



(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) 
1-0022375

(51)⁷ **C07K 14/34, C12N 1/20, C12R 1/15, C12P** (13) **B**
13/14

(21)	1-2015-01198	(22)	13.05.2014		
(86)	PCT/JP2014/062752	13.05.2014	(87)	WO2014/185430A1	20.11.2014
(30)	2013-101589	13.05.2013	JP		
	2013-219274	22.10.2013	JP		
(45)	25.12.2019	381	(43)	25.06.2015	327
(73)	AJINOMOTO CO., INC. (JP) 15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-8315 Japan				
(72)	HIRANO, Seiko (JP), HAYASHI, Kazuyuki (JP)				
(74)	Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)				

(54) **PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT AMIN DẠNG L**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất axit amin dạng L. Axit amin dạng L được sản xuất bằng cách nuôi cấy vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất axit amin dạng L, mà được biến đổi để hoạt tính của thể vận chuyển phosphat được tăng cường, trong môi trường nuôi cấy, và thu gom axit amin dạng L từ môi trường này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất axit L-glutamic sử dụng vi khuẩn coryneform theo điểm 1 hoặc điểm 6. Các axit amin dạng L là hữu dụng trong công nghiệp làm chất phụ gia cho thức ăn chăn nuôi, các thành phần cho gia vị, thực phẩm và đồ uống, dịch truyền chứa axit amin, và v.v..

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các axit amin dạng L được sản xuất ở quy mô công nghiệp bằng, ví dụ, phương pháp lên men sử dụng các vi sinh vật khác nhau có khả năng sản xuất axit amin dạng L. Các ví dụ về phương pháp sản xuất axit amin dạng L bằng cách lên men bao gồm, ví dụ, phương pháp sử dụng vi sinh vật kiểu đại (chủng kiểu đại), phương pháp sử dụng chủng khuyết dưỡng bắt nguồn từ chủng kiểu đại, phương pháp sử dụng chủng đột biến điều hòa cơ chế trao đổi chất có nguồn gốc như là chủng đột biến kháng nhiều loại thuốc khác nhau từ chủng kiểu đại, và phương pháp sử dụng chủng có các đặc trưng như có ở cả hai chủng khuyết dưỡng và chủng đột biến điều hòa cơ chế trao đổi chất.

Ngoài ra, trong những năm gần đây, các vi sinh vật mà khả năng sản xuất axit amin dạng L của nó được cải thiện bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp được sử dụng để sản xuất axit amin dạng L. Các ví dụ về các phương pháp cải thiện khả năng sản xuất axit amin dạng L của vi sinh vật bao gồm, ví dụ, cải thiện sự biểu hiện của gen mã hóa cho enzym sinh tổng hợp axit amin dạng L (các tài liệu sáng chế 1 và 2), và làm tăng dòng vào của nguồn cacbon vào trong hệ sinh tổng hợp axit amin dạng L (tài liệu sáng chế 3).

WO02/22671 mô tả viễn cảnh ức chế gen pstC2 trong quá trình sản xuất bằng cách lên men axit amin, cụ thể là L-lysine.

WO2015/050276 mô tả phương pháp sản xuất axit amin dạng L, như arginin hoặc histidin, sử dụng E.coli bị mất gen pitA.

Escherichia coli có ít nhất hai loại hệ thống hấp thu phosphat vô cơ (tài liệu phi sáng chế 1). Một là hệ thống vận chuyển phosphat vô cơ (Pit) ái lực

thấp, và hệ thống còn lại là hệ thống vận chuyển đặc hiệu phosphat (Pst) ái lực cao. Để làm gen mã hóa hệ Pit, gen *pitA* và gen *pitB* là đã được biết. Để làm gen mã hóa hệ Pst, các gen *pstSCAB* đã được biết. Các sản phẩm của gen *pstSCAB* tạo ra phức chất để thực hiện chức năng như hệ Pst. Tuy nhiên, mối liên quan giữa hoạt tính của các thể vận chuyển phosphat này và quá trình sản xuất axit amin dạng L là chưa được biết.

Tài liệu tình trạng kỹ thuật

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: patent Mỹ số 5,168,056

Tài liệu sáng chế 2: patent Mỹ số 5,776,736

Tài liệu sáng chế 3: patent Mỹ số 5,906,925

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: R.M. Harris et al., Journal of Bacteriology, Sept. 2001, pp.5008-5014

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích đạt được bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là phát triển kỹ thuật mới để cải thiện khả năng sản xuất axit amin dạng L của vi khuẩn coryneform, và nhờ đó đề xuất phương pháp sản xuất có hiệu quả axit L-glutamic.

Cách thức để đạt được mục đích của sáng chế

Tác giả của sáng chế đã tiến hành nhiều nghiên cứu khác nhau để đạt được mục đích nêu trên. Kết quả là, các tác giả đã khám phá ra rằng khả năng sản xuất axit L-glutamic của vi khuẩn coryneform có thể được cải thiện bằng cách biến đổi vi khuẩn coryneform sao cho hoạt tính của thể vận chuyển phosphat *pitA* tăng lên, và đã hoàn thành sáng chế.

Tức là, sáng chế có thể được đề cập dưới dạng các phương án, ví dụ, như sau.

[1]

Phương pháp sản xuất axit L-glutamic bao gồm các bước:

nuôi cấy vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất axit amin dạng L

trong môi trường nuôi cấy; và

thu gom axit amin dạng L từ môi trường này,

trong đó vi khuẩn này được biến đổi sao cho hoạt tính protein *pitA* của thể vận chuyển phosphat tăng lên.

[2]

Phương pháp được đề cập trên đây, trong đó hoạt tính của thể vận chuyển phosphat được làm tăng bằng cách làm tăng sự biểu hiện của gen *pitA* mã hóa thể vận chuyển phosphat này.

[3]

Phương pháp được đề cập trên đây, trong đó gen *pitA* là ADN được xác định theo (a) hoặc (b) sau:

- (a) ADN bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 hoặc 25,
- (b) ADN có thể lai hóa dưới các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự bổ sung với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 hoặc 25 hoặc với đoạn dò mà có thể được tạo ra từ trình tự bổ sung này, và trong đó ADN có thể lai hóa này mã hóa protein có hoạt tính vận chuyển phosphat.

[4]

Phương pháp được đề cập trên đây, trong đó gen *pitA* là ADN mã hóa protein được xác định theo (A) hoặc (B) sau:

- (A) protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 hoặc 26,
- (B) protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 hoặc 26 nhưng bao gồm sự thay thế, mất đoạn, xen đoạn, hoặc bổ sung một hoặc một vài gốc axit amin, và trong đó protein này có hoạt tính vận chuyển phosphat.

[5]

Phương pháp được đề cập trên đây, trong đó sự biểu hiện của gen này được tăng cường bằng cách làm tăng số bản sao của gen, và/hoặc bằng cách biến đổi trình tự kiểm soát sự biểu hiện của gen này.

[6]

Phương pháp được đề cập trên đây, trong đó hoạt tính của thể vận chuyển

phosphat được làm tăng bằng cách làm cho vi khuẩn này chứa gen pitA đột biến mã hóa thể vận chuyển phosphat có sự đột biến mà gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc axit amin khác gốc phenylalanin.

[7]

Phương pháp được đề cập trên đây, trong đó gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc serin.

[8]

Phương pháp sản xuất axit L-glutamic bao gồm các bước:

nuôi cấy vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất axit amin dạng L trong môi trường nuôi cấy; và

thu gom axit amin dạng L từ môi trường này,

trong đó vi khuẩn này chứa gen pitA đột biến mã hóa thể vận chuyển phosphat có sự đột biến mà gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc axit amin khác gốc phenylalanin.

[9]

Phương pháp được đề cập trên đây, trong đó gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc serin.

[10]

Phương pháp được đề cập trên đây, trong đó vi khuẩn này là vi khuẩn *Corynebacterium*.

[11]

Phương pháp được đề cập trên đây, trong đó vi khuẩn này là *Corynebacterium glutamicum*.

[12]

Phương pháp được đề cập trên đây, trong đó axit L-glutamic là monoamoni L-glutamat hoặc mononatri L-glutamat.

[13]

ADN mã hóa thể vận chuyển phosphat có sự đột biến mà gốc axit amin

tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc serin.

[14]

Vì khuẩn coryneform chứa gen *pitA* đột biến mã hóa thể vận chuyển phosphat có sự đột biến mà gốc axit amin tương ứng gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc serin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được giải thích chi tiết.

Phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất axit L-glutamic bao gồm bước nuôi cấy vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất axit L-glutamic trong môi trường nuôi cấy, và thu gom axit L-glutamic từ môi trường này, trong đó vi khuẩn này được biến đổi sao cho hoạt tính của protein *pitA* của thể vận chuyển phosphat được tăng lên.

<1> Vi khuẩn sử dụng theo sáng chế

Vi khuẩn sử dụng theo sáng chế là vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất axit L-glutamic, mà được biến đổi để hoạt tính của protein *pitA* của thể vận chuyển phosphat được tăng lên.

Sáng chế cũng đề cập đến vi khuẩn coryneform chứa gen *pitA* đột biến mã hóa cho thể vận chuyển phosphat có sự đột biến mà gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc serin.

<1-1> Vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất axit L-glutamic

Trong phần mô tả này, "vi khuẩn có khả năng sản xuất axit L-glutamic" đề cập đến vi khuẩn có khả năng tạo ra và tích lũy axit L-glutamic trong môi trường hoặc các tế bào của vi khuẩn ở mức độ mà axit L-glutamic có thể được thu gom, khi vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy. Vi khuẩn có khả năng sản xuất axit L-glutamic có thể là vi khuẩn mà có thể tích lũy axit L-glutamic trong môi trường nuôi cấy với lượng lớn hơn lượng có thể thu được bằng chủng không được biến đổi. Các ví dụ về chủng không được biến đổi bao gồm các chủng kiểu dại và các chủng gốc. Vi khuẩn có khả năng sản xuất axit L-glutamic có thể là vi khuẩn mà có thể tích lũy axit L-glutamic trong môi trường

nuôi cấy với lượng tốt hơn là 0,5 g/l hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 1,0 g/l hoặc lớn hơn.

Các ví dụ về axit amin dạng L bao gồm các axit amin bazơ như L-lysin, L-ornithin, L-arginin, L-histidin, và L-citrulin; các axit amin béo như L-isoleuxin, L-alanin, L-valin, L-leuxin, và glyxin; các axit amin mà là các axit hydroxy-monoaminocarboxylic như L-threonin và L-serin; các axit amin vòng như L-prolin; các axit amin thơm như L-phenylalanin, L-tyrosin, và L-tryptophan; các axit amin chứa lưu huỳnh như L-xystein, L-xystin, và L-methionin; các axit amin axit như axit L-glutamic và axit L-aspartic; và các axit amin có nhóm amit trong mạch nhánh như L-glutamin và L-asparagin. Vi khuẩn theo sáng chế có thể có khả năng sản xuất hai loại axit amin hoặc nhiều hơn.

Trong phần mô tả này, axit amin là axit amin dạng L trừ khi được chỉ định theo cách khác. Axit amin dạng L có thể là hợp chất tự do, muối của nó, hoặc hỗn hợp của nó. Tức là, theo sáng chế, thuật ngữ “axit amin dạng L” có nghĩa là axit amin dạng L ở dạng tự do, muối của nó, hoặc hỗn hợp của nó. Các ví dụ về muối bao gồm, ví dụ như sulfat, hydroclorua, carbonat, muối amoni, muối natri và muối kali. L-lysin có thể là, ví dụ như L-lysin ở dạng tự do, muối hydroclorua của L-lysin, muối carbonat của L-lysin, hoặc hỗn hợp của chúng. Hơn nữa, axit L-glutamic có thể là, ví dụ như axit L-glutamic ở dạng tự do, mononatri glutamat (MSG), monoamoni glutamat hoặc hỗn hợp của chúng.

Các ví dụ về vi khuẩn coryneform bao gồm vi khuẩn thuộc họ *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, hoặc loại tương tự.

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform bao gồm các loài sau.

Corynebacterium acetoacidophilum

Corynebacterium acetoglutamicum

Corynebacterium alkanolyticum

Corynebacterium callunae

Corynebacterium glutamicum

Corynebacterium lilium

Corynebacterium melassecola

Corynebacterium thermoaminogenes (*Corynebacterium efficiens*)

Corynebacterium herculis

Brevibacterium divaricatum (*Corynebacterium glutamicum*)

Brevibacterium flavum (*Corynebacterium glutamicum*)

Brevibacterium immariophilum

Brevibacterium lactofermentum (*Corynebacterium glutamicum*)

Brevibacterium roseum

Brevibacterium saccharolyticum

Brevibacterium thiogenitalis

Corynebacterium ammoniagenes (*Corynebacterium stationis*)

Brevibacterium album

Brevibacterium cerinum

Microbacterium ammoniophilum

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform bao gồm các chủng sau.

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060, ATCC 13869, FERM BP-734

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

Corynebacterium efficiens (*Corynebacterium thermoaminogenes*) AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) ATCC 13826, ATCC 14067, AJ12418 (FERM BP-2205)

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC

13869

Brevibacterium roseum ATCC 13825*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066*Brevibacterium thiogenitalis* ATCC 19240*Corynebacterium ammoniagenes* (*Corynebacterium stationis*) ATCC 6871, ATCC 6872*Brevibacterium album* ATCC 15111*Brevibacterium cerinum* ATCC 15112*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354

Vi khuẩn *Corynebacterium* bao gồm vi khuẩn mà đã được phân loại trước đó thành họ *Brevibacterium*, nhưng hiện tại được hợp nhất vào trong họ *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1991)). Hơn thế nữa, *Corynebacterium stationis* bao gồm vi khuẩn mà được phân loại trước đó vào họ *Corynebacterium ammoniagenes*, nhưng hiện tại được phân loại lại vào họ *Corynebacterium stationis* dựa trên việc phân tích trình tự nucleotit 16S rRNA, v.v. (Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 874-879 (2010)).

Các chủng này có sẵn từ, ví dụ, Viện giống chuẩn Mỹ (địa chỉ: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America). Tức là, các số đăng ký được gán cho các chủng tương ứng, và các chủng này có thể được sắp xếp bằng cách sử dụng số đăng ký này (tham khảo: <http://www.atcc.org/>). Các số đăng ký của các chủng này được liệt kê trong danh mục của Viện giống chuẩn Mỹ.

Vi khuẩn có thể là chính vi khuẩn có khả năng sản xuất axit L-glutamic, hoặc có thể là vi khuẩn được biến đổi sao cho nó có khả năng sản xuất axit L-glutamic. Vi khuẩn có khả năng sản xuất axit L-glutamic có thể thu được bằng cách truyền khả năng sản xuất axit L-glutamic vào vi khuẩn như được đề cập trên đây, hoặc bằng cách làm tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic của vi khuẩn này như được đề cập trên đây.

Để truyền hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic, các phương pháp thường được sử dụng trong quá trình nhân giống các chủng sản xuất axit

amin của vi khuẩn coryneform, vi khuẩn *Escherichia*, và v.v. (xem tài liệu: "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center (Ltd.), chỉnh sửa lần 1, công bố ngày 30 tháng 5 năm 1986, trang 77-100) có thể được sử dụng. Các ví dụ về các phương pháp này bao gồm, ví dụ, phương pháp thu nhận chủng đột biến khuyết dưỡng, thu nhận chủng kháng chất tương tự axit amin dạng L, thu nhận chủng đột biến điều hòa cơ chế trao đổi chất, và thiết kế ra chủng tái tổ hợp trong đó hoạt tính của enzym sinh tổng hợp axit amin dạng L được tăng cường. Trong quá trình nhân giống vi khuẩn sản xuất axit amin dạng L, một trong các tính chất được mô tả trên đây như khuyết dưỡng, kháng chất tương tự, và đột biến điều hòa quá trình trao đổi chất có thể được truyền riêng rẽ, hoặc hai hoặc ba hoặc nhiều tính chất này có thể được truyền ở dạng kết hợp. Hoạt tính của một trong các enzym sinh tổng hợp axit amin dạng L có thể được làm tăng riêng rẽ, hoặc các hoạt tính của hai hoặc ba hoặc nhiều các enzym này có thể được làm tăng kết hợp. Hơn thế nữa, việc truyền (các) đặc tính như khuyết dưỡng, kháng chất tương tự, và đột biến điều hòa quá trình trao đổi chất có thể được kết hợp với việc tăng cường (các) hoạt tính của (các) enzym sinh tổng hợp.

Chủng đột biến khuyết dưỡng, chủng kháng chất tương tự axit amin dạng L, hoặc chủng đột biến điều hòa cơ chế trao đổi chất có khả năng sản xuất axit amin dạng L có thể thu được bằng cách đưa chủng gốc hoặc chủng kiểu đại trải qua quá trình xử lý gây đột biến thông thường, và sau đó lựa chọn chủng thể hiện đặc tính khuyết dưỡng, kháng chất tương tự, hoặc đột biến điều hòa quá trình trao đổi chất, và có khả năng sản xuất axit amin dạng L từ các chủng đột biến thu được này. Các ví dụ về quá trình xử lý gây đột biến thông thường bao gồm chiếu xạ tia X hoặc tia cực tím và xử lý bằng tác nhân gây đột biến như N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), etyl metansulfonat (EMS), và metyl metansulfonat (MMS).

Khả năng sản xuất axit amin dạng L cũng có thể được truyền hoặc làm tăng bằng cách làm tăng hoạt tính của enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp axit amin dạng L đích. Hoạt tính enzym có thể được làm tăng bằng cách, ví dụ, biến đổi vi khuẩn sao cho sự biểu hiện của gen mã hóa enzym này được tăng

cường. Các phương pháp làm tăng sự biểu hiện này được mô tả trong WO00/18935, EP 1010755 A, và v.v.. Các phương pháp chi tiết để làm tăng hoạt tính của enzym sẽ được mô tả dưới đây.

Hơn nữa, khả năng sản xuất axit amin dạng L cũng có thể được truyền hoặc làm tăng bằng cách làm giảm hoạt tính của enzym mà xúc tác phản ứng phân nhánh từ con đường sinh tổng hợp của axit amin dạng L đích để tạo ra hợp chất khác axit amin dạng L đích. "Enzym mà xúc tác phản ứng phân nhánh từ con đường sinh tổng hợp của axit amin dạng L đích để tạo ra hợp chất khác axit amin dạng L đích" được đề cập ở đây bao gồm enzym tham gia vào quá trình phân hủy axit amin đích này. Phương pháp làm giảm hoạt tính của enzym sẽ được mô tả dưới đây.

Dưới đây, vi khuẩn sản xuất axit amin dạng L và phương pháp truyền hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit amin dạng L sẽ được mô tả một cách cụ thể. Toàn bộ các đặc tính của vi khuẩn sản xuất axit amin dạng L và các phương pháp biến đổi để truyền hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit amin dạng L có thể được sử dụng một cách độc lập hoặc ở dạng kết hợp một cách thích hợp.

<Vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic>

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và các chủng gốc để thu được chúng bao gồm các chủng trong đó hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ các enzym sinh tổng hợp axit L-glutamic là được tăng cường. Các ví dụ về các enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, glutamat dehydrogenaza (*gdhA*), glutamin synthetaza (*glnA*), glutamat synthetaza (*gltBD*), isoxitrat dehydrogenaza (*icdA*), aconitat hydrataza (*acnA*, *acnB*), xitrat syntaza (*gltA*), metylxitrat syntaza (*prpC*), phosphoenolpyruvat carboxylaza (*ppc*), pyruvat dehydrogenaza (*aceEF*, *lpdA*), pyruvat kinaza (*pykA*, *pykF*), phosphoenolpyruvat syntaza (*ppsA*), enolaza (*eno*), phosphoglyxeromutaza (*pgmA*, *pgmI*), phosphoglyxerat kinaza (*pgk*), glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (*gapA*), trioza phosphat isomeraza (*tpiA*), fructoza bisphosphat aldolaza (*fbp*), phosphofructokinaza (*pfkA*, *pfkB*), glucoza phosphat isomeraza (*pgi*), 6-phosphogluconat dehydrataza (*edd*), 2-

keto-3-deoxy-6-phosphogluconat aldolaza (*eda*), và transhydrogenaza. Được thể hiện trong dấu ngoặc đơn sau tên của enzym là tên của gen mã hóa enzym đó (các dạng thể hiện tương tự cũng sẽ được áp dụng cho các trường hợp tương tự ở đây). Tốt hơn, nếu làm tăng hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym được chọn từ, ví dụ, glutamat dehydrogenaza, xitrat syntaza, phosphoenol pyruvat carboxylaza, và metylxitrat syntaza, trong số các enzym này.

Các ví dụ về vi khuẩn coryneform được biến đổi sao cho sự biểu hiện của gen glutamat synthetaza (*gltBD*) được tăng cường bao gồm các vi khuẩn được bộc lộ trong WO99/07853.

Ngoài ra, các ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và các chủng gốc để thu được chúng cũng bao gồm các chủng trong đó hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều loại enzym mà xúc tác phản ứng phân nhánh từ con đường sinh tổng hợp của axit L-glutamic để tạo ra hợp chất khác axit L-glutamic bị giảm hoặc biến mất. Các ví dụ về các enzym này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, isoxitrat lyaza (*aceA*), α -ketoglutarat dehydrogenaza (*sucA*, *odhA*), phosphotransaxetylaza (*pta*), axetat kinaza (*ack*), axit axetohydroxy syntaza (*ilvG*), axetolactat syntaza (*ilvI*), format axetyltransferaza (*pfl*), lactat dehydrogenaza (*ldh*), glutamat decarboxylaza (*gadAB*), succinat dehydrogenaza (*sdhABCD*), và 1-pyrolin-5-carboxylat dehydrogenaza (*putA*).

Vi khuẩn coryneform trong đó hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza bị giảm hoặc biến mất, và phương pháp thu được chúng được bộc lộ trong WO2008/075483. Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform trong đó hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza bị giảm hoặc biến mất bao gồm, ví dụ, các chủng sau.

Chủng *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) L30-2 (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2006-340603)

Chủng *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) Δ S (WO95/34672)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12821

(FERM BP-4172, Patent Pháp số 9401748)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ12822 (FERM BP-4173, Patent Pháp số 9401748)

Corynebacterium glutamicum AJ12823 (FERM BP-4174, Patent Pháp số 9401748)

Chủng *Corynebacterium glutamicum* L30-2 (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2006-340603)

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và các chủng gốc để thu được chúng cũng bao gồm các chủng trong đó cả hoạt tính α -ketoglutarat dehydrogenaza (*sucA*) và hoạt tính succinat dehydrogenaza (*sdh*) bị giảm hoặc biến mất (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2010-041920). Các ví dụ cụ thể về các chủng này bao gồm, ví dụ, chủng *Corynebacterium glutamicum* 8L3G Δ SDH, là chủng thiếu hụt kép *odhAsdhA* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2010-041920).

Các ví dụ về vi khuẩn sản xuất axit L-glutamic và các chủng gốc để thu được chúng cũng bao gồm các chủng mà được biến đổi hoạt tính D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và/hoặc hoạt tính fructoza-6-phosphat phosphoketolaza được tăng cường (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kohyo) số 2008-509661). Hoặc một trong số hoạt tính D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và hoạt tính fructoza-6-phosphat phosphoketolaza có thể được tăng cường, hoặc cả hai có thể được tăng cường. Trong bản mô tả này, D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và fructoza-6-phosphat phosphoketolaza có thể được đề cập chung là phosphoketolaza.

Hoạt tính D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza có nghĩa là hoạt tính để chuyển hóa xyluloza-5-phosphat thành glyxaldehyt-3-phosphat và axetyl phosphat với việc tiêu thụ axit phosphoric để giải phóng một phân tử H₂O. Hoạt tính này có thể được đo bằng phương pháp được mô tả bởi Goldberg, M. và các đồng tác giả (Methods Enzymol., 9, 515-520, 1996) hoặc phương pháp được mô tả bởi L. Meile (J. Bacteriol., 183:2929-2936, 2001).

Hoạt tính fructoza-6-phosphat phosphoketolaza có nghĩa là hoạt tính để chuyển hóa fructoza-6-phosphat thành erythroza-4-phosphat và axetyl phosphat với sự việc tiêu thụ axit phosphoric để giải phóng một phân tử H_2O . Hoạt tính này có thể được đo bằng phương pháp được mô tả bởi Racker, E. (Methods Enzymol., 5, 276-280, 1962) hoặc phương pháp được mô tả bởi L. Meile (J. Bacteriol., 183:2929-2936, 2001).

Hơn thế nữa, các ví dụ về phương pháp truyền hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic cho hoặc vào vi khuẩn coryneform cũng bao gồm các phương pháp truyền khả năng kháng chất tương tự axit hữu cơ, chất ức chế hô hấp, hoặc các chất tương tự, và phương pháp truyền tính nhạy cho chất ức chế tổng hợp thành tế bào. Các ví dụ về các phương pháp này bao gồm, ví dụ, phương pháp truyền khả năng kháng axit monofloaxetic (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kaiko) số 50-113209), phương pháp truyền khả năng kháng adenin hoặc khả năng kháng thymin (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 57-065198), phương pháp làm giảm hoạt tính ureaza (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 52-038088), phương pháp truyền khả năng kháng axit malonic (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 52-038088), phương pháp truyền khả năng kháng benzopyron hoặc naphthoquinon (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 56-1889), phương pháp truyền khả năng kháng HOQNO (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 56-140895), phương pháp truyền khả năng kháng axit α -ketomalonic (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 57-2689), phương pháp truyền khả năng kháng guanidin (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 56-35981), và phương pháp truyền tính nhạy penixilin (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 4-88994).

Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn kháng hoặc nhạy này bao gồm các chủng sau.

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ3949 (FERM BP-2632, tham khảo Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 50-113209)

Corynebacterium glutamicum AJ11628 (FERM P-5736, tham khảo Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 57-065198)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11355 (FERM P-5007, tham khảo Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 56-1889)

Corynebacterium glutamicum AJ11368 (FERM P-5020, tham khảo Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 56-1889)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11217 (FERM P-4318, tham khảo Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 57-2869)

Corynebacterium glutamicum AJ11218 (FERM P-4319, tham khảo Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 57-2869)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11564 (FERM BP-5472, tham khảo Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 56-140895)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11439 (FERM BP-5136, tham khảo Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 56-35981)

Corynebacterium glutamicum H7684 (FERM BP-3004, tham khảo Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 04-88994)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ11426 (FERM P-5123, tham khảo Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 56-048890)

Corynebacterium glutamicum AJ11440 (FERM P-5137, tham khảo Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 56-048890)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ11796 (FERM P-6402, tham khảo Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 58-158192)

Hơn thế nữa, các ví dụ về phương pháp truyền hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic cho hoặc vào vi khuẩn coryneform cũng bao gồm phương pháp làm tăng sự biểu hiện của gen *yggB* và phương pháp đưa gen *yggB* đột biến có đột biến trong vùng mã hóa (WO2006/070944). Gen *yggB* là gen mã hóa kênh nhạy cơ học. Gen *yggB* của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 tương ứng với trình tự bổ sung cho trình tự của các số nucleotit 1336091 đến 1337692 trong trình tự hệ gen được đăng ký dưới dạng số đăng ký NC_003450 trong dữ liệu NCBI, và cũng được gọi là *NCgl1221*. Protein YggB

được đăng ký dưới dạng số đăng ký NP_600492. Trình tự nucleotit của gen *yggB* của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) và trình tự axit amin của protein YggB được mã hóa bởi gen này được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NOS: 21 và 22.

Các ví dụ về gen *yggB* đột biến có thể sử dụng trong các phương pháp được đề cập trên đây bao gồm các gen *yggB* có các đột biến sau. Protein YggB được mã hóa bởi gen *yggB* đột biến cũng được đề cập dưới dạng protein YggB đột biến. Gen *yggB* không có (các) đột biến này và protein YggB được mã hóa bởi gen này cũng được đề cập lần lượt dưới dạng gen *yggB* kiểu đại và protein YggB kiểu đại. Các ví dụ về protein YggB kiểu đại bao gồm, ví dụ, protein có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 22.

(1) Đột biến ở phía đầu tận cùng C

Đột biến ở phía đầu tận cùng C là đột biến được đưa vào một phần trình tự nucleotit của vùng mã hóa trình tự của các số axit amin 419 đến 533 trong SEQ ID NO: 22. Mặc dù đột biến ở phía đầu tận cùng C là không bị giới hạn một cách cụ thể miễn sao đột biến được đưa vào ít nhất một phần của trình tự nucleotit của vùng được đề cập trên đây, đột biến ở phía đầu tận cùng C tốt hơn là sự đột biến để gắn trình tự xen đoạn (dưới đây cũng được đề cập dưới dạng "IS") hoặc đoạn xen di động. Đột biến ở phía đầu tận cùng C có thể là đột biến bất kỳ để đưa vào đó sự thay thế axit amin (đột biến sai nghĩa), đột biến để đưa vào đột biến dịch khung gây ra bởi sự xen đoạn của IS hoặc kiểu đột biến tương tự, và đột biến để đưa vào đột biến vô nghĩa. Các ví dụ cụ thể về gen *yggB* đột biến có đột biến phía đầu tận cùng C bao gồm, ví dụ, gen *yggB* được xen bằng IS ở vị trí mã hóa gốc valin ở vị trí 419 trong SEQ ID NO: 22, và nhờ đó mã hóa protein YggB đột biến của 423 gốc amin có độ dài đầy đủ, mà ngắn hơn protein YggB kiểu đại (SEQ ID NO: 22) (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2007-222163). Trình tự nucleotit của gen *yggB* đột biến (V419::IS) và trình tự axit amin của protein YggB đột biến được mã hóa bởi gen này lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NOS: 23 và 24. Các ví dụ về đột biến ở phía đầu tận cùng C cũng bao gồm đột biến để thay thế gốc prolin có mặt trong vùng của các số axit

amin 419 đến 533 trong SEQ ID NO: 22 bằng gốc axit amin khác.

(2) Đột biến trong vùng chuyển màng

Ước tính rằng protein YggB được mã hóa bởi gen *yggB* có năm vùng chuyển màng. Trong trình tự axit amin của protein YggB kiểu đại của SEQ ID NO: 22, các vùng chuyển màng tương ứng với các vùng của các số axit amin từ 1 đến 23 (vùng chuyển màng thứ nhất), 25 đến 47 (vùng chuyển màng thứ hai), 62 đến 84 (vùng chuyển màng thứ ba), 86 đến 108 (vùng chuyển màng thứ tư), và 110 đến 132 (vùng chuyển màng thứ năm). Gen *yggB* có thể có đột biến trong vùng mã hóa các vùng chuyển màng bất kỳ này. Đột biến trong vùng chuyển màng này mong muốn là đột biến bao gồm thay thế, mất, bổ sung, xen, hoặc đảo một hoặc một vài gốc axit amin trong khi đó không kèm theo đột biến dịch khung hoặc đột biến vô nghĩa. Các ví dụ về đột biến trong vùng chuyển màng bao gồm đột biến để gắn một hoặc một vài gốc axit amin giữa gốc loxin ở vị trí 14 và gốc tryptophan ở vị trí 15, đột biến để thay thế gốc alanin ở vị trí 100 bằng gốc axit amin khác, và đột biến để thay thế gốc alanin ở vị trí 111 bằng gốc axit amin khác, trong trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 22, và v.v.. Số lượng "một hoặc một vài" cụ thể tốt hơn là từ 1 đến 20, tốt hơn nữa là từ 1 đến 10, tốt hơn thêm nữa là từ 1 đến 5, còn tốt hơn nữa là từ 1 đến 3.

Khi protein YggB kiểu đại có trình tự axit amin khác trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 22, gen *yggB* đột biến có thể có đột biến trong vùng mã hóa gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin ở vị trí được đề cập trên đây trong SEQ ID NO: 22. Trong protein YggB kiểu đại bất kỳ, mà gốc axit amin là "gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin ở vị trí được đề cập trên đây trong SEQ ID NO: 22" có thể được xác định dựa trên sự định hướng giữa trình tự axit amin của protein YggB kiểu đại và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22. Đối với các biến thể của gen *yggB* đột biến và protein YggB đột biến, các phần mô tả về các biến thể của thể vận chuyển phosphat đột biến và gen mã hóa nó được đề cập dưới đây có thể được sử dụng, *mutatis mutandis*. "Số axit amin X trong SEQ ID NO: 22" có thể được đọc dưới dạng "vị trí X trong SEQ ID NO: 22".

thiết kế thiết kế thiết kế thiết kế Ngoài ra, các ví dụ về phương pháp truyền hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit amin dạng L bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho hoạt tính gây tiết axit amin dạng L từ tế bào vi khuẩn được tăng cường. Hoạt tính gây tiết axit amin dạng L có thể được tăng cường bằng cách, ví dụ, làm tăng sự biểu hiện của gen mã hóa protein chịu trách nhiệm cho quá trình tiết axit amin dạng L. Các ví dụ về các gen mã hóa protein chịu trách nhiệm cho quá trình tiết các axit amin khác nhau bao gồm, ví dụ, gen *b2682* (*ygaZ*), gen *b2683* (*ygaH*), gen *b1242* (*ychE*), và gen *b3434* (*yhgN*) (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kaiko) số 2002-300874).

Hơn nữa, các ví dụ về phương pháp truyền hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit amin dạng L cũng bao gồm, ví dụ, phương pháp biến đổi vi khuẩn sao cho hoạt tính hoặc các hoạt tính của một hoặc nhiều protein liên quan trong quá trình chuyển hóa đường và các protein liên quan đến quá trình chuyển hóa năng lượng được tăng cường.

Các ví dụ về các protein liên quan đến quá trình chuyển hóa đường bao gồm các protein liên quan đến sự hấp thu sacarit và các enzym hệ phân hủy đường. Các ví dụ về các gen mã hóa các protein liên quan đến cơ chế chuyển hóa đường bao gồm gen glucoza-6-phosphat isomeraza (*pgi*, WO01/02542), gen phosphoenolpyruvat syntaza (*pps*, EP 877090 A), gen phosphoenolpyruvat carboxylaza (*ppc*, WO95/06114), gen pyruvat carboxylaza (*pyc*, WO99/18228, EP 1092776 A), gen phosphoglucomutaza (*pgm*, WO03/04598), gen fructoza bisphosphat aldolaza (*pfkB*, *fbp*, WO03/04664), gen pyruvat kinaza (*pykF*, WO03/008609), gen transaldolaza gen (*talB*, WO03/008611), gen fumaraza (*fum*, WO01/02545), gen hấp thu sucroza không PTS (*csc*, EP 149911 A), và gen sử dụng sucroza (operon *scrAB*, WO90/04636).

Các ví dụ về các gen mã hóa các protein liên quan đến quá trình chuyển hóa năng lượng bao gồm gen transhydrogenaza (*pntAB*, patent Mỹ số 5,830,716) và gen oxidaza kiểu cytochrom bo (*cyoB*, EP 1070376 A).

Các gen được sử dụng để nhân giống vi khuẩn sản xuất axit amin dạng L

được đề cập trên đây là không chỉ giới hạn ở các gen được minh họa trên đây và các gen có trình tự nucleotit đã biết, và cũng có thể là các biến thể của chúng, miễn sao các chức năng của các protein được mã hóa là không bị giảm. Ví dụ, các gen được sử dụng để nhân giống vi khuẩn sản xuất axit amin dạng L có thể là mỗi gen mã hóa protein có trình tự axit amin của protein đã biết, nhưng bao gồm sự thay thế, mất đoạn, xen đoạn, hoặc bổ sung một hoặc một vài gốc axit amin ở một hoặc một vài vị trí. Đối với biến thể của các gen và các protein, các phần mô tả về các biến thể của gen vận chuyển phosphat và thể vận chuyển phosphat được đề cập dưới đây có thể được sử dụng, *mutatis mutandis*.

<1-2> Sự tăng cường hoạt tính vận chuyển phosphat bằng cách tăng cường hoạt tính protein pitA

Vi khuẩn sử dụng theo phương pháp của sáng chế được biến đổi sao cho hoạt tính vận chuyển phosphat tăng lên. Vi khuẩn sử dụng theo phương pháp của sáng chế có thể thu được bằng cách biến đổi vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất axit L-glutamic để hoạt tính vận chuyển phosphat của nó tăng lên. Vi khuẩn sử dụng theo phương pháp của sáng chế cũng có thể thu được bằng cách biến đổi vi khuẩn coryneform sao cho hoạt tính vận chuyển phosphat của nó tăng lên, và sau đó truyền hoặc làm tăng khả năng sản xuất axit L-glutamic. Vi khuẩn sử dụng theo phương pháp của sáng chế có thể là vi khuẩn mà có khả năng sản xuất axit L-glutamic mong muốn bằng cách biến đổi để hoạt tính vận chuyển phosphat của nó tăng lên. Những sự biến đổi để thiết kế ra vi khuẩn để sử dụng theo phương pháp của sáng chế có thể được tiến hành theo trật tự bất kỳ.

Dưới đây, các thể vận chuyển phosphat và các gen mã hóa chúng sẽ được giải thích.

Theo sáng chế, “thể vận chuyển phosphat” đề cập đến protein pitA có hoạt tính vận chuyển phosphat. Theo sáng chế, “hoạt tính vận chuyển phosphat” đề cập đến hoạt tính đưa axit phosphoric vô cơ (Pi) vào trong tế bào từ bên ngoài tế bào.

Các ví dụ về thể vận chuyển phosphat bao gồm hệ thống vận chuyển

phosphat vô cơ (Pit) ái lực thấp và hệ thống vận chuyển đặc hiệu phosphat (Pst) ái lực cao. Các ví dụ về các gen mã hóa thể vận chuyển phosphat (cũng được đề cập dưới dạng "gen vận chuyển phosphat") bao gồm, gen *pitA* và *pitB* mã hóa hệ Pit, và gen *pstSCAB* mã hóa hệ Pst (tài liệu phi sáng chế 1). Hệ Pst có chức năng là phức của bốn protein (tức là, sản phẩm gen *pstSCAB*).

Theo sáng chế, hoạt tính của PitA tăng lên. Theo sáng chế, hoạt tính của protein PitA mà là sản phẩm gen *pitA* tăng lên.

Gen *pitA* của chủng *Escherichia coli* K12 MG1655 tương ứng với trình tự ở các vị trí 3635665 đến 3637164 trong trình tự hệ gen được đăng ký ở dữ liệu NCBI với số đăng ký Ngân hàng gen NC_000913 (VERSION NC_000913.2 GI: 49175990). Gen *pitA* của chủng *Escherichia coli* K12 MG1655 là đồng nghĩa với *ECK3478* và *JW3460*. Ngoài ra, protein PitA của chủng *Escherichia coli* K12 MG1655 được đăng ký dưới dạng số đăng ký Ngân hàng gen NP_417950 (version NP_417950,1 GI: 16131365, locus_tag="b3493"). Trình tự nucleotit của gen *pitA* của chủng MG1655 và trình tự axit amin của protein PitA được mã hóa bởi gen này lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NOS: 1 và 2.

Gen *pitA* của chủng *Pantoea ananatis* LMG20103 tương ứng với trình tự bổ sung với trình tự ở các vị trí 1397898 đến 1399514 trong trình tự hệ gen được đăng ký ở dữ liệu NCBI với số đăng ký Ngân hàng gen NC_013956 (VERSION NC_013956.2 GI: 332139403). Hơn nữa, protein PitA của chủng *Pantoea ananatis* LMG20103 được đăng ký dưới dạng số đăng ký Ngân hàng gen YP_003519531 (version YP_003519531,1 GI: 291616789, locus_tag="PANA_1236"). Trình tự nucleotit của gen *pitA* của chủng *Pantoea ananatis* LMG20103 và trình tự axit amin của protein PitA được mã hóa bởi gen này lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NOS: 3 và 4.

Gen *pitA* của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 tương ứng với trình tự bổ sung với trình tự ở các vị trí 481391 đến 482776 trong trình tự hệ gen được đăng ký ở dữ liệu NCBI với số đăng ký Ngân hàng gen NC_003450 (VERSION NC_003450.3 GI: 58036263). Gen *pitA* của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 là đồng nghĩa với *Cgl0460*. Ngoài

ra, protein PitA của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 được đăng ký dưới dạng số đăng ký Ngân hàng gen NP_599707 (version NP_599707,1 GI: 19551705, locus_tag="NCgl0445"). Trình tự nucleotit của gen *pitA* của chủng *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 và trình tự axit amin của protein PitA được mã hóa bởi gen này lần lượt được thể hiện trong các SEQ ID NO: 25 và 26. Hơn nữa, trình tự nucleotit của gen *pitA* của chủng *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) và trình tự axit amin của protein PitA được mã hóa bởi gen này lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NOS: 5 và 6.

Thể vận chuyển phosphat có thể là biến thể của các protein *PitA* khác nhau đề cập trên đây, miễn sao nó có hoạt tính vận chuyển phosphat. Biến thể như vậy cũng có thể được đề cập dưới dạng "biến thể bảo tồn". Các ví dụ về biến thể bảo tồn bao gồm, ví dụ, các thể tương đồng và các biến thể được biến đổi nhân tạo của các thể vận chuyển phosphat được đề cập trên đây như các protein *PitA* khác nhau.

Gen mã hóa thể tương đồng của protein *PitA* đề cập trên đây có thể thu được một cách dễ dàng từ các cơ sở dữ liệu công cộng bằng, ví dụ, tra cứu BLAST hoặc FASTA sử dụng trình tự nucleotit của gen *pitA* được đề cập trên đây (SEQ ID NO: 1, 3, 5, hoặc 25) làm trình tự truy vấn. Ngoài ra, gen mã hóa thể tương đồng của protein *PitA* được đề cập trên đây có thể thu được bằng, ví dụ, PCR sử dụng nhiễm sắc thể của vi khuẩn hoặc nấm men làm mẫu, và các oligonucleotit được tạo ra trên cơ sở trình tự gen đã biết của chúng dùng làm các đoạn mồi.

Gen mã hóa biến thể bảo tồn của thể vận chuyển phosphat có thể là, ví dụ, gen như được đề cập dưới đây. Tức là, gen vận chuyển phosphat có thể là gen mã hóa protein có trình tự axit amin nêu trên nhưng bao gồm sự thay thế, mất đoạn, xen đoạn, hoặc bổ sung một hoặc một vài gốc axit amin ở một hoặc một vài vị trí, miễn sao nó mã hóa protein có hoạt tính vận chuyển phosphat. Trong trường hợp này, thông thường 70% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 80% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc lớn hơn, hoạt tính vận chuyển phosphat được duy trì

trong protein biến thể, so với protein trước khi bao gồm bổ sung, mất, xen, hoặc bổ sung một hoặc một vài gốc axit amin. Mặc dù số "một hoặc một vài" có thể khác nhau, phụ thuộc vào các vị trí trong thiết kế ba chiều của protein hoặc các loại gốc axit amin, cụ thể, tốt hơn là 1 đến 20, tốt hơn nữa là 1 đến 10, vẫn tốt hơn nữa là 1 đến 5, đặc biệt tốt hơn nữa là 1 đến 3.

Sự thay thế, mất, xen, hoặc bổ sung một hoặc một vài gốc axit amin là đột biến bảo tồn mà duy trì chức năng thông thường của protein. Các ví dụ tiêu biểu về đột biến bảo tồn là thay thế bảo tồn. Thay thế bảo tồn là đột biến trong đó sự thay thế xảy ra lẫn nhau trong số Phe, Trp, và Tyr, nếu vị trí thay thế là axit amin thơm; trong số Leu, Ile, và Val, nếu nó là axit amin kỵ nước; giữa Gln và Asn, nếu nó là axit amin phân cực; trong số Lys, Arg, và His, nếu nó là axit amin bazơ; giữa Asp và Glu, nếu nó là axit amin axit; và giữa Ser và Thr, nếu nó là axit amin có nhóm hydroxyl. Các ví dụ về thay thế được xem như thay thế bảo tồn bao gồm, cụ thể là, sự thay thế của Ser hoặc Thr cho Ala, sự thay thế của Gln, His, hoặc Lys cho Arg, sự thay thế của Glu, Gln, Lys, His, hoặc Asp cho Asn, sự thay thế của Asn, Glu, hoặc Gln cho Asp, sự thay thế của Ser hoặc Ala cho Cys, sự thay thế của Asn, Glu, Lys, His, Asp, hoặc Arg cho Gln, sự thay thế của Gly, Asn, Gln, Lys, hoặc Asp cho Glu, sự thay thế của Pro cho Gly, sự thay thế của Asn, Lys, Gln, Arg, hoặc Tyr cho His, sự thay thế của Leu, Met, Val, hoặc Phe cho Ile, sự thay thế của Ile, Met, Val, hoặc Phe cho Leu, sự thay thế của Asn, Glu, Gln, His, hoặc Arg cho Lys, sự thay thế của Ile, Leu, Val, hoặc Phe cho Met, sự thay thế của Trp, Tyr, Met, Ile, hoặc Leu cho Phe, sự thay thế của Thr hoặc Ala cho Ser, sự thay thế của Ser hoặc Ala cho Thr, sự thay thế của Phe hoặc Tyr cho Trp, sự thay thế của His, Phe, hoặc Trp cho Tyr, và sự thay thế của Met, Ile, hoặc Leu cho Val. Hơn nữa, sự thay thế, mất, xen, bổ sung, đảo, hoặc các kiểu tương tự, của gốc axit amin như được đề cập trên đây bao gồm sự đột biến xảy ra trong tự nhiên do sự khác nhau giữa các cá thể, hoặc sự khác nhau của các loài sinh vật mà gen thu được từ các loài sinh vật này (đột biến hoặc biến thể).

Hơn thế nữa, gen có đột biến bảo tồn như được đề cập trên đây có thể là

gen mã hóa protein thể hiện độ đồng nhất 80% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 95% hoặc lớn hơn, vẫn tốt hơn nữa là 97% hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn nữa là 99% hoặc lớn hơn, so với toàn bộ trình tự axit amin được đề cập trên đây, và có hoạt tính vận chuyển phosphat. Ngoài ra, trong bản mô tả này, "độ đồng nhất" nghĩa là "giống".

Hơn thế nữa, gen vận chuyển phosphat có thể là ADN mà có thể lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt với đoạn dò mà có thể được tạo ra từ trình tự gen đã biết, như trình tự bổ sung với một phần hoặc toàn bộ trình tự nucleotit nêu trên, và là ADN mà mã hóa protein có hoạt tính vận chuyển phosphat. "Điều kiện nghiêm ngặt" đề cập đến điều kiện mà xảy ra sự lai đặc hiệu, và sự lai không đặc hiệu không xảy ra. Các ví dụ về điều kiện nghiêm ngặt bao gồm điều kiện mà dưới các điều kiện này các ADN đồng nhất cao lai với nhau, ví dụ, các ADN có độ đồng nhất không thấp hơn 80%, tốt hơn là độ đồng nhất không thấp hơn 90%, tốt hơn nữa là độ đồng nhất không thấp hơn 95%, vẫn tốt hơn nữa là độ đồng nhất không thấp hơn 97%, đặc biệt tốt hơn nữa là độ đồng nhất không thấp hơn 99%, lai với nhau, và các ADN có độ đồng nhất thấp hơn giá trị nêu trên không lai với nhau, hoặc các điều kiện làm sạch của phương pháp lai Southern tiêu biểu, tức là, các điều kiện làm sạch một lần, tốt hơn là 2 hoặc 3 lần, ở nồng độ muối và nhiệt độ tương ứng với 1 x SSC, 0,1% SDS ở 60°C, tốt hơn là 0,1 x SSC, 0,1% SDS ở 60°C, tốt hơn nữa là 0,1 x SSC, 0,1% SDS ở 68°C.

Đoạn dò để sử dụng cho quá trình lai nêu trên có thể là một phần của trình tự mà bổ sung với gen như được mô tả trên đây. Đoạn dò này có thể được tạo ra bằng PCR sử dụng các oligonucleotit được tạo ra dựa trên trình tự gen đã biết làm đoạn mồi và đoạn ADN chứa trình tự nucleotit dùng làm mẫu. Với đoạn dò, ví dụ như đoạn ADN có độ dài khoảng 300 bp có thể được sử dụng. Khi đoạn ADN có độ dài khoảng 300 bp được dùng làm đoạn dò này, cụ thể là các điều kiện làm sạch của phương pháp lai có thể là, ví dụ, 50°C, 2 x SSC và 0,1% SDS.

Ngoài ra, gen vận chuyển phosphat có thể là gen mà trong đó codon bất kỳ được thay thế bằng codon tương đương, miễn sao gen này mã hóa protein có hoạt tính vận chuyển phosphat. Ví dụ, gen vận chuyển phosphat có thể được

biến đổi sao cho nó có các codon tối ưu theo các trình tự codon trong vật chủ được sử dụng.

Tỷ lệ giống về trình tự giữa hai trình tự có thể được xác định bằng, ví dụ như sử dụng thuật toán. Các ví dụ không bị giới hạn về thuật toán như vậy bao gồm thuật toán trong tài liệu Myers và Miller (1988) CABIOS 4:11-17, thuật toán đồng nhất quỹ tích trong tài liệu Smith et al. (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, thuật toán liên kết đồng nhất trong tài liệu Needleman và Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453, phương pháp tìm kiếm đồng nhất trong tài liệu Pearson và Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448, và phiên bản thuật toán biến đổi trong tài liệu Karlin và Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, như các loại được mô tả trong tài liệu Karlin và Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877.

Bằng cách sử dụng chương trình dựa trên thuật toán như vậy, sự so sánh trình tự (ví dụ như sự liên kết) để xác định sự giống nhau về trình tự có thể được thực hiện. Chương trình này có thể được thực hiện thích hợp bằng máy tính. Các ví dụ về chương trình như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CLUSTAL của chương trình PC/Gen (có bán tại Intelligenetics, Mountain View, Calif.), chương trình ALIGN (Phiên bản 2.0), và GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, và TFASTA của Wisconsin Genetics Software Package, Phiên bản 8 (có bán tại Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wis., USA). Sự liên kết sử dụng các chương trình này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ như, các thông số ban đầu. Chương trình CLUSTAL được mô tả chi tiết trong tài liệu Higgins et al. (1988) Gene 73:237-244 (1988), Higgins et al. (1989) CABIOS 5:151-153, Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90, Huang et al. (1992) CABIOS 8:155-65, and Pearson et al. (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-331.

Để thu được trình tự nucleotit đồng nhất với trình tự nucleotit đích, cụ thể ví dụ như tìm kiếm nucleotit BLAST có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLASTN với điểm số 100 và độ dài từ là 12. Để thu được trình tự axit amin đồng nhất với protein đích, cụ thể ví dụ như tìm kiếm protein BLAST

có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLASTX với điểm số 50 và độ dài từ là 3. Xem <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> đối với tìm kiếm nucleotit BLAST và tìm kiếm protein BLAST. Ngoài ra, Gapped BLAST (BLAST 2.0) có thể được sử dụng để thu được sự liên kết bao gồm (các) khoảng cách nhằm mục đích so sánh. Ngoài ra, PSI-BLAST có thể được sử dụng để thực hiện tìm kiếm lặp lại để phát hiện các mối liên hệ về khoảng cách giữa các trình tự. Xem tài liệu Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 đối với Gapped BLAST và PSI-BLAST. Khi sử dụng BLAST, Gapped BLAST, hoặc PSI-BLAST, các thông số ban đầu của mỗi chương trình (ví dụ như BLASTN đối với các trình tự nucleotit, và BLASTX đối với các trình tự axit amin) có thể được sử dụng. Sự liên kết cũng có thể được điều khiển bằng tay.

Sự giống nhau về trình tự giữa hai trình tự được tính toán làm tỷ lệ của các gốc nối trong hai trình tự khi liên kết hai trình tự để làm cho chúng tương thích tối đa với nhau.

Phần mô tả trên đây liên quan đến các biến thể của các gen và protein cũng có thể áp dụng cho *mutatis mutandis* cho các protein bất kỳ như các enzym sinh tổng hợp axit amin dạng L và các gen mã hóa chúng.

<1-3> Các phương pháp làm tăng hoạt tính của protein

Dưới đây, các phương pháp làm tăng hoạt tính của protein sẽ được giải thích.

Thuật ngữ "hoạt tính của protein được làm tăng" có nghĩa là hoạt tính của protein trên mỗi tế bào được làm tăng khi so với hoạt tính của chúng không được biến đổi như chủng kiểu dại và chủng gốc. Trạng thái mà "hoạt tính của protein được làm tăng" cũng được thể hiện dưới dạng "hoạt tính của protein được tăng cường". Đặc biệt, thuật ngữ "hoạt tính của protein được làm tăng" có nghĩa là số phân tử của protein trên mỗi tế bào được làm tăng, và/hoặc chức năng của mỗi phân tử của protein được làm tăng khi so với chức năng của chúng không được biến đổi. Tức là, thuật ngữ "hoạt tính" trong thuật ngữ "hoạt tính của protein được làm tăng" là không chỉ giới hạn ở hoạt tính xúc tác của protein, nhưng có thể có nghĩa là lượng sao mã của gen (lượng mRNA) mã hóa protein

này, hoặc lượng dịch mã của protein (lượng protein). Mặc dù mức độ tăng hoạt tính của protein là không bị giới hạn một cách cụ thể miễn sao hoạt tính của protein được làm tăng khi so với chủng không được biến đổi, hoạt tính của protein có thể được làm tăng 1,5 lần hoặc lớn hơn, 2 lần hoặc lớn hơn, hoặc 3 lần hoặc lớn hơn, khi so với hoạt tính của chủng không được biến đổi. Ngoài ra, việc thể hiện rằng "hoạt tính của protein được làm tăng" bao gồm không chỉ thể hiện rằng hoạt tính của protein đích được làm tăng trong chủng vốn đã có hoạt tính của protein đích, mà còn thể hiện rằng hoạt tính của protein đích được truyền vào chủng vốn không có hoạt tính của protein đích. Hơn nữa, miễn sao hoạt tính của protein được làm tăng, hoạt tính của protein đích vốn đã có trong vật chủ có thể giảm và/hoặc mất đi, và sau đó loại protein thích hợp có thể được đưa vào.

Sự biến đổi mà làm tăng hoạt tính của protein đạt được bằng cách, ví dụ, làm tăng sự biểu hiện của gen mã hóa protein. Việc thể hiện rằng "sự biểu hiện của gen được làm tăng" cũng được đề cập là "sự biểu hiện của gen được tăng cường". Sự biểu hiện của gen có thể được làm tăng 1,5 lần hoặc lớn hơn, 2 lần hoặc lớn hơn, hoặc 3 lần hoặc lớn hơn, khi so với sự biểu hiện thấy được ở chủng không được biến đổi. Ngoài ra, việc thể hiện rằng "sự biểu hiện của gen được làm tăng" không chỉ bao gồm việc thể hiện rằng lượng biểu hiện của gen đích tăng lên trong chủng mà biểu hiện gen đích này, mà còn thể hiện rằng gen được đưa vào trong chủng mà vốn không biểu hiện gen đích này, và được biểu hiện trong đó. Tức là, cụm từ "sự biểu hiện của gen được làm tăng" cũng có nghĩa là, ví dụ, gen đích được đưa vào trong chủng mà không có gen này, và được biểu hiện trong đó.

Sự biểu hiện của gen này có thể được làm tăng bằng cách, ví dụ, làm tăng số bản sao của gen này.

Số bản sao của gen có thể được làm tăng bằng cách đưa gen đó vào trong nhiễm sắc thể của vật chủ. Gen có thể được đưa vào trong nhiễm sắc thể bằng cách, ví dụ, sử dụng sự tái tổ hợp đồng nhất (Miller, J.H., *Experiments in Molecular Genetics*, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory). Chỉ một bản sao,

hoặc hai hoặc nhiều bản sao của gen có thể được đưa vào. Ví dụ, bằng cách tiến hành tái tổ hợp đồng nhất sử dụng trình tự mà có mặt trong nhiều bản sao trên nhiễm sắc thể làm đích, nhiều bản sao của gen có thể được đưa vào trong nhiễm sắc thể này. Các ví dụ về trình tự mà có mặt trong nhiều bản sao trên nhiễm sắc thể bao gồm các trình tự ADN lặp, và các đoạn lặp đảo ngược ở cả hai đầu của đoạn di động. Theo cách khác, sự tái tổ hợp đồng nhất có thể được tiến hành bằng cách sử dụng trình tự thích hợp trên nhiễm sắc thể như gen không cần thiết cho quá trình sản xuất axit amin dạng L làm trình tự đích. Tái tổ hợp đồng nhất có thể được tiến hành bằng, ví dụ, phương pháp sử dụng ADN mạch thẳng như phương pháp hòa nhập điều khiển bởi Red (Datsenko, K.A., và Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645 (2000)), phương pháp sử dụng plasmid bao gồm thể gốc sao chép nhạy nhiệt độ, phương pháp sử dụng plasmid có khả năng chuyển tiếp hợp, phương pháp sử dụng vector tự sát không bao gồm thể gốc sao chép mà có chức năng trong vật chủ, hoặc phương pháp chuyển nạp sử dụng thể thực khuẩn. Hơn nữa, gen cũng có thể được đưa ngẫu nhiên vào trong nhiễm sắc thể bằng cách sử dụng đoạn di động hoặc Mini-Mu (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2-109985, patent Mỹ số 5,882,888, EP 805867 B1).

Việc đưa gen đích vào trong nhiễm sắc thể có thể được khẳng định bằng phương pháp lai Southern sử dụng đoạn dò có trình tự bổ sung với toàn bộ hoặc một phần gen này, PCR sử dụng đoạn mồi được tạo ra dựa trên trình tự của gen, hoặc các phương pháp tương tự.

Ngoài ra, số bản sao của gen đích cũng có thể được làm tăng bằng cách đưa vector bao gồm gen này vào vật chủ. Ví dụ, số bản sao của gen đích có thể được làm tăng bằng cách tạo phối tử cho đoạn ADN bao gồm gen đích với vector mà thực hiện chức năng trong vật chủ để thiết kế ra vector biểu hiện của gen, và bằng cách biến nạp vật chủ bằng vector biểu hiện. Đoạn ADN bao gồm gen đích có thể thu được bằng, ví dụ, phương pháp PCR sử dụng ADN hệ gen của vi sinh vật có gen đích làm mẫu. Để làm vector này, vector có thể tự sao chép trong tế bào của vật chủ có thể được sử dụng. Vector này tốt hơn là vector đa bản sao.

Ngoài ra, vector này tốt hơn là bao gồm chỉ thị như gen kháng kháng sinh để lựa chọn thể biến nạp. Vector này có thể là, ví dụ, vector thu được từ plasmit vi khuẩn, vector thu được từ plasmit nấm men, vector thu được từ thể thực khuẩn, cosmit, phagemit, hoặc các dạng tương tự. Các ví dụ cụ thể về vector có thể tự sao chép trong vi khuẩn coryneform bao gồm, ví dụ, pHM1519 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)); pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)); các plasmit thu được bằng cách cải thiện các vector được đề cập trên đây và bao gồm gen kháng thuốc; plasmit pCRY30 được mô tả trong Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 3-210184; các plasmit pCRY21, pCRY2KE, pCRY2KX, pCRY31, pCRY3KE, và pCRY3KX được mô tả trong Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2-72876 và patent Mỹ số 5,185,262; các plasmit pCRY2 và pCRY3 được mô tả trong Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 1-191686; pAJ655, pAJ611, và pAJ1844 được mô tả trong Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 58-192900; pCG1 được mô tả trong Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 57-134500; pCG2 được mô tả trong Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 58-35197; và pCG4 và pCG11 được mô tả trong Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 57-183799.

Khi gen được đưa vào, gen này được chứa theo cách biểu hiện bởi vi khuẩn theo sáng chế là đủ. Đặc biệt, gen này được đưa vào sao cho được biểu hiện dưới sự kiểm soát bởi trình tự khởi đầu mà thực hiện chức năng trong vi khuẩn theo sáng chế là đủ. Đoạn khởi đầu này có thể là đoạn khởi đầu thu được từ vật chủ, hoặc đoạn khởi đầu dị thể. Đoạn khởi đầu này có thể là đoạn khởi đầu nguyên thể của gen được đưa vào, hoặc đoạn khởi đầu của gen khác. Dùng làm đoạn khởi đầu này, ví dụ, đoạn khởi đầu hiệu nghiệm hơn như được đề cập dưới đây cũng có thể được sử dụng.

Ngoài ra, khi hai hoặc nhiều loại gen được đưa vào, mỗi gen được chứa theo cách biểu hiện bởi vi khuẩn theo sáng chế là đủ. Ví dụ, tất cả các gen này có thể được tiến hành bằng vector biểu hiện duy nhất hoặc nhiễm sắc thể. Hơn nữa, các gen có thể được tiến hành riêng rẽ bằng hai hoặc nhiều vector biểu hiện, hoặc được tiến hành riêng rẽ bởi một hoặc hai hoặc nhiều vector biểu hiện và

nhiễm sắc thể. Operon được cấu thành bởi hai hoặc nhiều gen cũng có thể được đưa vào.

Gen được đưa vào là không bị giới hạn một cách cụ thể miễn sao nó mã hóa protein mà thực hiện chức năng trong vật chủ. Gen được đưa vào có thể là gen thu được từ vật chủ, hoặc có thể là gen dị thể.

Ngoài ra, sự biểu hiện của gen có thể được làm tăng bằng cách cải thiện hiệu quả phiên mã của gen này. Hiệu quả phiên mã của gen có thể được cải thiện bằng, ví dụ, thay thế đoạn khởi đầu của gen trên nhiễm sắc thể bằng đoạn khởi đầu mạnh hơn. "Đoạn khởi đầu mạnh hơn" có nghĩa là đoạn khởi đầu tạo ra sự phiên mã gen được cải thiện khi so với đoạn khởi đầu kiểu đại vốn có của gen này. Các ví dụ về các đoạn khởi đầu mạnh hơn có thể sử dụng trong vi khuẩn coryneform bao gồm đoạn khởi đầu P54-6 được thiết kế nhân tạo (Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679 (2000)), các đoạn khởi đầu *pta*, *aceA*, *aceB*, *adh*, và *amyE* có thể cảm ứng trong vi khuẩn coryneform bằng axit axetic, etanol, axit pyruvic, hoặc các chất tương tự, các đoạn khởi đầu *cspB*, *SOD*, và *tuf*, mà là các đoạn khởi đầu hiệu nghiệm tạo ra lượng biểu hiện lớn trong vi khuẩn coryneform (Journal of Biotechnology, 104 (2003) 311-323; Appl. Environ. Microbiol., 2005 Dec; 71 (12):8587-96.), đoạn khởi đầu lac, đoạn khởi đầu tac, và đoạn khởi đầu trc. Hơn nữa, dùng làm đoạn khởi đầu mạnh hơn, kiểu hoạt tính mạnh của đoạn khởi đầu hiện có cũng có thể thu được bằng cách sử dụng các gen thông tin khác nhau. Ví dụ, bằng cách làm cho các vùng -35 và -10 trong vùng đoạn khởi đầu gần hơn với trình tự đồng nhất, hoạt tính của đoạn khởi đầu có thể được tăng cường (WO00/18935). Các phương pháp đánh giá độ mạnh của các đoạn khởi đầu và các ví dụ về các đoạn khởi đầu mạnh được mô tả trong bài báo của Goldstein và các đồng tác giả (Prokaryotic Promoters in Biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128 (1995)), và v.v..

Ngoài ra, sự biểu hiện của gen cũng có thể được tăng cường bằng cách cải thiện hiệu quả của quá trình dịch mã của gen này. Hiệu quả của quá trình dịch mã của gen có thể được cải thiện bằng cách, ví dụ, thay thế trình tự Shine-Dalgarno (SD) (cũng được đề cập là vị trí liên kết ribosom (RBS)) đối với gen

trên nhiễm sắc thể bằng trình tự SD mạnh hơn. "Trình tự SD mạnh hơn" có nghĩa là trình tự SD mà tạo ra quá trình dịch mã được cải thiện của mARN khi so với trình tự SD kiểu đại vốn có của gen này. Các ví dụ về trình tự SD mạnh hơn bao gồm, ví dụ, RBS của gen *10* thu được từ thể thực khuẩn T7 (Olins P.O. et al, Gene, 1988, 73, 227-235). Hơn nữa, đã biết rằng sự thay thế, xen, hoặc mất một vài nucleotit trong vùng đệm giữa RBS và codon khởi đầu, đặc biệt trình tự ngay phía trước của codon khởi đầu (5'-UTR), ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả ổn định và dịch mã của mRNA, và do đó, hiệu quả của quá trình dịch mã của gen cũng có thể được cải thiện bằng cách biến đổi chúng.

Theo sáng chế, các vị trí mà ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen này, như đoạn khởi đầu, trình tự SD, và vùng đệm giữa RBS và codon khởi đầu, cũng được gọi chung là "vùng kiểm soát quá trình biểu hiện". Vùng kiểm soát quá trình biểu hiện có thể được xác định bằng cách sử dụng vector tìm kiếm đoạn khởi đầu hoặc phần mềm phân tích gen như GENETYX. Vùng kiểm soát quá trình biểu hiện như vậy có thể được biến đổi bằng, ví dụ, phương pháp sử dụng vector nhạy nhiệt độ hoặc phương pháp hợp nhất được kích hoạt bởi Red (WO2005/010175).

Hiệu quả của quá trình dịch mã của gen cũng có thể được cải thiện, ví dụ, bằng cách biến đổi các codon. Ví dụ, trong trường hợp sự biểu hiện dị thể của gen hoặc tương tự, hiệu quả của quá trình dịch mã của gen có thể được cải thiện bằng cách thay thế codon hiếm có mặt trong gen này bằng codon đồng nghĩa thường được sử dụng hơn. Các codon có thể được thay thế bằng, ví dụ, phương pháp đột biến đặc hiệu vị trí để đưa đột biến mong muốn vào vị trí mong muốn của ADN. Theo cách khác, đoạn gen trong đó các codon mong muốn được thay thế có thể được tổng hợp hoàn toàn. Tần suất của các codon trong các sinh vật được bộc lộ trong "Codon Usage Database" (<http://www.kazusa.or.jp/codon>; Nakamura, Y. et al, Nucl. Acids Res., 28, 292 (2000)).

Ngoài ra, sự biểu hiện của gen cũng có thể được tăng cường bằng cách khuếch đại yếu tố điều hòa mà làm tăng sự biểu hiện của gen này, hoặc loại bỏ hoặc làm giảm yếu tố điều hòa mà làm giảm sự biểu hiện của gen này.

Các phương pháp làm tăng sự biểu hiện của gen như được đề cập trên đây có thể được sử dụng một cách độc lập hoặc ở dạng kết hợp bất kỳ.

Hơn nữa, sự biến đổi mà làm tăng hoạt tính của enzym cũng có thể thu được bằng cách, ví dụ, làm tăng hoạt tính đặc hiệu của enzym này. Enzym này thể hiện hoạt tính đặc hiệu tăng cường có thể thu được bằng cách, ví dụ, tìm kiếm các sinh vật khác nhau. Ngoài ra, loại hoạt tính mạnh của enzym hiện có cũng có thể thu được bằng cách đưa đột biến vào trong enzym hiện có. Sự tăng cường hoạt tính đặc hiệu có thể được sử dụng một cách độc lập, hoặc có thể được sử dụng ở dạng kết hợp bất kỳ với các phương pháp làm tăng sự biểu hiện của gen như được đề cập trên đây.

Hoạt tính của thể vận chuyển phosphat cũng có thể được làm tăng bằng cách, ví dụ, tạo ra vật chủ chứa gen vận chuyển phosphat mã hóa thể vận chuyển phosphat có "đột biến đặc hiệu". Theo sáng chế, thể vận chuyển phosphat có "đột biến đặc hiệu" cũng được đề cập là thể vận chuyển phosphat đột biến, và gen mã hóa nó cũng được đề cập là gen vận chuyển phosphat đột biến. Ngoài ra, theo sáng chế, thể vận chuyển phosphat không có "đột biến đặc hiệu" cũng được đề cập là thể vận chuyển phosphat kiểu dại, và gen mã hóa nó cũng được đề cập là gen vận chuyển phosphat kiểu dại. Thể vận chuyển phosphat đột biến có "đột biến đặc hiệu" có thể có hoạt tính đặc hiệu mạnh hơn hoạt tính của thể vận chuyển phosphat kiểu dại.

Các ví dụ về thể vận chuyển phosphat kiểu dại bao gồm các protein *PitA* không có "đột biến đặc hiệu" (protein *PitA* kiểu dại). Các ví dụ về thể vận chuyển phosphat đột biến bao gồm các protein *PitA* có "đột biến đặc hiệu" (protein *PitA* đột biến). Gen mã hóa protein *PitA* kiểu dại cũng được đề cập là gen *pitA* kiểu dại, và gen mã hóa protein *PitA* đột biến cũng được đề cập là gen *pitA* đột biến. Các ví dụ về các protein *PitA* kiểu dại bao gồm các protein *PitA* khác nhau được minh họa trên đây, và các biến thể bảo tồn của chúng không có "đột biến đặc hiệu". Tức là, thể vận chuyển phosphat có thể tương tự như protein được chọn từ các protein *PitA* khác nhau được minh họa trên đây và các biến thể bảo tồn của chúng, miễn sao nó có "đột biến đặc hiệu".

Cụ thể, thể vận chuyển phosphat đột biến có thể là, ví dụ, protein có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, hoặc 26 miễn sao nó có “đột biến đặc hiệu”. Ngoài ra, cụ thể là, thể vận chuyển phosphat đột biến cũng có thể là, ví dụ, protein có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, hoặc 26, nhưng bao gồm sự thay thế, mất, xen, hoặc bổ sung một hoặc một vài gốc axit amin, miễn sao nó có “đột biến đặc hiệu”. Hơn nữa, cụ thể là, thể vận chuyển phosphat đột biến cũng có thể là, ví dụ, protein thể hiện độ đồng nhất 80% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 95% hoặc lớn hơn, vẫn tốt hơn nữa là 97% hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn nữa là 99% hoặc lớn hơn, so với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, hoặc 26, miễn sao nó có “đột biến đặc hiệu”. Ngoài ra, trong bản mô tả này, “đồng nhất” nghĩa là “giống”.

Nói cách khác, thể vận chuyển phosphat đột biến có thể là biến thể của các protein PitA khác nhau bất kỳ được minh họa trên đây, mà có “đột biến đặc hiệu” và còn bao gồm đột biến bảo tồn ở vị trí khác vị trí của “đột biến đặc hiệu”.

Cụ thể, thể vận chuyển phosphat đột biến có thể là, ví dụ, protein có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, hoặc 26, nhưng có “đột biến đặc hiệu”, và còn bao gồm sự thay thế, mất, xen, hoặc bổ sung của một hoặc một vài gốc axit amin ở vị trí khác vị trí của “đột biến đặc hiệu”.

Số lượng "một hoặc một vài" cụ thể tốt hơn là từ 1 đến 20, tốt hơn nữa là từ 1 đến 10, tốt hơn thêm nữa là từ 1 đến 5, còn tốt hơn nữa là từ 1 đến 3. Sự thay thế, mất, xen hoặc bổ sung một hoặc một vài gốc axit amin nêu trên là đột biến bảo tồn mà duy trì chức năng thông thường của protein. Các ví dụ cụ thể về đột biến bảo tồn là các thay thế bảo tồn. Thay thế bảo tồn là đột biến trong đó sự thay thế diễn ra qua lại trong số Phe, Trp và Tyr, nếu vị trí thay thế là axit amin thơm; trong số Leu, Ile và Val, nếu nó là axit amin kỵ nước; giữa Gln và Asn, nếu nó là axit amin có cực; trong số Lys, Arg và His, nếu nó là axit amin có tính kiềm; giữa Asp và Glu, nếu nó là axit amin có tính axit; và giữa Ser và Thr, nếu nó là axit amin có nhóm hydroxyl. Các ví dụ về các thay thế được coi là các thay

thể bảo tồn bao gồm, cụ thể là thay thế bằng Ser hoặc Thr cho Ala, thay thế bằng Gln, His hoặc Lys cho Arg, thay thế bằng Glu, Gln, Lys, His hoặc Asp cho Asn, thay thế bằng Asn, Glu, hoặc Gln cho Asp, thay thế bằng Ser hoặc Ala cho Cys, thay thế bằng Asn, Glu, Lys, His, Asp, hoặc Arg cho Gln, thay thế bằng Gly, Asn, Gln, Lys, hoặc Asp cho Glu, thay thế bằng Pro cho Gly, thay thế bằng Asn, Lys, Gln, Arg, hoặc Tyr cho His, thay thế bằng Leu, Met, Val, hoặc Phe cho Ile, thay thế bằng Ile, Met, Val, hoặc Phe cho Leu, thay thế bằng Asn, Glu, Gln, His, hoặc Arg cho Lys, thay thế bằng Ile, Leu, Val, hoặc Phe cho Met, thay thế bằng Trp, Tyr, Met, Ile, hoặc Leu cho Phe, thay thế bằng Thr hoặc Ala cho Ser, thay thế bằng Ser hoặc Ala cho Thr, thay thế bằng Phe hoặc Tyr cho Trp, thay thế bằng His, Phe, hoặc Trp cho Tyr, và thay thế bằng Met, Ile, hoặc Leu cho Val. Hơn nữa, sự thay thế, mất, xen, bổ sung, đảo hoặc tương tự các gốc axit amin như đề cập nêu trên bao gồm đột biến xảy ra tự nhiên do sự khác biệt của cá thể, hoặc sự khác biệt loài sinh vật mà gen có nguồn gốc từ đó (đột biến hoặc biến thể).

Các ví dụ về “đột biến đặc hiệu” bao gồm, ví dụ, đột biến mà gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc axit amin khác gốc phenylalanin. Gốc axit amin sau khi thay thế có thể là axit amin có trong tự nhiên khác phenylalanin, và được chọn từ lysin, axit glutamic, tyrosin, valin, isoleuxin, serin, axit aspartic, asparagin, glutamin, arginin, xystein, methionin, tryptophan, glyxerin, alanin, và histidin, nhưng đặc biệt tốt hơn là serin.

"Vị trí X" trong trình tự axit amin là vị trí thứ X được đếm từ đầu tận cùng N của trình tự axit amin, và gốc axit amin của đầu tận cùng N là gốc axit amin ở vị trí 1. Vị trí của gốc axit amin là vị trí tương đối, và vị trí tuyệt đối của chúng có thể dịch chuyển do sự mất đoạn, xen đoạn, bổ sung hoặc hiện tượng tương tự của gốc hoặc các gốc axit amin. Tức là, khi một gốc axit amin bị mất ở phía đầu tận cùng N ở vị trí 246 trong trình tự của SEQ ID NO: 6, “gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6” có nghĩa là gốc axit amin thứ 245 được đếm từ đầu tận cùng N. Ngoài ra, khi một gốc axit

amin được xen vào ở phía đầu tận cùng N của vị trí 246 trong trình tự của SEQ ID NO: 6, “gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6” có nghĩa là gốc axit amin thứ 247 được đếm từ đầu tận cùng N.

Gốc axit amin mà là “gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6” trong trình tự axit amin bất kỳ có thể được xác định dựa trên sự định hướng giữa trình tự axit amin bất kỳ và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6. Sự định hướng có thể được tiến hành bằng, ví dụ, sử dụng phần mềm phân tích gen đã biết. Các ví dụ cụ thể về phần mềm như vậy bao gồm DNASIS được sản xuất bởi Hitachi Solutions, GENETYX được sản xuất bởi Genetyx, và v.v. (Elizabeth C. Tyler et al., *Computers và Biomedical Research*, 24 (1) 72-96, 1991; Barton GJ et al., *Journal of Molecular Biology*, 198 (2), 327-37, 1987).

Theo sáng chế, khi thể vận chuyển phosphat kiểu đại có trình tự axit amin khác trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6, “gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6” có thể không là gốc phenylalanin. Tức là, ví dụ, “đột biến mà gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc serin” là không chỉ giới hạn ở đột biến mà khi gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 là gốc phenylalanin, gốc phenylalanine này được thay thế bằng gốc serin, nhưng cũng bao gồm đột biến mà, khi gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 là gốc axit amin khác gốc phenylalanin và gốc serin, gốc axit amin này được thay thế bằng gốc serin.

Gen vận chuyển phosphat đột biến có thể thu được bằng cách biến đổi gen vận chuyển phosphat kiểu đại sao cho thể vận chuyển phosphat được mã hóa cần có “đột biến đặc hiệu”. Gen vận chuyển phosphat kiểu đại có thể là gen thu được từ vật chủ mà trong đó gen vận chuyển phosphat đã được đưa vào, hoặc có thể là gen của thể gốc dị thể. Sự biến đổi ADN có thể được tiến hành bằng phương pháp đã biết. Các ví dụ cụ thể về phương pháp gây đột biến đặc hiệu vị trí để đưa đột biến mong muốn vào vị trí mong muốn của ADN bao gồm, ví dụ,

phương pháp sử dụng PCR (Higuchi, R., 61, in PCR Technology, Erlich, H.A. Eds., Stockton Press, 1989; Carter P., Meth. In Enzymol., 154, 382, 1987), và phương pháp sử dụng thể thực khuẩn (Kramer, W. và Frits, H.J., Meth. in Enzymol., 154, 350, 1987; Kunkel, T.A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367, 1987). Ngoài ra, gen vận chuyển phosphat đột biến cũng có thể thu được cách tổng hợp hóa học.

Bằng cách đưa gen vận chuyển phosphat đột biến vào vi khuẩn coryneform, vi khuẩn coryneform có thể được tạo ra để chứa gen vận chuyển phosphate đột biến. Phương pháp đưa gen vận chuyển phosphat đột biến vào vi khuẩn coryneform không bị giới hạn một cách cụ thể, và phương pháp đã biết thông thường có thể được sử dụng. Ví dụ, gen vận chuyển phosphat đột biến có thể được đưa vào trong vi khuẩn coryneform theo phương pháp tương tự như phương pháp làm tăng số bản sao của gen được đề cập trên đây. Ngoài ra, gen vận chuyển phosphat kiểu đại của vi khuẩn coryneform có thể được biến đổi sao cho thể vận chuyển phosphat được mã hóa cần có “đột biến đặc hiệu” bởi đột biến tự nhiên hoặc xử lý bằng tác nhân gây đột biến. Khi vi khuẩn theo sáng chế chứa gen vận chuyển phosphat đột biến, vi khuẩn theo sáng chế có thể có hoặc có thể không có gen vận chuyển phosphat kiểu đại. Vi khuẩn theo sáng chế này có thể có một hoặc nhiều bản sao của gen vận chuyển phosphat đột biến.

Phương pháp biến nạp không bị giới hạn một cách cụ thể, và các phương pháp thông thường đã biết có thể được sử dụng. Có thể sử dụng, ví dụ, phương pháp xử lý các tế bào tiếp nhận bằng canxi clorua để làm tăng tính thấm của nó đối với ADN, mà đã được báo cáo đối với chủng *Escherichia coli* K-12 (Mandel, M. và Higa, A., J. Mol. Biol., 1970, 53, 159-162), và phương pháp chuẩn bị các tế bào khả biến từ các tế bào mà có mặt trong pha sinh trưởng, sau đó bằng cách biến nạp bằng ADN, mà đã được báo cáo đối với *Bacillus subtilis* (Duncan, C.H., Wilson, G.A. và Young, F.E., Gene, 1977, 1:153-167). Theo cách khác, cũng có thể sử dụng phương pháp tạo ra các tế bào nhận ADN trong các tế bào nguyên sinh hoặc tế bào trần, mà có thể dễ dàng nhận ADN tái tổ hợp, sau đó bằng cách đưa ADN tái tổ hợp vào các tế bào nhận ADN, mà đã biết là có thể

áp dụng cho *Bacillus subtilis*, xạ khuẩn, và nấm men (Chang, S. và Choen, S.N., 1979, Mol. Gen. Genet., 168:111-115; Bibb, M.J., Ward, J.M. và Hopwood, O.A., 1978, Nature, 274:398-400; Hinnen, A., Hicks, J.B. và Fink, G.R., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929-1933). Ngoài ra, phương pháp xung điện đã được báo cáo đối với vi khuẩn coryneform (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kaiko) số 2-207791) cũng có thể được sử dụng.

Sự tăng hoạt tính của protein có thể được khẳng định bằng đo hoạt tính của protein. Hoạt tính vận chuyển phosphat có thể được đo bằng cách, ví dụ, đo sự hấp thu axit phosphoric vô cơ sử dụng phương pháp đã biết (R.M. Harris et al., Journal of Bacteriology, Sept. 2001, pp,5008-5014).

Sự tăng hoạt tính của protein cũng có thể được khẳng định bằng cách khẳng định sự gia tăng biểu hiện của gen mã hóa protein. Sự gia tăng biểu hiện gen có thể được khẳng định bằng cách khẳng định sự tăng lượng dịch mã của gen, hoặc bằng cách khẳng định sự tăng về lượng protein được biểu hiện từ gen này.

Sự tăng lượng sao mã của gen có thể được khẳng định bằng cách so sánh lượng mARN được phiên mã từ gen này với lượng quan sát được ở chủng không được biến đổi như chủng kiểu dại hoặc chủng gốc. Các ví dụ về phương pháp đánh giá lượng mARN bao gồm phương pháp lai Northern, RT-PCR, và v.v. (Sambrook, J., et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual/Third Edition, Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001). Lượng mARN có thể tăng lên, ví dụ, 1,5 lần hoặc lớn hơn, 2 lần hoặc lớn hơn, hoặc 3 lần hoặc lớn hơn, so với lượng chủng không được biến đổi.

Sự tăng lượng protein có thể được khẳng định bằng phương pháp thẩm tách Western sử dụng các kháng thể (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001). Lượng protein có thể tăng lên, ví dụ, 1,5 lần hoặc lớn hơn, 2 lần hoặc lớn hơn, hoặc 3 lần hoặc lớn hơn, khi so với lượng protein của chủng không được biến đổi.

Các phương pháp làm tăng hoạt tính của protein được đề cập trên đây có thể được áp dụng để làm tăng hoạt tính của protein bất kỳ như các enzym sinh

tổng hợp axit amin dạng L, và tăng biểu hiện của gen bất kỳ như gen mã hóa các protein bất kỳ đó, ngoài tăng cường hoạt tính của thể vận chuyển phosphat.

<2> Phương pháp sản xuất axit L-glutamic theo sáng chế

Phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất axit L-glutamic bao gồm bước nuôi cấy vi khuẩn theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy, và thu gom axit amin dạng L từ môi trường này.

Môi trường được sử dụng không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn sao vi khuẩn theo sáng chế có thể tăng sinh trong đó, và axit L-glutamic có thể được tạo ra. Dùng làm môi trường nuôi cấy, ví dụ, môi trường thường được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn như vi khuẩn coryneform có thể được sử dụng. Dùng làm môi trường nuôi cấy, ví dụ, môi trường chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn phospho, và nguồn lưu huỳnh, cũng như các thành phần được chọn từ các thành phần hữu cơ và vô cơ khác nhau, nếu cần, có thể được sử dụng. Các loại và nồng độ của các thành phần trong môi trường có thể được xác định một cách thích hợp theo các điều kiện khác nhau như loại vi khuẩn được sử dụng và loại axit amin được tạo ra.

Các ví dụ cụ thể về nguồn cacbon bao gồm, ví dụ, saccharit như glucoza, fructoza, sucroza, lactoza, galactoza, xyloza, arabinoza, mật đường, dịch thủy phân tinh bột, và dịch thủy phân sinh khối, các axit hữu cơ như axit axetic, axit fumaric, axit citric, và axit succinic, các rượu như glyxerol, glyxerol thô, và etanol, và các axit béo. Dùng làm nguồn cacbon, loại nguồn cacbon duy nhất có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại nguồn cacbon có thể được sử dụng kết hợp.

Các ví dụ cụ thể về nguồn nitơ bao gồm, ví dụ, các muối amoni như amoni sulfat, amoni clorua, và amoni phosphat, nguồn nitơ hữu cơ như pepton, dịch chiết nấm men, dịch chiết thịt, và các sản phẩm phân hủy protein đậu nành, amoniac, và ure. Khí amoniac hoặc dung dịch nước amoniac được sử dụng để điều chỉnh độ pH cũng có thể được dùng làm nguồn nitơ. Dùng làm nguồn nitơ, loại nguồn nitơ duy nhất có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại nguồn nitơ có thể được sử dụng kết hợp.

Các ví dụ cụ thể về nguồn phosphat bao gồm, ví dụ, các muối của axit phosphoric như kali dihydrophosphat và dikali hydrophosphat, và các polyme của axit phosphoric như axit pyrophosphoric. Dùng làm nguồn phosphat, loại nguồn phosphat duy nhất có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại nguồn phosphat có thể được sử dụng kết hợp.

Các ví dụ cụ thể về nguồn lưu huỳnh bao gồm, ví dụ, các hợp chất lưu huỳnh vô cơ như các sulfat, các thiosulfat, và các sulfit, và các axit amin chứa lưu huỳnh như xystein, xystin, và glutathion. Dùng làm nguồn lưu huỳnh, loại nguồn lưu huỳnh duy nhất có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại nguồn lưu huỳnh có thể được sử dụng kết hợp.

Các ví dụ cụ thể về các thành phần hữu cơ và vô cơ khác nhau bao gồm, ví dụ, các muối vô cơ như natri clorua và kali clorua; các kim loại ở dạng vết như sắt, mangan, magie, và canxi; các vitamin như vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, các axit nicotinic, nicotinamit, và vitamin B12; các axit amin; các axit nucleic; và các thành phần hữu cơ chứa các thành phần như pepton, axit casamino, dịch chiết nấm men, và sản phẩm phân hủy protein đậu nành. Dùng làm các thành phần hữu cơ và các thành phần vô cơ khác nhau, loại thành phần duy nhất có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại thành phần có thể được sử dụng kết hợp.

Ngoài ra, khi thể đột biến khuyết dưỡng mà cần axit amin hoặc các chất tương tự cho sự sinh trưởng của nó được sử dụng, tốt hơn là bổ sung chất dinh dưỡng cần thiết vào môi trường này. Ví dụ, trong nhiều vi khuẩn sản xuất L-lysine, con đường sinh tổng hợp L-lysine được tăng cường và khả năng phân hủy L-lysine bị suy giảm. Do đó, khi vi khuẩn sản xuất L-lysine như vậy được nuôi cấy, ví dụ, một hoặc nhiều loại axit amin được chọn từ L-threonine, L-homoserine, L-isoleucine, và L-methionine là được ưu tiên bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Hơn nữa, khi axit L-glutamic được tạo ra bằng cách sử dụng vi khuẩn coryneform, tốt hơn là, ví dụ, làm giới hạn lượng biotin trong môi trường này, hoặc bổ sung chất hoạt động bề mặt hoặc penicillin vào môi trường này.

Các điều kiện nuôi cấy là không bị giới hạn cụ thể miễn sao vi khuẩn theo

sáng chế có thể tăng sinh, và axit amin dạng L đích có thể được tạo ra. Việc nuôi cấy có thể được tiến hành, ví dụ, dưới các điều kiện thông thường được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn như vi khuẩn coryneform. Các điều kiện nuôi cấy có thể được thiết lập một cách thích hợp theo các điều kiện khác nhau như loại vi khuẩn được sử dụng và loại axit amin được tạo ra.

Môi trường nuôi cấy có thể được tiến hành trong điều kiện ưa khí bằng cách sử dụng môi trường lỏng. Đặc biệt, việc nuôi cấy có thể được tiến hành bằng cách làm thông khí hoặc lắc. Nhiệt độ nuôi cấy có thể là, ví dụ, 20 đến 40°C, tốt hơn là 25 đến 37°C. Độ pH của môi trường có thể được điều chỉnh ở, ví dụ, từ 5 đến 8. Để điều chỉnh độ pH, các chất vô cơ hoặc hữu cơ có tính axit hoặc kiềm, như khí amoniac và v.v., có thể được sử dụng. Thời gian nuôi cấy có thể là, ví dụ, 15 đến 90 giờ. Việc nuôi cấy có thể được tiến hành ở dạng nuôi cấy theo mẻ, môi trường nuôi cấy cấp theo mẻ, nuôi cấy liên tục, hoặc dạng kết hợp của chúng. Ngoài ra, việc nuôi cấy có thể được tiến hành trong hai bước như nuôi cấy hạt và nuôi cấy chính. Trong trường hợp này, các điều kiện nuôi cấy của quá trình nuôi cấy hạt và nuôi cấy chính có thể giống hoặc không giống nhau. Ví dụ, cả hai quá trình nuôi cấy hạt và quá trình nuôi cấy chính có thể được tiến hành ở dạng nuôi cấy theo mẻ. Theo cách khác, ví dụ, quá trình nuôi cấy hạt có thể được tiến hành ở dạng nuôi cấy theo mẻ, và quá trình nuôi cấy chính có thể được tiến hành ở dạng nuôi cấy cấp theo mẻ hoặc nuôi cấy liên tục. Bằng cách nuôi cấy vi khuẩn theo sáng chế dưới các điều kiện này, axit amin dạng L được tích lũy trong môi trường này.

Hơn thế nữa, khi axit L-glutamic được tạo ra, việc nuôi cấy có thể được tiến hành bằng sử dụng môi trường lỏng được điều chỉnh để thỏa mãn điều kiện mà dưới điều kiện này axit L-glutamic được kết tủa, trong khi kết tủa axit L-glutamic trong môi trường. Các ví dụ về điều kiện mà dưới điều kiện này axit L-glutamic được kết tủa bao gồm, ví dụ, pH bằng 5,0 đến 4,0, tốt hơn là pH 4,5 đến 4,0, tốt hơn nữa là pH 4,3 đến 4,0, đặc biệt tốt hơn nữa là pH 4,0 (EP 1078989 A).

Axit amin dạng L thường có thể được thu gom từ dịch lên men

bằng cách kết hợp các phương pháp thông thường đã biết như phương pháp nhựa trao đổi ion (Nagai, H. et al., Separation Science và Technology, 39(16), 3691-3710), kết tủa, tách màng (Các đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) (Kokai) số 9-164323 và 9-173792), kết tinh (WO2008/078448, WO2008/078646), và các phương pháp khác. Khi axit amin dạng L tích tụ trong các tế bào, các tế bào có thể bị phá vỡ bằng, ví dụ, sóng siêu âm hoặc yếu tố tương tự, và sau đó axit amin dạng L có thể được thu gom bằng phương pháp nhựa trao đổi ion hoặc phương pháp tương tự từ dịch nổi thu được bằng cách loại bỏ các tế bào ra khỏi huyền phù đã phá tế bào bằng cách ly tâm. Axit amin dạng L được thu gom có thể là hợp chất tự do, muối của nó, hoặc hỗn hợp của nó. Các ví dụ về muối này bao gồm, ví dụ, sulfat, hydroclorua, cacbonat, muối amoni, muối natri, và muối kali. Ví dụ, trong trường hợp axit L-glutamic, mononatri L-glutamat (MSG) có thể thu được bằng cách kết tinh monoamoni L-glutamat trong nước xuýt lên men bằng cách bổ sung axit, và sau đó bằng cách thêm một đẳng mol natri hydroxit vào tinh thể. Ngoài ra, sự mất màu có thể được thực hiện bằng cách sử dụng cacbon hoạt tính trước và/hoặc sau khi kết tinh (xem tài liệu Tetsuya KAWAKITA, "Industrial Crystallization for Monosodium L-Glutamate.", Bulletin of the Society of Sea Water Science, Japan, Vol.56:5).

Ngoài ra, khi axit amin dạng L lắng trong môi trường này, có thể được thu gom bằng cách ly tâm, lọc, hoặc phương pháp tương tự. Axit amin dạng L lắng trong môi trường cũng có thể được tách cùng với axit amin dạng L hòa tan trong môi trường sau khi axit amin dạng L hòa tan trong môi trường được kết tinh.

Axit amin dạng L được thu gom có thể chứa các tế bào vi khuẩn, các thành phần của môi trường, độ ẩm, và chất trao đổi sản phẩm phụ của vi khuẩn, ngoài axit amin dạng L. Độ tinh khiết của axit amin dạng L thu gom được có thể là, ví dụ, 50% hoặc cao hơn, tốt hơn là 85% hoặc cao hơn, đặc biệt tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn (patent Nhật Bản số 1214636, patent Mỹ số 5,431,933, 4,956,471, 4,777,051, 4,946,654, 5,840,358, 6,238,714, Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20050025878).

Nếu axit amin dạng L là axit L-glutamic, ví dụ như tinh thể mononatri L-glutamat có thể được sử dụng làm gia vị umami. Tinh thể mononatri L-glutamat có thể được sử dụng làm gia vị kết hợp với axit nucleic như muối 5'-GMP dinatri và muối 5'-IMP dinatri mà cũng có vị umami.

Ngoài ra, phương án của phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất axit L-glutamic bao gồm bước nuôi cấy vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất axit L-glutamic trong môi trường nuôi cấy, và thu gom axit amin dạng L từ môi trường này, trong đó vi khuẩn này chứa gen *pitA* đột biến mã hóa thể vận chuyển phosphat có đột biến mà gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc axit amin khác gốc phenylalanin.

Đối với phương án của phương pháp theo sáng chế, các phần mô tả được đề cập trên đây liên quan đến vi khuẩn theo sáng chế và phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng, *mutatis mutandis*. Ví dụ, trong phương án này, tốt hơn là gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc serin. Hơn nữa, trong phương án này, vi khuẩn coryneform tốt hơn là *Corynebacterium glutamicum*.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được giải thích cụ thể hơn với việc tham khảo các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, các ví dụ này không được hiểu là làm giới hạn sáng chế theo nghĩa bất kỳ.

Ví dụ 1: Nuôi cấy để sản xuất Glu sử dụng chủng tăng cường *pitA*

Trong ví dụ này, quá trình sản xuất Glu được tiến hành bằng cách sử dụng chủng sản xuất Glu của *C. glutamicum* mà trong đó sự biểu hiện của gen *pitA* được tăng cường, và sự ảnh hưởng của việc làm tăng sự biểu hiện gen *pitA* đối với quá trình sản xuất Glu được đánh giá.

Các chủng được sử dụng là như sau.

C. glutamicum 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB**/pVK9

C. glutamicum 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB**/pVK9-Plac-*pitA*

(1) Các phương pháp thiết kế các chủng vi khuẩn

Dùng làm chủng sản xuất Glu mẫu, chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA yggB* được thiết kế bằng phương pháp sau sử dụng chủng *C. glutamicum* 2256 (ATCC 13869) làm chủng gốc. Đoạn mồi được sử dụng được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1

Đoạn mồi	Trình tự nucleotit (5' -> 3')	SEQ ID NO:
1	cactgcacggccctgcgaac	7
2	cgccaaactaggcgccaaaaattcctgatttcctaacggac	8
3	tgtgggccttcggcgaggac	9
4	gtccggttagggaaatcaggaatttttggcgcctagtggcg	10
5	gagtcgaccgcacccattttcata	11
6	tggtcgacgtgaatgctcggcgggatcc	12
7	ccaggcactcgctcctcggtt	13
8	aggctagtgcaggactataaagaccagttctcctaaaaataacgtgtc	14
9	tccatcgtggccaccgatecc	15
10	gacacgttatTTTTtaggagaactggcttttatagtcctgcactagcct	16
11	cgggatccccaccggcgctactcgtg	17
12	ccacggatccttccaatgctattgggtg	18
13	agcttgcatgcctgcagaggaggattataatggtcaccccaatca	19
14	cggatcccgggatcctgcccacgagggtgacctca	20

Đầu tiên, các đoạn ADN để làm khuyết gen *ldhA* được làm khuếch đại bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng 2256 dùng làm mẫu, và cặp đoạn mồi 1 và 2 và cặp đoạn mồi 3 và 4. Sau đó, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng hỗn hợp với lượng tương đương của cả hai đoạn được khuếch đại dùng làm mẫu cũng như các đoạn mồi 5 và 6 để thu được đoạn ADN bao gồm cả hai đoạn được dung hợp với nhau. Đoạn ADN thu được được xử lý bằng *SalI*, và được đưa vào plasmit pBS4S (WO2005/113745) ở vị trí *SalI* để thiết kế plasmit để làm khuyết đoạn *ldhA*. Plasmit để làm khuyết đoạn *ldhA* được xen vào nhiễm sắc thể của chủng 2256, và sau đó được phục hồi từ đó, để làm khuyết gen *ldhA*.

Sau đó, các đoạn ADN để làm khuyết gen *sucA* được làm khuếch đại bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng 2256 dùng làm mẫu, và cặp đoạn mồi 7 và 8 và cặp đoạn mồi 9 và 10. Sau đó, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng hỗn hợp với lượng tương đương của cả hai đoạn được khuếch đại làm mẫu cũng như các đoạn mồi 11 và 12 để thu được đoạn ADN bao gồm cả hai đoạn được dung hợp với nhau này. Đoạn ADN thu được được xử lý bằng *BamHI*, và được đưa vào plasmit pBS3 (WO2006/070944) ở vị trí *BamHI* để thiết kế plasmit để làm khuyết đoạn *sucA*. Plasmit để làm khuyết đoạn *sucA* được xen

vào nhiễm sắc thể của chủng 2256 Δ ldhA, và sau đó được phục hồi từ đó, để làm khuyết gen *sucA*. Một vài biến thể của chủng thiếu *sucA* thu được được nuôi cấy dưới điều kiện đủ biotin, và chủng có khả năng sản xuất Glu là được chọn. Kết quả là, chủng sản xuất Glu có đột biến IS (V419::IS) trong gen *yggB* thu được. Trình tự nucleotit của gen *yggB* có đột biến IS (V419::IS) và trình tự axit amin của protein YggB được mã hóa bởi gen này lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NOS: 23 và 24. Chủng sản xuất Glu thu được được chỉ định là chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB**.

Plasmit biểu hiện *pitA* (pVK9-Plac-*pitA*) được thiết kế bằng phương pháp sau. Đầu tiên, đoạn gen *pitA* được khuếch đại bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng 2256 làm mẫu cũng như các đoạn mồi 13 và 14. Sau đó, đoạn được khuếch đại này được liên kết với plasmit pVK9 (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20060141588) được xử lý bằng *Bam*HI và *Pst*I sử dụng In-Fusion (TaKaRa INC.) để thiết kế plasmit biểu hiện *pitA*. Plasmit biểu hiện *pitA* được thiết kế được chỉ định pVK9-Plac-*pitA*.

pVK9-Plac-*pitA* và pVK9 được thiết kế làm đối chứng vector được đưa vào vi khuẩn sản xuất Glu, chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB**, để thiết kế lần lượt chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB**/pVK9-Plac-*pitA* và chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB**/pVK9.

(2) Nuôi cấy sản xuất Glu

Việc nuôi cấy sản xuất Glu được tiến hành bằng cách sử dụng chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB**/pVK9-Plac-*pitA* và chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB**/pVK9. Thành phần của môi trường sử dụng được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

	Môi trường 1		Môi trường 2	
Glucosa	80	g/l	80	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	30	g/l	30	g/l
KH ₂ PO ₄	1	g/l	1	g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4	g/l	0,4	g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	g/l	0,01	g/l
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,01	g/l	0,01	g/l
VB ₁	200	µg/l	200	µg/l
Biotin	60	µg/l	0	µg/l
Mameno	0,48	g/l	0,48	g/l

Môi trường có thành phần nêu trên và được điều chỉnh đến độ pH 8,0 bằng KOH được tạo ra, thanh trùng bằng cách hấp (115°C, 15 phút), và được sử dụng cho quá trình nuôi cấy.

<Phương pháp nuôi cấy>

Việc nuôi cấy (nuôi cấy sơ bộ và nuôi cấy chính) được tiến hành bằng cách đưa 20 ml môi trường vào bình cầu Sakaguchi, bổ sung 50 g/l CaCO₃ vào đó, và lắc môi trường này ở 31,5°C bằng máy lắc hộp. Đầu tiên, đối với quá trình nuôi cấy sơ bộ, mỗi chủng được đề cập trên đây được nuôi cấy trong 24 giờ bằng cách sử dụng môi trường 1. Sau đó, 2 ml dịch nuôi cấy sơ bộ thu được được ủ với môi trường 2, và Tween 40 (nồng độ cuối, 4 g/l) được bổ sung vào đó 2 giờ sau khi ủ, để tiến hành quá trình nuôi cấy chính. Môi trường được lấy mẫu 17 giờ sau khi ủ. Sacarit và axit glutamic dư được định lượng bằng cách sử dụng AS-310 (Asahi Chemical Industry).

<Kết quả và thảo luận>

Các kết quả được thể hiện trong bảng 3. Trong bảng 3 này, "RS" thể hiện lượng sacarit dư, và "Glu" thể hiện lượng axit glutamic. Điều này cho thấy rằng bằng ví dụ này mà sự sinh trưởng và hiệu suất Glu của *C. glutamicum* được cải thiện bằng cách làm tăng sự biểu hiện của gen *pitA* trong *C. glutamicum*. Do đó,

kết luận rằng việc làm tăng hoạt tính của thể vận chuyển phosphat được mã hóa bởi gen *pitA* có hiệu quả để sản xuất axit amin như axit glutamic.

Bảng 3

Chủng	OD620nm (X51)	RS (g/l)	Glu (g/l)
2256 Δ ldhA Δ sucA yggB*/pVK9	0,498	26,2	35,8
2256 Δ ldhA Δ sucA yggB*/pVK9-Plac- <i>pitA</i>	0,645	15,0	41,8

Ví dụ 2: Quá trình nuôi cấy để sản xuất Glu sử dụng chủng đột biến *pitA*

Trong ví dụ này, quá trình sản xuất Glu được tiến hành bằng cách sử dụng chủng sản xuất Glu của *C. glutamicum* trong đó đột biến được đưa vào gen *pitA*, và sự ảnh hưởng của đột biến gen *pitA* đối với quá trình sản xuất Glu được đánh giá.

Các chủng được sử dụng là như sau.

C. glutamicum 2256 Δ ldhA Δ sucA yggB*

C. glutamicum 2256 Δ ldhA Δ sucA yggB* *pitA*mut

(1) Các phương pháp thiết kế các chủng vi khuẩn

Chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA yggB* *pitA*mut trong đó đột biến được đưa vào gen *pitA* được thiết kế bằng sử dụng chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA yggB*, mà là chủng làm mẫu sản xuất Glu được thiết kế trong ví dụ 1, dùng làm chủng gốc. Các đoạn nối sử dụng được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

Đoạn nối	Trình tự nucleotit (5' → 3')	SEQ ID NO
15	gagct cggc acccggggat ccat ggt caccccaat cat ggg	27
16	cccaacct t ccat cccf ccaat t act t ggt t acct cat t ct	28

Plasmid pBS4S-*pitA*mut để đưa đột biến vào trong *pitA* được thiết kế bằng phương pháp sau. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng vi khuẩn sản xuất Glu B3 trong đó đột biến thay thế gốc phenylalanin ở vị trí 246 của protein PitA bằng gốc serin (Phe246Ser ttc→tcc) được đưa vào vùng mã hóa của gen *pitA* làm mẫu cũng như các đoạn nối 15 và 16 để làm khuếch đại đoạn gen *pitA* có đột biến nêu trên. Sau đó, đoạn được khuếch đại

này được liên kết với plasmit pBS4S được xử lý bằng *Pst*I và *Bam*HI bằng cách sử dụng In-Fusion (TaKaRa INC.) để thiết kế plasmit để đưa đột biến vào trong *pitA*. Plasmit được thiết kế để đưa đột biến vào trong *pitA* được chỉ định là pBS4S-*pitA*mut.

pBS4S-*pitA*mut được thiết kế này được xen vào nhiễm sắc thể của chủng vi khuẩn sản xuất Glu 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB**, và sau đó được phục hồi từ đó, để thiết kế chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB** *pitA*mut trong đó đột biến này được đưa vào gen *pitA*.

Mặc dù chủng được gây đột biến *pitA* nêu trên, chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB** *pitA*mut, được thiết kế bằng sử dụng plasmit để đưa đột biến được thiết kế bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng vi khuẩn sản xuất Glu B3 làm mẫu, cũng có thể được thiết kế bằng cách sử dụng plasmit để đưa đột biến được tạo ra bằng kit PrimeSTAR® Mutagenesis Basal sản xuất bởi Takara Bio. Ví dụ, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của chủng kiểu đại như chủng *C. glutamicum* 2256 (ATCC 13869) làm mẫu cũng như các đoạn mồi 15 và 16 để làm khuếch đại đoạn gen *pitA* không có đột biến. Sau đó, đoạn được khuếch đại này được liên kết với plasmit pBS4S được xử lý bằng *Bam*HI và *Pst*I bằng cách sử dụng In-Fusion (TaKaRa INC.) để thiết kế plasmit bao gồm trình tự của gen *pitA* kiểu đại. Ngoài ra, PCR có thể được tiến hành bằng sử dụng plasmit này làm mẫu cũng như các đoạn mồi thích hợp để biến đổi T ở vị trí 737 của gen *pitA* thành C theo hướng dẫn của kit PrimeSTAR® Mutagenesis Basal để thiết kế plasmit pBS4S-*pitA*mut để đưa đột biến vào trong *pitA*. Chủng đột biến *pitA* có thể được thiết kế bằng cách sử dụng plasmit này.

(2) Quá trình nuôi cấy để sản xuất Glu

Việc nuôi cấy để sản xuất Glu được tiến hành bằng cách sử dụng chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB** và chủng 2256 Δ ldhA Δ sucA *yggB** *pitA*mut. Thành phần của môi trường sử dụng được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5

	Môi trường 3	
Glucoza	80	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	30	g/l
KH ₂ PO ₄	1	g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4	g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	g/l
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,01	g/l
VB ₁	200	µg/l
Biotin	300	µg/l
Mameno	0,48	g/l

Môi trường có thành phần nêu trên và được điều chỉnh đến độ pH 8,0 bằng KOH được điều chế, được thanh trùng bằng cách hấp (115°C, 15 phút), và được sử dụng cho quá trình nuôi cấy.

<Phương pháp nuôi cấy>

Việc nuôi cấy (nuôi cấy sơ bộ và nuôi cấy chính) được tiến hành bằng cách đặt 20 ml môi trường vào trong bình cầu Sakaguchi, bổ sung 50 g/l CaCO₃ vào đó, và lắc môi trường ở 31,5°C bằng dụng cụ lắc hộp. Đầu tiên, đối với quá trình nuôi cấy sơ bộ, mỗi chủng được đề cập trên đây được nuôi cấy trong 24 giờ bằng cách sử dụng môi trường 3. Sau đó, 2 ml dịch nuôi cấy sơ bộ thu được được ủ với môi trường 3, và Tween 40 (nồng độ cuối, 4 g/l) được bổ sung vào đó 2 giờ sau khi ủ, để tiến hành quá trình nuôi cấy chính. Môi trường được lấy mẫu 21,5 giờ sau khi ủ. Sacarit dư và axit glutamic được định lượng bằng cách sử dụng AS-310 (Asahi Chemical Industry).

<Kết quả và thảo luận>

Các kết quả được thể hiện trong bảng 6. Trong bảng 6 này, "RS" thể hiện lượng sacarit dư, và "Glu" là lượng axit glutamic. Điều này cho thấy rằng bằng ví dụ này sự sinh trưởng và hiệu suất Glu *C. glutamicum* được cải thiện bằng cách đưa đột biến (Phe246Ser) vào gen *pitA* trong *C. glutamicum*. Do đó, kết luận được rằng đột biến *pitA* (Phe246Ser) có hiệu quả để sản xuất axit amin như axit glutamic.

Bảng 6

Chủng	OD620nm (X51)	RS (g/l)	Glu (g/l)
2256 Δ ldhA Δ sucA yggB*	0,867	0,0	45,8
2256 Δ ldhA Δ sucA yggB* <i>pitA</i> mut	0,888	0,0	47,3

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Theo sáng chế, khả năng sản xuất axit L-glutamic của vi khuẩn *coryneform* có thể được cải thiện, và axit L-glutamic có thể được sản xuất một cách hiệu quả.

Giải thích danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1, Trình tự nucleotit của gen *pitA* của *E. coli* MG1655

SEQ ID NO: 2, Trình tự axit amin của protein *PitA* của *E. coli* MG1655

SEQ ID NO: 3, Trình tự nucleotit của gen *pitA* của *Pantoea ananatis* LMG20103

SEQ ID NO: 4, Trình tự axit amin của protein *PitA* của *Pantoea ananatis* LMG20103

SEQ ID NO: 5, Trình tự nucleotit của gen *pitA* của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

SEQ ID NO: 6, Trình tự axit amin của protein *PitA* *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

Các SEQ ID NO: 7 đến 20, các đoạn nối

SEQ ID NO: 21, Trình tự nucleotit của gen *yggB* của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

SEQ ID NO: 22, Trình tự axit amin của protein YggB của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

SEQ ID NO: 23, Trình tự nucleotit của gen *yggB* (V419::IS) của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

SEQ ID NO: 24, Trình tự axit amin của protein YggB (V419::IS) của *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

SEQ ID NO: 25, Trình tự nucleotit của gen *pitA* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

SEQ ID NO: 26, Trình tự axit amin của protein *PitA* của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Các SEQ ID NO: 27 và 28, các đoạn mồi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất axit amin dạng L bao gồm các bước:

nuôi cấy vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất axit amin dạng L trong môi trường nuôi cấy; và

thu gom axit amin dạng L từ môi trường này,

trong đó vi khuẩn này được biến đổi sao cho hoạt tính của thể vận chuyển phosphat, protein *pitA* được tăng cường và trong đó axit amin dạng L là axit L-glutamic.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hoạt tính của thể vận chuyển phosphat được làm tăng bằng cách làm tăng sự biểu hiện của gen *pitA*.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó gen *pitA* là ADN được xác định theo (a) hoặc (b) sau:

(a) ADN bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 hoặc 25,

(b) ADN có thể lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự bổ sung với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 hoặc 25 hoặc với đoạn dò mà có thể được tạo ra từ trình tự bổ sung này, và trong đó ADN có thể lai này mã hóa cho protein có hoạt tính vận chuyển phosphat.

4. Phương pháp theo điểm 2 hoặc 3, trong đó gen *pitA* là ADN mã hóa cho protein được xác định theo (A) hoặc (B) sau:

(A) protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 hoặc 26,

(B) protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 hoặc 26 nhưng bao gồm sự thay thế, mất, xen, hoặc bổ sung một đến 20 gốc axit amin, và trong đó protein này có hoạt tính vận chuyển phosphat.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó sự biểu hiện của gen này được tăng cường bằng cách làm tăng số bản sao của gen, và/hoặc bằng cách biến đổi trình tự kiểm soát sự biểu hiện của gen này.

6. Phương pháp sản xuất axit amin dạng L bao gồm các bước:

nuôi cấy vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất axit amin dạng L trong môi trường nuôi cấy; và

thu gom axit amin dạng L từ môi trường này,

trong đó vi khuẩn này chứa gen *pitA* đột biến mã hóa thể vận chuyển phosphat có đột biến mà gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc axit amin khác gốc phenylalanin và trong đó axit amin dạng L là axit L-glutamic.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc serin.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó vi khuẩn này là vi khuẩn *Corynebacterium*.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó vi khuẩn coryneform là *Corynebacterium glutamicum*.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó axit L-glutamic là monoamoni L-glutamat hoặc mononatri L-glutamat.

11. ADN mã hóa thể vận chuyển phosphat có đột biến mà gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc serin.

12. Vi khuẩn coryneform chứa gen *pitA* đột biến mã hóa thể vận chuyển phosphat có đột biến mà gốc axit amin tương ứng với gốc phenylalanin ở vị trí 246 trong SEQ ID NO: 6 được thay thế bằng gốc serin.