



(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)



1-0035816

(51)⁸ C12N 9/90; C12P 19/24; C12N 15/61

(13) B

(21) 1-2018-04874

(22) 31/03/2017

(86) PCT/CN2017/078923 31/03/2017

(87) WO 2017/167255 A1 05/10/2017

(30) 201610047300.4 01/04/2016 CN

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/02/2019 371A

(73) 1. LANGNAI BIOTECH CO., LTD (CN)

No.9 Kechuang Road Luhe, Nanjing, Jiangsu 211505, China

2. L&P FOOD INGREDIENT CO., LTD (CN)

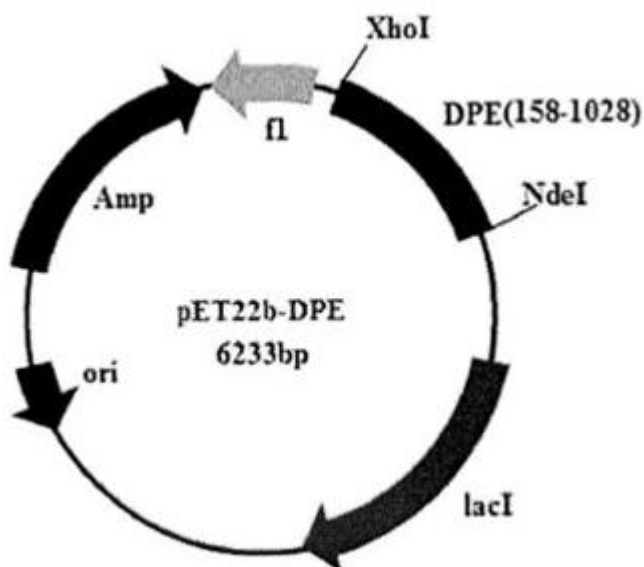
Wengcheng Industrial Park, Wengcheng Town, Wengyuan County, Shaoguan City,
Guangdong Province 512627, China

(72) WANG, Sanyong (CN); LI, Chunrong (CN); HAN, Shilei (CN); YAN, Ming (CN);
WEI, Miao (CN); CHEN, Sheng (CN); ZHANG, Zhilin (CN).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT D-ALULOZA

(57) Sáng chế đề cập đến 3-epimeraza và polynucleotit mã hóa nó, cấu trúc axit nucleic hoặc vector biểu hiện, tế bào chủ có polynucleotit này và phương pháp sản xuất polypeptit hoặc protein.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến polypeptit hoặc protein có hoạt tính 3-epimeraza, trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc protein có hoạt tính 3-epimeraza, cấu trúc axit nucleic hoặc vector biểu hiện bao gồm trình tự polynucleotit, phương pháp sản xuất enzym và sử dụng enzym trong nhiều ứng dụng công nghiệp.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất D-aluloza bằng xúc tác sử dụng đường đơn như fructoza, glucoza và tinh bột, hoặc hỗn hợp của chúng, bằng cách sử dụng polypeptit hoặc protein có hoạt tính 3-epimeraza và phương pháp sản xuất D-tagatoza bằng xúc tác sử dụng đường đơn như sorboza và tinh bột, hoặc hỗn hợp của chúng, bằng cách sử dụng polypeptit hoặc protein.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khi việc ăn uống lành mạnh ngày càng được chú trọng, sự phát triển của chất tạo ngọt nhân tạo có hàm lượng calo thấp an toàn và lành mạnh đã trở thành trọng tâm nghiên cứu trong ngành công nghiệp thực phẩm. D-aluloza và D-tagatoza, là các chất tạo ngọt nhân tạo có hàm lượng calo thấp tự nhiên, mà có tự nhiên nhưng ít thấy, đã trở thành đề tài nghiên cứu đang được quan tâm.

D-aluloza, còn được gọi là D-ribo-2-hexuloza, là đồng tâm lập thể của D-fructoza đồng phân hóa ở vị trí C-3. D-aluloza là chất tạo ngọt nhân tạo với hàm lượng calo thấp có tự nhiên nhưng ít thấy với độ ngọt bằng 70% độ ngọt của sucroza, nhưng có năng lượng chỉ bằng 0,3% năng lượng của sucroza và có thể được sử dụng như chất tạo ngọt trong thực phẩm ăn kiêng có hàm lượng calo thấp. Hơn nữa, D-aluloza cũng có chức năng ức chế hoạt tính của enzym tham gia vào quá trình tổng hợp lipid trong gan, góp phần giảm tích tụ mỡ bụng và kiểm soát trọng lượng cơ thể ở một mức độ nào đó, do đó nó hữu ích dùng trong các loại thực phẩm chức năng như thực phẩm bổ dưỡng. Ngoài ra, D-aluloza cũng có thể cải thiện hương vị, hình thức, v.v. của thực phẩm và kéo dài thời hạn sử dụng của thực phẩm. Do đó, D-aluloza, chất tạo ngọt nhân tạo có hàm lượng calo thấp lành mạnh và an toàn, đã ngày càng thu hút sự chú ý và trở thành một trong những chất tạo ngọt mới có tính cạnh tranh nhất.

D-aluloza là đường đơn tự nhiên hiếm gặp và có nhược điểm như năng suất thấp và chi phí cao khi được tách và chiết xuất từ thiên nhiên. Do đó, D-aluloza khó đáp ứng nhu cầu làm chất tạo ngọt lành mạnh có hàm lượng calo thấp và không thích hợp cho sản xuất công nghiệp có quy mô lớn. Như vậy, để có thể áp dụng cho ngành công nghiệp thực phẩm, cần có một phương pháp hiệu quả để sản xuất D-aluloza. Phương pháp truyền thống để sản xuất D-aluloza chủ yếu là phương pháp hóa học, mà có nhược điểm như chi phí cao và tạo ra nhiều phụ phẩm và chất gây ô nhiễm. Việc điều chế D-aluloza bằng phương pháp sinh học có đặc điểm là độ đặc hiệu phản ứng cao, thành phần sản phẩm đơn giản, thanh lọc thuận tiện và là sản phẩm tự nhiên, do đó nó trở thành đề tài nghiên cứu đang được quan tâm.

Cách hiệu quả nhất để điều chế D-aluloza bằng phương pháp sinh học là tìm ra enzym mà chuyển đổi fructoza thành D-aluloza. Tuy nhiên, enzym aluloza-3-epimeraza hiện tại có vấn đề như giảm độ ổn định khi ở nhiệt độ cao hoặc hoạt tính thấp và tỷ lệ phản ứng thấp, điều này không có lợi cho việc kiểm soát chi phí trong sản xuất công nghiệp đối với D-aluloza. Do đó, cần phải phát triển aluloza-3-epimeraza với độ ổn định nhiệt độ cao và hoạt tính cao phù hợp, để đáp ứng nhu cầu trong sản xuất công nghiệp.

D-tagatoza là đồng tâm lập thể của D-sorboza được đồng phân hóa ở vị trí C-3. D-tagatoza là chất tạo ngọt nhân tạo có hàm lượng calo thấp, có tự nhiên nhưng ít thấy, với độ ngọt bằng 92% độ ngọt của sucroza, nhưng có tỷ lệ hấp thu thấp ở người chỉ từ 20 đến 25%, do đó không tạo ra thay đổi rõ rệt trong mức đường huyết của cơ thể. Do đó, D-tagatoza phù hợp cho bệnh nhân tiểu đường sử dụng. Hơn nữa, hầu hết các tagatoza trực tiếp đi vào ruột kết và lên men chọn lọc bởi hệ vi khuẩn trong ruột kết, để thúc đẩy sự gia tăng của vi khuẩn có lợi, ức chế sự phát triển của vi khuẩn có hại và cải thiện đáng kể khu hệ ruột. Vì vậy, D-tagatoza là probiotic tốt và có thể được sử dụng trong nhiều loại thực phẩm chức năng như thực phẩm bổ dưỡng. Ngoài ra, D-tagatoza cũng có thể cải thiện hương vị, hình thức, v.v. của thực phẩm. Do đó, D-tagatoza, chất tạo ngọt nhân tạo có hàm lượng calo thấp lành mạnh và an toàn, đã thu hút ngày càng nhiều sự chú ý và trở thành một trong những chất tạo ngọt mới có tiềm năng phát triển nhất.

Sự đồng phân hóa sorboza thành D-tagatoza là một trong những phương pháp hiệu

quả nhất để điều chế D-tagatoza bằng phương pháp sinh học. Vấn đề mấu chốt của phương pháp này là tìm ra loại enzyme mà chuyển đổi sorboza thành D-tagatoza. Tagatoza-3-epimeraza hiện tại có vấn đề như giảm độ ổn định ở nhiệt độ cao hoặc hoạt tính thấp và tỷ lệ phản ứng thấp, điều này không có lợi cho việc kiểm soát chi phí và tăng quy mô sản xuất công nghiệp của D-tagatoza. Do đó, cần phải phát triển một loại tagatose-3-epimeraza có độ ổn định nhiệt độ cao và hoạt tính cao để đáp ứng nhu cầu trong sản xuất công nghiệp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế phát hiện protein mới có hoạt tính 3-epimeraza từ *Thermogemmatispora carboxidivorans*. Theo đó, sáng chế đề xuất protein mới có hoạt tính 3-epimeraza và polynucleotit mã hóa protein hoặc polypeptit. Protein hoặc polypeptit có aluloza-3-epimeraza và hoạt tính tagatoza-3-epimeraza. Protein hoặc polypeptit theo sáng chế có hoạt tính tốt và độ ổn định nhiệt tuyệt vời, cả hai đều có đặc tính tuyệt vời để sản xuất D-aluloza và D-tagatoza trong điều kiện nhiệt độ cao.

Sáng chế đề xuất protein hoặc polypeptit bị phân lập có hoạt tính aluloza-3-epimeraza và tagatoza-3-epimeraza, được chọn từ nhóm gồm:

(a) protein hoặc polypeptit, có trình tự giống ít nhất 70% so với trình tự axit amin như thể hiện ở SEQ ID No: 2;

(b) protein hoặc polypeptit, mã hóa bởi polynucleotit được lai, dưới điều kiện nghiêm ngặt từ trung bình đến cao với (i) trình tự mã hóa polypeptit như thể hiện ở SEQ ID No: 1, (ii) trình tự ADN bộ gen bao gồm trình tự mã hóa polypeptit như thể hiện ở SEQ ID No: 1, hoặc (iii) sợi bổ sung đầy đủ của (i) hoặc (ii);

(c) protein hoặc polypeptit, được mã hóa bởi polynucleotit có trình tự giống ít nhất 70% so với trình tự mã hóa protein hoặc polypeptit như thể hiện ở SEQ ID No: 1;

(d) biến thể của protein hoặc polypeptit như thể hiện ở SEQ ID No: 2, bao gồm một hoặc nhiều (một vài) thay thế, mất và/hoặc chèn axit amin; và

(e) bất kỳ protein hoặc polypeptit (a), (b) hoặc (c) nào, có trình tự axit amin bao gồm hoặc chứa trình tự như thể hiện ở SEQ ID No: 2; và

(f) đoạn protein hoặc polypeptit (a), (b), (c), (d), hoặc (e), có hoạt tính aluloza-3-epimeraza và tagatoza-3-epimeraza.

Sáng chế cũng đề xuất cấu trúc axit nucleic, vector biểu hiện và tế bào chủ tái tổ hợp axit nucleic bao gồm polynucleotit và đề xuất phương pháp sản xuất polynucleotit.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất D-aluloza và D-tagatoza bằng enzym.

Hiệu quả của sáng chế

3-epimeraza theo sáng chế có hoạt tính tốt đối với fructoza và sorboza và cũng có độ ổn định nhiệt tuyệt vời, cả hai đều có đặc tính tuyệt vời để sản xuất D-aluloza và D-tagatoza trong điều kiện nhiệt độ cao. Phương pháp sản xuất D-aluloza và D-tagatoza theo khía cạnh của sáng chế là thân thiện với môi trường vì sử dụng enzym có nguồn gốc từ vi sinh vật. Chỉ cần quá trình cố định enzym đơn giản trong phương pháp này, năng suất và hiệu quả sản xuất của D-aluloza và D-tagatoza được cải thiện đáng kể, do đó làm giảm chi phí sản xuất và tối đa hóa kết quả sản xuất.

Do đó, D-aluloza và D-tagatoza được sản xuất có thể được sử dụng hiệu quả làm chất phụ gia cho thực phẩm hoặc thuốc.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là lưu đồ thể hiện quá trình sản xuất 3-epimeraza trong ví dụ 1 theo sáng chế;

Hình 2-1 là đường cong thể hiện ảnh hưởng của pH lên hoạt tính của 3-epimeraza trong ví dụ 5 theo sáng chế;

Hình 2-2 là đường cong thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ đối với hoạt tính của 3-epimeraza trong ví dụ 5 theo sáng chế;

Hình 3 thể hiện mối quan hệ nhiệt độ-hoạt tính trong ví dụ 6 theo sáng chế;

Hình 4 là sơ đồ thể hiện tỷ lệ chuyển đổi fructoza thành D-aluloza bằng 3-epimeraza trong ví dụ 7 theo sáng chế; và

Hình 5 là sơ đồ thể hiện tỷ lệ chuyển đổi của sorboza thành D-tagatoza bởi 3-epimeraza trong ví dụ 11 theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Hoạt tính của aluloza-3-epimeraza: Thuật ngữ "hoạt tính của aluloza-3-epimeraza" có nghĩa là hoạt tính để xúc tác sự đồng phân hóa của fructoza ở

vị trí C-3 thành D-aluloza.

Hoạt tính của tagatoza-3-epimeraza: Thuật ngữ "hoạt tính của tagatoza-3-epimeraza" có nghĩa là hoạt tính để xúc tác đồng phân hóa sorboza ở vị trí C-3 thành D-tagatoza.

Protein hoặc polypeptit bị phân lập: Thuật ngữ "protein hoặc polypeptit bị phân lập" có nghĩa là polypeptit được biến đổi nhân tạo theo protein hoặc polypeptit tìm thấy trong tự nhiên. Theo một khía cạnh, polypeptit có độ nguyên chất ít nhất là 1%, ví dụ ít nhất là 5%, ít nhất là 10%, ít nhất là 20%, ít nhất là 40%, ít nhất là 60%, ít nhất là 80% và tốt nhất là 90%, như được xác định bằng SDS-PAGE.

Ví dụ không giới hạn của protein hoặc polypeptit bị phân lập bao gồm (1) bất kỳ protein hoặc polypeptit không có trong tự nhiên nào, (2) bất kỳ protein hoặc polypeptit nào, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bất kỳ enzym, biến thể, axit nucleic, protein, peptit hoặc đồng yếu tố, trong đó ít nhất một phần bị loại bỏ khỏi một hoặc nhiều hay tất cả các thành phần có trong tự nhiên được kết hợp với nó trong tự nhiên; (3) bất kỳ protein hoặc polypeptit nào đã được biến đổi nhân tạo theo protein hoặc polypeptit có trong tự nhiên; hoặc (4) bất kỳ protein hoặc polypeptit nào được biến đổi về mặt tăng lượng protein hoặc polypeptit so với các thành phần khác trong tự nhiên được kết hợp với nó. Protein hoặc polypeptit bị phân lập có thể có mặt trong mẫu rượu lên men.

Protein hoặc polypeptit về cơ bản là tinh khiết: Thuật ngữ "protein hoặc polypeptit về cơ bản là tinh khiết" có nghĩa là việc điều chế protein hoặc polypeptit có chứa tự nhiên nhiều nhất là 10% trọng lượng của nguyên liệu protein hoặc polypeptit khác trong tự nhiên hoặc được kết hợp theo kiểu tái tổ hợp. Tốt hơn là, protein hoặc polypeptit có độ nguyên chất ít nhất là 90% trọng lượng của tất cả các nguyên liệu protein hoặc polypeptit có mặt trong quá trình điều chế. Protein hoặc polypeptit theo sáng chế tốt hơn là ở dạng về cơ bản là tinh khiết, ví dụ, điều này có thể đạt được bằng cách điều chế polypeptit bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp đã biết hoặc bằng phương pháp tinh chế thông thường.

Sự giống nhau của trình tự: Thuật ngữ "sự giống nhau của trình tự" mô tả mối tương quan giữa hai trình tự axit amin hoặc giữa hai trình tự nucleotit.

Trong phạm vi mục đích theo sáng chế, sự giống nhau của trình tự giữa hai trình tự axit amin được xác định bằng, ví dụ, thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, J.Mol. Biol. 48: 443-453) sử dụng chương trình Needle trong gói phần mềm EMBOSS (EMBOSS: Bộ phần mềm mở sinh học phân tử châu Âu, Rice và cộng sự, 2000, Xu hướng trong di truyền học 16: 276-277) (tốt nhất là phiên bản 3.0.0 hoặc cao hơn). Các tham số tùy chọn được sử dụng là độ bù khoảng trống 10, độ bù mở rộng khoảng trống 0,5 và ma trận thay thế EBLOSUM62 (phiên bản BLOSUM62 của EMBOSS). Kết quả đầu ra được gắn nhãn là "độ giống dài nhất" (thu được bằng cách sử dụng tùy chọn -nobrief) bằng chương trình Needle được sử dụng làm phần trăm độ giống và được tính như sau:

$$(\text{số nhóm dư giống nhau} \times 100) / (\text{chiều dài bắt cặp} - \text{tổng số khoảng trống})$$

Trong phạm vi mục đích theo sáng chế, sự giống nhau của trình tự giữa hai trình tự nucleotit được xác định bằng, ví dụ, thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, supra) được thực hiện bởi chương trình Needle trong gói phần mềm EMBOSS (EMBOSS: Bộ phần mềm mở rộng sinh học phân tử châu Âu Bi010, Rice và cộng sự, supra). Các tham số tùy chọn được sử dụng là độ bù khoảng trống 10, độ bù mở rộng khoảng trống 0,5 và ma trận thay thế EDNAFULL (phiên bản NCBI NUC4.4 của EMBOSS). Kết quả đầu ra có nhãn "độ giống dài nhất" (thu được bằng cách sử dụng tùy chọn -nobrief) bằng chương trình Needle được sử dụng làm phần trăm độ giống và được tính như sau:

$$(\text{số deoxyribonucleotit giống nhau} \times 100) / (\text{chiều dài bắt cặp} - \text{tổng số khoảng trống})$$

Đoạn: Thuật ngữ "đoạn" có nghĩa là một polypeptit có một hoặc nhiều (một số) axit amin bị xóa khỏi amin và/hoặc đầu tận cùng carboxyl của polypeptit trưởng thành, nơi đoạn có hoạt tính của 3-epimeraza.

Biến thể alen: Thuật ngữ "biến thể alen" có nghĩa là bất kỳ hai hoặc nhiều hình thức thay thế nào của gen trên cùng vị trí nhiễm sắc thể. Biến thể alen xảy ra tự nhiên do đột biến và có thể dẫn đến hiện tượng đa hình trong quần thể. Đột biến di truyền có thể là đột biến câm (không thay đổi trong polypeptit được mã hóa) hoặc có thể mã hóa polypeptit với trình tự axit amin bị biến đổi. Biến thể alen của polypeptit là polypeptit được mã hóa bởi biến thể alen của gen.

Polynucleotit bị phân lập: Thuật ngữ "Polynucleotit bị phân lập" có nghĩa là polynucleotit được biến đổi nhân tạo so với polynucleotit tìm thấy trong tự nhiên. Theo một khía cạnh, polynucleotit bị phân lập là tinh khiết từ 1 đến 95% được xác định bằng điện di agarosa. Polynucleotit có thể là bộ gen, ADN bổ sung, ARN, có nguồn gốc bán tổng hợp hoặc tổng hợp, hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng.

Polynucleotit về cơ bản là tinh khiết: Thuật ngữ "polynucleotit về cơ bản là tinh khiết" có nghĩa là quá trình điều chế polynucleotit không chứa các nucleotit ngoại lai hoặc không mong muốn khác, mà ở dạng thích hợp để sử dụng trong hệ thống sản xuất protein bằng kỹ thuật di truyền. Vì vậy, polynucleotit về cơ bản là tinh khiết có chứa từ 0,5% đến 10% trọng lượng các nguyên liệu polynucleotit khác tự nhiên hoặc tái tổ hợp được kết hợp với nó. Tuy nhiên, polynucleotit về cơ bản là tinh khiết có thể bao gồm các vùng không dịch mã 5' và 3' có tự nhiên, ví dụ như vùng khởi động và vùng kết thúc. Tốt hơn là, polynucleotit về cơ bản là tinh khiết có độ tinh khiết từ 90% đến 99,5% trọng lượng. Polynucleotit theo sáng chế này tốt hơn là về cơ bản là tinh khiết.

Trình tự mã hóa: Thuật ngữ "trình tự mã hóa" có nghĩa là polynucleotit quy định trực tiếp trình tự axit amin của polypeptit. Trình tự mã hóa thường được giới hạn bởi một khung đọc mở thường bắt đầu bằng đơn vị mã khởi động ATG hoặc các đơn vị mã khởi động thay thế như GTG và TTG và kết thúc bằng các đơn vị mã dừng như TAA, TAG và TGA. Trình tự mã hóa có thể là ADN, ADN bổ sung, polynucleotit tổng hợp hoặc tái tổ hợp.

ADN bổ sung: Thuật ngữ "ADN bổ sung" có nghĩa là phân tử ADN có khả năng được tạo thành bằng cách sao mã ngược từ phân tử ARN thông tin cắt nối, trưởng thành có nguồn gốc từ tế bào có nhân. ADN bổ sung thiếu một trình tự intron thường xuất hiện trong ADN bộ gen tương ứng. Bản sao ARN ban đầu, sơ cấp là tiền thân của ARN thông tin được xử lý thông qua nhiều bước, bao gồm ghép nối, và sau đó xuất hiện như là ARN thông tin ghép nối, trưởng thành.

Cấu trúc axit nucleic: Thuật ngữ "cấu trúc axit nucleic" có nghĩa là phân tử axit nucleic sợi đơn hoặc sợi đôi được phân lập từ một gen có trong tự nhiên, được biến đổi để chứa một phân đoạn của axit nucleic theo cách chưa biết đến hoặc là tổng hợp. Thuật ngữ cấu trúc axit nucleic đồng nghĩa với thuật ngữ "cassette biểu hiện" khi cấu trúc axit nucleic chứa các trình tự điều khiển cần thiết cho sự biểu hiện của một trình

tự mã hóa ở sáng chế này.

Trình tự điều khiển: Thuật ngữ "trình tự điều khiển" có nghĩa là tất cả các thành phần cần thiết cho sự biểu hiện của polynucleotit mã hóa polypeptit ở sáng chế này. Mỗi trình tự điều khiển có thể là nguyên sinh hoặc ngoại lai đối với trình tự nucleotit mã hóa polypeptit, hoặc mỗi trình tự điều khiển có thể là nguyên sinh hoặc ngoại lai với nhau. Các trình tự điều khiển này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự dẫn đầu, trình tự polyadenyl hóa, trình tự propeptit, chất tăng xúc tác, trình tự peptit tín hiệu và một đoạn kết thúc phiên mã. Các trình tự điều khiển ít nhất bao gồm chất tăng xúc tác cũng như tín hiệu kết thúc cho phiên mã và dịch mã. Các trình tự điều khiển có thể được cung cấp với một trình liên kết nhằm mục đích đưa ra một vị trí hạn chế cụ thể tạo điều kiện cho sự liên kết của trình tự điều khiển đến một vùng mã hóa của polynucleotit mã hóa polypeptit

Liên kết hoạt động: Thuật ngữ "liên kết hoạt động" có nghĩa là một cấu hình trong đó trình tự điều khiển được đặt ở vị trí thích hợp liên quan đến trình tự mã hóa của polynucleotit sao cho trình tự điều khiển quy định biểu hiện của trình tự mã hóa.

Biểu hiện: Thuật ngữ "biểu hiện" bao gồm bất kỳ bước nào liên quan đến việc sản xuất polypeptit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phiên mã, sửa đổi sau phiên mã, dịch mã, sửa đổi sau dịch mã và tiết ra.

Vectơ biểu hiện: Thuật ngữ "vectơ biểu hiện" có nghĩa là phân tử ADN mạch thẳng hoặc mạch vòng bao gồm polynucleotit mã hóa một polypeptit và được liên kết hoạt động với nucleotit bổ sung được cung cấp cho biểu hiện của nó.

Tế bào chủ: Thuật ngữ "tế bào chủ" có nghĩa là bất kỳ loại tế bào nào dễ bị biến nạp, chuyển nhiễm và tải nạp, v.v. cấu trúc axit nucleic hoặc vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit theo sáng chế. Thuật ngữ "tế bào chủ" bao gồm bất kỳ thế hệ con cháu nào của tế bào cha mẹ khác với tế bào cha mẹ do đột biến xảy ra trong quá trình sao chép.

Biến thể: Thuật ngữ "biến thể" có nghĩa là protein hoặc polypeptit có hoạt tính 3-epimeraza có chứa các thay đổi tại một hoặc nhiều (một vài) vị trí, tức là thay thế, chèn và (hoặc) xóa một hoặc nhiều (một số) gốc axit amin. Thay thế có nghĩa là việc thay thế một axit amin trên một vị trí bằng một axit amin khác; xóa có nghĩa là loại bỏ

một axit amin chiếm một vị trí; và chèn có nghĩa là bổ sung 1-3 axit amin liền kề với một axit amin trên một vị trí.

Các tác giả sáng chế hiện nay đã nghiên cứu các đặc điểm của polypeptit epimeraza có nguồn gốc từ *Thermogemmatispora carboxidivorans* và phát hiện ra rằng trong thí nghiệm chuyển đổi fructoza thành D-aluloza và sorboza thành D-tagatoza, polypeptit có chức năng chuyển đổi fructoza hoặc sorboza thành D-aluloza hoặc D-tagatoza bằng cách epimer hóa fructoza hoặc sorboza tại vị trí C-3. Polypeptit thu được thông qua quá trình bao gồm tổng hợp gen mã hóa epimeraza có nguồn gốc từ *Thermogemmatispora carboxidivorans*, nuôi cấy vi sinh vật có chứa vector biểu hiện gen và biểu hiện quá mức polypeptit. Sau khi thử nghiệm, peptit được tìm thấy có hoạt tính aluloza-3-epimeraza và tagatoza-3-epimeraza tốt và ổn định nhiệt tuyệt vời. Theo đó, sáng chế này đề cập đến polypeptit có hoạt tính aluloza-3-epimeraza và tagatoza-3-epimeraza và phương pháp sản xuất D-aluloza hoặc D-tagatoza bằng cách sử dụng polypeptit có hoạt tính aluloza-3-epimeraza và tagatoza-3-epimeraza.

Để xác định các đặc điểm của polypeptit epimeraza, trong sáng chế này, gen mã hóa polypeptit được chỉ định là epimeraza có nguồn gốc từ *Thermogemmatispora carboxidivorans* thu được bằng cách tổng hợp gen và gen mã hóa polypeptit chỉ định là epimeraza được xác định chỉ dựa trên trình tự gốc ADN, thay vì các kết quả thể hiện đặc điểm từ chức năng của chúng. Gen mã hóa epimeraza thu được sau đó được chèn vào vector biểu hiện thích hợp để tạo ra vector tái tổ hợp chứa gen mã hóa epimeraza và vector tái tổ hợp được biến nạp vào vi sinh vật thích hợp. Vi sinh vật bị biến nạp được nuôi cấy trong môi trường lên men và sản phẩm polypeptit của gen mã hóa epimeraza được biểu hiện quá mức trong vi sinh vật. Sau đó, sản phẩm polypeptit của gen mã hóa epimeraza được phân lập và tinh chế để sử dụng sau. Sau khi thử nghiệm, phát hiện được peptit có hoạt tính aluloza-3-epimeraza và tagatoza-3-epimeraza và có thể chuyển đổi fructoza thành D-aluloza và sorboza thành D-tagatoza.

Polypeptit mới có hoạt tính 3-epimeraza được tạo ra bằng phương pháp theo sáng chế có thể có trình tự axit amin mà không chỉ giới hạn ở trình tự axit amin như thể hiện trong SEQ ID No: 2 và bao gồm trình tự axit amin được hình thành bằng cách thay thế, chèn hoặc xóa một hoặc nhiều gốc axit amin trong trình tự axit amin của SEQ ID No: 2, miễn là protein hoặc polypeptit với những biến đổi axit amin này có hoạt

tính aluloza-3-epimeraza và tagatoza-3-epimeraza và có thể chuyển đổi fructoza hoặc sorboza thành D-psicoza hoặc D-tagatoza.

Trong phương pháp theo sáng chế, vector biểu hiện mà có thể được sử dụng để tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp có thể là bất kỳ vector biểu hiện nào thường được sử dụng trong các kỹ thuật tái tổ hợp di truyền và có thể là, ví dụ như pET-22b(+). Vi sinh vật có khả năng bị biến nạp bởi vector biểu hiện tái tổ hợp có thể là *E. coli* BL21 (DE3). Tuy nhiên, vi sinh vật này không bị giới hạn miễn là vi sinh vật bất kỳ mà có thể biểu hiện quá mức gen mong muốn sau khi bị biến nạp bằng vector biểu hiện tái tổ hợp có chứa gen và có thể tạo ra protein hoặc polypeptit hoạt tính do biểu hiện quá mức.

Cụ thể hơn, quá trình nuôi cấy vi sinh vật bị biến nạp và gây ra sự biểu hiện quá mức của protein hoặc polypeptit theo sáng chế này có thể được thực hiện theo sơ đồ thử nghiệm mẫu theo sáng chế như được mô tả dưới đây. *E. coli* tái tổ hợp bảo quản cryo được cấy vào bình 250 ml chứa 50 ml môi trường LB và chủng được nuôi cấy trong máy lắc duy trì ở 37°C cho đến khi độ hấp thụ ở 600 nm đạt 2,0. Vi khuẩn nuôi cấy được thêm vào hệ thống lên men 7 L chứa 5 L môi trường lên men chứa 15 g/L pepton, 25 g/L chiết xuất men, 10 g/L natri clorua, 2 g/L glucoza, 3 g/L lactoza và hỗn hợp được nuôi cấy trong thùng lên men để tạo ra sự biểu hiện quá mức protein theo sáng chế. Trong quá trình lên men, tốc độ khuấy là 500 vòng/phút, tốc độ sục khí là 1,0 vvm và nhiệt độ nuôi cấy là 37°C và điều kiện nuôi cấy ở trên thuận lợi cho việc sản xuất 3-epimeraza quy mô lớn.

Với mục đích tinh chế protein được tạo ra bởi sự biểu hiện quá mức, việc nuôi cấy *E. coli* tái tổ hợp được ly tâm ở 6.000 xg và 4°C trong 30 phút và sau đó rửa sạch hai lần với NaCl 0,85%. Sau đó, các tế bào được tái huyền phù trong dung dịch đệm natri phosphat 50 mM có độ pH 8,0 (chứa 300 mM NaCl) và dung dịch đệm chứa các tế bào được đặt trong bồn đá trong 30 phút. Các tế bào trong dung dịch đệm bị phá vỡ bởi máy đồng hóa cao áp và các tế bào bị phá vỡ được ly tâm ở 13.000 xg và 4°C trong 20 phút và được loại bỏ. Phần nổi phía trên được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 0,45 µm và được tinh chế bằng phép sắc ký protein nhanh trong điều kiện nhiệt độ thấp. Phần lọc chứa protein theo sáng chế được thêm vào cột HisTrap HP được cân bằng với dung dịch đệm natri phosphat 50 mM (pH 8,0) chứa 300 mM NaCl và 10 mM imidazol. Sau đó, cột HP HisTrap được rửa bằng dung dịch đệm natri phosphat

tương tự và protein gắn vào cột được tách rửa trên gradient cô chứa imidazol từ 10 mM đến 200 mM trong dung dịch đệm natri phosphat tương tự với tốc độ dòng chảy 1 mL/phút. Chất tách rửa có chứa protein theo sáng chế được thêm vào cột nhựa HiPrep 16/60 cân bằng với dung dịch đệm natri phosphat 50 mM có độ pH 7,5 để loại bỏ imidazol và sau đó protein được tách rửa ở tốc độ dòng chảy 6 mL/phút. Do đó, dung dịch protein thu được, được thêm vào cột HR Sephacryl S-100 cân bằng với dung dịch đệm natri phosphat 50 mM có độ pH 7,5 chứa 0,15 M NaCl và protein được tách rửa ở tốc độ dòng chảy 6 mL/phút. Cuối cùng, protein tách rửa được thẩm tách trong dung dịch đệm natri phosphat 50 mM.

Protein theo sáng chế thu được như mô tả ở trên là 3-epimeraza và trọng lượng phân tử của 3-epimeraza dưới dạng monome là 31.770 Da. 3-epimeraza là enzym chứa kim loại và các ion kim loại được tăng cường hoạt tính một cách rõ ràng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, nhờ phản ứng xúc tác bằng 3-epimeraza với sự có mặt của ion kim loại, có thể đạt được mục đích tăng năng suất D-aluloza sản xuất từ fructoza và tăng năng suất D-tagatoza sản xuất từ sorboza. Ion kim loại được chọn từ nhóm bao gồm mangan, magiê và coban có nồng độ từ 0,5 đến 5 mM, ví dụ, 1 mM. Khi nồng độ ion kim loại nhỏ hơn 0,5 mM, hiệu quả của việc tăng tỷ lệ chuyển đổi là không đáng kể và khi nồng độ ion kim loại cao hơn 5 mM, không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ chuyển đổi.

Phản ứng giữa 3-epimeraza và fructoza hoặc sorboza có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chất nền (pH 6-8) có nồng độ 10-75% (trọng lượng/trọng lượng) ở nhiệt độ 50-90°C (tức là dung dịch fructoza hoặc sorboza). Khi nồng độ của chất nền, fructoza hoặc sorboza, nằm trong khoảng 10-75% (trọng lượng/trọng lượng), năng suất của D-aluloza hoặc D-tagatoza là tốt và tỷ lệ chuyển đổi cao; đồng thời các điều kiện pH và nhiệt độ trong các khoảng trên là khoảng pH và nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính của 3-epimeraza.

3-epimeraza có độ ổn định nhiệt tuyệt vời. Sau khi ủ ở 60°C trong 12 giờ, không phát hiện hoạt tính nào bị suy giảm. Sau khi ủ ở 80°C trong 12 giờ, vẫn còn trên 80% hoạt tính, và sau khi ủ ở 90°C trong 8 giờ, vẫn còn trên 50% hoạt tính. Sự ổn định nhiệt tuyệt vời của 3-epimeraza là đặc tính tốt để sản xuất D-aluloza và D-tagatoza trong điều kiện nhiệt độ cao.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, phản ứng chuyển đổi fructoza để tạo ra D-aluloza và chuyển đổi sorboza để tạo ra D-tagatoza bởi 3-epimeraza có thể được thực hiện bằng cách cố định 3-epimeraza trên chất mang trong suốt phản ứng, bởi vì các 3-epimeraza cố định trên chất mang có thể giữ lại hoạt tính enzym trong một thời gian dài và thuận tiện cho việc sử dụng lại. Chất mang được sử dụng theo phương án của sáng chế có thể là bất kỳ chất mang đã biết để sử dụng trong quá trình cố định enzym và có thể là, ví dụ như natri alginat. Natri alginat là polysacarit keo tự nhiên có nhiều trong các vách tế bào tảo và chứa dư lượng axit β -D-manuronic và axit α -L-guluronic, trong đó dư lượng axit β -D-manuronic và axit α -L-guluronic ngẫu nhiên được liên kết bởi liên kết β -1,4. Do đó, natri alginat cho phép cố định ổn định 3-epimeraza và thuận lợi cho việc thu nhận D-aluloza hoặc D-tagatoza với năng suất cao. Để tối đa hóa năng suất của D-aluloza hoặc D-tagatoza, natri alginat có thể được sử dụng để cố định 3-epimeraza ở nồng độ 1,5-4% (trọng lượng/thể tích), ví dụ ở nồng độ 2,5% (trọng lượng/thể tích). Khi natri alginat được sử dụng làm chất mang để cố định 3-epimeraza, dung dịch 3-epimeraza được thêm vào dung dịch natri alginat nước bằng một hoặc hai lần thể tích dung dịch 3-epimeraza. Hỗn hợp này sau đó được thêm nhỏ giọt vào dung dịch ion canxi 0,2 M bằng cách sử dụng bơm tiêm và bơm chân không để tạo thành các quả cầu phức hợp 3-epimeraza-natri alginat. Những quả cầu phức hợp 3-epimeraza-natri alginat này có thể được sử dụng trực tiếp trong quá trình chuyển đổi fructoza để tạo ra D-aluloza và sorboza để tạo ra D-tagatoza.

3-epimeraza theo sáng chế có hoạt tính tốt đối với fructoza và sorboza và cũng có độ ổn định nhiệt tuyệt vời, cả hai đều có đặc tính tuyệt vời để sản xuất D-aluloza và D-tagatoza trong điều kiện nhiệt độ cao. Phương pháp sản xuất D-aluloza và D-tagatoza theo phương án của sáng chế là thân thiện với môi trường vì enzym được sử dụng có nguồn gốc vi sinh vật. Chỉ cần quá trình cố định enzym đơn giản trong phương pháp này, năng suất và hiệu quả sản xuất của D-aluloza và D-tagatoza được cải thiện đáng kể, do đó làm giảm chi phí sản xuất và tối đa hiệu quả sản xuất.

Do đó, D-aluloza và D-tagatoza được sản xuất có thể được sử dụng hiệu quả làm chất phụ gia cho thực phẩm hoặc thuốc.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết hơn với sự viện dẫn đến các ví dụ cụ thể. Các ví

dự này chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Trong các ví dụ thí nghiệm hiện tại, hoạt tính enzym được đo bằng cách sử dụng fructoza và sorboza làm chất nền. Để đo hoạt tính của enzym, 3-epimeraza được trộn với dung dịch đệm natri phosphat 50 mM (pH 7,5) chứa 10% fructoza hoặc sorboza, phản ứng ở 60°C trong 20 phút, và sau đó gia nhiệt ở 100°C trong 15 phút để kết thúc phản ứng. Dung dịch đệm natri phosphat chứa fructoza hoặc sorboza được điều chế bằng cách hòa tan fructoza hoặc sorboza trong dung dịch đệm natri phosphat có pH 7-8 để tạo nồng độ 60-70% (trọng lượng/thể tích) Dung dịch đệm natri phosphat có chứa fructoza hoặc sorboza được tiếp tục bổ sung vào thiết bị phản ứng sinh học được duy trì ở 60°C. Với mục đích tạo thuận lợi cho việc so sánh hoạt tính của enzym, một đơn vị aluloza-3-epimeraza được định nghĩa là lượng aluloza-3-epimeraza cần thiết để tạo ra 1 mol D-aluloza mỗi phút ở pH 7,5 và 60°C; và một đơn vị tagatoza-3-epimeraza được định nghĩa là lượng tagatoza-3-epimeraza cần thiết để tạo ra 1 mol D-tagatoza mỗi phút tại pH 7,5 và 60°C. Nồng độ fructoza, D-aluloza, sorboza và D-tagatoza được xác định bằng phép sắc ký lỏng hiệu năng cao với cột hydrocarbon ion canxi BP-100 và đầu dò RI. Nhiệt độ cột là 80°C và pha động là nước siêu tinh khiết với tốc độ dòng chảy là 0,5 mL/phút.

Ví dụ 1: Sản xuất 3-epimeraza

Gen mã hóa 3-epimeraza thu được bằng cách tổng hợp gen mã hóa polypeptit được chỉ định là epimeraza có nguồn gốc từ *Thermogemmatispora carboxidivorans* và gen mã hóa epimeraza được xác định chỉ dựa trên trình tự, thay vì các kết quả đặc trưng về chức năng của chúng. Gen mã hóa epimeraza thu được được chèn vào vector biểu hiện pET-22b(+) bằng cách sử dụng các enzym giới hạn NdeI và XhoI, để tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp pET-22b (+)/epimeraza (xem Fig. 1). Vector biểu hiện tái tổ hợp này được biến nạp vào E. coli BL21 (DE3) bằng phương pháp biến nạp thông thường. E.coli tái tổ hợp bị biến nạp BL21 (DE3) được lưu trữ trong tủ đông ở nhiệt độ cực thấp -80°C.

Sau đó, E. coli tái tổ hợp được cấy vào bình Erlenmeyer 250 mL chứa 50 mL dung môi LB lỏng, nuôi cấy và kích hoạt trong máy lắc ở 37°C cho đến khi độ hấp thụ của thể nuôi cấy ở bước sóng 600 nm đạt 2,0. Thể nuôi cấy này được đưa vào hệ thống lên men 7 L chứa 5 L môi trường lên men và trải qua quá trình nuôi cấy lên men để sản

xuất hàng loạt 3-epimeraza. Trong suốt quá trình lên men, tốc độ khuấy được duy trì ở 500 vòng/phút, tốc độ sục khí là 1,0 vvm và nhiệt độ nuôi cấy là 37°C.

Ví dụ 2: Tinh chế 3-epimeraza

Để mô tả đặc tính của 3-epimeraza, 3-epimeraza được tinh chế bằng phép sắc ký ái lực (cột HP HisTrap), cột HiPrep 16/60 và cột HR Sephacryl S-100.

Đo trọng lượng phân tử của 3-epimeraza đã tinh chế và tìm thấy 3-epimeraza monome có trọng lượng phân tử là 31.770 Da. Trình tự axit amin của 3-epimeraza được xác nhận là giống với trình tự axit amin được lưu trữ theo Số truy cập NCBI.WP_052889376.

Ví dụ 3: Sự phụ thuộc kim loại của 3-epimeraza

Trong ví dụ 3, để nghiên cứu ảnh hưởng của các ion kim loại lên 3-epimeraza, ảnh hưởng đến hoạt tính của 3-epimeraza đã được đo với fructoza có vai trò là chất nền khi có mặt các ion kim loại khác nhau. Phép đo được thực hiện bằng cách xử lý 3-epimeraza với EDTA, và sau đó thêm 1 mM ion kim loại khác nhau được thể hiện trong bảng 1 bên dưới vào dung dịch 3-epimeraza. Phản ứng xúc tác bởi 3-epimeraza được thực hiện trong dung dịch đệm Tris 50 mM với pH 7,5 ở 60°C trong 20 phút, trong đó dung dịch đệm Tris chứa 0,04 U/mL 3-epimeraza và 10% (trọng lượng/thể tích) fructoza. Dung dịch phản ứng được gia nhiệt thêm ở 100°C trong 15 phút để kết thúc phản ứng, và sau đó đo hoạt tính của 3-epimeraza.

Kết quả thể hiện 3-epimeraza phụ thuộc vào kim loại. Như thể hiện trong bảng 1 dưới đây, các ion magie, mangan và coban tăng cường hoạt tính của enzym, trong khi các ion đồng và kẽm ức chế hoạt tính của enzym.

Bảng 1

Ion kim loại	Hoạt tính tương đối (%)
Không	100
Co^{2+}	170
Ca^{2+}	65
Mn^{2+}	168
Mg^{2+}	130
Zn^{2+}	0
Cu^{2+}	0
Na^+	120
K^+	113

Ví dụ 4: Tính đặc hiệu của 3-epimeraza đối với chất nền

Phản ứng được xúc tác bởi 3-epimeraza được thực hiện trong dung dịch đệm natri phosphat 50 mM với độ pH là 7,5 ở 60°C trong 20 phút, trong đó dung dịch đệm natri phosphat chứa 0,04 U/ml 3-epimeraza và 10 mM monosacarit riêng biệt được thể hiện trong bảng 2 dưới đây. Mỗi dung dịch phản ứng được gia nhiệt ở 100°C trong 15 phút để kết thúc phản ứng và sau đó đo hoạt tính enzym của 3-epimeraza trong mỗi dung dịch phản ứng.

Kết quả thể hiện 3-epimeraza có tác dụng đối với D-fructoza, D-aluloza, D-sorboza và D-tagatoza. 3-epimeraza có thể được sử dụng để sản xuất D-aluloza cũng như D-tagatoza.

Bảng 2

	Hoạt tính tương đối (%)
Fructoza	63,9
D-aluloza	100
Sorboza	21
D-tagatoza	40,7

Ví dụ 5: Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt tính của 3-epimeraza

Trong ví dụ 5, để nghiên cứu ảnh hưởng của pH và nhiệt độ khác nhau lên hoạt tính của 3-epimeraza, ảnh hưởng lên hoạt tính của 3-epimeraza được đo bằng fructoza làm chất nền ở các điều kiện nhiệt độ và pH khác nhau và các hoạt tính của enzym tại nhiệt độ và pH khác nhau được so sánh. Để nghiên cứu ảnh hưởng của pH, phản ứng xúc tác bởi 3-epimeraza được thực hiện trong dung dịch đệm natri phosphat 50 mM có độ pH từ 6,0-8,5, trong đó dung dịch đệm natri phosphat chứa 0,04 U/mL 3-epimeraza và 10% (trọng lượng/thể tích) fructoza. Tại đây, các phản ứng tương ứng được thực hiện ở 60°C trong 20 phút khi không có các ion kim loại, và sau đó phản ứng được kết thúc bằng cách gia nhiệt ở 100°C trong 15 phút và đo hoạt tính của enzym. Kết quả được thể hiện trong Hình 2-1.

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ, phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm natri phosphat 50 mM (pH 7,5) ở nhiệt độ từ 40 đến 90°C trong 20 phút, trong đó dung dịch đệm natri phosphat chứa 0,04 U/mL 3-epimeraza và 10% (trọng lượng/thể tích) fructoza. Phản ứng được kết thúc bằng cách gia nhiệt ở 100°C trong 15 phút và đo hoạt tính của enzym. Kết quả được thể hiện trong hình 2-2.

Kết quả thể hiện rằng pH và nhiệt độ tối ưu cho 3-epimeraza tương ứng là 7,5 và 90°C.

Hình 2-1 là đường cong thể hiện ảnh hưởng của pH lên hoạt tính của 3-epimeraza với các điều kiện trong ví dụ của sáng chế.

Hình 2-2 là đường cong thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính 3-epimeraza theo các điều kiện trong ví dụ của sáng chế.

Ví dụ 6: Tính ổn định nhiệt của 3-epimeraza

Trong ví dụ 6, để nghiên cứu tính ổn định nhiệt của 3-epimeraza, 3-epimeraza được ủ riêng trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau và các mẫu được lấy tại các thời điểm khác nhau để đo hoạt tính còn lại sử dụng fructoza làm chất nền. Phép đo được thực hiện bằng cách lấy mẫu mỗi 1 giờ sau khi 3-epimeraza được duy trì trong bể điều nhiệt ở 50°C, 60°C, 70°C, 80°C và 90°C. Phản ứng xúc tác bởi 3-epimeraza được thực hiện trong dung dịch đệm natri phosphat 50 mM với pH 7,5 ở 60°C trong 20 phút, trong đó dung dịch đệm natri phosphat chứa 0,04 U/mL 3-epimeraza và 10% (trọng lượng/thể tích) fructoza. Dung dịch phản ứng được gia nhiệt thêm ở 100°C trong 15

phút để kết thúc phản ứng, và sau đó đo hoạt tính của 3-epimeraza. Kết quả được thể hiện trong hình 3.

Kết quả cho thấy rằng 3-epimeraza có độ ổn định nhiệt tuyệt vời. Sau khi ủ ở 60°C trong 12 giờ, không phát hiện hoạt tính nào bị suy giảm. Sau khi ủ ở 80°C trong 12 giờ, vẫn còn trên 80% hoạt tính, và sau khi ủ ở 90°C trong 8 giờ, vẫn còn trên 50% hoạt tính.

Ví dụ 7: Tỷ lệ chuyển đổi fructoza thành D-aluloza bằng 3-epimeraza

Trong ví dụ 7, phản ứng xúc tác bởi 3-epimeraza được thực hiện trong dung dịch đệm natri phosphat 50 mM (pH 7,5) ở nhiệt độ từ 40 đến 90°C trong 12 giờ để cho phép phản ứng diễn ra đầy đủ, trong đó dung dịch đệm natri phosphat chứa 0,04 U/mL 3-epimeraza, 1 mM ion coban và 10% (trọng lượng/thể tích) fructoza. Phản ứng sau đó được kết thúc bằng cách gia nhiệt ở 100°C trong 15 phút và đo hàm lượng của fructoza và D-aluloza trong mẫu. Kết quả được thể hiện trong hình 4.

Kết quả thể hiện rằng sau 12 giờ, tỷ lệ chuyển đổi fructoza thành D-aluloza bởi 3-epimeraza cao nhất ở 90°C và là 39%, và thấp nhất ở 50°C và là 22%; và chuyển đổi ở 60°C là 37%.

Ví dụ 8: Sản xuất D-aluloza bằng cách sử dụng 3-epimeraza

Để sản xuất D-aluloza có nồng độ cao, phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm natri phosphat 50 mM (pH 7,5) ở 60°C, trong đó dung dịch đệm natri phosphat chứa 10 U/mL 3-epimeraza, 1 mM ion coban và 700g/L fructoza. Sau đó, các mẫu được lấy tại các thời điểm phản ứng khác nhau và phản ứng sau đó được kết thúc bằng cách gia nhiệt ở 100°C trong 15 phút và đo nồng độ D-aluloza trong mẫu. Năng suất của D-aluloza tại các thời điểm phản ứng khác nhau được thể hiện trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

	D-aluloza (g/L)
1	98
2	154
3	182
4	210
6	259
8	257

Kết quả cho thấy sau 6 giờ phản ứng, 259 g/L D-aluloza được sản xuất với tỷ lệ chuyển đổi khoảng 37%.

Ví dụ 9: Sản xuất D-aluloza bằng cách cố định enzym

Để nghiên cứu hiệu quả của phương pháp sản xuất D-aluloza, 3-epimeraza được cố định. Khả năng sản xuất của 3-epimeraza cố định được đo và so sánh với 3-epimeraza không cố định (tự do).

Đối với 3-epimeraza cố định trên một chất mang, sử dụng một quả cầu phức hợp 3-epimeraza-natri alginat, được điều chế như sau. Dung dịch 3-epimeraza được thêm vào dung dịch natri alginat 2,5% (trọng lượng/thể tích) trong đó thể tích dung dịch natri alginat gấp 1,5 lần thể tích dung dịch 3-epimeraza và sau đó hỗn hợp được thêm vào 0,2 M dung dịch ion canxi bằng cách sử dụng bơm tiêm và bơm chân không.

Phản ứng này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 7, ngoại trừ việc sử dụng 3-epimeraza cố định. Lượng 3-epimeraza được sử dụng trong phản ứng này là 10 U/mL, và đo năng suất của D-aluloza. Kết quả được thể hiện trong bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Thời gian phản ứng (giờ)	D-aluloza (g/L)
1	89
2	141
3	165
4	190
6	231
8	258
10	260

Kết quả cho thấy sau 8 giờ phản ứng với sự có mặt của 3-epimeraza cố định, năng suất tối đa đạt được là 258 g/L, tỷ lệ chuyển đổi là khoảng 37% và tốc độ phản ứng hơi chậm hơn so với 3-epimeraza tự do. Tuy nhiên, 3-epimeraza cố định có lợi hơn cho sản xuất liên tục, để đạt hiệu suất cao trong sản xuất D-aluloza.

Ví dụ 10: Năng suất sản xuất D-aluloza trong thiết bị phản ứng sinh học

Phản ứng sau đây được thực hiện trong thiết bị phản ứng sinh học để kiểm tra khả năng sản xuất của 3-epimeraza cố định thu được trong ví dụ 9.

Đầu tiên, 3-epimeraza cố định và fructoza được điều chế như mô tả trong ví dụ 9. Fructoza được thêm vào 3-epimeraza cố định, và hỗn hợp đã được điều chỉnh với thể tích 100 mL. Sau đó, thiết bị phản ứng sinh học có chiều cao 100 cm và đường kính 2,6 cm được đổ đầy hỗn hợp gồm 3-epimeraza cố định và fructoza và phản ứng được thực hiện ở tốc độ dòng chảy 10 mL/h và 60°C.

Lượng 3-epimeraza được sử dụng là 500 U và nồng độ fructoza sử dụng bị giới hạn ở 600 g/L, do sự kết tủa của fructoza thừa trong quá trình hoạt động kéo dài.

Kết quả được thể hiện trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Thời gian (ngày)	1	2	3	5	10	15	20	25	30
Sản lượng của D-aluloza (g/L)	18 9	22 2	21 9	22 1	22 0	22 2	21 9	22 1	22 0

Kết quả thể hiện rằng phản ứng giữa 3-epimeraza và fructoza ổn định trong suốt thời gian thử nghiệm 30 ngày. Việc chuyển đổi fructoza thành D-aluloza là 37% và nồng độ D-aluloza là 220 g/L. Năng suất có thể đáp ứng nhu cầu sản xuất đường quy mô lớn.

Do đó, sáng chế đề cập đến hệ thống sản xuất D-aluloza sử dụng thiết bị phản ứng sinh học có khả năng sản xuất hàng loạt trên quy mô công nghiệp.

Ví dụ 11: Tỷ lệ chuyển đổi sorboza thành D-tagatoza bằng 3-epimeraza

Trong ví dụ 11, phản ứng được xúc tác bởi 3-epimeraza được thực hiện trong dung dịch đệm natri phosphat 50 mM (pH 7,5) ở nhiệt độ từ 40 đến 90°C trong 12 giờ để cho phép phản ứng diễn ra đầy đủ, trong đó dung dịch đệm natri phosphat chứa 0,04 U/mL 3-epimeraza, 1 mM ion coban và 10% sorboza. Phản ứng sau đó được kết thúc

bằng cách gia nhiệt ở 100°C trong 15 phút và đo hàm lượng của sorboza và D-tagatoza trong mẫu. Kết quả được thể hiện trong Fig. 5.

Kết quả thể hiện rằng sau 12 giờ, tỷ lệ chuyển đổi của sorboza thành D-tagatoza bởi 3-epimeraza cao nhất ở 90°C và đạt 36% và thấp nhất ở 50°C và đạt 29%; và chuyển đổi ở 60°C đạt 34%.

Ví dụ 12: Sản xuất D-tagatoza bằng cách sử dụng 3-epimeraza

Để sản xuất D-tagatoza có nồng độ cao, phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm natri phosphat 50 mM (pH 7,5) ở 60°C, trong đó dung dịch đệm natri phosphat chứa 20 U/mL 3 epimeraza, 1 mM ion coban và 500 g/L sorboza. Sau đó, các mẫu được lấy tại các thời điểm phản ứng khác nhau và phản ứng sau đó được kết thúc bằng cách gia nhiệt ở 100°C trong 15 phút và đo nồng độ D-tagatoza trong mẫu. Năng suất của D-tagatoza tại các thời điểm phản ứng khác nhau được thể hiện trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

Thời gian phản ứng (giờ)	D-tagatoza (g/L)
1	65
2	101
3	120
4	139
6	171
8	170

Kết quả thể hiện rằng sau 8 giờ phản ứng, 171 g/L D-tagatoza được sản xuất với tỷ lệ chuyển đổi khoảng 34%

Ví dụ 13: Sản xuất D-tagatoza bằng cách cố định enzym

Để nghiên cứu hiệu suất của phương pháp sản xuất D-tagatoza, 3-epimeraza được cố định. Khả năng sản xuất của 3-epimeraza cố định được đo và so sánh với 3-epimeraza không cố định (tự do).

Đối với 3-epimeraza cố định trên chất mang, sử dụng quả cầu phức hợp 3-epimeraza-natri alginat, được điều chế như sau. Dung dịch 3-epimeraza được thêm vào dung dịch natri alginat 2,5% (trọng lượng/thể tích) trong đó thể tích dung dịch

natri alginat gấp 1,5 lần thể tích dung dịch 3-epimeraza và sau đó hỗn hợp được thêm vào 0,2 M dung dịch ion canxi bằng cách sử dụng bơm tiêm và bơm chân không.

Phản ứng này được thực hiện như mô tả trong ví dụ 12, ngoại trừ sử dụng 3-epimeraza cố định. Lượng 3-epimeraza sử dụng trong phản ứng này là 20 U/mL và đo sản lượng của D-tagatoza. Kết quả được thể hiện trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

Thời gian phản ứng (giờ)	D-tagatoza (g/L)
1	59
2	95
3	108
4	125
6	153
8	170
10	171

Kết quả thể hiện rằng sau 10 giờ phản ứng với sự có mặt của 3 epimeraza cố định, đạt được năng suất tối đa là 170 g/L, tỷ lệ chuyển đổi là khoảng 34% và tốc độ phản ứng hơi chậm hơn so với 3-epimeraza tự do. Tuy nhiên, 3-epimeraza cố định có lợi hơn cho sản xuất liên tục, để đạt được sản xuất D-tagatoza hiệu quả cao.

Ví dụ 14: Năng suất sản xuất D-tagatoza trong thiết bị phản ứng sinh học

Phản ứng sau được thực hiện trong thiết bị phản ứng sinh học để kiểm tra khả năng sản xuất của 3-epimeraza cố định thu được trong ví dụ 13.

Đầu tiên, 3-epimeraza cố định được điều chế như mô tả trong ví dụ 13. Sorboza được thêm vào 3-epimeraza cố định và hỗn hợp được điều chỉnh với thể tích 100 mL. Sau đó, một thiết bị phản ứng sinh học có chiều cao 100 cm và đường kính 2,6 cm được đổ đầy hỗn hợp của 3-epimeraza cố định và sorboza đồng thời phản ứng được thực hiện ở tốc độ dòng chảy 10 mL/h và 60°C. Lượng 3-epimeraza được sử dụng là 400 U và nồng độ sorboza được sử dụng là 400 g/L. Kết quả được thể hiện trong bảng 8 dưới đây.

Bảng 8

Thời gian (ngày)	1	2	3	5	10	15	20	25	30
Sản lượng của D-tagatoza (g/L)	115	135	136	136	137	135	137	135	136

Kết quả thể hiện rằng phản ứng giữa 3-epimeraza và sorboza ổn định trong suốt thời gian thử nghiệm 30 ngày. Sự chuyển đổi sorboza thành D-tagatoza là 34% và nồng độ D-tagatoza là 170 g/L. Năng suất có thể đáp ứng nhu cầu sản xuất đường quy mô lớn.

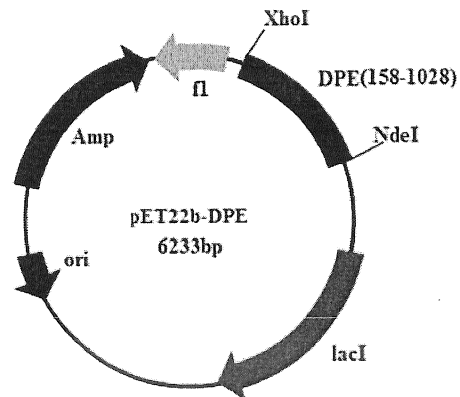
Do đó, sáng chế này có thể đề xuất hệ thống sản xuất D-tagatoza sử dụng thiết bị phản ứng sinh học có khả năng sản xuất hàng loạt trên quy mô công nghiệp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

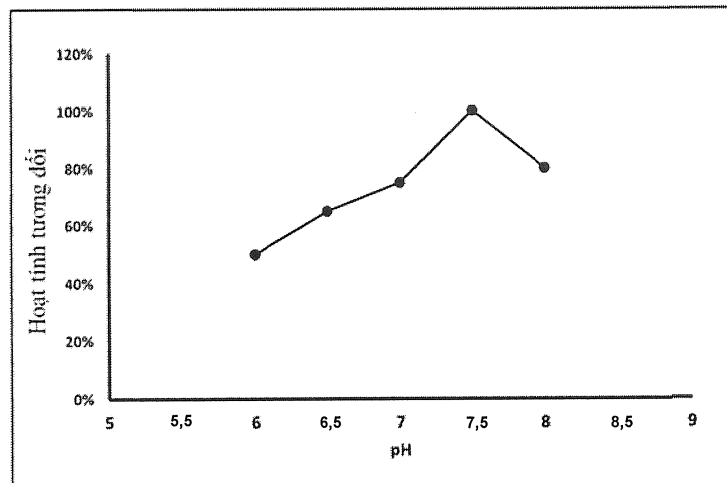
1. Phương pháp sản xuất D-aluloza, bao gồm bước cho tiếp xúc fructoza, với dung dịch nước của polypeptit hoặc protein, polypeptit hoặc protein này có trình tự axit amin giống SEQ ID No : 2.
2. Phương pháp sản xuất D-aluloza theo điểm 1, trong đó khi polypeptit hoặc protein tiếp xúc với 10% (trọng lượng/thể tích) fructoza ở nhiệt độ 60°C trong 20 phút ở độ pH là 7,5, fructoza được chuyển hóa thành D-aluloza.
3. Phương pháp sản xuất D-aluloza theo điểm 1, trong đó polypeptit hoặc protein được làm tăng hoạt tính enzym khi có mặt các ion magie, mangan, và coban trong khi đó các ion đồng và kẽm ức chế hoạt tính enzym.
4. Phương pháp sản xuất D-aluloza theo điểm 1, trong đó khi polypeptit hoặc protein được tạo ra trong dung dịch đệm phosphat ở 0,04 U/ml với 10% (trọng lượng/thể tích) fructoza, độ pH tối ưu là ở 7,5 và nhiệt độ tối ưu là ở 90°C.
5. Phương pháp sản xuất D-aluloza theo điểm 1, trong đó:
 - phản ứng diễn ra trong dung dịch đệm natri phosphat 50mM (pH 7,5) ở 60°C;
 - dung dịch đệm natri phosphat chứa 10 U/ml polypeptit hoặc protein, 1mM ion coban và 700g/L fructoza;
 - sau 6 giờ phản ứng, phản ứng kết thúc nhờ gia nhiệt ở 100°C trong 15 phút và D-aluloza được tạo ra với tỷ lệ chuyển đổi khoảng 37%.
6. Phương pháp sản xuất D-aluloza theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm cố định polypeptit hoặc protein trên chất mang, trong đó quả cầu phức hợp natri alginat được sử dụng làm chất mang.
7. Phương pháp sản xuất D-aluloza theo điểm 6, trong đó phương pháp này còn bao gồm:
 - tiến hành phản ứng giữa fructoza và polypeptit hoặc protein trong thiết bị phản ứng sinh học, phương pháp này bao gồm làm cố định polypeptit hoặc protein;
 - bổ sung fructoza vào polypeptit hoặc protein cố định và thu được hỗn hợp, và điều chỉnh thể tích hỗn hợp ở 100ml;
 - chuyển hỗn hợp thu được vào thiết bị phản ứng sinh học có chiều cao 100cm và

đường kính 2,6cm; và tiến hành phản ứng ở tốc độ dòng chảy là 10ml/giờ và ở 60°C.

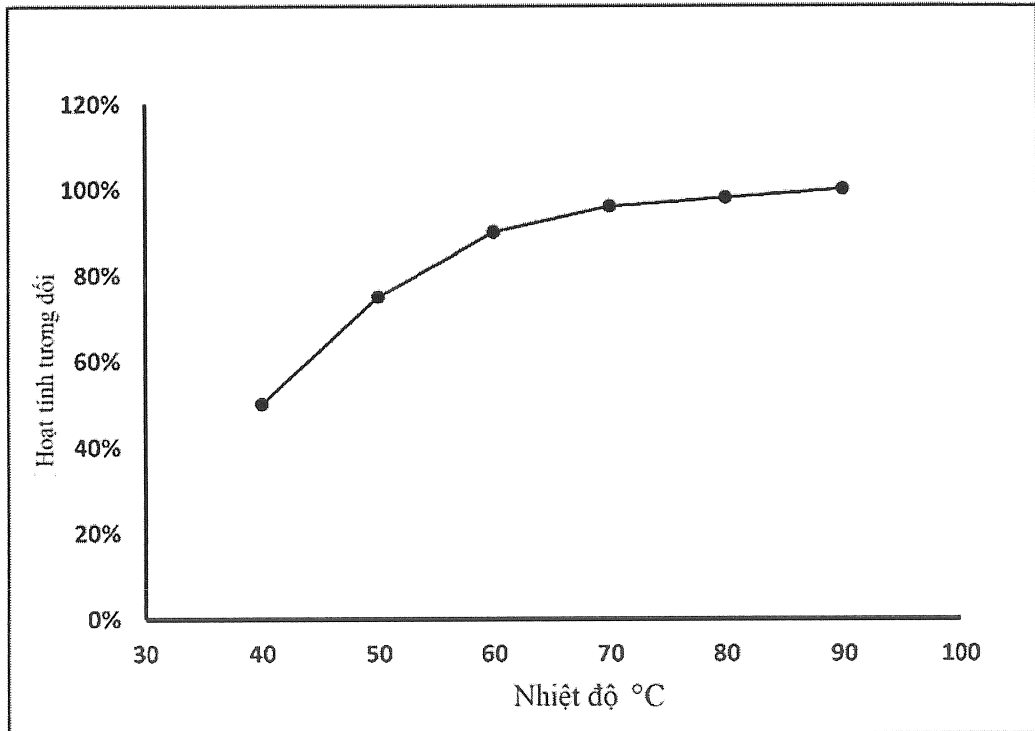
8. Phương pháp sản xuất D-aluloza theo điểm 6, trong đó nồng độ của fructoza được sử dụng bị giới hạn ở 600g/ l, và phản ứng giữa polypeptit hoặc protein và fructoza ổn định trong suốt khoảng thời gian 30 ngày.



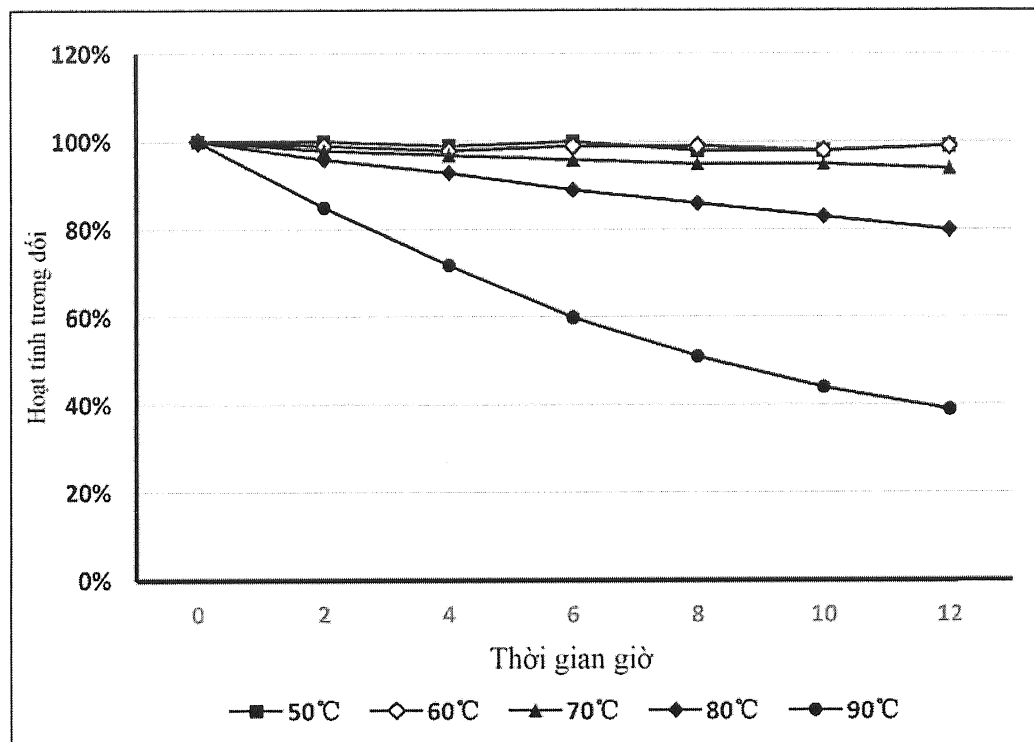
HÌNH 1



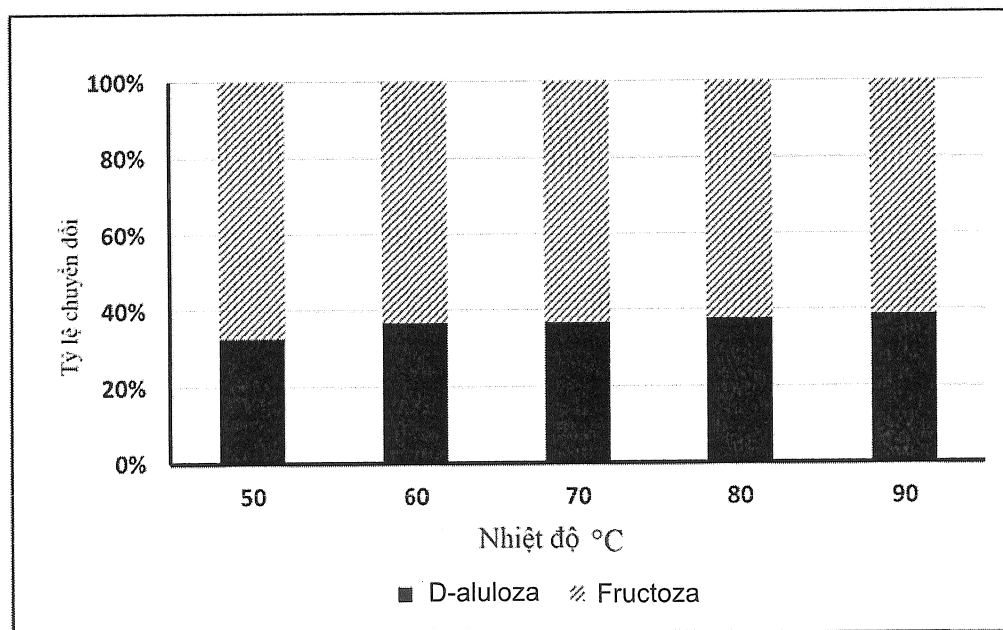
HÌNH 2-1



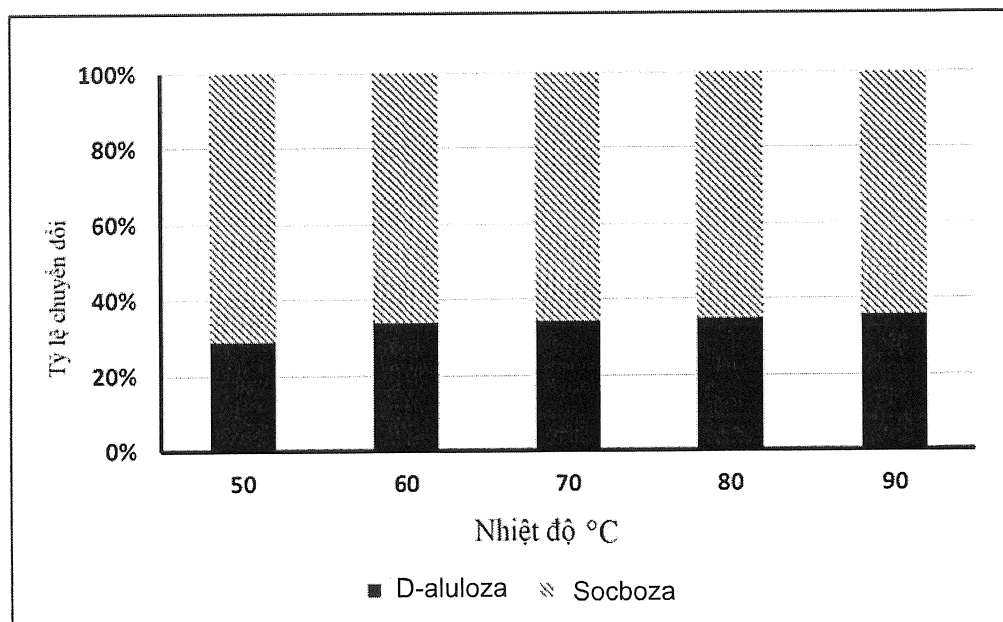
HÌNH 2-2



HÌNH 3



HÌNH 4



HÌNH 5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>Langnai Biotech Co.,Ltd

<120>Phương pháp sản xuất D-aluloza

<130> 2016

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 873

<212> DNA

<213> Thermogemmatispora carboxidivorans

<400> 1

```

atgaagcaga aaatcggat tcacgcgttc gtgtgggttg gtggctggag cgaggaagag
60
tgccgtcaag cgctggagag cagccgtgcg agcggttacg acctgatcga gattccgctg
120
ctggaaccgg cggcgatcga tgtggcgctg acccgtagcc tgctggagaa gaccggtctg
180
gaagcgacct gcaccctggc gctgaccccg gaaaccgaca tcagcagcac cgatgaggcg
240
attggtgctg gtggtgaacg tctgctgcac gacgcgctgg cggtgggcgc tgatctgggt
300
gcgagctacc tgggtggcgt tattttcggc gcgctgacct gttatcgtga gccgctggcg
360
ccggcgggtc gtctgaacag catgcgtgtg ctggcgcgtc tggcggaaca ggcggcggtt
420
aacggtatgc aactgggcct ggaagtgggt aaccgttacg aaagcaactt tctgaacacc
480
gcggagcagg cgctgaacct gatcgaagag attggcgcg cgaacctggg ggttcacctg
540
gacacctatc acatgaacat cgaagaggaa aacttcgtga agccggtggg tgctgctggg
600
aaacgtctgg gctacgtgca cggttggtgaa agccaccgtg gctatctggg taccggcacc
660
gtggattttc cgggtttctt tcgtgcgctg cgtcaggcgg gttatcaagg cccggttacc
720
ttcgagagct ttagccgtgc gcaagaaatc gcgaacctga gcggtagcct ggcgatttgg
780
cgtcacacct ggaccgaccg tttcgatctg gcgcgtcagg cgcgtgcggt tattgcggcg
840
ggtctggagg cgaccgacac ccaagaagat taa
873

```

<210> 2

<211> 290

<212> PRT

<213> Thermogemmatispora carboxidivorans

<400> 2

```

Met Lys Gln Lys Ile Gly Ile His Ala Phe Val Trp Val Gly Gly Trp
1      5      10      15
Ser Glu Glu Glu Cys Arg Gln Ala Leu Glu Ser Ser Arg Ala Ser Gly
20      25      30
Tyr Asp Leu Ile Glu Ile Pro Leu Leu Glu Pro Ala Ala Ile Asp Val
35      40      45
Ala Leu Thr Arg Ser Leu Leu Glu Lys Thr Gly Leu Glu Ala Thr Cys
50      55      60
Thr Leu Ala Leu Thr Pro Glu Thr Asp Ile Ser Ser Thr Asp Glu Ala
65      70      75      80
Ile Val Ala Arg Gly Glu Arg Leu Leu His Asp Ala Leu Ala Val Ala
85      90      95
Arg Asp Leu Gly Ala Ser Tyr Leu Gly Gly Val Ile Phe Gly Ala Leu
100     105     110
Thr Arg Tyr Arg Glu Pro Leu Ala Pro Ala Gly Arg Leu Asn Ser Met
115     120     125
Arg Val Leu Ala Arg Leu Ala Glu Gln Ala Ala Val Asn Gly Met Gln
130     135     140
Leu Gly Leu Glu Val Val Asn Arg Tyr Glu Ser Asn Phe Leu Asn Thr
145     150     155     160
Ala Glu Gln Ala Leu Asn Leu Ile Glu Glu Ile Gly Ala Pro Asn Leu
165     170     175
Val Val His Leu Asp Thr Tyr His Met Asn Ile Glu Glu Glu Asn Phe
180     185     190
Val Lys Pro Val Val Ala Cys Gly Lys Arg Leu Gly Tyr Val His Val
195     200     205
Gly Glu Ser His Arg Gly Tyr Leu Gly Thr Gly Thr Val Asp Phe Pro
210     215     220
Gly Phe Phe Arg Ala Leu Arg Gln Ala Gly Tyr Gln Gly Pro Val Thr
225     230     235     240
Phe Glu Ser Phe Ser Arg Ala Gln Glu Ile Ala Asn Leu Ser Gly Ser
245     250     255
Leu Ala Ile Trp Arg His Thr Trp Thr Asp Arg Phe Asp Leu Ala Arg
260     265     270
Gln Ala Arg Ala Phe Ile Ala Ala Gly Leu Glu Ala Thr Asp Thr Gln
275     280     285
Glu Asp
290

```