FLP-recombinaza, và gen cat, là gen có khả năng kháng chất kháng sinh, vào pMW118 (do Takara Bio Inc. sản xuất). Các trình tự này được cài xen theo thứ tự FRT-cat-FRT. FRT được thể hiện trong SEQ ID NO:75.

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các oligonucleotit tổng hợp được thể hiện trong SEQ ID NO:76 và 77 làm đoạn mồi, các đầu 3' của chúng có trình tự tương ứng với cả hai đầu của FRT và các đầu 5' của chúng mỗi đầu có 50 bazơ chặn khung đọc mở (ORF) của gen *cadA*.

Sản phẩm PCR đã khuếch đại được tinh chế thông qua gel agarosa, và được đưa bằng kỹ thuật biến nạp bằng xung điện vào chủng *E. coli* W3110 mang pKD46, là plasmid có khả năng sao chép nhảy với nhiệt độ. Plasmid pKD46 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645) bao gồm mảnh ADN của thể thực khuẩn λ có chiều dài tổng cộng bằng 2154 bazơ (GenBank/EMBL số hiệu nộp lưu J02459, vị trí từ 31088 đến 33241) bao gồm gen mã hóa Red recombinaza (gen γ , β và α) đối với hệ tái tổ hợp tương đồng λ Red được điều hòa bởi gen khởi đầu *ParaB* cảm ứng arabinosa.

Các tế bào khả biến dùng cho kỹ thuật biến nạp bằng xung điện được tạo ra như sau. Cụ thể, chủng *E. coli* W3110 được nuôi cấy trong môi trường LB được bổ sung ampicilin ở nhiệt độ 30°C qua đêm, và môi trường nuôi cấy thu được sau đó được pha loãng 100 lần bằng môi trường SOB được bổ sung ampicilin và L-arabinosa. Các tế bào đã pha loãng thu được được để sinh trưởng ở nhiệt độ 30°C trong điều kiện thông khí cho đến khi OD600 đạt đến khoảng 0,6, và được rửa 3 lần bằng glyxerol nồng độ 10%, sao cho các tế bào này có thể sử dụng được trong kỹ thuật biến nạp bằng xung điện.

1 mL môi trường SOC được bổ sung vào các tế bào sau khi biến nạp

bằng sung điện, và sau đó, các tế bào được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 2,5 giờ. Sau đó, các tế bào được nuôi cấy trên đĩa ở nhiệt độ 37°C trên môi trường aga LB được bổ sung cloramphenicol, nhờ đó thể tái tổ hợp có khả năng kháng cloramphenicol được chọn lọc. Sau đó, để loại bỏ plasmit pKD46, các tế bào này được cấy chuyển hai lần ở nhiệt độ 42°C trên môi trường aga LB được bổ sung cloramphenicol. Các khuẩn lạc thu được được kiểm tra về khả năng kháng ampicilin, và thu chủng nhạy ampicilin, trong đó pKD46 bị làm mất.

Việc làm mất gen *cadA* trong thể đột biến mà có thể được nhận dạng bằng gen có khả năng kháng cloramphenicol được xác nhận bằng PCR. Chủng thiếu hụt *cadA* thu được được ký hiệu là chủng W3110 *cadA::FRT-cat-FRT*.

Sau đó, plasmit hỗ trợ pCP20 được sử dụng để loại bỏ gen *FRT-cat-FRT* đã được đưa vào gen *cadA*. pCP20 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645) là plasmit mang FLP recombinaza của nấm men và có khả năng sao chép nhạy với nhiệt độ. Nhờ việc đưa vào pCP20, recombinaza nhận biết FRT ở hai vị trí trong nhiễm sắc thể để gây ra sự tái tổ hợp, nhờ đó phân cắt ra gen giữa các vị trí FRT, cuối cùng chỉ để lại FRT trong nhiễm sắc thể.

Các tế bào khả biến của chủng W3110 *cadA::FRT-cat-FRT* thu được theo cách như vậy được tạo ra theo phương pháp thông thường, và được biến nạp bằng plasmit hỗ trợ pCP20. Sau đó, các tế bào này được nuôi cấy trên đĩa ở nhiệt độ 30°C trên môi trường aga LB được bổ sung 50 mg/L ampicilin, nhờ đó chủng có khả năng kháng ampicilin được chọn lọc. Sau đó, để loại bỏ pCP20, các tế bào được cấy chuyển hai lần ở nhiệt độ 42°C trên môi trường aga LB. Các khuẩn lạc thu được được kiểm tra về khả năng kháng ampicilin và khả năng kháng cloramphenicol, và thu chủng nhạy

cloramphenicol/ampixilin, trong đó gen cat và pCP20 bị làm mất. Chủng này được ký hiệu là W3110 Δ cadA.

(1-2) Làm mất gen ldcC

Việc làm mất gen ldcC trong chủng *E. coli* W3110 Δ cadA được tiến hành theo phương pháp trong phần (1-1) ở trên sử dụng các đoạn mồi được thể hiện trong SEQ ID NO:78 và 79 làm đoạn mồi để làm mất ldcC. Nhờ đó, thu được chủng trong đó gen cadA và ldcC được làm mất. Chủng vi khuẩn đã tạo cấu trúc được ký hiệu là W3110 Δ LDC.

Ví dụ 6 và 7, ví dụ so sánh 4 (Tạo ra chủng *E. coli* tiết ra lysin decarboxylaza ngoại bào (thông qua con đường Sec và thông qua con đường Tat) và tạo ra chủng *E. coli* không tiết ra lysin decarboxylaza ngoại bào)

Chủng W3110 Δ LDC được biến nạp bằng plasmit pTM101, pTM65 và pTM66 theo phương pháp thông thường. Các chủng *E. coli* tái tổ hợp lần lượt được ký hiệu là chủng W3110 Δ LDC/pTM101 (chủng không có tiết ngoại bào) (Ví dụ so sánh 4), chủng W3110 Δ LDC/pTM65 (chủng có tiết ngoại bào: thông qua con đường Tat) (Ví dụ 6) và chủng W3110 Δ LDC/pTM66 (chủng có tiết ngoại bào: thông qua con đường Sec) (Ví dụ 7).

Ví dụ 8: Xác nhận việc tiết lysin decarboxylaza ngoại bào

Chủng W3110 Δ LDC/pTM101, chủng W3110 Δ LDC/pTM65 và chủng W3110 Δ LDC/pTM66 được nuôi cấy trong môi trường LB được bổ sung kanamycin, và mỗi môi trường nuôi cấy thu được được phân tách thành phần vi sinh vật và phần dịch nổi nuôi cấy bằng ly tâm. Phần vi sinh vật được đồng hóa theo phương pháp thông thường, để tạo ra dịch đồng hóa vi sinh vật. Hoạt tính lysin decarboxylaza trong dịch nổi nuôi cấy và dịch đồng hóa vi sinh vật thu được theo cách như vậy được xác định. Lấy hoạt

tính enzym mà theo đó L-lysin được chuyển hóa thành 1 nmol cadaverin trong 1 phút là 1 U, các kết quả được thể hiện trong bảng 4 dưới dạng hoạt tính riêng tính trên khối lượng protein.

[Bảng 4]

Tên vi sinh vật		Hoạt tính LDC [mU/mg]	
		Dịch đồng hóa vi sinh vật	Dịch nổi nuôi cấy
Chủng Δ LDC/pTM101	W3110	15700×10^3	0
Chủng Δ LDC/pTM65	W3110	18700×10^3	10×10^3
Chủng Δ LDC/pTM66	W3110	19700×10^3	12×10^3

Trong trường hợp của chủng W3110 Δ LDC/pTM101 và chủng W3110 Δ LDC/pTM65, vì dịch nổi nuôi cấy, mà là phần bên ngoài tế bào, có hoạt tính lysin decarboxylaza, có thể xác nhận rằng lysin decarboxylaza được tiết ra ngoài bào. Ngoài ra, có thể xác nhận được rằng tất cả các chủng này đều có lysin decarboxylaza trong dịch đồng hóa vi sinh vật của chúng. Ví dụ 9 và 10, ví dụ so sánh 5: Nuôi cấy vi sinh vật: Trường hợp khi vi sinh vật là *E. coli*

Chủng W3110 Δ LDC/pTM65 (Ví dụ 9), chủng W3110 Δ LDC/pTM66 (Ví dụ 10) và chủng W3110 Δ LDC/pTM101 + 20 m lysin decarboxylaza đã tinh chế (được tạo ra bằng phương pháp được mô tả trong JP 2004-000114 A) (Ví dụ so sánh 5) được nuôi cấy, và các chủng này được so sánh về khả năng sản xuất cadaverin.

Một vòng platin của mỗi chủng được cấy vào 5 ml môi trường LB được bổ sung kanamycin, và việc tiền nuôi cấy sơ bộ được tiến hành ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ có lắc. Toàn bộ thể tích của môi trường tiền nuôi cấy sơ bộ thu được được cấy vào 50 ml môi trường giống như trong môi trường tiền nuôi cấy sơ bộ, và việc nuôi cấy sơ bộ được tiến hành ở nhiệt độ

30°C với biên độ lắc là 30 cm ở tốc độ 120 vòng/phút trong 24 giờ. Sau đó, toàn bộ thể tích của môi trường nuôi cấy sơ bộ thu được được cấy vào 950 ml môi trường MS (môi trường nuôi cấy) được thể hiện trong bảng 5, và việc nuôi cấy được tiến hành trong điều kiện thông khí với không khí đã được khử trùng ở 0,20 vvm ở nhiệt độ 37°C ở tốc độ quay của cánh khuấy 800 vòng/phút ở độ pH được kiểm soát bằng 7,0 trong 50 giờ. Dung dịch axit nước sulfuric (3 M) và nước amoniac (3 M) được sử dụng làm chất trung hòa. Trong ví dụ so sánh 6, 20 mg lysin decarboxylaza đã tinh chế được bổ sung vào lúc bắt đầu nuôi cấy.

[Bảng 5]

Thành phần môi trường	Nồng độ cuối cùng
	[g/L]
Glucosa	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	16
PolyPepton S	10
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
FeSO ₂ ·7H ₂ O	0,01
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,01

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, vi sinh vật được loại bỏ bằng ly tâm ở nhiệt độ 4°C ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó là thu hồi dịch nổi nuôi cấy. Cadaverin và lysin trong dịch nổi nuôi cấy này được phân tích bằng HPLC. Sử dụng “Glucose Test Wako C” (nhãn hiệu đã được đăng ký) (do Wako Pure Chemical Industries, Ltd. sản xuất) để xác định nồng độ glucosa. Hiệu suất thu hồi cadaverin so với mức tiêu thụ glucosa ((khối lượng cadaverin được tạo ra / khối lượng glucosa đã tiêu thụ) × 100 (%)) được tính toán. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

	Ví dụ so sánh 5	Ví dụ 9	Ví dụ 10
	W3110 Δ LDC/pTM101 + Lysin decarboxylaza	W3110 Δ LDC/pTM65 (thông qua con đường Tat)	W3110 Δ LDC/pTM66 (thông qua con đường Sec)
Cadaverin [g/L]	0,57	1,52	1,72
Lysin [g/L]	0	0	0
Hiệu suất thu hồi cadaverin so với mức tiêu thụ glucoza [%]	1,42	3,86	4,3

Dựa trên so sánh giữa ví dụ so sánh 5 và ví dụ 9 và 10, ngay nhiên là có thể xác nhận được rằng việc nuôi cấy vi sinh vật tiết ra lysin decarboxylaza ngoại bào làm tăng lượng cadaverin tích lũy và hiệu suất thu hồi cadaverin so với mức tiêu thụ glucoza cao hơn, so với trường hợp khi lysin decarboxylaza được bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Ví dụ 11 và 12, ví dụ so sánh 6 và 7 (Nuôi cấy vi sinh vật: So sánh ảnh hưởng của việc bổ sung lysin)

Chủng W3110 Δ LDC/pTM65 (Ví dụ 11), chủng W3110 Δ LDC/pTM66 (Ví dụ 12), chủng W3110 Δ LDC/pTM101 (Ví dụ so sánh 6) và chủng W3110 Δ LDC/pTM101 + 20 mg lysin decarboxylaza đã tinh chế (được điều chế bằng phương pháp được mô tả trong JP 2004-000114 A) (Ví dụ so sánh 7) được so sánh về khả năng chuyển hóa lysin thành cadaverin. Mỗi vi sinh vật được nuôi cấy theo cùng cách như trong ví dụ 9 và 10 ngoại trừ rằng 62,5 g/L L-lysin hydroclorua được bổ sung vào môi trường MS (môi trường nuôi cấy). Sau 50 giờ nuôi cấy, vi sinh vật này được loại bỏ bằng ly tâm ở nhiệt độ 4°C ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 10 phút, và dịch nổi nuôi cấy được thu hồi. Cadaverin và lysin trong dịch nổi nuôi cấy này

được phân tích bằng HPLC. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7

	Ví dụ so sánh 6	Ví dụ so sánh 7	Ví dụ 11	Ví dụ 12
	W3110 Δ LDC/pTM10 1	W3110 Δ LDC/pTM10 1 + Lysin decarboxylaza	W3110 Δ LDC/pTM65 (thông qua con đường Tat)	W3110 Δ LDC/pTM66 (thông qua con đường Sec)
Cadaverin [g/L]	5,78	21,2	29,5	29,5
Lysin [g/L]	40,6	8,2	0	0
Tốc độ tạo ra cadaverin [g/L·giờ]	0,12	0,42	0,59	0,59

Dựa trên so sánh giữa ví dụ so sánh 6 và 7 và ví dụ 11 và 12, có thể xác nhận rằng hiệu quả tạo ra (tốc độ tạo ra) cadaverin cao hơn một cách đáng kể ở các sinh vật tiết ra lysin decarboxylaza ngoại bào. Nhờ điều này, đã thấy rằng việc bổ sung lysin trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật tiết ra lysin decarboxylaza ngoại bào cải thiện hiệu quả tạo ra cadaverin.

Ví dụ 13 và 14, ví dụ so sánh 8: Nuôi cấy vi sinh vật: so sánh với vi sinh vật có lysin decarboxylaza liên kết với bề mặt của nó

Các vi sinh vật tiết ra lysin decarboxylaza ngoại bào (sau đây được gọi là vi sinh vật tiết ra LDC) và chủng JM109/pTM16 được mô tả trong JP 2004-298033 A làm vi sinh vật có lysin decarboxylaza trên bề mặt của nó (sau đây được gọi là vi sinh vật trình diện LDC trên bề mặt tế bào) được nuôi cấy, và các chủng này được so sánh về khả năng sản xuất cadaverin.

Một vòng platin của mỗi trong số các chủng W3110 Δ LDC/pTM65 (Ví dụ 13), chủng W3110 Δ LDC/pTM66 (Ví dụ 14), và chủng JCM109/pTM16 (Ví dụ so sánh 8) được cấy vào 5 ml môi trường LB được bổ sung kanamycin (Môi trường LB được bổ sung ampicilin trong trường hợp của chủng JCM109/pTM16), và việc tiến nuôi cấy sơ bộ được tiến

hành ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ có lắc. Toàn bộ thể tích của môi trường tiền nuôi cấy sơ bộ thu được được cấy vào 50 ml của môi trường giống như trong môi trường tiền nuôi cấy sơ bộ, và việc nuôi cấy sơ bộ được tiến hành ở nhiệt độ 30°C với biên độ lắc là 30 cm ở tốc độ 120 vòng/phút trong 24 giờ. Sau đó, toàn bộ thể tích của môi trường nuôi cấy sơ bộ thu được được cấy vào 950 ml môi trường MS (môi trường nuôi cấy) được bổ sung isopropyl-thio- β -D-galactosit ở nồng độ cuối cùng bằng 1 mM, và việc nuôi cấy được tiến hành trong điều kiện thông khí bằng không khí đã được khử trùng ở 0,20 vvm ở nhiệt độ 37°C ở tốc độ quay của cánh khuấy bằng 800 vòng/phút ở độ pH được kiểm soát bằng 7,0 trong 50 giờ. Dung dịch axit nước sulfuric (3 M) và nước amoniac (3 M) được sử dụng làm chất trung hòa.

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, vi sinh vật được loại bỏ bằng ly tâm ở nhiệt độ 4°C ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó là thu hồi dịch nổi nuôi cấy. Cadaverin và lysin trong dịch nổi nuôi cấy này được phân tích bằng HPLC. Sử dụng “Glucose Test Wako C” (nhãn hiệu đã được đăng ký) (do Wako Pure Chemical Industries, Ltd. sản xuất) để xác định nồng độ glucoza. Tính toán hiệu suất thu hồi cadaverin so với mức tiêu thụ glucoza ((khối lượng cadaverin được tạo ra / khối lượng glucoza đã tiêu thụ) $\times$ 100 (%)). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8

	Ví dụ so sánh 8	Ví dụ 13	Ví dụ 14
	JCM109/pTM16 (trình diện trên bề mặt tế bào)	W3110 Δ LDC/pTM65 (thông qua con đường Tat)	W3110 Δ LDC/pTM66 (thông qua con đường Sec)
Cadaverin [g/L]	0,24	1,35	1,41
Lysin [g/L]	0,15	0	0
Hiệu suất thu hồi cadaverin	0,6	3,38	3,53

so với mức tiêu thụ glucoza [%]			
---------------------------------------	--	--	--

Dựa trên sự so sánh giữa ví dụ so sánh 8 và ví dụ 13 và 14, ngạc nhiên là có thể xác nhận rằng việc nuôi cấy vi sinh vật tiết ra LDC làm tăng nhiều hơn nồng độ của cadaverin tích lũy và hiệu suất thu hồi cadaverin so với mức tiêu thụ glucoza, so với trường hợp khi vi sinh vật trình diện LDC trên bề mặt tế bào được nuôi cấy.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Sáng chế có thể thích hợp được áp dụng để sản xuất cadaverin.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất cadaverin bao gồm bước:

nuôi cấy vi sinh vật đã được biến nạp bằng gen mã hóa lysin decarboxylaza mà tiết ngoại bào lysin decarboxylaza để làm tăng hiệu suất thu hồi cadaverin so với mức tiêu thụ glucoza, trong đó vi sinh vật này được chọn từ nhóm bao gồm *Corynebacterium glutamicum* và *E. coli*,

vi sinh vật này biểu hiện nội bào protein bao gồm lysin decarboxylaza có peptit tín hiệu tiết ra được gắn vào phía đầu N của trình tự axit amin của nó, lysin decarboxylaza này nhờ đó được tiết ngoại bào, và

peptit tín hiệu tiết ra là peptit được biểu thị bởi trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ trong số các SEQ ID NO: từ 13 đến 43 hoặc peptit có độ đồng nhất trình tự không nhỏ hơn 85% so với trình tự amino được nêu trong bất kỳ trong số các SEQ ID NO: từ 13 đến 43.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lysin được bổ sung vào môi trường để nuôi cấy vi sinh vật.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lysin decarboxylaza thu được từ *E. coli*.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này có cấu trúc gen bao gồm, theo hướng từ 5' đến 3' của trình tự axit nucleic, trình tự gen khởi đầu mà thực hiện chức năng ở vi sinh vật này, trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết ra và trình tự axit nucleic mã hóa lysin decarboxylaza, cấu trúc gen này cho phép biểu hiện nội bào protein bao gồm lysin decarboxylaza có peptit tín hiệu tiết ra được gắn vào phía đầu N của trình tự axit amin của nó.

5. Phương pháp theo điểm 2, trong đó lysin decarboxylaza thu được từ *E. coli*.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lysin decarboxylaza thu được từ *E. coli*.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó độ đồng nhất trình tự không nhỏ hơn 90%.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó độ đồng nhất trình tự không nhỏ hơn 95%.

9. Phương pháp sản xuất cadaverin bao gồm bước:

nuôi cấy vi sinh vật đã được biến nạp bằng gen mã hóa lysin decarboxylaza mà tiết ngoại bào lysin decarboxylaza để làm tăng hiệu suất thu hồi cadaverin so với mức tiêu thụ glucoza, trong đó vi sinh vật này được chọn từ nhóm bao gồm *Corynebacterium glutamicum* và *E. coli*,

vi sinh vật này biểu hiện nội bào protein bao gồm lysin decarboxylaza có peptit tín hiệu tiết ra được gắn vào phía đầu N của trình tự axit amin của nó, lysin decarboxylaza này nhờ đó được tiết ngoại bào,

peptit tín hiệu tiết ra là peptit được biểu thị bởi trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ trong số các SEQ ID NO: từ 13 đến 43 hoặc peptit có độ đồng nhất trình tự không nhỏ hơn 85% so với trình tự amino được nêu trong bất kỳ trong số các SEQ ID NO: từ 13 đến 43,

và vi sinh vật này có cấu trúc gen bao gồm, theo hướng từ 5' đến 3' của trình tự axit nucleic, trình tự gen khởi đầu mà thực hiện chức năng ở vi sinh vật này, trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu tiết ra và trình tự axit nucleic mã hóa lysin decarboxylaza, cấu trúc gen này cho phép biểu hiện nội bào protein bao gồm lysin decarboxylaza có peptit tín hiệu tiết ra được gắn vào phía đầu N của trình tự axit amin.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó độ đồng nhất trình tự không nhỏ hơn 90%.

11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó độ đồng nhất trình tự không nhỏ hơn 95%.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Toray Industries, Inc.

<120> Phương pháp sản xuất cadaverin

<130> 10112

<160> 79

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 29

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 1

gaagaattct aaacctcagc atctgcccc

29

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

gaaggatcca aaggacttgt ttaccgacgc

30

<210> 3

<211> 29

<212> ADN

<213> pHSG299

<400> 3

gaaccgcggc ctgaatcgcc ccatcatcc

29

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> pHSG299

<400> 4

gaaccatggc cccttgatt actg

24

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 5

gaaccatgga cgttattgca a 21

<210> 6
 <211> 30
 <212>ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 6
 gaaccgcggt tattttttgc tttcttcttt 30

<210> 7
 <211> 99
 <212>ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 7
 atgtctttat ctcgtcgtca attcattcaa gcttctggta ttgctttatg tgctgggtgct 60
 gttccttttaa aggcttctgc tatgaacgtt attgcaata 99

<210> 8
 <211> 60
 <212>ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 8
 ttgaatgaat tgacgacgag ataaagacat ggcacccctt gtattactgt ttatgtaagc 60

<210> 9
 <211> 35
 <212>ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 9
 ttcggatccc ctgaatcgcc ccatcatcca gccag 35

<210> 10
 <211> 35
 <212>ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 10
 gttgcatgct tattttttgc tttcttcttt caata 35

<210> 11
 <211> 120
 <212>ADN
 <213> Bacillus subtilis

<400> 11
 atgagaagca aaaaattgtg gatcagcttg ttgtttgcgt taacgttaat ctttacgatg 60
 gcgttcagca acatgtctgc gcaggctatg aacgttattg caatattgaa tcacatgggg 120

<210> 12
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

<400> 12
 caagctgatc cacaattttt tgcttctcat ggcacccctt gtattactgt ttatgtaagc 60

<210> 13
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 13

Met Asn Asn Asn Asp Leu Phe Gln Ala Ser Arg Arg Arg Phe Leu Ala
 1 5 10 15

Gln Leu Gly Gly Leu Thr Val Ala Gly Met Leu Gly Pro Ser Leu Leu
 20 25 30

Thr Pro Arg Arg Ala Thr Ala
 35

<210> 14
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 14

Met Ser Leu Ser Arg Arg Gln Phe Ile Gln Ala Ser Gly Ile Ala Leu
 1 5 10 15

Cys Ala Gly Ala Val Pro Leu Lys Ala Ser Ala
 20 25

<210> 15
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

<400> 15

Met Ala Tyr Asp Ser Arg Phe Asp Glu Trp Val Gln Lys Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Glu Ser Phe Gln Asn Asn Thr Phe Asp Arg Arg Lys Phe Ile Gln Gly
 20 25 30

Ala Gly Lys Ile Ala Gly Leu Ser Leu Gly Leu Thr Ile Ala Gln Ser
 35 40 45

<210> 16

<211> 34

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 16

Met Lys Phe Val Lys Arg Arg Thr Thr Ala Leu Val Thr Thr Leu Met
 1 5 10 15

Leu Ser Val Thr Ser Leu Phe Ala Leu Gln Pro Ser Ala Lys Ala Ala
 20 25 30

Glu His

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> *Arthrobacter globiformis*

<400> 17

Met Met Asn Leu Ser Arg Arg Thr Leu Leu Thr Thr Gly Ser Ala Ala
 1 5 10 15

Thr Leu Ala Tyr Ala Leu Gly Met Ala Gly Ser Ala Gln Ala
 20 25 30

<210> 18

<211> 25

<212> PRT

<213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<400> 18

Met Lys Arg Met Lys Ser Leu Ala Ala Ala Leu Thr Val Ala Gly Ala
 1 5 10 15

Met Leu Ala Ala Pro Val Ala Thr Ala
 20 25

<210> 19

<211> 48

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 19

Met Pro Ser Phe Lys Ser Ala Arg Trp Arg Met Asn Arg Arg Leu Phe
 1 5 10 15

Leu Gly Thr Ser Ala Ala Ile Ile Ala Val Gly Gly Val Leu Gly Gly
 20 25 30

Val Gln Val Val Pro Tyr Ile Ser Ser Gly Glu Ile Gln Thr Ser Ala
 35 40 45

<210> 20

<211> 35

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 20

Met Thr Ser Ser Phe Ser Arg Arg Gln Phe Leu Leu Gly Gly Leu Val
 1 5 10 15

Leu Ala Gly Thr Gly Ala Val Ala Ala Cys Thr Ser Asp Pro Gly Pro
 20 25 30

Ala Ala Ser
 35

<210> 21

<211> 35

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 21

Met Thr Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Pro Leu Ala Ser Asp Gly Cys
 1 5 10 15

Gly Cys Cys Ala Pro Ser Thr Pro Ser Ala Thr Val Ser Ala Pro Ala
 20 25 30

Val Ala Ala
 35

<210> 22
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 22

Met Arg Arg Pro Val Ser Arg Arg Ala Ile Phe Ala Thr Ser Val Leu
 1 5 10 15

Val Ala Gly Val Ser Ile Met Ser Pro Ser Ala Asn Ala
 20 25

<210> 23
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 23

Met Gln Ile Asn Arg Arg Gly Phe Leu Lys Ala Thr Ala Gly Leu Ala
 1 5 10 15

Thr Ile Gly Ala Ala Ser Met Phe Met Pro Lys Ala Asn Ala
 20 25 30

<210> 24
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 24

Val Arg Lys Gly Ile Ser Arg Val Leu Ser Val Ala Val Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Ile Gly Phe Gly Thr Val Leu Thr Gly Thr Gly Ile Ala Ala Ala
 20 25 30

<210> 25
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 25

Met Ala Gln Ile Ser Arg Arg His Phe Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Ala Thr Leu Ala Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ser Thr
 20 25 30

Ser Ser Ser
 35

<210> 26
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 26

Met Pro Gln Leu Ser Arg Arg Gln Phe Leu Gln Thr Thr Ala Val Thr
 1 5 10 15

Ala Gly Leu Ala Thr Phe Leu Gly Thr Pro Ala Arg Ala
 20 25

<210> 27
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 27

Met Val Asn Thr Leu Asn Ser Lys Thr Val Asn Val Pro Arg Phe Ala
 1 5 10 15

Arg Gly Val Val Ala Ala Ala Thr Ala Leu Phe Phe Gly Ala Leu Val
 20 25 30

Ser Leu Ala Pro Ser Ala Leu Ala

35

40

<210> 28
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 28

Met Thr Gln Pro Ala Pro Met Cys Ser Arg Arg Met Phe Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Thr Ala Thr Thr Phe Ala Gly Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gly Thr Glu
 20 25 30

Pro Asp Gln Glu Val Ala
 35

<210> 29
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 29

Met Lys Asn Ser Lys Leu Leu Leu Ile Ala Ala Val Ser Thr Ala Ser
 1 5 10 15

Ile Leu Leu Ala Ser Cys
 20

<210> 30
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 30

Met Arg Thr Ser Arg Val Leu Ala Gly Ile Leu Ala Ala Thr Leu Thr
 1 5 10 15

Val Ser Leu Ala Ala Cys
 20

<210> 31
 <211> 24

<212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 31

Val Ser Lys Ile Ser Thr Lys Leu Lys Ala Leu Ser Ala Val Leu Ser
 1 5 10 15

Val Thr Thr Leu Val Ala Gly Cys
 20

<210> 32
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 32

Met Phe Lys Leu Ser Lys Pro Ser Lys Ser Met Arg Val Ala Val Ser
 1 5 10 15

Thr Leu Ala Ile Ser Thr Leu Ala Leu Val Gly Cys
 20 25

<210> 33
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 33

Met Thr Leu Lys Lys Ser Leu Ala Val Thr Thr Ala Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Ala Ala Cys
 20

<210> 34
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 34

Met Ser Ile Ser Arg Thr Val Phe Gly Ile Ala Ala Thr Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Ser Ala Ala Leu Val Ala Cys
20

<210> 35
<211> 29
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 35

Val Arg Val Phe Arg Gly Arg Arg Gly Ala Val Ala Gly Ser Phe Leu
1 5 10 15

Ala Val Leu Ala Ile Gly Ser Leu Ala Leu Thr Gly Cys
20 25

<210> 36
<211> 21
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 36

Met Ala Asp Met Lys Lys Leu Leu Trp Thr Leu Pro Ile Leu Pro Leu
1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Cys
20

<210> 37
<211> 30
<212> PRT
<213> Brevibacterium sp.

<400> 37

Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Ala Ala Ile Pro Ala Phe Ala
20 25 30

<210> 38
<211> 40
<212> PRT
<213> Bacillus subtilis

<400> 38

Met Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
 1 5 10 15

Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Met Asn Val
 20 25 30

Ile Ala Ile Leu Asn His Met Gly
 35 40

<210> 39

<211> 31

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 39

Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val
 1 5 10 15

Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala
 20 25 30

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 40

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala
 20

<210> 41

<211> 26

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 41

Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala
20 25

<210> 42
<211> 45
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 42

Met Lys Thr Lys Ile Pro Asp Ala Val Leu Ala Ala Glu Val Ser Arg
1 5 10 15

Arg Gly Leu Val Lys Thr Thr Ala Ile Gly Gly Leu Ala Met Ala Ser
20 25 30

Ser Ala Leu Thr Leu Pro Phe Ser Arg Ile Ala His Ala
35 40 45

<210> 43
<211> 45
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 43

Met Asn Asn Glu Glu Thr Phe Tyr Gln Ala Met Arg Arg Gln Gly Val
1 5 10 15

Thr Arg Arg Ser Phe Leu Lys Tyr Cys Ser Leu Ala Ala Thr Ser Leu
20 25 30

Gly Leu Gly Ala Gly Met Ala Pro Lys Ile Ala Trp Ala
35 40 45

<210> 44
<211> 117
<212>ADN
<213> Escherichia coli

<400> 44
atgaataata atgatttatt ccaagcttct cgctcgctggt tcttagctca attaggtggt 60
ttaactgttg ctggtatggt aggtccttct ttattaactc ctgctcgctgc tactgct 117

<210> 45
 <211> 81
 <212>ADN
 <213> *Escherichia coli*

<400> 45
 atgtctttat ctcgtcgtca attcattcaa gcttctggta ttgctttatg tgctgggtgct 60
 gttccttttaa aggcttctgc t 81

<210> 46
 <211> 144
 <212>ADN
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 46
 atggcttatg attctcgttt cgatgagtgg gttcaaaagt taaaggagga gtctttccaa 60
 aataatactt tcgatcgtcg taagttcatt caaggtgctg gtaagattgc tggtttatct 120
 ttaggttttaa ctattgctca atct 144

<210> 47
 <211> 102
 <212>ADN
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 47
 atgaagttcg ttaagcgtcg tactactgct ttagttacta ctttaatggt atctgttact 60
 tctttattcg ctttacaacc ttctgctaag gctgctgagc at 102

<210> 48
 <211> 90
 <212>ADN
 <213> *Arthrobacter globiformis*

<400> 48
 atgatgaatt tatctcgtcg tactttatta actactgggt ctgctgctac tttagcttat 60
 gcttttaggta tggctgggtc tgctcaagct 90

<210> 49
 <211> 75
 <212>ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<400> 49
 atgaagcgta tgaagtcttt agctgctgct ttaactgttg ctggtgctat gttagctgct 60

cctggttgcta ctgct 75

<210> 50

<211> 144

<212>ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 50

atgccttctt tcaagtctgc tcggtggcgt atgaatcgtc gtttattctt aggtacttct 60

gctgctatta ttgctgttg tggtgtttta ggtggtgttc aagttgttcc ttatatttct 120

tctggtgaga ttcaaacttc tgct 144

<210> 51

<211> 105

<212>ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 51

atgacttctt ctttctctcg tcgtcaattc ttattaggtg gtttagtttt agctgggtact 60

ggtgctgttg ctgcttgtag ttctgaccc ggtcctgctg cttct 105

<210> 52

<211> 105

<212>ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 52

atgactactc ctacttctcc tttattacct ttagcttctg atggttggtg ttgttggtgct 60

ccttctactc cttctgctac tgtttctgct cctgctgttg ctgct 105

<210> 53

<211> 87

<212>ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 53

atgcgtcgtc ctgtttctcg tcgtgctatt ttcgctactt ctgttttagt tgctgggtgtt 60

tctattatgt ctccttctgc taatgct 87

<210> 54

<211> 90

<212>ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 54
 atgcaaatta atcgtcgtgg tttcttaaag gctactgctg gtttagctac tattggtgct 60
 gcttctatgt tcatgcctaa ggctaagtct 90

<210> 55
 <211> 93
 <212>ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 55
 gttcgtaagg gtatttctcg tgttttatct gttgctgttg cttcttctat tggtttcggt 60
 actgttttaa ctggtactgg tattgctgct gct 93

<210> 56
 <211> 105
 <212>ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 56
 atggctcaaa tttctcgtcg tcatttctta gctgctgcta ctgttgctgg tgctgggtgct 60
 acttttagctg cttgtgctgg tactgggtgg tctacttctt cttct 105

<210> 57
 <211> 87
 <212>ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 57
 atgcctcaat tatctcgtcg tcaattctta caaactactg ctgttactgc tggtttagct 60
 actttcttag gtactcctgc tcgtgct 87

<210> 58
 <211> 120
 <212>ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 58
 atgggtaata ctttaaattc taagactgtt aatgttcctc gtttcgctcg tgggtgttgtt 60
 gctgctgcta ctgctttatt cttcggtgct ttagtttctt tagctccttc tgcttttagct 120

<210> 59
 <211> 114
 <212>ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 59
 atgactcaac ctgctcctat gtgttctcgt cgtatgttct tattaggtac tgctactact 60
 ttcgctggtg ctttcttagc tgcttgtggt actgagcctg atcaagaggt tgct 114

<210> 60
 <211> 66
 <212>ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 60
 atgaagaatt ctaagttatt attaatgtct gctgtttcta ctgcttctat tttattagct 60
 tcttgt 66

<210> 61
 <211> 66
 <212>ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 61
 atgctgactt ctcgtgtttt agctgggtatt ttagctgcta ctttaactgt ttcttttagct 60
 gcttgt 66

<210> 62
 <211> 72
 <212>ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 62
 gtttctaaga tttctactaa gttaaaggct ttatctgctg ttttatctgt tactacttta 60
 gttgctgggt gt 72

<210> 63
 <211> 84
 <212>ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 63
 atgttcaagt tatctaagcc ttctaagtct atgctgtgtg ctgtttctac ttttagctatt 60
 tctacttttag ctttagttgg ttgt 84

<210> 64
 <211> 66
 <212>ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 64

atgacttttaa agaagtcttt agctgttact actgctgctg ctttagcttt atcttttagct 60

gcttgt 66

<210> 65

<211> 69

<212>ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 65

atgtctatatt ctcgtactgt tttcgggtatt gctgctactg ctgctttatc tgctgcttta 60

gttgcttgt 69

<210> 66

<211> 87

<212>ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 66

gttcgtgttt tccgtggctg tcgtgggtgct gttgctgggt ctttcttagc tgtttttagct 60

attggttctt tagctttaac tggttgt 87

<210> 67

<211> 63

<212>ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 67

atggctgata tgaagaagtt attatggact ttacctatatt taccttttagt ttttagctggt 60

tgt 63

<210> 68

<211> 90

<212>ADN

<213> Brevibacterium sp.

<400> 68

atgttcaata atcgtattcg tactgctgct ttagctgggt ctttagctat ttctactgct 60

gcttctgggtg ctgctattcc tgctttcgt 90

<210> 69

<211> 120

<212>ADN

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 69

atgcgttcta agaagttatg gatttcttta ttattcgctt taactttaat ttctactatg 60

gctttctcta atatgtctgc tcaagctatg aatgttattg ctattttaaa tcatatgggt 120

<210> 70

<211> 93

<212>ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 70

atgcgtattc gtcgtcgtgc tttagttttc gctactatgt ctgctgtttt atgtactgct 60

ggtttcatgc cttctgctgg tgaggctgct gct 93

<210> 71

<211> 63

<212>ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 71

atgaagaaga ctgctattgc tattgctgtt gctttagctg gtttcgctac tgttgctcaa 60

gct 63

<210> 72

<211> 78

<212>ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 72

atgaagatta agactgggtgc tcgtatttta gctttatctg ctttaactac tatgatgttc 60

tctgcttctg ctttagct 78

<210> 73

<211> 135

<212>ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 73

atgaagacta agattcctga tgctgtttta gctgctgagg tttctcgctg tggtttagtt 60

aagactactg ctattgggtg tttagctatg gcttcttctg ctttaacttt acctttctct 120

cgtattgctc atgct 135

<210> 74
 <211> 135
 <212>ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 74
 atgaataatg aggagacttt ctatcaagct atgcgtcgtc aagggtgttac tcgtcgtttct 60
 ttcttaaagt attgttcttt agctgctact tctttaggtt taggtgctgg tatggctcct 120
 aagattgctt gggct 135

<210> 75
 <211> 34
 <212>ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 75
 gaagttccta tactttctag agaataggaa cttc 34

<210> 76
 <211> 70
 <212>ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 76
 cattttgtcc catgtgttg gaggggcctt ttttacctgg agatatgact gtgtaggctg 60
 gagctgcttc 70

<210> 77
 <211> 70
 <212>ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 77
 cttatgagca aaaaaggga gtggcaagcc acttcccttg tacgagctaa catatgaata 60
 tcctccttag 70

<210> 78
 <211> 70
 <212>ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 78
 ccacggtttg agcaggctat gattaaggaa ggattttcca ggaggaacac gtgtaggctg 60
 gagctgcttc 70

<210> 79

<211> 69

<212>ADN

<213> Escherichia coli

<400> 79

tcctttatatt gttaacagca cggtactcgc ccggaagccg ctctggcaag catatgaata 60

tccttcctta 69