



(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)



1-0033329

(51)⁷ C12P 19/02; C12R 1/01; C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2018-02911

(22) 01/12/2016

(86) PCT/KR2016/014030 01/12/2016

(87) WO 2017/099418 15/06/2017

(30) 10-2015-0173489 07/12/2015 KR

(45) 25/09/2022 414

(43) 25/09/2018 366A

(73) SAMYANG CORPORATION (KR)

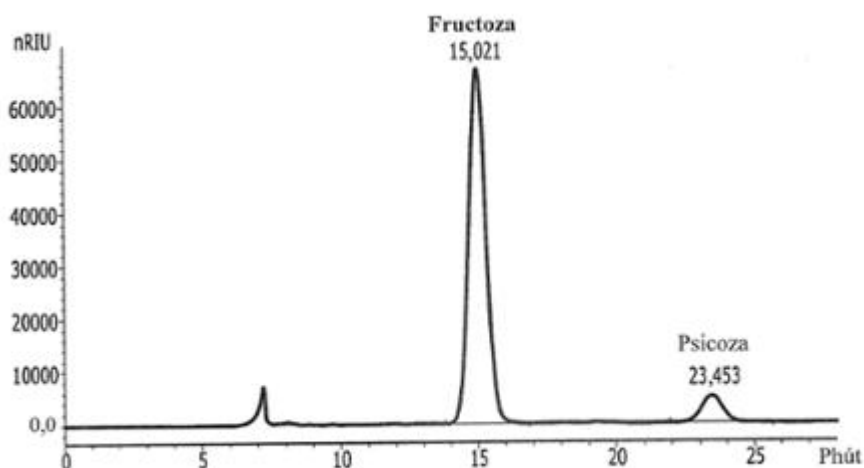
31 Jong-ro 33-gil, Jongno-gu, Seoul 03129, Republic of Korea

(72) HAN, Eun Jin (KR); LEE, Sang-Hee (KR); KWON, Soun Gyu (KR); PARK, Bu-Soo (KR); AHN, Sin Hye (KR); PARK, Chong Jin (KR); LEE, Kang Pyo (KR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHỦNG VI KHUẨN MICROBACTERIUM FOLIORUM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PSICOZA TỪ FRUCTOZA SỬ DỤNG CHỦNG VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi khuẩn mới được phân lập thuộc giống *Microbacterium*, chế phẩm để sản xuất psicoza chứa chủng này, và phương pháp sản xuất psicoza sử dụng chế phẩm này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium*, chế phẩm để sản xuất psicoza chứa vi khuẩn này, và phương pháp sản xuất psicoza bằng cách sử dụng chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhìn chung, psicoza là epime của cacbon số 3 của fructoza (D-fructoza). Psicoza có độ ngọt tương ứng bằng 70% so với fructoza, nhưng không giống như fructoza, nó khó được chuyển hóa khi hấp thụ bên trong trong cơ thể và nó có chức năng ức chế sự hấp thụ glucoza và ức chế glucoza trong máu. Do đó, nó có thể được sử dụng cho thực phẩm và đồ uống dùng cho bệnh nhân bị tiểu đường hoặc thực phẩm và đồ uống để bảo vệ cơ thể, và nó có thể được sử dụng cho các thực phẩm khác nhau như thực phẩm có lợi cho sức khỏe, v.v., vì nó có chức năng ức chế hoạt tính của enzym liên quan đến sự tổng hợp lipit ở gan và do đó có chức năng kiểm soát đường trong máu, ngăn ngừa lỗ rỗng, và ức chế sự tổng hợp chất béo ở gan, như ức chế sự tích tụ mỡ bụng.

Rượu đường, được sử dụng trên quy mô lớn làm chất làm ngọt thay thế cho đường, có các tác dụng phụ như gây tiêu chảy khi hấp thụ vượt quá lượng nhất định, v.v., nhưng psicoza không có tác dụng phụ đã biết. Do đó, psicoza là chất làm ngọt hấp dẫn dùng cho chế độ ăn kiêng, nhưng cần phải phát triển công nghệ để điều chế psicoza một cách hiệu quả để áp dụng nó trong ngành công nghiệp thực phẩm, vì nó thuộc loại đường hiếm, một monosacarit cực kỳ hiếm trong tự nhiên.

Phương pháp điều chế psicoza thông thường là điều chế nó chủ yếu thông qua quy trình tổng hợp hóa học như phương pháp hóa học để sản xuất psicoza từ fructoza sử dụng tác dụng xúc tác của ion axit molybdic. Tuy nhiên, phương pháp tổng hợp hóa học có vấn đề ở chỗ psicoza có mặt với lượng rất nhỏ trong quá trình xử lý xi rô hoặc quá trình đồng phân hóa glucoza và phương pháp này tốn chi phí và tạo ra sản phẩm phụ.

Để giải quyết vấn đề này, phương pháp sinh học để điều chế psicoza bằng phản ứng enzym với fructoza làm cơ chất, như sản xuất psicoza từ fructoza bằng psicoza epimeraza có nguồn gốc từ *Agrobacterium tumefaciens* đã được nghiên cứu.

Tuy nhiên, theo phương pháp enzym thông thường sử dụng enzym có chức năng đã biết, các enzym sản xuất psicoza thể hiện sự tối ưu dưới độ pH của điều kiện kiềm, nhưng phản ứng dưới điều kiện kiềm kích thích phản ứng không đặc hiệu và sự hóa nâu của đường, và do đó, nó không thích hợp trên quy mô công nghiệp. Ngoài ra, các enzym thông thường có vấn đề ở chỗ hiệu suất sản xuất psicoza áp dụng trên quy mô công nghiệp là thấp và giá thành sản xuất tăng vì chúng có độ ổn định giảm hoặc tốc độ phản ứng chậm ở nhiệt độ cao. Do đó, cần có phương pháp sản xuất psicoza với hiệu suất cao dưới điều kiện nhiệt độ và độ pH thích hợp trên quy mô công nghiệp mà không tạo ra sản phẩm phụ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Theo một phương án, sáng chế đề xuất giống *Microbacterium* mới có hoạt tính biến đổi psicoza để sản xuất psicoza từ fructoza.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm để sản xuất psicoza chứa giống *Microbacterium*, giống nuôi cấy của chủng này, dịch nổi bề mặt của giống nuôi cấy của chủng này, dịch chiết giống nuôi cấy của chủng này, và/hoặc dịch tan của chủng này.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất psicoza từ fructoza sử dụng giống *Microbacterium*.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập giống *Microbacterium* để sản xuất enzym biến đổi fructoza thành psicoza từ thực phẩm.

Giải pháp kỹ thuật

Giống *Microbacterium* mới (ví dụ, *Microbacterium foliorum*) có hoạt tính biến đổi fructoza thành psicoza tuyệt vời đã được phân lập và định dạng, hoạt tính biến đổi từ fructoza thành psicoza đã được xác nhận bằng cách sử dụng tế bào vi khuẩn của chủng này, và xác nhận xem có cần nhiệt độ tối ưu, độ pH tối ưu và ion kim loại của phản ứng tế bào vi khuẩn để thu được hoạt tính biến đổi cao của psicoza hay không,

nhờ đó thiết lập điều kiện để sản xuất psicoza hiệu quả trên quy mô lớn, để hoàn thành sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vi khuẩn mới thuộc giống *Microbacterium* có khả năng biến đổi fructoza thành psicoza.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất psicoza từ fructoza bằng cách sử dụng chủng thuộc giống *Microbacterium*. Trong phương pháp điều chế, điều kiện phản ứng tối ưu của tế bào vi khuẩn để thu được hoạt tính biến đổi psicoza cao và điều kiện để sản xuất psicoza trên quy mô lớn được đề xuất.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là đồ thị thể hiện sắc ký xác nhận psicoza được sản xuất từ nồng độ cao của fructoza bằng sắc ký lỏng tính năng cao (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) theo một ví dụ của sáng chế.

FIG. 2 là đồ thị thể hiện hoạt tính sản xuất psicoza tương đối của chủng *Microbacterium foliorum* được phân lập theo một ví dụ của sáng chế theo nhiệt độ.

FIG. 3 là đồ thị thể hiện hoạt tính sản xuất psicoza tương đối của chủng *Microbacterium foliorum* được phân lập theo một ví dụ của sáng chế theo pH.

FIG. 4 là đồ thị thể hiện hoạt tính sản xuất psicoza tương đối của chủng *Microbacterium foliorum* được phân lập theo một ví dụ của sáng chế theo loại ion kim loại.

FIG. 5 là đồ thị thể hiện kết quả phân tích độ ổn định nhiệt độ của chủng *Microbacterium foliorum* được phân lập theo một ví dụ của sáng chế ở nhiệt độ 50°C.

FIG. 6 là đồ thị thể hiện hiệu suất của psicoza ở phản ứng cơ chất nồng độ cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn.

Trước tiên, vi khuẩn mới thuộc giống *Microbacterium* được đề xuất. Vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* là chủng có hoạt tính biến đổi fructoza thành psicoza tuyệt vời, và nó có thể là *Microbacterium foliorum*, *Microbacterium oxydans*, *Microbacterium maritypicum*, *Microbacterium liquefaciens*, *Microbacterium luteolum*, *Microbacterium ginsengiterrae*, *Microbacterium keratanolyticum*, *Microbacterium*

natoriense, *Microbacterium lacticum*, *Microbacterium xylanilyticum*, *Microbacterium koreense*, *Microbacterium imperial* hoặc *Microbacterium phyllosphaerae*, và tốt hơn nếu nó có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm *Microbacterium foliorum*, *Microbacterium oxydans*, và *Microbacterium phyllosphaerae*, và ví dụ, nó có thể là chủng *Microbacterium foliorum*.

Theo một phương án cụ thể, vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* có thể là chủng *Microbacterium foliorum* SYG27B được nộp lưu dưới số nộp lưu KCCM11774P.

Vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* khác biệt ở chỗ nó có hoạt tính biến đổi psicoza tuyệt vời để biến đổi fructoza thành psicoza.

Thu được hoạt tính biến đổi psicoza vì vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* sản xuất ra enzym biến đổi fructoza thành psicoza, và giống *Microbacterium* có thể sản xuất ra enzym có hoạt tính biến đổi psicoza cao, hoặc có thể sản xuất ra psicoza convertaza với lượng thể hiện hoạt tính biến đổi psicoza tuyệt vời. Do đó, vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* có thể được áp dụng một cách hữu ích để điều chế psicoza, và có thể tăng cường hiệu suất sản xuất psicoza.

Hoạt tính biến đổi psicoza có thể có hoạt tính dưới điều kiện nhiệt độ 40°C hoặc cao hơn, và ví dụ, có thể thể hiện hoạt tính tối đa dưới điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 80°C, 60 đến 80°C, hoặc 70 đến 80°C, ví dụ, 75°C.

Ngoài ra, hoạt tính biến đổi psicoza có thể có hoạt tính cao dưới điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 9,0, ví dụ, độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,0, độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,0, độ pH nằm trong khoảng từ 8,0 đến 9,0 hoặc nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9,0. Cụ thể, có thể sản xuất psicoza một cách hiệu quả trong khoảng pH trung tính từ pH 7,0 đến 8,0.

Do đó, sáng chế đề xuất chế phẩm để sản xuất psicoza bao gồm một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm tế bào vi khuẩn của vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium*, giống nuôi cấy của chủng này, dịch chiết của chủng này và dịch tan của chủng này.

Giống nuôi cấy này chứa enzym được sản xuất từ vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* và có thể chứa chủng này hoặc dạng không có tế bào không chứa chủng này.

Dịch tan nghĩa là dịch tan của quá trình nghiền vụn vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* hoặc dịch nổi bề mặt thu được bằng cách ly tâm dịch tan này, và chứa enzym được sản xuất từ vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium*.

Ở đây, trừ khi được nêu khác đi, vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* được sử dụng để điều chế psicoza được sử dụng với nghĩa là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm tế bào vi khuẩn của chủng này, giống nuôi cấy của chủng này, và dịch tan của chủng này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế psicoza bằng cách sử dụng vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium*. Phương pháp điều chế psicoza bao gồm bước cho chủng của giống *Microbacterium* phản ứng với fructoza.

Theo một phương án cụ thể, bước cho chủng của giống *Microbacterium* phản ứng với fructoza có thể được thực hiện bằng bước nuôi cấy tế bào vi khuẩn của chủng của giống *Microbacterium* trong môi trường nuôi cấy chứa fructoza.

Theo phương án cụ thể khác, bước cho vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* phản ứng với fructoza có thể được thực hiện bằng bước cho chủng này (tế bào vi khuẩn, giống nuôi cấy của chủng, và/hoặc dịch tan của chủng này) tiếp xúc với fructoza, ví dụ, bước trộn chủng này với fructoza hoặc bước cho fructoza tiếp xúc với nền trong đó chủng này được cố định. Như vậy, bằng cách cho vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* phản ứng với fructoza, psicoza có thể được sản xuất từ fructoza bằng cách biến đổi fructoza thành psicoza.

Trong phương pháp điều chế psicoza, để sản xuất psicoza hiệu quả, nồng độ của fructoza được sử dụng làm cơ chất có thể nằm trong khoảng từ 40 đến 75% (khối lượng/thể tích), 45 đến 75% (khối lượng/thể tích), ví dụ, từ 50 đến 75% (khối lượng/thể tích), tính theo tổng các chất phản ứng. Khi nồng độ của fructoza thấp hơn khoảng này, giá trị kinh tế trở nên thấp hơn, và khi nồng độ của fructoza cao hơn khoảng này, fructoza không được hòa tan tốt, và do đó nồng độ của fructoza trong khoảng này là được ưu tiên. Fructoza có thể được sử dụng dưới dạng trạng thái lỏng được hòa tan trong dung dịch đậm hoặc nước (ví dụ, nước cất).

Trong phương pháp điều chế psicoza, phản ứng có thể được thực hiện dưới điều kiện nhiệt độ 30°C hoặc cao hơn, ví dụ, 40°C hoặc cao hơn. Vì sự nhuộm nâu fructoza làm cơ chất có thể xảy ra, khi nhiệt độ bằng 80°C hoặc cao hơn, nên phản ứng có thể

được thực hiện dưới điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 80°C, ví dụ, từ 50 đến 80°C, từ 60 đến 80°C, hoặc từ 70 đến 80°C, ví dụ, 75°C.

Ngoài ra, phản ứng có thể được thực hiện dưới điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 9,0, ví dụ, pH 7,0 đến 9,0, pH 7,5 đến 9,0, pH 8,0 đến 9,0 hoặc 8,5 đến 9,0, Cụ thể, có thể sản xuất psicoza hiệu quả ngay cả trong khoảng pH trung tính từ pH 7,0 đến 8,0.

Ngoài ra, trong phương pháp điều chế psicoza, tốc độ biến đổi của psicoza tăng khi thời gian phản ứng lâu hơn. Ví dụ, tốt hơn nếu thời gian phản ứng bằng 1 giờ hoặc lâu hơn, ví dụ, 2 giờ hoặc lâu hơn, 3 giờ hoặc lâu hơn, 4 giờ hoặc lâu hơn, 5 giờ hoặc lâu hơn hoặc 6 giờ hoặc lâu hơn. Ngoài ra, vì sự tăng tốc độ biến đổi của psicoza là không đáng kể hoặc đúng hơn là giảm, khi thời gian phản ứng hơn 48 giờ, tốt hơn nếu thời gian phản ứng không vượt quá 48 giờ. Do đó, thời gian phản ứng có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 48 giờ, 2 đến 48 giờ, 3 đến 48 giờ, 4 đến 48 giờ, 5 đến 48 giờ, hoặc 6 đến 48 giờ, và nó có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến 48 giờ, 2 đến 36 giờ, 3 đến 24 giờ, 3 đến 12 giờ, hoặc 3 đến 6 giờ, xét đến khía cạnh công nghiệp và kinh tế, nhưng không giới hạn ở các khoảng thời gian này.

Điều kiện được chọn là điều kiện để tối đa hóa hiệu quả biến đổi từ fructoza thành psicoza.

Ngoài ra, trong phương pháp điều chế psicoza, nồng độ của tế bào vi khuẩn của vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* có thể là 5 mg(dcw: khối lượng tế bào khô)/ml hoặc cao hơn, ví dụ, 5 đến 100 mg(dcw)/ml, 10 đến 90 mg(dcw)/ml, 20 đến 80 mg(dcw)/ml, 30 đến 70 mg(dcw)/ml, 40 đến 60 mg(dcw)/ml, hoặc 45 đến 55 mg(dcw)/ml, tính theo tổng các chất phản ứng. Khi nồng độ của tế bào vi khuẩn nhỏ hơn khoảng này, hoạt tính biến đổi psicoza là thấp hoặc ít, và khi nó vượt quá khoảng này, tổng hiệu quả của phản ứng biến đổi psicoza là thấp vì tế bào vi khuẩn quá nhiều, và khoảng nồng độ của tế bào vi khuẩn này là được ưu tiên.

Vì sự hoạt hóa enzym biến đổi fructoza mà chủng của giống *Microbacterium* sản xuất ra thành psicoza (ví dụ, epimeraza) có thể được kiểm soát bằng ion kim loại, trong quá trình sản xuất psicoza sử dụng vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium*, khi ion kim loại được bổ sung, thì hiệu quả biến đổi từ fructoza thành psicoza, tốc độ sản xuất psicoza có thể được làm tăng.

Do đó, chế phẩm để điều chế psicoza chứa vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* có thể còn chứa ion kim loại. Ngoài ra, phương pháp điều chế psicoza sử dụng vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* có thể còn bao gồm bước bổ sung ion kim loại.

Theo một phương án, ion kim loại có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trong bước nuôi cấy, hoặc bước nuôi cấy có thể được thực hiện trong môi trường nuôi cấy trong đó ion kim loại được bổ sung. Theo phương án khác, ion kim loại có thể được bổ sung vào fructoza hoặc được bổ sung vào hỗn hợp của vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* và fructoza. Theo phương án khác, nó có thể được bổ sung vào nền trong đó vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* được cố định (trước khi bổ sung fructoza), hoặc được bổ sung vào hỗn hợp của nền trong đó vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* được cố định và fructoza (sau khi bổ sung fructoza), hoặc nó có thể được bổ sung ở dạng hỗn hợp với fructoza hoặc tương ứng dưới dạng bổ sung fructoza.

Ion kim loại có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm ion đồng, ion mangan, ion canxi, ion magie, ion kẽm, ion niken, ion coban, ion sắt, ion nhôm, v.v.. Ví dụ, ion kim loại có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm ion mangan, ion magie, ion niken, ion coban, v.v., và theo một phương án, ion kim loại có thể là ion mangan, ion coban, hoặc hỗn hợp của chúng.

Khi ion mangan, ion coban, hoặc hỗn hợp của chúng có mặt làm ion kim loại, hoạt tính biến đổi psicoza có thể được làm tăng 1,2 lần, 1,3 lần, 1,4 lần, 1,5 lần, 1,6 lần, 1,7 lần, 1,8 lần, 1,9 lần, 2,0 lần, 2,1 lần, 2,2 lần, hoặc 2,3 lần, so với trường hợp không có ion kim loại, và ví dụ, nó có thể được làm tăng 1,2 đến 2,3 lần.

Ngoài ra, khi lượng ion kim loại bổ sung ít hơn 0,5mM, hiệu quả tăng cường hiệu suất sản xuất psicoza là không đáng kể, và do đó, lượng ion kim loại bổ sung có thể bằng 0,5mM hoặc cao hơn. Mặt khác, khi lượng ion kim loại bổ sung lớn hơn 5mM, hiệu quả này là không đáng kể so với lượng dư, và do đó lượng ion kim loại bổ sung có thể bằng 5mM hoặc nhỏ hơn. Ví dụ, lượng ion kim loại bổ sung có thể nằm trong khoảng từ 0,5mM đến 5mM, 0,5mM đến 4mM, 0,5mM đến 3mM, ví dụ, 0,5 mM đến 2mM.

Nền có thể tạo ra môi trường trong đó hoạt tính của chủng đã được cố định hoặc enzym được sản xuất từ chủng này có thể được duy trì trong khoảng thời gian dài, và

nó có thể là tất cả các nền đã biết được sử dụng để cố định enzym.

Ví dụ, natri alginat có thể được sử dụng làm nền. Natri alginat là polysaccharit có mặt dồi dào trong thành tế bào của tảo biển, và bao gồm axit mannuronic (axit β -D-mannuronic) và axit gluronic (axit α -L-gluronic), và tạo ra liên kết beta-1,4 ngẫu nhiên theo khía cạnh của hàm lượng, và nhờ đó, chủng hoặc enzym này được cố định một cách ổn định, và do đó, nó có lợi để cho thấy hiệu suất psicoza tuyệt vời.

Theo một phương án cụ thể, để tăng cường thêm hiệu suất của psicoza, dung dịch chứa natri alginat có nồng độ nằm trong khoảng từ 1,5 đến 4,0 % (khối lượng/thể tích) (ví dụ, dung dịch natri alginat chứa nước), ví dụ, dung dịch chứa natri alginat có nồng độ khoảng 2,5% (khối lượng/thể tích) có thể được sử dụng để cố định chủng. Ví dụ, sau khi bổ sung tế bào vi khuẩn của chủng này, giống nuôi cấy chứa enzym được sản xuất bởi chủng này, hoặc dịch tan của chủng này vào dung dịch natri alginat chứa nước có thể tích gấp 1 đến 2 lần thể tích của tế bào vi khuẩn của chủng này, giống nuôi cấy chứa enzym được sản xuất bởi chủng này hoặc dịch tan của chủng này và trộn, bằng cách tạo hạt bằng cách nhỏ giọt dung dịch hỗn hợp thu được vào dung dịch ion canxi khoảng 0,2M nhờ sử dụng bơm tiêm và bơm chân không, tế bào vi khuẩn của chủng này, giống nuôi cấy chứa enzym được sản xuất bởi chủng này, hoặc dịch tan của chủng này có thể được cố định trong nền natri alginat. Enzym có thể được tinh chế từ chủng, giống nuôi cấy của chủng hoặc dịch tan của chủng bằng các phương pháp thông thường, ví dụ, phương pháp thẩm tách, kết tủa, hấp phụ, điện di, sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, v.v..

Phương pháp điều chế psicoza được đề xuất theo sáng chế có thể biến đổi fructoza thành psicoza bằng cách không sử dụng dung dịch đệm và sử dụng tế bào vi khuẩn, và do đó, nó có ưu điểm sản xuất được psicoza với hiệu suất cao bằng phương pháp đơn giản hơn.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế đề cập đến vi khuẩn mới được phân lập thuộc giống *Microbacterium*, chế phẩm để sản xuất psicoza chứa chủng này, và phương pháp sản xuất psicoza bằng cách sử dụng chế phẩm này, và vì vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* theo sáng chế có độ ổn định trong khoảng pH, nhiệt độ hữu dụng và có hoạt tính sản xuất psicoza từ fructoza với hiệu suất cao, vi khuẩn này được cho là sẽ được sử dụng rộng rãi trong

ngành công nghiệp dược phẩm và thực phẩm có lợi cho sức khỏe có liên quan đến đường chức năng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ là các ví dụ nhằm minh họa sáng chế, và sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1. Phân lập vi sinh vật có nguồn gốc từ thực phẩm biến đổi fructoza thành psicoza

Để phân lập chủng biến đổi fructoza thành psicoza, canh muối khoáng được bổ sung psicoza (KH_2PO_4 2,4 g/L, K_2HPO_4 5,6 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,6 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L, dịch chiết nấm men 1 g/L) được sử dụng.

Thực phẩm (ví dụ, cây bông cải xanh, củ nhân sâm, hoa ăn được, v.v.) được lựa chọn, và 1g mỗi thực phẩm được thu gom và được bổ sung vào canh MSP, và sau đó được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ, nhờ đó thực hiện được công đoạn làm giàu. Sau đó, 100 μL (microlit) dung dịch nuôi cấy được thu gom và được phết trên môi trường aga, và sau đó, được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C cho đến khi khuẩn lạc được xác nhận. Các khuẩn lạc có các hình dạng và kích thước khác nhau trong số các khuẩn lạc tạo thành trong môi trường aga được chọn và được cấy vào canh MSP, và sau đó được nuôi cấy có lắc ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ và được ly tâm để thu hồi chỉ các tế bào vi khuẩn. Tế bào vi khuẩn đã thu hồi được đặt vào 100 μL dung dịch đệm PIPES (piperazin-N, N'-bis(axit 2-etansulfonic)) 50 mM (pH 7,0) và được tạo huyền phù, và được làm tan bằng cách sử dụng bộ xử lý siêu âm (ColeParmer) để thu gom dung dịch dịch tan. Sau khi ly tâm dung dịch dịch tan ở tốc độ 12.000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút, dịch nổi bề mặt được thu gom và được sử dụng làm dung dịch enzym (enzym thô), và dung dịch enzym được cho phản ứng ở nhiệt độ 30°C trong 12 giờ với fructoza 10 mM và psicoza làm cơ chất.

Tiến hành xác nhận việc liệu psicoza có được biến đổi thành fructoza trong dung dịch phản ứng hay không bằng phân tích sắc ký lớp mỏng (TLC, Thin Layer Chromatography). Phân tích sắc ký lớp mỏng được thực hiện bằng cách sử dụng dung môi hiện hình của pha tĩnh của silica gel (Silica gel 60F254 (Merck, Germany)) có chiều rộng 20cm, chiều cao 10cm và pha động trộn axetonitril và nước ở tỷ lệ thể tích

bằng 85:15 và hiện hình 3 lần trong 10 phút.

Các chủng trong đó psicoza được biến đổi thành fructoza như được xác nhận bởi phân tích TLC được phân loại và được cấy vào canh MS đã được bổ sung psicoza 0,1 % (khối lượng/thể tích) và được nuôi cấy có lắc ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ, và sau khi ly tâm, chỉ có tế bào vi khuẩn được thu hồi. Tế bào vi khuẩn đã được thu hồi được rửa bằng NaCl 0,85 % (khối lượng/thể tích), và sau đó, được tạo huyền phù bằng cách đặt fructoza 400 g/L và dung dịch đệm PIPES 50mM đã được bổ sung ion mangan 1mM (pH 7,0), và được cho phản ứng ở nhiệt độ 70°C trong 1 giờ.

Sau đó, sau khi thu hồi dịch nổi bề mặt bằng cách ly tâm kết quả phản ứng, phân tích sắc ký lỏng tính năng cao (HPLC) được tiến hành. Phân tích sắc ký lỏng được thực hiện bằng cách sử dụng RID (Refractive Index Detector, Agilent 1260 RID) của HPLC (Agilent, USA) được trang bị cột Aminex HPX-87C (BIO-RAD). Nước được sử dụng làm pha động và nhiệt độ là 80°C, và tốc độ dòng là 0,6 mL/phút. Kết quả thu được được thể hiện trên FIG. 1, và cuối cùng chọn được 1 loại chủng sản xuất psicoza mạnh nhất trong số 1500 loại chủng.

Ví dụ 2. Nhận diện chủng biến đổi psicoza

2-1. Nhận diện chủng

Trình tự của ARN ribosom 16S được xác nhận để nhận diện chủng đã được phân lập trong Ví dụ 1. Đã xác nhận được rằng trình tự (5'→3') của ARN ribosom 16S của chủng đã được phân lập là giống như SEQ ID NO. 1 và nó đồng nhất 99,5% với *Microbacterium foliorum* DSM12966, và được đặt tên là *Microbacterium foliorum* SYG27B. Chủng này được nộp lưu ở Trung tâm giống nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc vào ngày 24 tháng 9 năm 2015 với số nộp lưu là KCCM11774P.

2-2. Hoạt tính biến đổi psicoza của các chủng thuộc cùng một giống

Các chủng được nhận diện là vi khuẩn thuộc giống *Microbacterium* bởi trình tự của ARN ribosom 16S trong số các chủng đã được phân lập thể hiện hoạt tính biến đổi psicoza trong Ví dụ 1 là 3 loại (*M. foliorum*, *M. oxydans*, *M. phyllosphaerae*). Trong số này, *M. foliorum*, được xem là ưu việt xét về khía cạnh độ ổn định vì nó được biết là được phân lập từ cây bông cải xanh và củ nhân sâm, chủng này được chọn và các thử nghiệm sau được tiến hành.

Ví dụ 3. Thiết lập điều kiện tối ưu bằng cách sử dụng phản ứng vi khuẩn của chúng

Đối với các chủng đã được phân lập, tế bào vi khuẩn và cơ chất được cho phản ứng trong các điều kiện khác nhau về độ pH, nhiệt độ và ion kim loại, và hoạt tính biến đổi psicoza của các chủng này được so sánh.

3-1. Phân tích hoạt tính trong điều kiện nhiệt độ

Để xác định nhiệt độ tối ưu để sản xuất psicoza, chủng được phân lập trong Ví dụ 1 với nồng độ của tế bào vi khuẩn bằng 5 mg(dcw)/mL được cho phản ứng trong fructoza 400g/L và dung dịch đệm PIPES 50nM được bổ sung ion mangan kim loại 1nM (pH 7,0) trong 1 giờ khi thay đổi nhiệt độ trong khoảng từ 55 đến 80°C, và sau khi phản ứng kết thúc, việc sản xuất psicoza được xác định thông qua phân tích HPLC với cùng phương pháp như Ví dụ 1, và kết quả thu được được thể hiện trên FIG. 2 và Bảng 1.

Bảng 1

Nhiệt độ phản ứng (°C)	Hoạt tính tương đối (%)
55	54,2
60	66,1
65	85,8
70	96,7
75	100,0
80	87,7

Như được thể hiện trên FIG. 2 và Bảng 1, đã xác nhận được rằng hoạt tính tương đối của *Microbacterium foliorum* SYG27B tăng khi tăng nhiệt độ phản ứng đến 75°C và giảm ở nhiệt độ 80°C. Ngoài ra, chủng đã phân lập thể hiện hoạt tính tối đa ở nhiệt độ 75°C.

3-2. Phân tích hoạt tính trong điều kiện pH

Để nghiên cứu ảnh hưởng của pH trong phản ứng biến đổi, chủng đã được phân lập trong Ví dụ 1 với nồng độ của tế bào vi khuẩn bằng 5 mg/mL được cho phản ứng bằng cách sử dụng fructoza 400g/L và McIlvaine đã được bổ sung ion mangan kim loại 1mM (dung dịch đệm được điều chế bằng cách bổ sung dung dịch axit xitric 0,1 M và dinatri hydro phosphat 0,2 M với các lượng khác nhau bởi pH) trong khoảng pH từ 5,0 đến 9,0, một cách tương ứng, ở nhiệt độ 70°C trong 1 giờ, và sau khi phản ứng

kết thúc, tiến hành xác định sự sản xuất psicoza thông qua phân tích HPLC với cùng phương pháp như Ví dụ 1, và kết quả thu được được thể hiện trên FIG. 3 và Bảng 2.

Bảng 2

pH	Hoạt tính tương đối (%)
5,0	24,6
5,5	36,0
6,0	39,6
6,5	60,8
7,0	75,9
7,5	81,2
8,0	91,8
8,5	93,9
9,0	100,0

Như được thể hiện trên FIG. 3 và Bảng 2, đã xác nhận được rằng *Microbacterium foliorum* SYG27B là chủng đã được phân lập thu được trong Ví dụ 1 thể hiện hoạt tính cao trong khoảng pH từ 6,5 đến 9,0, và cụ thể, có thể sản xuất psicoza hiệu quả ngay cả trong khoảng pH trung tính nằm trong khoảng từ pH 7,0 đến 8,0.

3-3. Phân tích hoạt tính theo ion kim loại

Để xác định nhu cầu đối với ion kim loại, sử dụng fructoza 400g/L làm cơ chất, và sử dụng nồng độ của tế bào vi khuẩn đã được phân lập trong Ví dụ 1 bằng 5mg/mL, 70°C, và dung dịch ion kim loại 1mM (CaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, FeSO₄, MnCl₂, NiSO₄, ZnSO₄) được hòa tan trong dung dịch đệm PIPES 50mM (pH 7,0), một cách tương ứng, nó được cho phản ứng trong 1 giờ và sau khi phản ứng kết thúc, việc sản xuất psicoza được xác định thông qua phân tích HPLC với cùng phương pháp như Ví dụ 1, và kết quả thu được được thể hiện trên FIG. 4 và Bảng 3.

Bảng 3

Ion kim loại	Hoạt tính tương đối (%)
Không có (đối chứng)	100,0
Ca	90,1
Co	222,6
Cu	24,8
Fe	77,1
Mn	121,5
Ni	95,8

Zn	31,7
----	------

Như được thể hiện trên FIG. 4 và Bảng 3, so với nhóm đối chứng trong đó không bổ sung ion kim loại (Không có), *Microbacterium foliorum* SYG27B thu được trong Ví dụ 1 thể hiện hoạt tính biến đổi psicoza cao hơn so với nhóm đối chứng, khi ion mangan (Mn) và ion coban (Co) được bổ sung.

Ví dụ 4. Điều kiện để sản xuất psicoza trên quy mô lớn

4-1. Phân tích độ ổn định nhiệt độ của tế bào vi khuẩn

Để xác nhận độ ổn định nhiệt độ của chủng đã được phân lập, tế bào vi khuẩn đã được phân lập trong Ví dụ 1 được tạo huyền phù với dung dịch đệm PIPES 50mM đã được bổ sung ion mangan 1mM (pH 7,0) và sốc nhiệt 50°C trong 36 giờ. Sau đó, sau khi cho chúng phản ứng ở nhiệt độ 70°C trong 1 giờ ở nồng độ fructoza cuối cùng bằng 400g/L, và nồng độ của tế bào vi khuẩn bằng 5 mg/mL, tiến hành xác định sự sản xuất psicoza theo thời gian sốc nhiệt và kết quả thu được được thể hiện trên FIG. 5 và Bảng 4.

Bảng 4

Thời gian (giờ)	Hoạt tính tương đối (%)
0	100
2	93,4
4	77,8
8	65,1
12	59,7
24	53,1
36	46,1

Như được thể hiện trên FIG. 5 và Bảng 4, đã thấy rằng thời gian bán hủy là khoảng 28 giờ, khi sự sốc nhiệt được đưa ra đối với *Microbacterium foliorum* SYG27B thu được trong Ví dụ 1 ở nhiệt độ 50°C, so với hoạt tính biến đổi psicoza của *Microbacterium foliorum* SYG27B không có sốc nhiệt.

4-2. Hiệu suất của psicoza

Dưới điều kiện sản xuất psicoza trên quy mô lớn đã được thiết lập, hiệu suất tối đa theo thời gian phản ứng được xác nhận. Hoạt tính theo thời gian phản ứng được xác nhận dưới điều kiện nồng độ của tế bào vi khuẩn của chủng đã được phân lập trong Ví

dụ 1 bằng 20mg/mL, nồng độ của fructoza bằng 400g/L, nhiệt độ bằng 70°C và pH 7,0. Phản ứng được thực hiện trong 12 giờ và hiệu suất psicoza được xác nhận bằng phân tích HPLC trong khoảng thời gian 2 giờ. Kết quả được thể hiện trên FIG. 6 và Bảng 5.

Bảng 5

Thời gian (giờ)	Hoạt tính tương đối(%)
1	8,4
2	13,9
4	18,5
6	20,2
8	24,8
10	26,4
12	27,1
14	27,1

Như được thể hiện trên FIG. 6 và Bảng 5, *Microbacterium foliorum* SYG27B cho thấy tốc độ biến đổi psicoza tăng khi thời gian phản ứng tăng, và cụ thể, cho thấy tốc độ biến đổi psicoza tối đa là khoảng 27%, sau khi phản ứng ở nhiệt độ 70°C trong 12 giờ, và sau đó, hiệu suất psicoza được xác nhận là khoảng 75g/L.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất psicoza từ fructoza trong sự có mặt của ion mangan (Mn^{2+}), phương pháp này bao gồm bước:

cho fructoza tiếp xúc với tế bào vi khuẩn của *Microbacterium foliorum* có hoạt tính biến đổi psicoza để sản xuất psicoza từ fructoza, giống nuôi cấy của *Microbacterium foliorum*, dịch nổi bề mặt nuôi cấy của *Microbacterium foliorum*, dịch chiết nuôi cấy của *Microbacterium foliorum*, và/hoặc dịch tan của *Microbacterium foliorum*,

trong đó *Microbacterium foliorum* có hoạt tính biến đổi psicoza được làm tăng trong sự có mặt của ion mangan (Mn^{2+}) so với khi không có mặt ion mangan.

2. Phương pháp sản xuất psicoza theo điểm 1, trong đó bước cho tiếp xúc bao gồm việc nuôi cấy *Microbacterium foliorum* trong môi trường chứa fructoza.

3. Phương pháp sản xuất psicoza theo điểm 1, trong đó bước cho tiếp xúc được thực hiện bằng cách cho fructoza tiếp xúc với nền được cố định bằng tế bào vi khuẩn của *Microbacterium foliorum*, giống nuôi cấy của *Microbacterium foliorum*, dịch nổi bề mặt nuôi cấy của *Microbacterium foliorum*, dịch chiết nuôi cấy của *Microbacterium foliorum*, và/hoặc dịch tan của *Microbacterium foliorum*.

4. Phương pháp sản xuất psicoza theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bổ sung một hoặc nhiều loại ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm mangan và coban.

5. Phương pháp sản xuất psicoza theo điểm 1, trong đó phương pháp này được thực hiện bằng cách không sử dụng dung dịch đệm.

6. Phương pháp sản xuất psicoza theo điểm 1, trong đó fructoza có nồng độ nằm trong khoảng từ 40 đến 75% (theo khối lượng).

7. Phương pháp sản xuất psicoza theo điểm 1, trong đó phương pháp này được thực hiện dưới điều kiện pH từ 6,5 đến 9,0 và nhiệt độ từ 40 đến 80°C.

8. Phương pháp sản xuất psicoza theo điểm 1, trong đó *Microbacterium foliorum* được nộp lưu ở Trung tâm giống nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc dưới số nộp lưu KCCM11774P.

9. Chế phẩm để sản xuất psicoza từ fructoza, chứa tế bào vi khuẩn của *Microbacterium foliorum* có hoạt tính biến đổi psicoza để sản xuất psicoza từ fructoza, giống nuôi cấy của *Microbacterium foliorum*, dịch nổi bề mặt nuôi cấy của *Microbacterium foliorum*, dịch chiết nuôi cấy của *Microbacterium foliorum*, và/hoặc dịch tan của *Microbacterium foliorum*, và

ion mangan (Mn^{2+}),

trong đó *Microbacterium foliorum* có hoạt tính biến đổi psicoza được làm tăng trong sự có mặt của ion mangan (Mn^{2+}), so với khi không có mặt ion mangan.

10. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó *Microbacterium foliorum* có hoạt tính biến đổi psicoza ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 80°C.

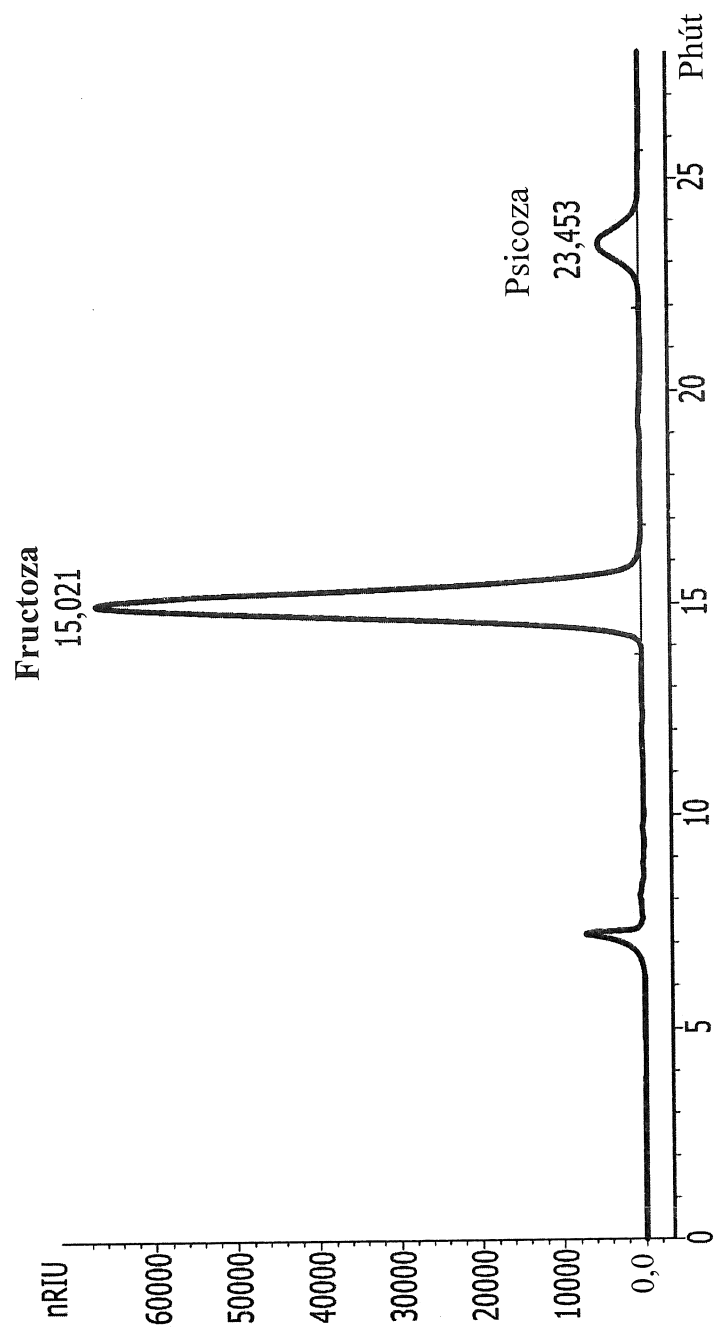
11. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó *Microbacterium foliorum* có hoạt tính biến đổi psicoza ở độ pH từ 6,5 đến 9,0.

12. Chế phẩm để sản xuất psicoza theo điểm 9, trong đó *Microbacterium foliorum* có hoạt tính biến đổi psicoza tăng từ 1,2 đến 2,3 lần trong sự có mặt của một hoặc nhiều loại ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm mangan và coban, so với trường hợp không có ion kim loại.

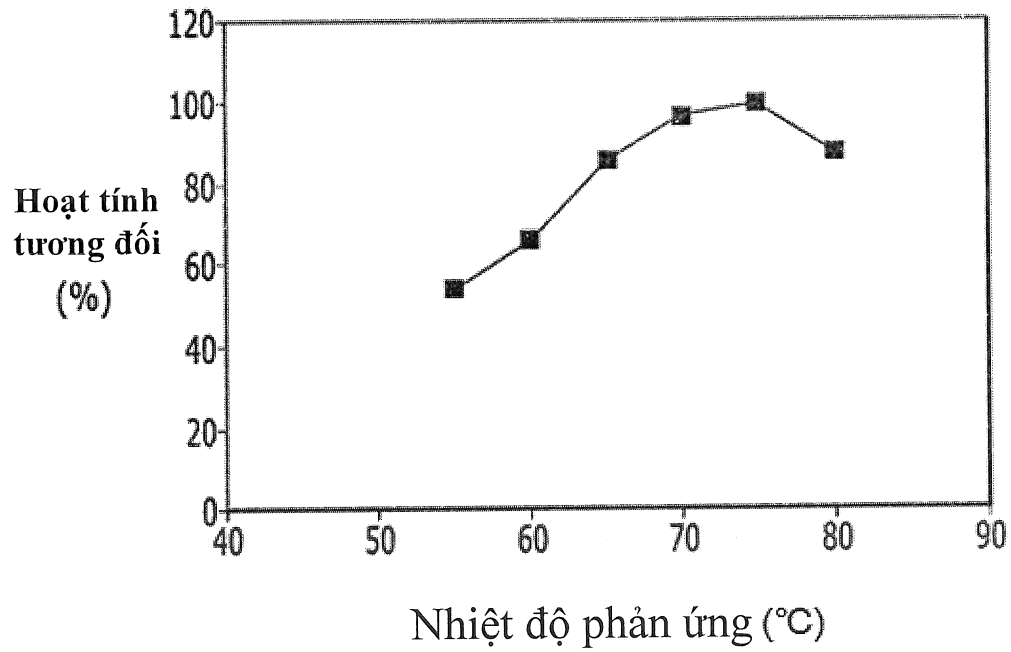
13. Chế phẩm để sản xuất psicoza theo điểm 9, trong đó *Microbacterium foliorum* được nộp lưu ở Trung tâm giống nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc dưới số nộp lưu KCCM11774P.

14. Chủng *Microbacterium foliorum* được nộp lưu ở Trung tâm giống nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc dưới số nộp lưu KCCM11774P.

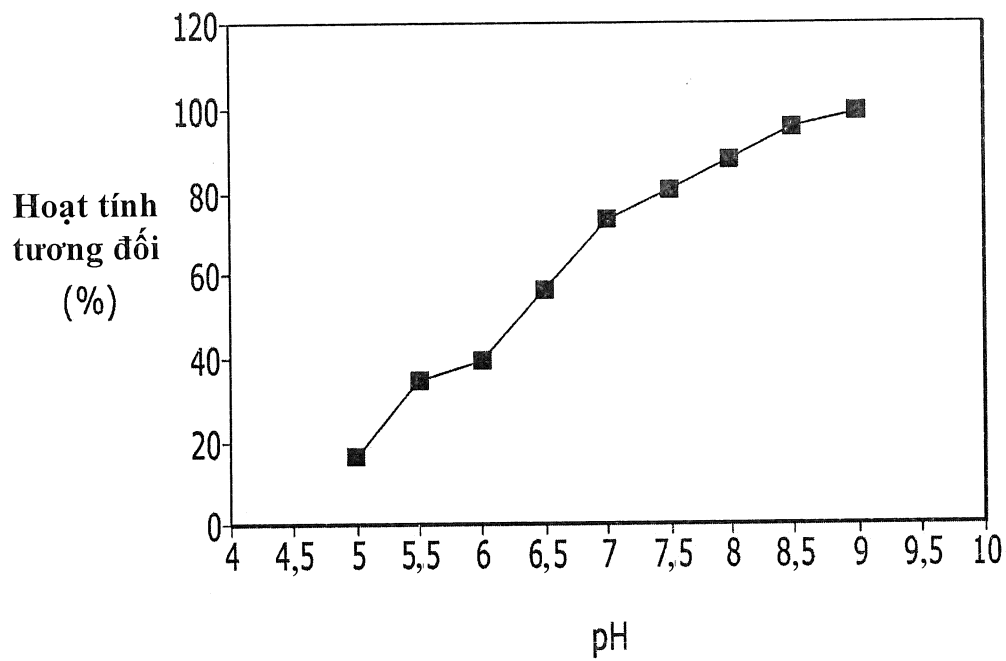
【FIG. 1】



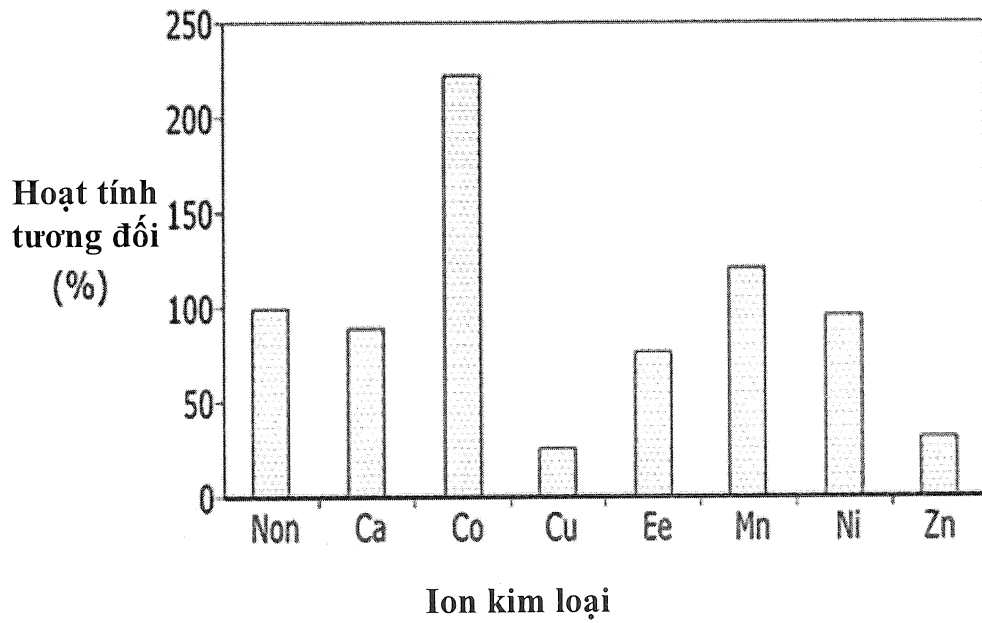
【FIG. 2】



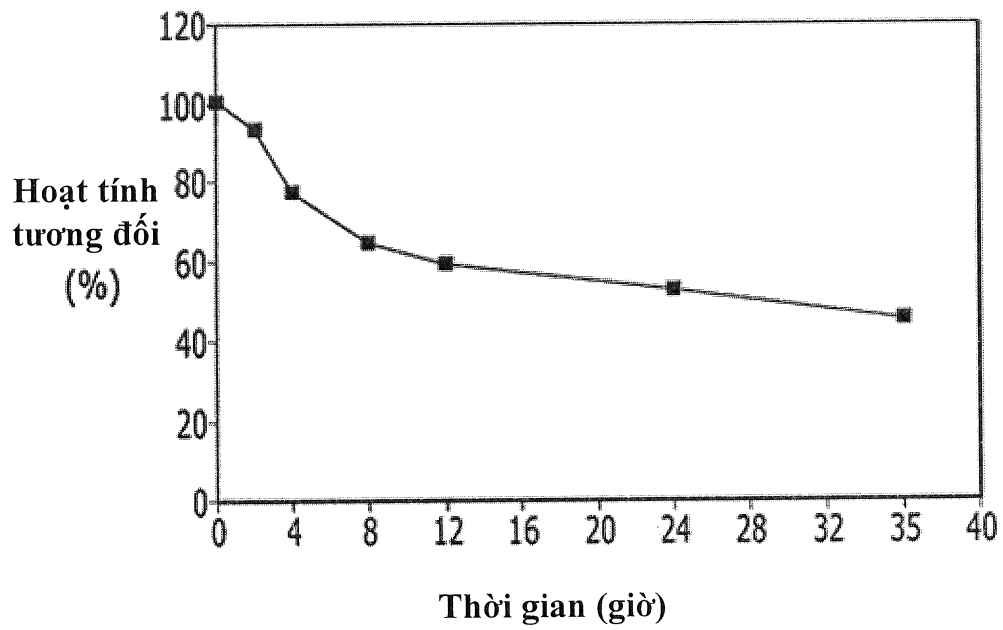
【FIG. 3】



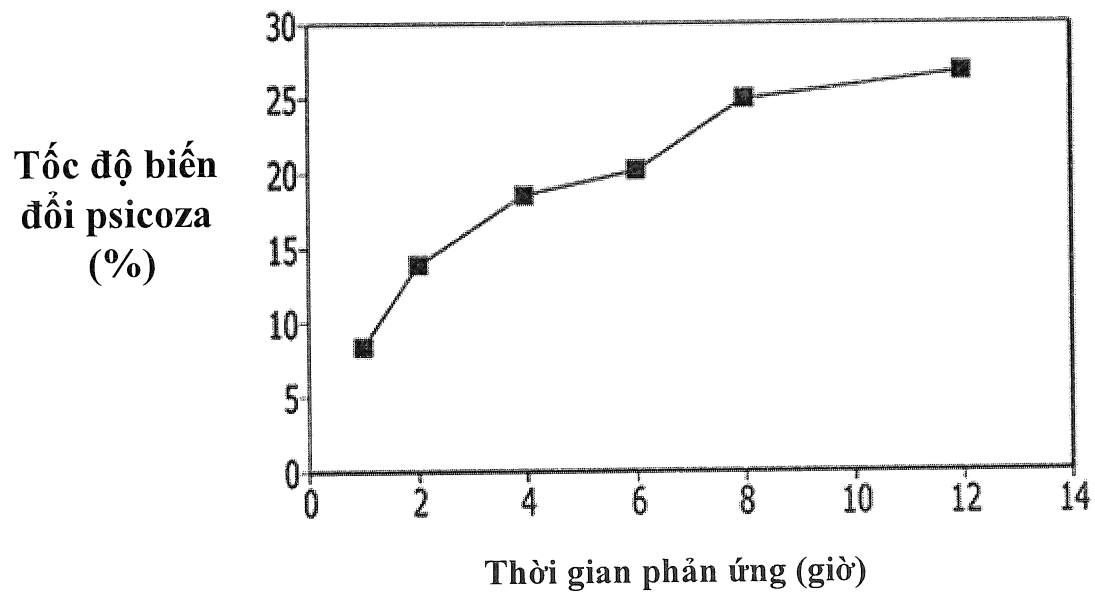
【FIG. 4】



【FIG. 5】



【FIG. 6】



<110> SAMYANG GENEX CORPORATION
 <120> CHỦNG VI KHUẨN *MICROBACTERIUM FOLIORUM* VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PSICOZA TỪ FRUCTOZA SỬ DỤNG CHỦNG VI KHUẨN NÀY
 <130> OPP-2016-3640-KR
 <160> 1
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 1466
 <212> ADN
 <213> Microbacterium foliorum
 <400> 1
 gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac ggtgaacacg gagcttgctc
 60
 tgtgggatca gtggcgaacg ggtgagtaac acgtgagcaa cctaccctg actctgggat
 120
 aagcgctgga aacggcgtct aatactggat acgagtggcg accgcatggt cagctactgg
 180
 aaagatttat tggttgggga tgggctcgcg gcctatcagc ttgttggtga ggtaatggct
 240
 caccaaggcg tcgacgggta gccggcctga gagggtgacc ggccacactg ggactgagac
 300
 acggcccaga ctccctacggg aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg cgcaagcctg
 360
 atgcagcaac gccgcgtgag ggatgacggc cttcgggttg taaacctctt ttagcagggg
 420
 agaagcgaaa gtgacggtac ctgcagaaaa agcgccggct aactacgtgc cagcagccgc
 480
 ggtaatacgt agggcgcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagagc tcgtaggcgg
 540
 tttgtcgcgt ctgctgtgaa atccggaggc tcaacctccg gcctgcagtg ggtacgggca
 600
 gactagagtg cggtagggga gattggaatt cctgggtgtag cggtggaatg cgagatatc
 660
 aggaggaaca ccgatggcga aggcagatct ctgggccgta actgacgctg aggagcgaaa
 720

gggtggggag caaacaggct tagataccct ggtagtcac cccgtaaagc ttgggaacta
780

gttgtggggt ccattccacg gattccgtga cgcagctaac gcattaagtt cccgccttg
840

ggagtacggc cgcaaggcta aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggcgga
900

gcatgcggat taattcgatg caacgcgaag aacottacca aggcttgaca tatacgagaa
960

cgggccagaa atggtcaact ctttgacac tcgtaaagc gtggtgcatg gttgtcgtca
1020

gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctcg ttctatgttg
1080

ccagcacgta atggtgggaa ctcatgggat actgccgggg tcaactcgga ggaaggtggg
1140

gatgacgtca aatcatcatg ccccttatgt cttgggcttc acgcatgcta caatggccgg
1200

tacaaagggc tgcaataaccg cgaggtggag cgaatcccaa aaagccggtc ccagttcgga
1260

ttgaggtctg caactcgacc tcatgaagtc ggagtcgcta gtaatcgag atcagcaacg
1320

ctgcggtgaa tacgttcccg ggtcttgtag acaccgcccg tcaagtcatg aaagtcggta
1380

acacctgaag ccggtggcct aacccttggt gagggagccg tcgaaggtgg gatcggtaat
1440

taggactaag tcgtaacaag gtaacc
1466