



(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)



1-0032493

(51)⁷ C12P 13/12; C12P 7/46

(13) B

(21) 1-2014-00718

(22) 02/09/2011

(86) PCT/EP2011/065241 02/09/2011

(87) WO/2013/029690 07/03/2013

(45) 25/07/2022 412

(43) 26/05/2014 314A

(73) 1. ARKEMA FRANCE (FR)

420, rue d'Estienne d'Orves, F-92700 Colombes, France

2. CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

Smartplex Building, 292 Ssangnim-dong, Jung-gu, Seoul 100-400, Korea

(72) FREMY, Georges (FR); BARRE, Patrice (FR); KIM, So Young (KR); SON, Sung Kwang (KR); LEE, Sang Mok (KR).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) QUY TRÌNH CHUYỂN HÓA TIỀN CHẤT L-METHIONIN ĐỂ TẠO RA L-METHIONIN VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT L-METHIONIN

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp tổng hợp L-methionin bằng cách sử dụng quy trình sinh tổng hợp và quy trình enzym cụ thể. Cụ thể hơn là, sáng chế đề xuất phương pháp tổng hợp L-methionin với hiệu suất cao bằng phản ứng chuyển hóa nhờ enzym từ tiền chất L-methionin khi có mặt metyl mercaptan (CH_3SH). Quy trình theo sáng chế cho phép tổng hợp chọn lọc L-methionin mà có thể được sử dụng trong nhiều lĩnh vực công nghiệp khác nhau, như lĩnh vực công nghiệp phụ gia chăn nuôi và phụ gia thực phẩm, làm nguyên liệu thô cho vật tư y tế, dược phẩm và thiết bị tương tự.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tổng hợp L-methionin bằng cách sử dụng quy trình sinh tổng hợp và quy trình sử dụng enzym đặc hiệu. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến phương pháp tổng hợp L-methionin với hiệu suất cao bằng phản ứng chuyển hóa bằng enzym từ tiền chất L-methionin khi có mặt methyl mercaptan (CH_3SH). Quy trình tổng hợp L-methionin theo sáng chế thân thiện với môi trường hơn các quy trình thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và cho phép tổng hợp chọn lọc L-methionin mà có thể được sử dụng trong nhiều lĩnh vực công nghiệp, như làm các chất phụ gia thực phẩm và phụ gia chăn nuôi, làm nguyên liệu thô cho vật tư y tế, dược phẩm và dạng tương tự.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Methionin là một trong số các axit amin cần thiết cho cơ thể con người và đã được sử dụng rộng rãi làm phụ gia chăn nuôi và phụ gia thực phẩm và ngoài ra còn được sử dụng làm các nguyên liệu thô tổng hợp cho các dung dịch y tế, vật tư y tế, cũng như là cho dược phẩm. Methionin hoạt động như một tiền chất của các hợp chất như cholin (lexithin) và creatin và đồng thời được sử dụng làm nguyên liệu thô tổng hợp cho cystein và taurin. Methionin cũng có thể cung cấp lưu huỳnh.

S-adenosyl-L-methionin thu được từ L-methionin và đóng một vai trò nhất định trong việc tạo ra nhóm methyl trong cơ thể người và cũng có liên quan đến quá trình tổng hợp nhiều chất dẫn truyền thần kinh khác nhau ở trong não. L-methionin (L-Met) và/hoặc S-adenosyl-L-methionin (SAM) ức chế sự tích tụ chất béo ở gan và thúc đẩy sự chuyển hóa lipid ở động

mạch. Hợp chất này cũng cải thiện sự tuần hoàn máu ở não, tim và thận và do đó được sử dụng làm chất chống trầm cảm để làm giảm bớt viêm, đau cơ, và bệnh gan, đặc biệt là có hiệu quả đối với bệnh gan do rượu gây ra.

Hợp chất này cũng có thể được sử dụng để thúc đẩy tiêu hóa, giải độc và bài tiết các chất độc và bài tiết các kim loại nặng như chì. Hợp chất này cũng có tác dụng chống viêm đối với các bệnh về xương và khớp và thúc đẩy sự phục hồi khớp, và cũng là chất dinh dưỡng cần thiết cho tóc, do đó ngăn ngừa sự rụng tóc.

Methionin đã được biết đến là được điều chế bằng cách tổng hợp hóa học và/hoặc sinh học, mà là đối tượng của nhiều công trình nghiên cứu, chủ yếu nhằm mục đích đưa ra được phương pháp điều chế hiệu quả hơn, chọn lọc hơn, và thân thiện với môi trường hơn.

Theo phương pháp tổng hợp hóa học, methionin chủ yếu được tổng hợp bằng cách thủy phân 5-(β -methylmercaptoethyl)hydantoin. Methionin được tổng hợp bằng phương pháp hóa học có nhược điểm là chỉ được tổng hợp ở dạng hỗn hợp gồm cả dạng L và dạng D.

Theo phương pháp tổng hợp sinh học, methionin được tổng hợp bằng phương pháp sử dụng các protein có liên quan đến quá trình tổng hợp methionin. L-Methionin được sinh tổng hợp từ homoserin bởi tác động của enzym được biểu hiện bằng nhiều gen khác nhau như metA, metB, metC, metE và metH. Cụ thể là, metA là gen mã hóa homoserin-O-succinyl transferaza mà là enzym đầu tiên cần thiết để sinh tổng hợp methionin, và enzym này chuyển hóa homoserin thành O-succinyl-L-homoserin. O-succinylhomoserin lyaza hoặc xystathionin- γ -synthaza được mã hóa bởi gen metB chuyển hóa O-succinyl-L-homoserin thành xystathionin.

Xystathionin- β -lyaza được mã hóa bởi gen metC chuyển hóa xystathionin thành L-homoxystein. MetE mã hóa methionin synthaza không phụ thuộc cobalamin và metH mã hóa methionin synthaza phụ thuộc

cobalamin, cả hai enzym này đều chuyển hóa L-homoxystein thành L-methionin. Tại thời điểm này, 5,10-metylentetrahydrofolat reductaza được mã hóa bởi metF và serin hydroxymetytransferaza được mã hóa bởi gen glyA kết hợp với nhau để tổng hợp N(5)-metyltetrahydrofolat cung cấp nhóm methyl cần để tổng hợp L-methionin. L-Methionin được tổng hợp bởi một dãy các phản ứng hữu cơ nhờ các enzym trên đây.

Methionin được tổng hợp bằng phương pháp sinh học thông thường là ở dạng L, mà có ưu điểm nhưng lượng được tổng hợp là quá nhỏ. Nguyên nhân là do con đường sinh tổng hợp methionin có hệ thống điều hòa ngược rất chặt chẽ. Một khi methionin được tổng hợp đến một mức nhất định, thì sản phẩm cuối methionin sẽ ức chế quá trình phiên mã của gen metA mã hóa protein bậc một để khởi đầu quá trình sinh tổng hợp methionin. Bản thân, việc biểu hiện quá mức gen metA không thể làm tăng sản lượng methionin do gen metA bị ức chế bởi methionin ở giai đoạn phiên mã và sau đó bị thoái biến bởi các proteaza nội bào ở giai đoạn dịch mã.

Phương pháp sinh tổng hợp methionin thông thường sử dụng con đường chuyển hóa xystathionin synthaza để tổng hợp methionin, vì thế quá trình phản ứng enzym là không có hiệu quả do tạo ra độc tố sulfua và sản phẩm phụ. Ngoài ra, sự điều hòa ngược trong con đường tổng hợp methionin cũng ức chế sự tổng hợp hàng loạt methionin.

Một phương pháp khác tổng hợp L-methionin để khắc phục các vấn đề nêu trên được mô tả trong đơn quốc tế được công bố dưới số WO 2008/013432. Phương pháp này bao gồm hai bước, trong đó tiền chất L-methionin được tổng hợp bằng cách lên men và tiền chất L-methionin được chuyển hóa chọn lọc thành L-methionin nhờ các enzym.

Chính xác hơn là WO 2008/013432 mô tả phương pháp tổng hợp L-methionin bao gồm các bước 1) chuẩn bị chủng tổng hợp tiền chất

L-methionin và tổng hợp tiền chất L-methionin bằng cách lên men chủng này, và 2) tổng hợp L-methionin và axit hữu cơ bằng phản ứng enzym với tiền chất L-methionin.

Bước 2) trong phương pháp bao gồm quy trình tổng hợp L-methionin và axit hữu cơ bằng phản ứng enzym sử dụng enzym có hoạt tính của xystathionin synthaza hoặc O-succinyl homoserin sulfhydrylaza hoặc O-acetyl homoserin sulfhydrylaza hoặc chủng chứa các enzym có hoạt tính này bằng cách sử dụng O-succinyl homoserin hoặc O-acetyl homoserin được tổng hợp từ chủng tổng hợp tiền chất L-methionin nêu trên, và methyl mercaptan làm cơ chất.

WO 2008/013432 cung cấp thông tin chung về bước 2) mà bao gồm chuyển hóa tiền chất L-methionin thành L-methionin bằng phản ứng enzym khi có mặt methyl mercaptan.

Mặc dù tổng hiệu suất tổng hợp L-methionin là đáp ứng, nhưng vẫn tồn tại một nhu cầu về việc cải thiện quá trình sinh tổng hợp L-methionin, đặc biệt là cải thiện bước chuyển hóa tiền chất L-methionin nhờ enzym có mặt methyl mercaptan để thu được riêng L-methionin với hiệu suất cải thiện hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích thứ nhất của sáng chế là đề xuất quy trình chuyển hóa tiền chất L-methionin nhờ enzym có mặt methyl mercaptan được cải thiện để thu được L-methionin với hiệu suất tốt hơn.

Cụ thể hơn là, sáng chế đề xuất phương pháp tổng hợp L-methionin bằng phản ứng enzym giữa tiền chất L-methionin và methyl mercaptan.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong quy trình theo sáng chế, tiền chất L-methionin có thể là tiền chất bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được chuyển hóa thành L-methionin bằng phản ứng enzym với methyl mercaptan, và ví dụ

như được mô tả trong WO 2008/013432. Theo một khía cạnh được ưu tiên của sáng chế, tốt hơn nếu enzym được sử dụng để chuyển hóa tiền chất L-methionin được chọn từ xystathionin synthaza hoặc O-succinyl homoserin sulfhydrylaza hoặc O-axetyl homoserin sulfhydrylaza sử dụng homoserin, O-phospho-homoserin, O-succinyl homoserin hoặc O-axetyl homoserin được tích tụ làm cơ chất.

Tốt hơn nữa là, tiền chất L-methionin được sử dụng trong quy trình theo sáng chế được chọn từ O-succinyl homoserin (OSH) và O-axetyl homoserin (OAH). Tốt hơn nữa là, tiền chất L-methionin là OAH.

Trong quy trình theo sáng chế, nếu O-axetyl homoserin được sử dụng làm tiền chất L-methionin, tốt hơn là xystathionin- γ -synthaza hoặc O-succinyl homoserin sulfhydrylaza hoặc O-axetyl homoserin sulfhydrylaza (OAHS) thu được từ *Leptospira* sp., *Chromobacterium* sp., hoặc *Hyphomonas* sp., tốt hơn nữa là thu được từ *Leptospira meyeri*, *Pseudomonas aurogenosa*, *Hyphomonas Neptunium* hoặc *Chromobacterium Violaceum*, có thể được sử dụng.

Quy trình phản ứng enzym theo sáng chế có thể được thể hiện bằng sơ đồ sau:



trong đó phản ứng này là phản ứng enzym và được tiến hành với khoảng áp suất cụ thể của metyl mercaptan (CH_3SH).

Trong các phản ứng trên đây, gốc $\text{CH}_3\text{S-}$ của metyl mercaptan được thế bằng gốc succinat hoặc axetat của O-succinyl homoserin hoặc của O-axetyl homoserin để tạo ra L-methionin. Theo sáng chế, metyl mercaptan được bổ sung ở khoảng áp suất chính xác, như được giải thích thêm trong bản mô tả.

Phản ứng chuyển hóa tiền chất L-methionin thành L-methionin khi có mặt methyl mercaptan được mô tả trên đây là một phản ứng enzym, như được mô tả trong WO 2008/013432.

WO 2008/013432 mô tả chi tiết bản chất và quy trình điều chế các enzym mà có thể được sử dụng, và là các enzym có hoạt tính chuyển hóa tiền chất L-methionin thành L-methionin thích hợp khi có mặt methyl mercaptan. Các enzym thích hợp này có thể được điều chế bằng cách biểu hiện các gen theo các quy trình công nghệ sinh học.

Như các ví dụ không hạn chế, trình tự của các gen mã hóa các enzym có hoạt tính enzym nêu trên có thể thu được từ cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen NCBI, USA, và DNA (KEGG), Nhật Bản.

Đối với phản ứng chuyển hóa sinh học, gen được tách dòng từ trình tự gen thu được, sau đó được đưa vào vector biểu hiện. Enzym được biểu hiện ở dạng có hoạt tính từ chủng tái tổ hợp. Cả chủng biểu hiện enzym và enzym được biểu hiện đều có thể được sử dụng trực tiếp cho phản ứng.

Các enzym được biểu hiện từ các gen trên đây hoặc các chủng vi sinh vật biểu hiện các enzym này có thể được trộn trực tiếp, một phần hoặc không được trộn với dịch nổi lên men hoặc môi trường lên men lỏng giàu tiền chất L-methionin để bắt đầu phản ứng. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, O-succinyl homoserin hoặc O-acetyl homoserin tích tụ trong dung dịch lên men có thể được chuyển hóa thành L-methionin nhờ xystathionin- γ -synthaza hoặc O-acetyl homoserin sulfhydrylaza hoặc O-succinyl homoserin sulfhydrylaza thu được từ *Pseudomonas* sp., *Chromobacterium* sp., *Leptospira* sp. hoặc *Hyphomonas* sp..

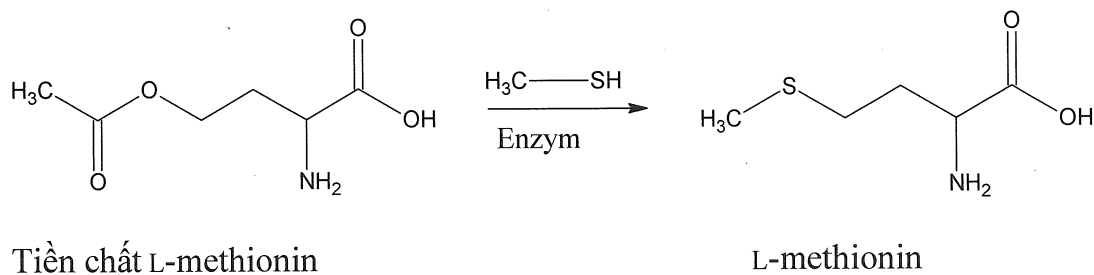
Tốt hơn là, O-succinyl homoserin tích tụ trong dung dịch lên men được chuyển hóa thành methionin nhờ xystathionin- γ -synthaza hoặc O-acetyl homoserin sulfhydrylaza hoặc O-succinyl homoserin sulfhydrylaza thu được từ *Pseudomonas aurogenosa*, *Pseudomonas putida*

hoặc *Chromobacterium Violaceum*. O-Axetyl homoserin tích tụ trong dung dịch lên men được chuyển hóa thành methionin nhờ xystathionin- γ -synthaza hoặc O-axetyl homoserin sulfhydrylaza hoặc O-sucxinyl homoserin sulfhydrylaza thu được từ *Leptospira meyeri*, *Hyphomonas Neptunium* hoặc *Chromobacterium Violaceum*.

Mỗi gen được biểu hiện trong vector pCL-CJ1 (CJ, Korea), vector biểu hiện đối với *E. coli*, và protein được biểu hiện thu được từ dung dịch enzym được điều chế bằng cách dung giải tế bào nhờ gây sóng âm. Dung dịch enzym được bổ sung vào dung dịch lên men giàu O-sucxinyl homoserin hoặc O-axetyl homoserin, và ngoài ra metyl mercaptan cũng được bổ sung vào để bắt đầu phản ứng.

Phản ứng được xác nhận bằng cách sử dụng DTNB [5,5-dithiobis(axit 2-nitro-benzoic, Sigma, USA)] và sản phẩm phản ứng được phân tích bằng HPLC. Trong sáng chế, sản phẩm phụ như axit succinic hoặc axit axetic có thể được tổng hợp thêm bằng phản ứng giữa metyl mercaptan với O-sucxinyl homoserin và O-axetyl homoserin tương ứng mà không cần quy trình sản xuất riêng.

Phản ứng enzym giữa tiền chất L-methionin với CH_3SH có thể được minh họa bằng sơ đồ dưới đây:



Như được mô tả trên đây, quy trình chuyển hóa tiền chất L-methionin nhờ enzym được tiến hành khi có mặt metyl mercaptan, (CH_3SH) và, theo sáng chế, dưới áp suất CH_3SH , cụ thể hơn là sao cho áp

suất riêng phần CH_3SH trên môi trường phản ứng nằm trong khoảng áp suất riêng.

Quy trình được mô tả trong WO 2008/013432 không đề cập đến các điều kiện tiến hành chi tiết đối với phản ứng chuyển hóa tiền chất L-methionin thành L-methionin nhờ enzym khi có mặt methyl mercaptan, cụ thể là methyl mercaptan được sử dụng mà không có chỉ dẫn bất kỳ về cách dùng. Cũng không có thông tin nào về tỷ lệ chuyển hóa tiền chất L-methionin.

Hiện tại, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng tỷ lệ chuyển hóa của tiền chất L-methionin chủ yếu tùy thuộc vào cách dùng methyl mercaptan đối với môi trường phản ứng và đặc biệt là đối với áp suất riêng phần CH_3SH có trong bình phản ứng chuyển hóa được sử dụng cho phản ứng này.

Chính xác hơn, rõ ràng là có một cửa sổ nhỏ, từ 0 đến áp suất bay hơi bão hòa CH_3SH ở nhiệt độ phản ứng, trong đó tỷ lệ chuyển hóa dịch chuyển từ tác động ức chế áp suất có lợi sang tác động ức chế mạnh.

Do đó, có một khoảng áp suất riêng phần CH_3SH tối ưu, trong đó sự chuyển hóa tiền chất methionin (ví dụ, OAHS) thành methionin là tối đa. Đã được cho rằng áp suất CH_3SH càng cao, thì lượng CH_3SH được hòa tan càng lớn, do đó động học của phản ứng chuyển hóa càng nhanh thì tỷ lệ chuyển hóa thành methionin càng cao.

Tuy nhiên, cũng nhận thấy rằng, áp suất CH_3SH tiếp tục tăng là không tốt cho sự chuyển hóa này. Không bị trói buộc theo lý thuyết, một giải thích có thể được đưa ra cho hiện tượng này là áp suất CH_3SH quá lớn sẽ dẫn đến lượng CH_3SH có mặt trong môi trường phản ứng quá cao. Lượng dư CH_3SH này sẽ phong bế các vị trí hoạt động của enzym, và dẫn đến ức chế phản ứng. Do đó, có sự cạnh tranh giữa động học phản ứng và sự tiếp cận các vị trí phản ứng của enzym.

Theo quy trình của sáng chế, áp suất riêng phần CH_3SH tối ưu trong bình phản ứng trên môi trường phản ứng nằm trong khoảng từ 10kPA đến 180kPA, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 51kPA đến 180kPA, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 51kPA đến 160kPA, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 80kPA đến 160kPA, thuận lợi là nằm trong khoảng từ 90kPA đến 150kPA, ví dụ áp suất riêng phần CH_3SH nằm trong khoảng từ 100kPA đến 150kPA, ở nhiệt độ phản ứng.

Các điều kiện cụ thể này cho phép động học chuyển hóa nhanh cũng như là tỷ lệ chuyển hóa tiền chất L-methionin cao, ví dụ tỷ lệ chuyển hóa 100% có thể đạt được sau thời gian phản ứng là 2 giờ.

Thông thường, phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ thích hợp mà được điều chỉnh cho sự chuyển hóa tiền chất L-methionin thành L-methionin nhờ enzym, ví dụ như được mô tả trong WO 2008/013432. Thuận lợi là, nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C.

Chính xác hơn là, methyl mercaptan được đưa vào bình phản ứng thông qua ống nhúng, vào môi trường phản ứng. Methyl mercaptan được đưa vào bằng cách tạo áp suất nitơ trên bình methyl mercaptan bên ngoài. Tốc độ dòng methyl mercaptan được kiểm soát bằng cách thay đổi áp suất nitơ, bằng van xả. Một phần của methyl mercaptan được đưa vào được hòa tan trong môi trường phản ứng, trong khi đó phần còn lại là ở dạng khí trong môi trường phản ứng.

Độ hòa tan của methyl mercaptan trong phản ứng có thể được tăng lên bằng cách trộn methyl mercaptan với dimethyl sulfua (DMS) ở tỷ lệ thích hợp. Sử dụng DMS giúp cải thiện tỷ lệ chuyển hóa của L-methionin và axit hữu cơ từ tiền chất L-methionin, cũng như là hiệu suất sản xuất L-methionin.

Tốt hơn là, nếu DMS được trộn với metyl mercaptan, thì tỷ lệ mol của metyl mercaptan/DMS nằm trong khoảng từ 1:0,05 đến 1:1, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1:0,20 đến 1:1, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1:0,25 đến 1:0,50. Bằng cách ví dụ, DMS có thể được trộn ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 5% đến 25%, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 20% đến 25% so với tổng lượng metyl mercaptan và DMS.

Sau khi đưa một lượng metyl mercaptan cần thiết vào bình phản ứng, và đạt được trạng thái cân bằng giữa pha lỏng và pha khí, thì metyl mercaptan có thể được bổ sung hoặc loại bỏ, áp suất riêng phần trong môi trường phản ứng được kiểm tra bằng cách đã biết bất kỳ, ví dụ áp kế. Áp suất riêng phần metyl mercaptan được kiểm soát trong suốt phản ứng cho đến khi kết thúc phản ứng.

Theo một phương án được ưu tiên, dùng đưa metyl mercaptan vào khi đạt được lượng hợp thức, và từ điểm này, áp suất riêng phần metyl mercaptan giảm xuống cho đến khi kết thúc phản ứng.

Giống như phản ứng chuyển hóa enzym, phản ứng này cũng tạo ra sản phẩm phụ axit, độ pH của phản ứng có thể được kiểm soát thuận lợi và được duy trì ở mức trung tính hoặc hơi axit, tốt hơn là độ pH của môi trường phản ứng được duy trì nằm trong khoảng từ 6 đến 7 trong suốt phản ứng chuyển hóa.

Để điều chỉnh trị số pH nằm trong khoảng từ 6 đến 7, một hoặc nhiều hợp chất bazơ có thể được bổ sung vào môi trường phản ứng, các hợp chất bazơ này là dung dịch bazơ, như được mô tả trong WO 2008/013432, ví dụ được chọn từ trong số amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, và dung dịch tương tự, ví dụ dung dịch nước amoniac.

Phản ứng chuyển hóa cũng được tiến hành thuận lợi khi có mặt co-enzym, theo các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ như được mô tả

trong WO 2008/013432. Ví dụ về co-enzym này là pyridoxal-5'-phosphat (PLP).

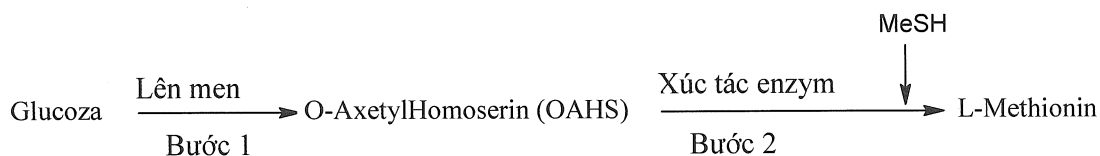
Trong khi tiến hành quy trình theo sáng chế, đặt áp suất riêng phần CH_3SH ở trị số được ưu tiên như nêu trên, tỷ lệ chuyển hóa của tiền chất L-methionin ít nhất cao hơn từ 10% đến 20%, so với khi áp suất riêng phần CH_3SH nằm ngoài khoảng của quy trình theo sáng chế. Trong các điều kiện cụ thể này, cũng nhận thấy rằng tỷ lệ chuyển hóa tiền chất L-methionin có thể cao hơn 80% sớm nhất là sau 0,5 giờ, và thậm chí bằng 100% sau thời gian phản ứng là 2 giờ.

Tỷ lệ chuyển hóa hoàn toàn đặc biệt nhanh này dẫn đến tạo ra toàn bộ L-methionin, trong đó bước chuyển hóa tiền chất L-methionin bằng enzym không phải là bước giới hạn, và nhờ đó cho phép sinh tổng hợp toàn bộ L-methionin với hiệu suất cao, cao hơn cả hiệu suất đã biết trong lĩnh vực này cho đến nay.

Do đó, một khía cạnh thứ hai của sáng chế đề cập đến quy trình điều chế L-methionin bao gồm các bước:

- 1) tạo ra chủng tổng hợp tiền chất L-methionin và tổng hợp tiền chất L-methionin bằng cách lên men chủng này,
- 2) chuyển hóa tiền chất L-methionin thành L-methionin, bằng phản ứng enzym khi có mặt CH_3SH ở áp suất riêng phần nằm trong khoảng từ 10kPA đến 180kPA, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50kPA đến 160kPA, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 80kPA đến 150kPA, và
- 3) thu gom L-methionin được tạo thành.

Toàn bộ quy trình sản xuất sinh tổng hợp L-methionin có thể được thể hiện bằng sơ đồ dưới đây:



trong đó tiền chất L-methionin là OAHS, được điều chế thông qua sự biểu hiện gen, từ quá trình lên men glucoza.

Quy trình lên men ở bước 1 có thể là quy trình lên men bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, và ví dụ như được mô tả trong WO 2008/013432.

Cụ thể là, ở bước 1) của quy trình, chủng tổng hợp tiền chất L-methionin được tạo ra và được lên men để tích tụ tiền chất L-methionin trong môi trường nuôi cấy.

Tốt hơn là, tiền chất L-methionin theo sáng chế là O-axetyl homoserin hoặc O-succinyl homoserin. Thuật ngữ "chủng tổng hợp tiền chất L-methionin" như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ chủng vi sinh vật nhân sơ hoặc nhân thực mà có thể tích tụ tiền chất L-methionin bằng cách tiến hành sáng chế.

Ví dụ, chủng này có thể được chọn từ nhóm bao gồm các vi sinh vật *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacteria* sp., *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Salmonella* sp., *Brevibacteria* sp., *Hypomononas* sp., *Chromobacterium* sp. và *Norcardia* sp. hoặc nấm hoặc nấm men.

Tốt hơn là, các vi sinh vật trong số *Pseudomonas* sp., *Norcardia* sp. và *Escherichia* sp. có thể được sử dụng để tổng hợp O-succinyl homoserin, và các vi sinh vật trong số *Escherichia* sp., *Corynebacterium* sp., *Reptospira* sp. và nấm men có thể được sử dụng để tổng hợp O-axetyl homoserin. Tốt hơn nữa là, các vi sinh vật *Escherichia* sp. có thể được sử dụng, và tốt nhất là *Escherichia coli* (ở đây được dùng để chỉ là "*E. Coli*") có thể được sử dụng. Ngoài ra, các gen ngoại lai có thể được đưa vào vi

sinh vật *Escherichia* sp. để tổng hợp chọn lọc O-succinyl homoserin và O-acetyl homoserin.

Chúng tổng hợp tiền chất L-methionin có thể được tạo ra từ chúng tổng hợp L-lysin, L-threonin hoặc L-isoleuxin. Tốt hơn là, chúng này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chúng tổng hợp L-threonin. Với chủng này, sự tổng hợp homoserin là cao hơn và do đó sản lượng tiền chất methionin có thể được tăng lên.

Vì thế, tiền chất methionin có thể được tích tụ bằng cách loại bỏ hoặc làm yếu gen có liên quan đến con đường sinh tổng hợp threonin và sau đó là gen metA hoặc metY hoặc MetZ, sử dụng chúng tổng hợp L-threonin. Ưu tiên loại bỏ hoặc làm yếu gen thrB trước và sau đó là gen metB, metY hoặc metZ để tổng hợp tiền chất methionin. Trong khi đó, việc tăng cường sự biểu hiện gen metA hoặc metX dẫn đến làm tăng tổng hợp tiền chất methionin.

Như được mô tả trên đây, thuật ngữ "chúng tổng hợp L-threonin" theo sáng chế được dùng để chỉ chủng vi sinh vật nhân sơ hoặc nhân thực mà có thể tổng hợp L-threonin *in vivo*. Ví dụ, chủng này có thể bao gồm chủng vi sinh vật tổng hợp L-threonin thuộc các loài *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Corynebacterium* sp. và *Brevibacterium* sp. Trong số các vi sinh vật này, vi sinh vật *Escherichia* sp. được ưu tiên và *Escherichia coli* được ưu tiên hơn.

Chúng tổng hợp L-threonin bao gồm không chỉ các vi sinh vật trong tự nhiên mà còn bao gồm các chủng đột biến của chúng mà được lấy làm ví dụ là các vi sinh vật mà đòi hỏi rò *iso*-leuxin và kháng các chất tương tự L-lysin và axit α -aminobutyric; và được gây đột biến bằng cách đưa thêm vào ít nhất một bản sao bổ sung của gen phosphoenol pyruvat carboxylaza (ppc) nội sinh; và được bất hoạt gen pckA có liên quan đến quá trình chuyển hóa oxaloacetat (OAA), một chất trung gian của quá trình tổng hợp

L-methionin thành phosphoenol pyruvat (PEP); và được bất hoạt gen *tyrR* ức chế sự biểu hiện gen *tyrB* có liên quan đến sự sinh tổng hợp L-methionin; và được bất hoạt gen *galR* ức chế sự biểu hiện gen *galP* có liên quan đến sự vận chuyển glucoza.

Các chất tương tự L-lysin ở đây có thể là một hoặc nhiều hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm S-(2-aminoethyl)-L-xystein và δ -metyl-L-lysin. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, CJM002, chủng tổng hợp L-threonin và không phụ thuộc L-methionin được đột biến từ TF4076 (KFCC 10718, Patent Hàn Quốc số 92-8365), chủng *E. coli* đột biến tổng hợp L-threonin, được sử dụng. TF4076 cần methionin, và kháng các chất tương tự methionin (ví dụ, axit α -amino- β -hydroxy valeric, AHV), các chất tương tự lysin (ví dụ, S-(2-aminoethyl)-L-xystein, AEC), và các chất tương tự isoleuxin (ví dụ, axit α -aminobutyric).

Việc nuôi cấy chủng tổng hợp tiền chất L-methionin được tạo ra trên đây có thể được tiến hành bằng môi trường và các điều kiện thích hợp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng hiểu rằng phương pháp nuôi cấy có thể được sử dụng nhờ dễ dàng điều chỉnh theo chủng đã chọn. Ví dụ, phương pháp nuôi cấy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục và nuôi cấy theo mẻ có cung cấp dinh dưỡng. Nhiều phương pháp nuôi cấy được mô tả, ví dụ trong tài liệu "*Biochemical Engineering*" by J. M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp 138-176.

Môi trường nuôi cấy phải đáp ứng các điều kiện nuôi cấy đối với chủng cụ thể. Nhiều môi trường nuôi cấy vi sinh vật được mô tả, ví dụ trong tài liệu "*Manual of Methods for General Bacteriology*" bởi Hiệp hội vi khuẩn học Mỹ, Washington D.C., USA, 1981. Các môi trường này chứa các nguồn cacbon khác nhau, nguồn nitơ và các yếu tố vi lượng khác nhau.

Nguồn cacbon được lấy làm ví dụ là cacbohydrat như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, xenluloza; chất béo như dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu thầu dầu và dầu dừa; axit béo như axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic; rượu như glyxerol và etanol; và axit hữu cơ như axit axetic.

Một trong số các hợp chất này hoặc hỗn hợp của chúng có thể được sử dụng làm nguồn cacbon. Nguồn nitơ được lấy làm ví dụ là nguồn nitơ hữu cơ như pepton, dịch chiết nấm men, nước thịt, dịch chiết mạch nha, dịch chiết ngô (corn steep liquor-CSL) và bột đậu và nguồn nitơ vô cơ như ure, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat và amoni nitrat. Một trong số các hợp chất này hoặc hỗn hợp của chúng có thể được sử dụng làm nguồn nitơ.

Ngoài ra, môi trường ở đây có thể chứa kali di-hydro phosphat, di-kali hydro phosphat và muối chứa natri tương ứng làm nguồn phosphat. Môi trường này cũng có thể chứa muối kim loại như magie sulfat hoặc sắt sulfat. Ngoài ra, axit amin, vitamin và tiền chất thích hợp cũng có thể được bổ sung. Môi trường hoặc tiền chất có thể được bổ sung vào trong quá trình nuôi cấy theo mẻ hoặc quá trình nuôi cấy liên tục.

Độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh trong suốt quá trình nuôi cấy bằng cách bổ sung hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric và axit sulphuric theo cách thích hợp. Để duy trì điều kiện ưa khí của môi trường nuôi cấy, oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ, không khí) có thể được bơm vào môi trường. Nhiệt độ của môi trường nuôi cấy thường nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C.

Thời gian nuôi cấy sẽ được kéo dài cho đến khi quá trình tổng hợp tiền chất L-methionin đạt được mức mong muốn, và tốt hơn là thời gian nuôi cấy nằm trong khoảng từ 10 giờ đến 160 giờ.

Phương pháp theo sáng chế cho phép tổng hợp chọn lọc L-methionin, mà tốt hơn so với phương pháp tổng hợp hóa học thông thường tổng hợp cả D-methionin và L-methionin, và phương pháp tổng hợp axit hữu cơ như axit succinic hoặc axit axetic dưới dạng sản phẩm phụ mà không cần các quy trình độc lập khác.

Các ví dụ dưới đây minh họa sáng chế mà không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế mà được xác định trong yêu cầu bảo hộ đi kèm. Các phương án được ưu tiên của sáng chế được thể hiện trong các ví dụ dưới đây chỉ nhằm mục đích minh họa.

Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng hiểu rằng, dựa trên bản mô tả này, có thể tiến hành các cải biến và các thay đổi mà vẫn thuộc phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 đến 4

Ví dụ 1 đến 4 được tiến hành với các áp suất riêng phần methyl mercaptan (CH_3SH) khác nhau trên môi trường phản ứng. Áp suất riêng phần nằm trong khoảng từ 10kPA đến 200kPA trong các ví dụ dưới đây.

Tất cả các thử nghiệm được tiến hành trong thiết bị bao gồm bình phản ứng được bọc thép không gỉ có dung tích 5l được lắp bộ phận khuấy với cánh khuấy dạng mỏ neo và được lắp động cơ khuấy với tốc kế, bể điều nhiệt cho phép lưu thông dầu bên trong vỏ, đầu đo nhiệt ở vỏ, đầu đo pH, áp kế, cửa nạp để đưa nitơ vào và cửa nạp để đưa methyl mercaptan vào thông qua ống nhúng. Tốc độ dòng của methyl mercaptan được đo và được kiểm soát bằng lưu lượng kế khối lượng.

Các quy trình sau được áp dụng cho tất cả các thử nghiệm:

225g O-axetyl homoserin (OAHS, 1,4 mol) được pha loãng trong 3L nước cất được đưa vào bình phản ứng.

Môi trường phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 33°C (nhiệt độ phản ứng) với tốc độ khuấy được đặt ở 600 vòng/phút.

Nếu nhiệt độ phản ứng đạt đến mức 33°C, thì độ pH được điều chỉnh ở mức 6,5 bằng cách bổ sung amoniac với lượng 28% trọng lượng trong nước cất.

3mL dung dịch pyridoxal-5'-phosphat (PLP) ở nồng độ 10mM trong nước cất được bổ sung vào bình phản ứng. PLP được sử dụng làm coenzym. Sau đó, bình phản ứng được đậy kín.

Ngoài ra, methyl mercaptan được hóa lỏng trong xylanh đã điều áp được lắp ống nhúng. Áp suất nitơ cao hơn áp suất CH_3SH được áp dụng cho CH_3SH đã hóa lỏng. Bằng cách này, CH_3SH lỏng có thể được đưa vào môi trường phản ứng trong bình phản ứng chính. CH_3SH được bay hơi tự phát trong bình phản ứng chính.

Trong khi khuấy, đạt được trạng thái cân bằng giữa pha lỏng và pha khí trong bình phản ứng sau một vài phút đến một hoặc hai giờ. Áp suất riêng phần CH_3SH được biểu thị trên áp kế và được kiểm soát bằng van ở giá trị cần thiết. Methyl mercaptan cũng được đưa vào với tốc độ dòng được kiểm soát.

Áp suất riêng phần của methyl mercaptan được đặt ở 10kPA (ví dụ 1), 100kPA (ví dụ 2), 150kPA (ví dụ 3), và 200kPA (ví dụ 4).

9g enzym, như được mô tả trong WO 2008/013432, được hòa tan trong 150mL nước cất và được đưa vào bình phản ứng bằng cách sử dụng bình điều áp nitơ trung gian.

Dùng đưa methyl mercaptan (CH_3SH) vào khi đạt được lượng hợp thức (67,2g, 1,4 mol). Từ điểm này, áp suất riêng phần CH_3SH giảm cho đến khi kết thúc thời gian phản ứng.

Trong suốt thời gian phản ứng, độ pH được duy trì nằm trong khoảng từ 6,2 đến 6,5 bằng cách bổ sung amoniac, như nêu trên. Thực ra, độ pH của môi trường phản ứng giảm theo thời gian do giảm axit axetic, axit axetic là đồng sản phẩm của phản ứng.

Mỗi giờ, mẫu được lấy ra khỏi bình phản ứng và được phân tích bằng HPLC (sắc khí lỏng hiệu năng cao) để xác định lượng OAHS dư và lượng L-Methionin.

Bảng 1 dưới đây so sánh các kết quả của các ví dụ 1-4:

-- Bảng 1 --

	Áp suất riêng phần của CH_3SH (kPa)	% chuyển hóa OAHS		
		sau 1 giờ	sau 2 giờ	sau 3 giờ
Ví dụ 1	10	11,4	28,5	44,3
Ví dụ 2	100	32,5	52,3	61,6
Ví dụ 3	150	26,9	49,8	59,1
Ví dụ 4	200	25,5	30,7	32,9

Trước hết, các kết quả này cho thấy tác động có lợi của áp suất riêng phần CH_3SH tăng, khi so sánh tỷ lệ chuyển hóa OAHS, tức là hiệu suất L-methionin, ở thời điểm 3 giờ trong ví dụ 1 và ví dụ 2. Việc tăng thêm áp suất riêng phần của CH_3SH dẫn đến tác động có hại, xem ví dụ tỷ lệ chuyển hóa OAHS, tức là hiệu suất L-methionin, ở thời điểm 3 giờ trong ví dụ 4.

Bốn thử nghiệm đầu tiên này rõ ràng cho thấy rằng tỷ lệ chuyển hóa OAHS tối ưu, và do đó hiệu suất tổng hợp L-methionin cũng tối ưu, đạt được ở áp suất riêng phần CH_3SH chính xác trong bình phản ứng (nằm

trong khoảng từ 10kPA đến 150kPA trong các ví dụ trên đây, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100kPA đến 150kPA).

Ví dụ 5 đến 7

Các thử nghiệm được mô tả trong các ví dụ 5 đến 7 dưới đây được tiến hành trong bình phản ứng có dung tích 30L bằng cách sử dụng quy trình như được mô tả trong các ví dụ trên đây, tuy nhiên các thử nghiệm này được tiến hành ở nhiệt độ phản ứng bằng 37°C, thay vì 33°C, và sử dụng một mẫu dung dịch enzym mới khác, trong đó PLP được hòa tan trước và được khuấy từ từ trong vòng 20 phút trước khi chuyển vào bình phản ứng.

Dung dịch enzym/PLP được điều chế bằng 1,2L dung dịch enzym mới được điều chế theo WO 2008/013432 và 25mL dung dịch PLP 10mM trong nước cất. Lượng OAHS được sử dụng là 1480g được pha loãng trong 18,5L nước cất.

Độ pH của môi trường phản ứng được điều chỉnh đến 6,2 bằng amoniac, như được mô tả trong các ví dụ trên đây, và tốc độ khuấy được để ở 300 vòng/phút.

Bảng 2 dưới đây so sánh các kết quả của các ví dụ 5 đến 7:

-- Bảng 2 --

	Áp suất riêng phần CH ₃ SH (kPa)	% chuyển hóa OAHS			
		sau 0,5 giờ	sau 1 giờ	sau 2 giờ	sau 3 giờ
Ví dụ 5	10	33	60	92	100
Ví dụ 6	100	82	97	100	100
Ví dụ 7	200	65	75	87	87

Các ví dụ này cho thấy một hiện tượng như nhau về tác động của áp suất riêng phần metyl mercaptan. Cũng được khẳng định rằng đối với phản ứng này, tồn tại một áp suất tối ưu mà có thể thu được hiệu suất cao nhất. Một lần nữa, áp suất riêng phần CH_3SH tối ưu này lại được quan sát thấy là nằm trong khoảng từ 10kPA đến dưới 200kPA.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chuyển hóa tiền chất L-methionin nhờ enzym với sự có mặt methyl mercaptan để tạo ra L-methionin, trong đó áp suất riêng phần của methyl mercaptan trong bình phản ứng trên môi trường phản ứng nằm trong khoảng từ 10kPA đến 180kPA, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 51kPA đến 180kPA, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 51kPA đến 160kPA, cũng tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 80kPA đến 160kPA, thuận lợi là nằm trong khoảng từ 90kPA đến 150kPA, ví dụ áp suất riêng phần của CH_3SH nằm trong khoảng từ 100kPA đến 150kPA, ở nhiệt độ phản ứng, trong đó enzym được sử dụng cho quy trình chuyển hóa nhờ enzym được chọn từ xystathionin- γ -synthaza hoặc O-axetyl homoserin sulfhydrylaza hoặc O-sucxinyl homoserin sulfhydrylaza.
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C, cũng tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C.
3. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó tiền chất L-methionin được chọn từ trong số O-sucxinyl homoserin (OSHS) và O-axetyl homoserin (OAHS), và tốt hơn là OAHS.
4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó enzym được sử dụng cho quy trình chuyển hóa nhờ enzym được tạo ra bằng cách biểu hiện gen theo các quy trình công nghệ sinh học.
5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó enzym được sử dụng cho quy trình chuyển hóa nhờ enzym thu được từ *Pseudomonas* sp., *Chromobacterium* sp., *Leptospira* sp. hoặc *Hyphomonas* sp..

6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó độ pH của phản ứng được duy trì ở trị số trung tính hoặc hơi axit, tốt hơn là độ pH của môi trường phản ứng được duy trì nằm trong khoảng từ 6 đến 7.
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó co-enzym được bổ sung, tốt hơn là co-enzym này là pyridoxal-5'-phosphat.
8. Quy trình sản xuất L-methionin, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
 - 1) tạo ra chủng tổng hợp tiền chất L-methionin và tổng hợp tiền chất L-methionin bằng cách lên men chủng này,
 - 2) chuyển hóa tiền chất L-methionin này thành L-methionin, theo quy trình chuyển hóa nhờ enzym theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, và
 - 3) thu gom L-methionin tạo thành.
9. Quy trình theo điểm 8, trong đó chủng tổng hợp tiền chất L-methionin này là chủng vi sinh vật nhân sơ hoặc nhân thực mà có thể tích tụ tiền chất L-methionin.
10. Quy trình theo điểm 9, trong đó chủng này được chọn từ nhóm bao gồm các vi sinh vật *Escherichia* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Coryne bacteria* sp., *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Salmonellar* sp., *Brevibacteria* sp., *Hypomononas* sp., *Chromobacterium* sp. và *Norcardia* sp. hoặc nấm hoặc nấm men.
11. Quy trình theo điểm 9 hoặc 10, trong đó chủng này được tạo ra trong môi trường nuôi cấy mà chứa các nguồn cacbon, nguồn nitơ và các yếu tố vi lượng khác nhau.
12. Quy trình theo điểm 11, trong đó nguồn cacbon được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, xenluloza; chất béo như dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu thầu dầu và dầu dừa; axit béo

như axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic; rượu như glyxerol và etanol; và axit hữu cơ như axit axetic, cũng như là hỗn hợp của chúng.