



(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)



1-0031717

(51)⁸ C12N 15/77; C12R 1/15; C12P 13/06

(13) B

(21) 1-2018-01062

(22) 25/08/2016

(86) PCT/KR2016/009438 25/08/2016

(87) WO 2017/034343 02/03/2017

(30) 10-2015-0119785 25/08/2015 KR

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/06/2018 363A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

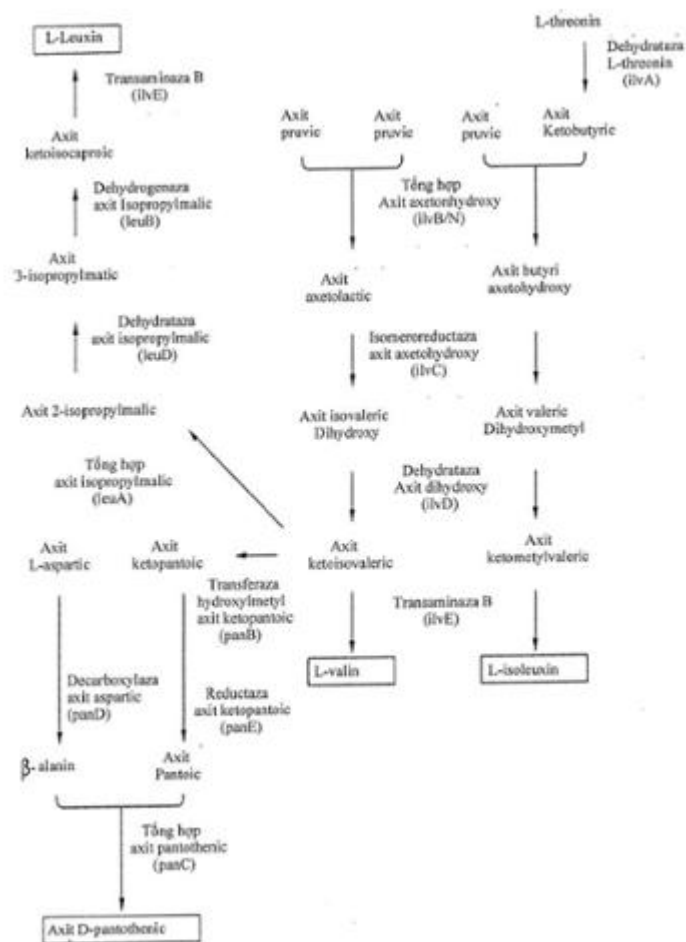
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) SONG, Byeong Cheol (KR); LEE, Ji Hye (KR); JEON, Ae Ji (KR); KIM, Jong Hyun (KR); KIM, Hye Won (KR).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) CHŨNG ĐỘT BIẾN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM SẢN XUẤT L-LEUXIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-LEUXIN SỬ DỤNG CHŨNG ĐỘT BIẾN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản xuất L-leuxin và phương pháp sản xuất L-leuxin bằng cách sử dụng vi sinh vật này, và cụ thể hơn nữa là, sáng chế đề cập đến chủng đột biến Corynebacterium glutamicum có khả năng kháng với L-leuxin và dẫn xuất của nó, khả năng sản xuất L-leuxin được cải thiện, và phương pháp sản xuất L-leuxin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản xuất L-leuxin và phương pháp sản xuất L-leuxin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các axit amin mạch nhánh đề cập đến ba loại axit amin (tức là, L-valin, L-leuxin và L-isoleuxin) và chúng được biết là được chuyển hóa chính trong cơ và được sử dụng như nguồn năng lượng trong quá trình hoạt động thể chất. Cùng với sự nâng cao nhận thức về vai trò quan trọng của các axit amin mạch nhánh này trong việc duy trì và tăng khối cơ trong hoạt động thể chất, việc sử dụng của chúng cũng tăng lên. Cụ thể là, L-leuxin là axit amin thiết yếu và được sử dụng rộng rãi trong y học, thực phẩm, các chất phụ gia thức ăn, các hóa chất công nghiệp, v.v.

Trong khi đó, các axit amin mạch nhánh được sản xuất chủ yếu bởi các vi sinh vật thuộc chi *Escherichia* hoặc chi *Corynebacterium* đã biết là được sinh tổng hợp từ axit 2-ketoisocaproic, tiền chất, sau khi trải qua một số bước từ axit pyruvic (các Patent Hàn Quốc số 10-0220018 và 10-0438146). Tuy nhiên, các enzym bao gồm các quá trình sinh tổng hợp leuxin có vấn đề khi chúng trải qua sự ức chế ngược gây ra bởi sản phẩm cuối cùng, tức là, L-leuxin hoặc dẫn xuất của chúng, do đó làm cho khó khăn để thực hiện sản xuất công nghiệp quy mô lớn của L-leuxin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả của sáng chế đã nỗ lực phát triển các vi sinh vật sản xuất L-leuxin với hiệu suất cao được so với các chủng truyền thống. Kết quả là, họ được phát hiện rằng các chủng đột biến thu được bằng cách sử dụng vi sinh vật sản xuất axit glutamic có khả năng kháng với norleuxin (NL) (tức là, dẫn xuất leuxin), và sự ức chế ngược bởi L-leuxin hoặc dẫn xuất của chúng được giải phóng từ các chủng đột biến này, và do đó L-leuxin được sản xuất với hiệu suất cao, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* có khả năng sản xuất L-leuxin mới.

Mục đích khác của sáng chế là để đề xuất phương pháp sản xuất L-leuxin bằng cách sử dụng chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum*.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Vi sinh vật thuộc chi *Corynebacterium glutamicum* là vi sinh vật kháng với L-leuxin hoặc dẫn xuất của chúng và do đó có thể ngăn chặn sự ức chế ngược và có hiệu suất L-leuxin được cải thiện được so với chủng gốc của nó. Do đó, phương pháp sản xuất L-leuxin bằng cách sử dụng vi sinh vật của sáng chế có thể sản xuất L-leuxin và hiệu quả và hiệu suất cao.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ tiến trình minh họa phương pháp sinh tổng hợp của L-leuxin mà là sản phẩm cuối cùng của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Khía cạnh của sáng chế đề xuất chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* mới (chủng *Corynebacterium glutamicum* biến đổi) sản xuất L-leuxin, và cụ thể là, chủng đột biến được đưa vào theo số truy cập trình tự KCCM11661P và chủng đột biến đưa vào theo số truy cập trình tự KCCM11662P cho việc sản xuất L-leuxin.

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, thuật ngữ “L-leuxin”, là axit amin thiết yếu, để chỉ axit amin L được thể hiện bởi công thức $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ tương ứng cấu trúc với các axit amin mạch nhánh cùng với L-valin và L-isoleuxin.

Trong khi đó, theo quá trình sinh tổng hợp của L-leuxin trong các vi sinh vật, đã biết là L-leuxin được sinh tổng hợp từ axit pyruvic thông qua axit axetolactic, axit isovaleric dihydroxy, axit ketoisovaleric, axit 2-isopropylmalic, axit 3-isopropylmalic, và axit ketoisocaproic thông qua quá trình sinh tổng hợp được thể hiện trên Fig.1. Ngoài ra, L-leuxin được sinh tổng hợp bằng cách xúc tác quá trình sinh tổng hợp bằng cách sử dụng các enzym, chẳng hạn như synthaza của axit axetohydroxy, isomeroreductaza của axit axetohydroxy, dehydrataza của axit dihydroxy, synthaza của axit isopropylmalic, dehydrataza của axit isopropylmalic, dehydrogenaza của axit isopropylmalic và transaminaza B. Tuy nhiên, thật khó để sản xuất công nghiệp chỉ một loại axit amin

mạch nhánh thông qua quá trình lên men bởi vì các enzym được sử dụng theo các con đường tương tự như quá trình sinh tổng hợp của các axit amin mạch nhánh (tức là, L-valin, L-isoleuxin và L-leuxin). Ngoài ra, do sự xuất hiện của sự ức chế ngược bằng sản phẩm cuối (tức là, L-leuxin hoặc dẫn xuất của chúng), đây là vấn đề trong sản xuất quy mô lớn công nghiệp của L-leuxin. Về vấn đề này, chủng đột biến theo sáng chế có thể kháng với L-leuxin hoặc dẫn xuất của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, thuật ngữ “dẫn xuất” có thể chỉ các hợp chất mà đã biết là có khả năng ức chế khả năng sản xuất L-leuxin của các vi sinh vật bằng việc cảm ứng sự ức chế ngược liên quan đến quá trình sinh tổng hợp của L-leuxin, sản phẩm cuối cùng của sáng chế. Các ví dụ về các hợp chất có thể bao gồm isoleuxin, terleuxin, norleuxin, xycloleuxin, v.v, nhưng không giới hạn ở đó. Cụ thể là, chủng đột biến có thể kháng với ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm leuxin, isoleuxin, terleuxin, norleuxin, và xycloleuxin, cụ thể hơn nữa là, norleuxin. Nhìn chung, được biết là quá trình sinh tổng hợp được ức chế khi L-leuxin được tích tụ trên mức cụ thể trong tế bào. Do đó, chủng bất kỳ có khả năng kháng với dẫn xuất có thể giải phóng sự ức chế bởi L-leuxin và có thể sản xuất L-leuxin thậm chí với nồng độ L-leuxin cao.

Chủng đột biến mong muốn của vi sinh vật sản xuất L-leuxin theo sáng chế có thể thu được bằng cách gây đột biến chủng gốc của nó. Cụ thể là, gây đột biến của vi sinh vật có thể được thực hiện bởi nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và có thể sử dụng gây đột biến vật lý hoặc gây đột biến hóa học. Các ví dụ về các tác nhân gây đột biến hóa học thích hợp cho sáng chế có thể bao gồm N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG), diepoxybutan, etyl metansulfonat, các hợp chất mustard, hydrazin, và nitrit, nhưng các tác nhân gây đột biến hóa học không giới hạn ở đó. Ngoài ra, các ví dụ về các tác nhân gây đột biến vật lý có thể bao gồm tia cực tím và các bức xạ gamma, nhưng các tác nhân gây đột biến vật lý không giới hạn ở đó.

Khi thực hiện quá trình gây đột biến, chủng gốc chịu tác động bởi tác nhân gây đột biến với nồng độ mà có thể để lại kích thước cụ thể của quần thể sống sót của chủng gốc. Kích thước thay đổi với loại tác nhân gây đột biến và phụ thuộc vào lượng đột biến được gây ra trong quần thể sống sót với tỷ lệ gây chết không đổi. Ví dụ, trong trường hợp của NTG, tỷ lệ gây chết có thể giữ lại khoảng

10% đến 50% của quần thể ban đầu sống sót. Sự gây đột biến bằng axit nitrat có thể giữ lại khoảng 0,01% đến 0,1% quần thể ban đầu sống sót, và sự đột biến bằng tia cực tím có thể giữ lại khoảng 1,0% của quần thể ban đầu sống sót, nhưng các tác nhân gây đột biến không giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất ra L-leuxin mà bao gồm việc nuôi cấy chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* và thu hồi L-leuxin từ chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* hoặc môi trường nuôi cấy của chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, thuật ngữ “nuôi cấy” có nghĩa là các vi sinh vật được sinh trưởng trong các điều kiện môi trường được kiểm soát nhân tạo thích hợp. Nuôi cấy vi sinh vật của sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy *Corynebacterium glutamicum* đã biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cụ thể là, các ví dụ về các phương pháp nuôi cấy có thể bao gồm nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục, và nuôi cấy được cung cấp theo mẻ, nhưng các phương pháp nuôi cấy không giới hạn ở đó. Các phương pháp khác nhau này được bộc lộ, ví dụ trong tài liệu “Biochemical Engineering” (James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp. 138 to 176, 1991), v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, thuật ngữ “sự nuôi cấy” để chỉ chất chứa môi trường trong đó vi sinh vật đang sinh trưởng hoặc đã sinh trưởng trong điều kiện môi trường kiểm soát nhân tạo thích hợp. Môi trường nuôi cấy không bao gồm vi sinh vật được sinh trưởng theo nghĩa hẹp, nhưng có thể bao gồm nó theo nghĩa rộng. “Sự nuôi cấy” bao gồm các chất khác nhau được giải phóng vào môi trường bởi vi sinh vật trong quá trình sinh trưởng của nó với các thành phần môi trường được thiết lập cho việc nuôi cấy vi sinh vật, và cụ thể là, leuxin, mà là các chất mục tiêu.

Môi trường được sử dụng cho quá trình nuôi cấy phải đáp ứng các yêu cầu nuôi cấy của chủng cụ thể theo cách thích hợp. Các ví dụ về môi trường nuôi cấy đối với các chủng *Corynebacterium* được bộc lộ (e.g., Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., U.S.A., 1981). Các ví dụ về các nguồn cacbon được sử dụng có thể bao gồm các sacarit và các cacbohydrat, chẳng hạn như glucozơ, sacarozơ, lactozơ, fructozơ, maltozơ, tinh bột, và xenlulozơ; các dầu và chất béo, chẳng hạn như dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu thầu dầu, và dầu dừa; các axit béo, chẳng hạn như axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic; các rượu, chẳng hạn như glyxerol và

etanol; và các axit hữu cơ, chẳng hạn như axit axetic, nhưng các nguồn cacbon không chỉ giới hạn ở đó. Các chất này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp. Các ví dụ về nguồn nitơ được sử dụng có thể bao gồm pepton, chiết xuất men, chiết xuất thịt, chiết xuất mạch nha, rượu ngô ngâm, bột đậu nành, và urê; hoặc các hợp chất vô cơ, như amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat và amoni nitrat, nhưng các nguồn nitơ không giới hạn ở đó. Các nguồn nitơ có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp. Ví dụ về các nguồn phospho được sử dụng có thể bao gồm kali dihydro phosphat hoặc dikali hydro phosphat hoặc các muối có chứa natri tương ứng nhưng nguồn phospho không giới hạn ở đó. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm các muối kim loại chẳng hạn như magiê sulphat hoặc sắt sulphat mà cần thiết cho sự sinh trưởng. Ngoài các chất ở trên, các chất sinh trưởng cần thiết, chẳng hạn như có thể bao gồm các axit amin và các vitamin. Các tiền chất phù hợp cũng có thể được sử dụng trong môi trường nuôi cấy. Các chất được đề cập ở trên có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy theo cách thích hợp bằng nuôi cấy mẻ hoặc nuôi cấy liên tục trong quá trình nuôi cấy.

Trong khi đó, độ pH của nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng các hợp chất bazơ chẳng hạn như natri hydroxit, kali hydroxit, và amoniac, hoặc các hợp chất axit chẳng hạn như axit phosphoric và axit sulfuric, theo cách thích hợp. Ngoài ra, sự tạo thành các bọt khí có thể được ngăn chặn bằng cách sử dụng tác nhân chống tạo bọt chẳng hạn như este của polyglycol axit béo. Để duy trì các điều kiện hiếu khí, oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ, không khí) được bơm vào môi trường nuôi cấy. Nhìn chung, nhiệt độ của môi trường nuôi cấy có thể nằm trong khoảng từ 20 đến 45°C. Quá trình nuôi cấy được tiếp tục cho đến khi việc sản xuất L-leuxin đạt đến mức tối đa của nó, mà thường đạt được từ 10 đến 160 giờ. L-leuxin có thể được giải phóng vào môi trường nuôi cấy hoặc được chứa trong các tế bào.

Phương pháp để thu hồi L-leuxin từ các tế bào hoặc môi trường nuôi cấy có thể được thực hiện bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, ly tâm, lọc, sắc ký trao đổi anion, kết tinh, HPLC, v.v., nhưng phương pháp không giới hạn ở đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các phương án minh họa. Tuy nhiên, các phương án minh họa này chỉ có mục đích minh họa, và không có mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Chọn lọc các chủng đột biến bằng quá trình gây đột biến nhân tạo

Để thu các chủng vi sinh vật đột biến sản xuất L-leuxin, sự biến đổi của vi sinh vật được gây ra bởi các phương pháp dưới đây.

Cụ thể là, các chủng gốc (tức là, *Corynebacterium glutamicum* sản sinh axit glutamic ATCC 14067 và *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869), mà được kích hoạt bằng việc nuôi cấy trong môi trường kích hoạt trong 16 giờ, được ủ vào môi trường mầm mà được tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong vòng 15 phút, và được nuôi cấy trong 14 giờ. Sau đó, 5ml môi trường nuôi cấy được thu và được rửa bằng 100mM chất đệm xitrat, và N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) được thêm vào nồng độ cuối là 200mg/L. Sau khi xử lý 20 phút, môi trường nuôi cấy được rửa bằng 100nM chất đệm phosphat. Các chủng được xử lý bằng NTG được trải trên môi trường tối thiểu và tỷ lệ chết được đo. Kết quả là, tỷ lệ chết được xác nhận là 85%. Để chọn các chủng biến đổi kháng với norleuxin (NL), mà tương ứng với dẫn xuất của L-leuxin, các chủng được xử lý NTG được trải trên môi trường tối thiểu chứa NL với nồng độ cuối cùng lần lượt là 20mM, 30mM, 40mM, và 50mM. Sau đó, các chủng được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 5 ngày, và nhờ đó thu được các chủng đột biến kháng với NL.

Do đó, các chủng đột biến thu được gọi lần lượt là *Corynebacterium glutamicum* KCJ-24 và *Corynebacterium glutamicum* KCJ-28, và được đưa vào Trung Tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM), là cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế theo Hiệp ước Budapest, vào ngày 22 tháng 1 năm 2015 và được ấn định số truy cập trình tự KCCM11661P và KCCM11662P.

Các thành phần của môi trường nuôi cấy được sử dụng trong các ví dụ 1 và 2 được chỉ ra dưới đây:

<Môi trường kích hoạt>

Chiết xuất thịt bò 1%, Polypeptone 1%, Natri clorua 0,5%, chiết xuất men 1%, thạch 2%, độ pH là 7,2.

<Môi trường mầm>

Glucose 5%, Bacto Peptone 1%, Natri Clorua 0,25%, chiết xuất men 1%, Ure 0,4%, độ pH là 7,2

<Môi trường tối thiểu>

Glucose 1,0%, Amoni Sulphat 0,4%, Magiê Sulphat 0,04%, Kali Dihydrogen Phosphat 0,1%, Urê 0,1%, Thiamin 0,001%, Biotin 200 µg/L, thạch 2%, độ pH 7,0

Ví dụ 2: Kiểm tra khả năng sản xuất L-leuxin của các chủng đột biến

Corynebacterium glutamicum KCJ-24 và *Corynebacterium glutamicum* KCJ-28, thu được trong ví dụ 1, và được xác nhận kháng với NL với các nồng độ cao, được nuôi cấy bằng các phương pháp dưới đây, sao cho xác nhận khả năng sản xuất L-leuxin.

Corynebacterium glutamicum ATCC 14067 và *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 (tức là, các chủng gốc), và hai chủng đột biến được ủ vào 250 ml bình góc vách ngăn chứa 25 ml của môi trường mầm dưới đây, và nuôi cấy ở 30°C trong 20 giờ với việc lắc ở 200 rpm để có được môi trường mầm. Sau đó, 1ml của môi trường nuôi cấy mầm được ủ vào 250 mL bình góc vách ngăn chứa 24 ml của môi trường sản xuất dưới đây, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong vòng 72 giờ với việc lắc ở tốc độ 200 vòng/phút để sinh ra L-leuxin.

Thành phần của môi trường sản xuất được sử dụng trong ví dụ 2 là như sau:

<Môi trường sản xuất>

Glucose 5%, Amoni Sulphat 2%, Kali Dihydrogen Phosphat 0,1%, Magiê Sulphate Heptahydrat 0,05%, Rượu ngô ngâm (CSL) 2,0%, Biotin 200 µg/L, độ pH là 7,2.

Khi hoàn thành quá trình nuôi cấy, lượng sản lượng L-leuxin được đo bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Nồng độ của L-leuxin trong môi trường nuôi cấy cho mỗi chủng đối với các thử nghiệm được tóm tắt trong bảng 1 bên dưới.

Bảng 1: So sánh khả năng sản xuất L-leuxin giữa *Corynebacterium glutamicum* KCJ-24 và *Corynebacterium glutamicum* KCJ-28

	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 14067 (Chủng gốc)	<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCJ-24 (Chủng biến đổi)	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13869 (Chủng gốc)	<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCJ-28 (Chủng biến đổi)
Nồng độ L-Leuxin (g/L)	0,1	2,7	0,3	3,1

Kết quả, như được thể hiện trên bảng 1, các chủng gốc (tức là *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 và *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869) có nồng độ L-leuxin sinh ra lần lượt là 0,1 g/L và 0,3 g/L, nhưng các chủng đột biến (tức là *Corynebacterium glutamicum* KCJ-24 và *Corynebacterium glutamicum* KCJ-28) theo sáng chế có nồng độ L-leuxin sinh ra lần lượt là 2,7 g/L và 3,1 g/L, xác nhận rằng khả năng sản xuất L-leuxin của các chủng đột biến tăng ít nhất khoảng 10 lần so với các chủng gốc.

Các kết quả trên cho thấy các chủng đột biến kháng L-leuxin và norleuxin không bị ảnh hưởng bởi sự ức chế ngược bởi leuxin hoặc dẫn xuất của nó và do đó có thể sản xuất L-leuxin với hiệu suất cao và năng suất cao.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* sản xuất L-leuxin được chọn từ nhóm bao gồm chủng đột biến được đưa vào theo số truy cập trình tự KCCM11661P và chủng đột biến được đưa vào theo số truy cập trình tự KCCM11662P.
2. Chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* theo điểm 1, trong đó chủng đột biến này có khả năng kháng với L-leuxin và dẫn xuất của nó.
3. Chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* theo điểm 2, trong đó dẫn xuất của L-leuxin là norleuxin (NL).
4. Phương pháp sản xuất L-leuxin bao gồm:
nuôi cấy chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* theo điểm 1; và
thu hồi L-leuxin từ chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* hoặc môi trường nuôi cấy.

[FIG. 1]

