



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003343

(51) **C07K 14/79; C12R 1/84; C12N 1/16**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00458

(22) 24/11/2020

(67) 1-2020-06759

(45) 25/09/2023 426

(43) 25/01/2021 394

(73) Đại học Bách khoa Hà Nội (VN)

Số 1, Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

(72) Trương Quốc Phong (VN); Khuất Hữu Thanh (VN); Nguyễn Tiến Thành (VN);

Phạm Tuấn Anh (VN); Nguyễn Trường Giang (VN); Nguyễn Chính Nghĩa (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM CHỨA LACTOFERRIN TỪ CHỦNG NẤM MEN
PICHIA PASTORIS KM71-3 TÁI TỔ HỢP

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất Lactoferrin từ chủng *Pichia pastoris* tái tổ hợp. Quy trình này bao gồm các bước:

i) Lên men chủng *Pichia pastoris* tái tổ hợp sinh tổng hợp Lactoferrin

ii) Thu hồi sinh khối nấm men *Pichia pastoris* và sấy khô

iii) Tách và tinh sạch protein Lactoferrin

iv) Đông khô và tạo chế phẩm Lactoferrin

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm chứa lactoferrin từ chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lactoferrin (LF) là một protein liên kết với sắt không chứa nhân hem, một thành phần trong họ protein transferrin với chức năng chung là vận chuyển sắt trong máu (Shanbacher et al., 1992). LF được tạo ra bởi các tế bào biểu mô màng nhầy của nhiều loài động vật có vú khác nhau như người, bò, dê, ngựa, chó và nhiều loài gặm nhấm khác. LF được tìm thấy trong các dịch tiết như nước mắt, nước bọt, dịch âm đạo, semen, nước mũi, dịch phổi, dịch mật, dịch dạ dày, dịch ruột, nước tiểu (van der Strate et al., 2001, Oztas et al., 2005) và đặc biệt là có mặt với hàm lượng cao trong sữa và sữa non (7 g/l) (Rodriguez et al., 2005). LF là một thành phần protein chiếm hàm lượng cao thứ 2 trong sữa sau casein (Connely et al., 2001). LF cũng có mặt trong dịch cơ thể như máu và dịch màng ối. Hàm lượng LF cũng có sự thay đổi lớn, với nồng độ cao nhất là 7 g/l sữa non của người, 1 g/l đối với sữa người trong giai đoạn tiết sữa và 0,4 mg/l trong huyết thanh của người bình thường và tăng lên 5000 lần khi có sự nhiễm khuẩn.

LF có khả năng kết hợp với với ái lực cao với sắt và tồn tại bền vững trong một phổ rộng pH, thậm chí cả ở pH rất thấp (Aisen et al., 1972). LF cũng khó bị phân hủy bởi các protease. LF được coi là một protein đa chức năng. LF liên quan đến nhiều chức năng sinh lý khác nhau như điều hòa hấp thụ sắt trong dạ ruột, đáp ứng miễn dịch, chống oxi hóa, chống phòng ngừa ung thư, và chống viêm; LF giúp bảo vệ đối với sự nhiễm khuẩn và đặc tính này được nghiên cứu nhiều nhất cho đến nay. Hoạt tính kháng khuẩn của LF chủ yếu do hai cơ chế: (1) hấp thu sắt tại các vị trí có sự xâm nhiễm làm mất đi nguồn dinh dưỡng này của vi sinh vật do đó sẽ tạo ra sự kiềm hãm phát triển của vi sinh vật ; (2) sự tương tác trực tiếp của LF với các tác nhân gây nhiễm. Các axit amin tích điện dương của LF có thể tương tác với các phân tử ion âm trên bề mặt của vi khuẩn, virus, nấm và ký sinh trùng và từ đó gây ra sự phân hủy tế bào.

Do có nhiều đặc tính bảo vệ tốt đối với cơ thể nên nhu cầu bổ sung dưới dạng thuốc hoặc thực phẩm chức năng ngày càng tăng. Trong thời gian qua, nhiều nhà người cứu đã tập chung nghiên cứu tìm kiếm phương án thích hợp để sản xuất protein này. Ngày nay, LF có thể được sản xuất theo 2 con đường : (1) tách chiết từ sữa và sữa non của nhiều loài

động vật khác nhau; (2) sản xuất LF tái tổ hợp (rLF) từ các hệ biểu hiện như vi khuẩn, nấm, virus, hoặc thậm chí từ thực vật và động vật biến đổi gen.

Các phương pháp sản xuất Lactoferrin

Tinh sạch Lactoferrin từ sữa

Vì lactoferrin bị biến tính khi bị xử lý nhiệt nên sữa thanh trùng không được sử dụng làm nguồn nguyên liệu để tách chiết lactoferrin. Do đó sữa gầy và whey phomat sẽ được sử dụng để tách tinh sạch lactoferrin. Chiến lược tinh sạch LF được thiết kế dựa vào đặc tính của LF và phụ thuộc vào 3 kiểu sắc ký. Vì LF là một protein có bản chất tích điện dương do đó LF có thể được tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion sử dụng cột carboxy-methyl Sephadex (cột CM) (Law và Reiter, 1977; Yoshida et al., 2000; Faraji et al., 2017). Phương pháp tinh sạch này là quy trình thường quy nhất để tinh sạch LF của bò đối với các công ty chuyên sản xuất bLF. Độ sạch có thể đạt > 95% (Tomita et al., 2002). Sữa gầy (pH 6,7) hoặc whey phomat (pH 6,4) được lọc và đưa lên một cột sắc ký trao đổi cation. Cột được rửa với dung dịch NaCl nồng độ thấp (1,6 %) để loại bỏ lactoperoxidase. Sau đó bLF được thổi ra khỏi cột với dung dịch NaCl nồng độ cao (5%). bLF được cô đặc bằng phương pháp siêu lọc và được loại muối bằng phương pháp thẩm tích. Sau khi được xử lý ở nhiệt độ thấp, bLF được sấy đông khô để tạo bột. Ngoài ra, bLF cũng có thể được sấy phun sau khi lọc vô trùng.

LF là protein liên kết với F^{3+} nên nó có thể được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực với sắt và các hợp chất tích điện âm như heparin (Aguila et al., 2000). Sắc ký ái lực Heparin-Sepharose đã được sử dụng để tinh sạch LF từ sữa gầy người, dịch tụy và sữa gầy bò. Ngoài ra, LF cũng là một protein được đường hóa nên nó có cũng có thể được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực ConA (Nuijens et al., 1996).

Sản xuất Lactoferrin tái tổ hợp

Việc sản xuất hLF bằng phương pháp tinh sạch từ sữa có một số hạn chế: (1) có thể tiềm ẩn một số rủi ro về an toàn như có khả năng bị tạp nhiễm với các tác nhân gây bệnh từ người; (2) hạn chế về nguồn cung sữa.

Cho đến nay nhiều hệ biểu hiện LF tái tổ hợp đã được phát triển kể cả sinh vật nhân thực và nhân sơ. Các hệ thống biểu hiện LF tái tổ hợp bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm mốc, côn trùng, tế bào dòng, dê, thỏ, chuột, bò, thuốc lá, lúa, khô, khoai tây, khoai lang, cà chua, linh lăng, sâm, lúa mạch. Các hệ thống biểu hiện này cho phép biểu hiện LF có nguồn gốc từ nhiều loài khác nhau như người, bò, ngựa, dê. Mức độ biểu hiện LF cũng khác nhau đối với mỗi vật chủ khác nhau.

Lactoferrin người tái tổ hợp đã được sản xuất trong *A. niger* var. *awamori* bởi công ty Agennix Inc., trong bò chuyển gen bởi công ty Pharming Technologies B.V., và trong lúa gạo bởi công ty Ventria Bioscience.

Lactoferrin người tái tổ hợp đã được sản xuất với năng suất đạt 2 g/L môi trường lên men *A. awamori* (Ward et al., 1995); 5 g/L đối với *A. niger* var. *awamori* (Headson, 2000) và được tinh sạch bằng sắc ký trao đổi cation. Lactoferrin người tái tổ hợp được sản xuất bởi *A. niger* có đặc tính tương tự như hLF tự nhiên.

Bò chuyển gen mang gen mã hóa hLF người dưới sự điều khiển bởi promoter α ₁-casein có khả năng tổng hợp 0,4-3,0 g/L sữa (Van Berkel et al., 2002). LF tái tổ hợp trong sữa bò chuyển gen đã được tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion Mono S. Tương tự như LF sản xuất bởi nấm mốc, mặc dù LF tái tổ hợp từ bò có sự khác biệt về sự đường hóa so với LF tự nhiên nhưng hoạt tính của LF tái tổ hợp vẫn tương tự như dạng tự nhiên. Dê cũng là một vật chủ được sử dụng để sản xuất LF người tái tổ hợp. Hiệu suất tổng hợp LF tái tổ hợp trong sữa đạt 0,765 – 2,0 g/L, và rhLF được tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion với độ sạch đạt 97% (Han et al., 2007; Zhang et al., 2008). Một nghiên cứu gần đây của Yu và cộng sự 2012 đã tạo ra dê chuyển gen có khả năng tổng hợp LF người đạt khoảng 30 mg/ml sữa. Hiệu suất tinh sạch LF từ sữa toàn phần đạt khoảng 70% với độ sạch trên 98% (Yu et al., 2012).

Đối với hệ biểu hiện thực vật, lactoferrin người tái tổ hợp cũng đã được biểu hiện trong lúa gạo và 0,5% trọng lượng hạt (Bethell and Huang, 2004; Nandi et al., 2005).

Đối với hệ biểu hiện vi khuẩn trong đó chủ yếu là *E. coli*, hiệu suất biểu hiện LF tái tổ hợp là 2 – 60 mg/L. Mức độ tổng hợp LF này chỉ tương đương như LF trong sữa bò. Đối với hệ biểu hiện vi khuẩn nói chung và *E. coli* nói riêng không có sự biến đổi sau dịch mã đặc biệt là sự đường hóa protein trong khi đó LF là một glycoprotein nên hệ biểu hiện *E. coli* có những hạn chế trong việc sản xuất lactoferrin.

Đối với hệ biểu hiện nấm men, là một sinh vật có hệ thống điều khiển gen đơn giản như vi khuẩn nhưng protein sau khi được tổng hợp có thể được biến đổi đặc biệt là có khả năng đường hóa protein nên rất phù hợp đối với glycoprotein LF. Cho đến nay nhiều nghiên cứu biểu hiện LF đã được thực hiện trong nấm men với hiệu suất đạt 2 – 3500 mg/L. Tuy nhiên chưa có quy trình công nghệ quy mô lớn để sản xuất Lactoferrin từ *Pichia pastoris* tái tổ hợp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết các vấn đề tồn tại nêu trên, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm chứa lactoferrin từ chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp. Quy trình này bao gồm các bước:

- i) lên men chủng *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp sinh tổng hợp Lactoferrin
- ii) thu hồi sinh khối nấm men *Pichia pastoris* và sấy khô
- iii) tách và tinh sạch protein lactoferrin
- iv) đông khô và tạo chế phẩm chứa lactoferrin

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm chứa lactoferrin từ chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm chứa lactoferrin từ chủng nấm men *Pichia pastoris* tái tổ hợp. Quy trình này bao gồm các bước sau:

- i) lên men chủng *Pichia pastoris* tái tổ hợp sinh tổng hợp Lactoferrin
- ii) thu hồi sinh khối nấm men *Pichia pastoris* và sấy khô
- iii) tách và tinh sạch protein lactoferrin
- iv) đông khô và tạo chế phẩm chứa lactoferrin

Cụ thể các bước được tiến hành như mô tả chi tiết dưới đây.

- i) Lên men chủng *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp sinh tổng hợp lactoferrin

Làm tươi chủng giống

Chủng giống được sử dụng là *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp được bảo quản trong 50% glyxerol ở tủ lạnh sâu -80°C.

- Chủng *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp ở -80°C được lấy ra, giữ trong đá lạnh.
- Dùng tăm cây vô trùng lấy ra một ít tế bào từ ống giống, cấy ria làm ba pha trên đĩa môi trường YPD (1% Chiết xuất nấm men, 2% Pepton, 2% Dextroza).
- Đĩa được ủ ở 28°C trong 2 ngày để nấm men mọc thành khuẩn lạc đơn.
- Đĩa được bảo quản 4°C trong 1 tháng.

Nhân giống

Nhân giống cấp 1:

- Lựa chọn khuẩn lạc đơn cấy chuyển vào 250 ml môi trường nhân giống cấp 1 (môi trường 2x-MMP (g/l): KH_2PO_4 1,7%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5%; cao ngô 0,5%; Glyxerol 1% pha trong đệm phosphat 0,1M, pH=6,0), bổ sung Biotin 1X và vi lượng khoáng PTM4 1X) trong bình tam giác cỡ 500 ml.
- Nuôi lắc 120 vòng/phút, ở 28°C, thời gian 16-18 giờ.

Nhân giống cấp 2:

- Chuyển dịch nuôi cấy cấp 1 vào hệ thống lên men chứa 5 lít môi trường nhân giống (môi trường 2x-MMP (g/l): KH_2PO_4 1,7%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5%; cao ngô 0,5%; Glyxerol 1% pha trong đệm phosphat 0,1M, pH=6,0), bổ sung Biotin 1X và vi lượng khoáng PTM4 1X.
- Thành phần PTM4 500X: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2%; NaI 0,008%; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,3%; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,0148%; H_3BO_3 0,002%; CoCl_2 0,05%; ZnCl_2 0,7%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,2%; Biotin 0,02%; H_2SO_4 0,1%. Môi trường được lọc thanh trùng bằng màng lọc vi sinh trong tủ cấy, bảo quản 4°C.
- Nuôi trong hệ thống lên men với điều kiện khuấy 120 vòng/phút, có sục khí ở điều kiện 28°C trong 16-18 giờ.

Lên men chính

Chuẩn bị thiết bị lên men với dung tích dịch lên men 100 lít

- Cân đủ các hóa chất theo thành phần môi trường lên men: môi trường 2x-MMP (g/l): KH_2PO_4 1,7%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5%; cao ngô 0,5%; Glyxerol 1% pha trong đệm phosphat 0,1M, pH=6,0), bổ sung Biotin 1X và vi lượng khoáng PTM4 1X.
- Cho từng loại hóa chất vào thiết bị chứa chuyên dụng, vừa cho vừa khuấy để đảm bảo hóa chất tan hoàn toàn.
- Bơm toàn bộ dịch môi trường lên men từ bình chứa sang thiết bị lên men
- Khử trùng môi trường 110°C trong 30 phút; làm nguội về nhiệt độ phòng

Tiếp giống và lên men

- Trước khi tiếp giống, tiến hành đo mật độ sinh khối ở giống cấp 2 và tiếp giống vào thiết bị lên men sao cho OD_{600} khởi đầu trong môi trường lên men đạt 0,5

- Tiến hành lên men ở điều kiện thiết lập: nhiệt độ 28°C, pH = 6,0; Oxy hòa tan (DO) ~ 20% (giữ theo tốc độ khuấy). Việc kiểm soát oxy được thực hiện bằng khuấy và sục khí 1vvm.
- Tiến hành lên men với các điều kiện lên men như trên trong 14 giờ.
- Sau 14 giờ, tiến hành bổ sung dịch cấp dưỡng theo chế độ DO stat (DO=20%) với thành phần như sau: Glyxerol 29,23%; cao ngô 2,62%; (NH₄)₂SO₄ 9,2%; Biotin 1X và PTM4 1X.
- Sau 48 giờ lên men khi sinh khối tế bào đạt cao nhất (OD600 đạt khoảng trên 300) tiến hành cảm ứng bằng dung dịch methanol (dịch cảm ứng) chứa MeOH 18%, Biotin 1X, PTM4 1X.
- Quá trình lên men được duy trì trong 96 giờ từ khi bắt đầu lên men.
- Sau khi kết thúc lên men, tiến hành bơm toàn bộ dịch lên men vào thùng chứa di động (có bánh xe) và chuyển sang phòng ly tâm.

ii) Thu hồi sinh khối nấm men *Pichia pastoris* và sấy khô

Ly tâm

Sinh khối nấm men sau lên men được thu hồi bằng kỹ thuật ly tâm liên tục. Quy trình này bao gồm các bước:

- Chuẩn bị máy ly tâm liên tục: bao gồm việc rửa vệ sinh máy bằng nước mềm và chạy ly tâm không tải với nước mềm để làm sạch hệ thống
- Kết nối máy ly tâm với thùng chứa dịch lên men
- Tiến hành ly tâm ở chế độ lưu lượng dòng ra: khoảng 80 lít/giờ
- Thu nhận sinh khối trong khoang chứa rotor
- Bảo quản sinh khối ở -20°C

Đông khô sinh khối

Sinh khối thu được được trộn với maltodextrin tỷ lệ 5% và dàn đều trên khay inox, sau đó cho vào tủ đông -20°C trong 24 giờ để sinh khối đông đá hoàn toàn. Sau khi sinh khối đông đá, tiến hành đông khô bằng thiết bị đông khô YK-118 Vacuum Freeze Dryer trong thời gian 48 giờ.

iii) Tách và tinh sạch protein lactoferrin

Nghiền sinh khối

- Vệ sinh máy nghiền bằng cồn 70%
- Đưa sinh khối sau khi đông khô vào máy
- Nghiền thành bột mịn: thời gian nghiền 5 phút
- Bảo quản bột trong túi thiếc hàn kín, giữ -20°C

Chiết protein

- Chuẩn bị dịch đệm chiết: 1X PBS pH 7,4 vô trùng (0,137 M NaCl; 2,7 mM KCl; 0,01 M Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄); thanh trùng dung dịch đệm chiết ở điều kiện 121°C, 30 phút.
- Hoà bột nghiền vào đệm 1X PBS, pH 7,4 theo tỷ lệ 1kg : 3 lít dung dịch đệm 1X PBS, pH 7,4.
- Khuấy đều trong 24 giờ ở nhiệt độ 4°C
- Dịch chiết xong được cho qua máy đồng hóa ở điều kiện áp suất 1200 bar.
- Ly tâm thu dịch chiết: 10000 vòng/phút, trong 20 phút, ở 4°C.

Tinh sạch Lactoferrin

Chuẩn bị gel:

- Hạt resin IMAC (TOYOPEARL AF- Chelate- 650M, Tosoh Corporation) được ủ với ion Ni²⁺ (0,2 M) trong 2 giờ.
- Rửa hạt gel bằng DI.H₂O với tỷ lệ bằng 3 lần thể tích gel
- Rửa hạt gel bằng 1X PBS pH 7,4 với tỷ lệ bằng 3 lần thể tích gel

Gắn protein:

- Trộn dịch chiết protein với gel theo tỷ lệ dịch chiết protein:gel = 3:1 (v/v)
- Lắc hỗn dịch qua đêm ở 4°C

Rửa gel:

- Ly tâm 6000 vòng/phút, ở 4°C trong 5 phút, sau đó thu gel
- Bổ sung đệm rửa (1X PBS, pH 7.4): tỷ lệ 1:1, trộn đều 5 phút
- Ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó thu gel
- Lặp lại bước rửa: 5 lần

Thôi protein:

- Bổ sung đệm thôi (40 mM Imidazol/1X PBS pH 7,4) vào gel, tỷ lệ 1:1 (v/v)
- Lắc đều trong 30 phút
- Ly tâm 6000 vòng/phút, trong 5 phút
- Thu dịch

Đổi đệm:

- Dịch protein được đổi đệm sử dụng hệ thống lọc màng 10 kDa, đệm được sử dụng là 1X PBS pH 7,4.
- Dịch protein tinh sạch: được định lượng, kiểm tra độ sạch bằng điện di SDS-PAGE và bảo quản ở -20°C

iv) Đông khô và tạo chế phẩm chứa lactoferrin

- Dịch protein thu được được trộn với maltodextrin theo tỷ lệ thích hợp để đạt $\geq 80\%$ Lactoferrin.
- Làm đông đá hỗn dịch
- Tiến hành đông khô trong khoảng 36 giờ
- Nghiền thành bột mịn bằng máy nghiền
- Kiểm tra sản phẩm, cụ thể là hàm lượng protein
- Bảo quản sản phẩm ở -20°C

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện sáng chế mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1: Quy trình lên men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp tổng hợp Lactoferrin quy mô 100 lít/mẻ

Nhân giống

Nhân giống cấp 1:

- Lựa chọn khuẩn lạc đơn cấy chuyển vào 250 ml môi trường nhân giống cấp 1 (môi trường 2x-MMP (g/l): KH_2PO_4 1,7%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5%; cao ngô 0,5%; Glyxerol 1% pha trong đệm phosphat 0,1M, pH=6,0), bổ sung Biotin 1X và vi lượng khoáng PTM4 1X) trong bình tam giác cỡ 500 ml.
- Nuôi lắc 120 vòng/phút, ở 28°C, thời gian 16-18 giờ.

Nhân giống cấp 2:

- Chuyển dịch nuôi cấy cấp 1 vào hệ thống lên men chứa 5 lít môi trường nhân giống (môi trường 2x-MMP (g/l): KH_2PO_4 1,7%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5%; cao ngô 0,5%; Glyxerol 1% pha trong đệm phosphat 0,1M, pH=6,0), bổ sung Biotin 1X và vi lượng khoáng PTM4 1X
- Thành phần PTM4 500X: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2%; NaI 0,008%; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,3%; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,0148%; H_3BO_3 0,002%; CoCl_2 0,05%; ZnCl_2 0,7%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,2%; Biotin 0,02%; H_2SO_4 0,1%. Môi trường được lọc thanh trùng bằng màng lọc vi sinh trong tủ cấy, bảo quản 4°C
- Nuôi trong hệ thống lên men với điều kiện khuấy 120 vòng/phút, có sục khí ở điều kiện 28°C trong 16-18 giờ.

Lên men chính

Bước 1: Chuẩn bị thiết bị lên men với dung tích dịch lên men 100 lít

- Cân đủ các hóa chất theo thành phần môi trường lên men: môi trường 2x-MMP (g/l): KH_2PO_4 1,7%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5%; cao ngô 0,5%; Glyxerol 1% pha trong đệm phosphat 0,1M, pH=6,0), bổ sung Biotin 1X và vi lượng khoáng PTM4 1X.
- Cho từng loại hóa chất vào thiết bị chứa chuyên dụng, vừa cho vừa khuấy để đảm bảo hóa chất tan hoàn toàn.
- Bơm toàn bộ dịch môi trường lên men từ bình chứa sang thiết bị lên men
- Khử trùng môi trường 110°C trong 30 phút; làm nguội về nhiệt độ phòng

Bước 2: Tiếp giống và lên men

- Trước khi tiếp giống, tiến hành đo mật độ sinh khối ở giống cấp 2 và tiếp giống vào thiết bị lên men sao cho OD_{600} khởi đầu trong môi trường lên men đạt 0,5
- Tiến hành lên men ở điều kiện thiết lập: nhiệt độ 28°C, pH = 6,0; Oxy hòa tan (DO) ~ 20% (giữ theo tốc độ khuấy). Việc kiểm soát oxy được thực hiện bằng khuấy và sục khí 1vvm.
- Tiến hành lên men với các điều kiện lên men như trên trong 14 giờ.
- Sau 14 giờ, tiến hành bổ sung dịch cấp dưỡng theo chế độ DO stat (DO=20%) với thành phần như sau: Glyxerol 29,23%; cao ngô 2,62%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 9,2%, Biotin 1X và PTM4 1X.

- Sau 48 giờ lên men khi sinh khối tế bào đạt cao nhất (OD_{600} đạt khoảng trên 300) tiến hành cảm ứng bằng dung dịch methanol (dịch cảm ứng) chứa MeOH 18%, Biotin 1X, PTM4 1X.
- Quá trình lên men được duy trì trong 96 giờ từ khi bắt đầu lên men.
- Sau khi kết thúc lên men, tiến hành bơm toàn bộ dịch lên men vào thùng chứa di động (có bánh xe) và chuyển sang phòng ly tâm.

Ví dụ 2: Quy trình thu hồi sinh khối nấm men từ dịch lên men 100 lít/mẻ

Ly tâm

Sinh khối nấm men sau lên men được thu hồi bằng kỹ thuật ly tâm liên tục.

- Chuẩn bị máy ly tâm liên tục: bao gồm việc rửa vệ sinh máy bằng nước mềm và chạy ly tâm không tải với nước mềm để làm sạch hệ thống. Kết nối máy ly tâm với thùng chứa dịch lên men
- Tiến hành ly tâm ở chế độ lưu lượng dòng ra: khoảng 80 lít/giờ
- Thu nhận sinh khối trong khoang chứa rotor
- Bảo quản sinh khối -20°C

Đông khô sinh khối

- Sinh khối thu được được trộn với maltodextrin tỷ lệ 5% và dàn đều trên khay inox, sau đó cho vào tủ đông -20°C trong 24 giờ để sinh khối đông đá hoàn toàn.
- Sau khi sinh khối đông đá, tiến hành đông khô bằng thiết bị đông khô YK-118 Vacuum Freeze Dryer trong thời gian 48 giờ.

Ví dụ 3: Tách chiết và tinh sạch protein Lactoferrin

Nghiền sinh khối

- Vệ sinh máy nghiền bằng cồn 70%
- Đưa sinh khối sau khi đông khô vào máy
- Nghiền thành bột mịn: thời gian nghiền 5 phút
- Bảo quản bột trong túi thiếc hàn kín, giữ -20°C

Chiết protein

- Chuẩn bị dịch đệm chiết: 1X PBS pH 7,4 vô trùng (0,137 M NaCl; 2,7 mM KCl; 0,01 M Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄); thanh trùng dung dịch đệm chiết ở điều kiện 121°C, 30 phút.
- Hoà bột nghiền vào đệm 1X PBS, pH 7,4 theo tỷ lệ 1kg : 3 lít dung dịch đệm 1X PBS, pH 7,4.
- Khuấy đều trong 24 giờ ở nhiệt độ 4°C
- Dịch chiết xong được cho qua máy đồng hóa ở điều kiện áp suất 1200 bar.
- Ly tâm thu dịch chiết: 10000 vòng/phút, trong 20 phút, ở 4°C.

Tinh sạch Lactoferrin

Chuẩn bị gel

- Hạt resin IMAC (TOYOPEARL AF- Chelate- 650M, Tosoh Corporation) được ủ với ion Ni²⁺ (0,2 M) trong 2 giờ.
- Rửa hạt gel bằng DI.H₂O: 3 lần thể tích gel
- Rửa hạt gel bằng 1X PBS pH 7,4: 3 lần thể tích gel

Gắn protein

- Trộn dịch chiết protein với gel theo tỷ lệ 3:1 (v/v)
- Lắc hỗn dịch qua đêm, ở 4°C

Rửa gel

- Ly tâm 6000 vòng/phút, ở 4°C, 5 phút, thu gel
- Bổ sung đệm rửa (1X PBS, pH 7.4): tỷ lệ 1:1, trộn đều 5 phút
- Ly tâm 6000 vòng/phút, 5 phút, thu gel
- Lặp lại bước rửa: 5 lần

Thôi protein

- Bổ sung đệm thôi (40 mM Imidazol/1X PBS pH 7,4) vào gel, tỷ lệ 1:1 (v/v)
- Lắc đều trong 30 phút
- Ly tâm 6000 vòng/phút, 5 phút
- Thu dịch

Đổi đệm

- Dịch protein được đổi đệm sử dụng hệ thống lọc màng 10 kDa, đệm được sử dụng là 1X PBS pH 7,4.

Dịch protein tinh sạch: được định lượng, kiểm tra độ sạch bằng điện di SDS-PAGE và bảo quản ở -20°C

Ví dụ 4: Đông khô và tạo chế phẩm

- Dịch protein thu được được trộn với maltodextrin theo tỷ lệ thích hợp để đạt $\geq 80\%$ Lactoferrin.
- Làm đông đá hỗn dịch
- Đông khô: khoảng 36 giờ
- Nghiền thành bột mịn bằng máy nghiền
- Kiểm tra sản phẩm: hàm lượng protein
- Bảo quản sản phẩm: -20°C

Hiệu quả có thể đạt được của sáng chế

Xây dựng được quy trình công nghệ sản xuất được chế phẩm chứa Lactoferrin từ *Pichia pastoris* tái tổ hợp quy mô ≥ 100 lít dịch lên men/mẻ. Sản phẩm có thể được sử dụng để bào chế thực phẩm chức năng bổ sung Lactoferrin.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm chứa lactoferrin từ chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp bao gồm các bước:

i) lên men chủng *Pichia pastoris* tái tổ hợp sinh tổng hợp Lactoferrin:

chuẩn bị giống trong phòng thí nghiệm: chủng *P. pastoris* KM71-3 tái tổ hợp được hoạt hóa trên môi trường YPD agar (1% yeast extract, 2% pepton, 2% glucoza, 2% agar); sau 2 ngày, chọn 1 khuẩn lạc điển hình cấy vào môi trường nuôi cấy 2x-MMP (KH_2PO_4 1,7%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5%, cao ngô 0,5%, Glyxerol 1% pha trong đệm phosphat 0,1M, pH=6,0), PTM4 1X, Biotin 1X (PTM4 500X: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2%, NaI 0,008%, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,3%, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,0148%, H_3BO_3 0,002%, CoCl_2 0,05%, ZnCl_2 0,7%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,2%, Biotin 0,02%, H_2SO_4 0,1%)), sau 16-18 giờ được chuyển vào môi trường dinh dưỡng cấp 2 chứa 2x-MMP, nuôi ở nhiệt độ 28 °C, khuấy 120 vòng/phút, sau 16-18 giờ, giống được chuyển sang hệ thống lên men 100 lít;

nhân giống qui mô pilot: chuẩn bị môi trường lên men với thể tích 100 lít, chỉnh pH tới $6,0 \pm 0,2$ bằng NH_4OH và bổ sung khoáng vi lượng PTM4 1X, Biotin 1X, nhiệt độ lên men được duy trì ở 28 °C tốc độ khuấy 200 vòng/phút, sục khí 1vvm, pH $6,0 \pm 0,2$, DO = 20% trong 14 giờ;

nhân nhanh sinh khối: sau 14 giờ thì bổ sung dung dịch bao gồm: glyxerol 29,23%, cao ngô 2,62%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 9,2%, Biotin 1X, PTM4 1X; bổ sung theo chế độ DO ổn định, duy trì DO 20%, kết thúc quá trình nhân nhanh tăng sinh khối, OD_{600 nm} đạt khoảng 300;

cảm ứng biểu hiện protein lactoferrin: từ giờ thứ 48 đến giờ thứ 96, cảm ứng liên tục bằng dung dịch metanol 18% có bổ sung biotin 1X và PTM4 1X, khuấy và sục khí 1vvm;

ii) thu hồi sinh khối nấm men *Pichia pastoris* và sấy khô:

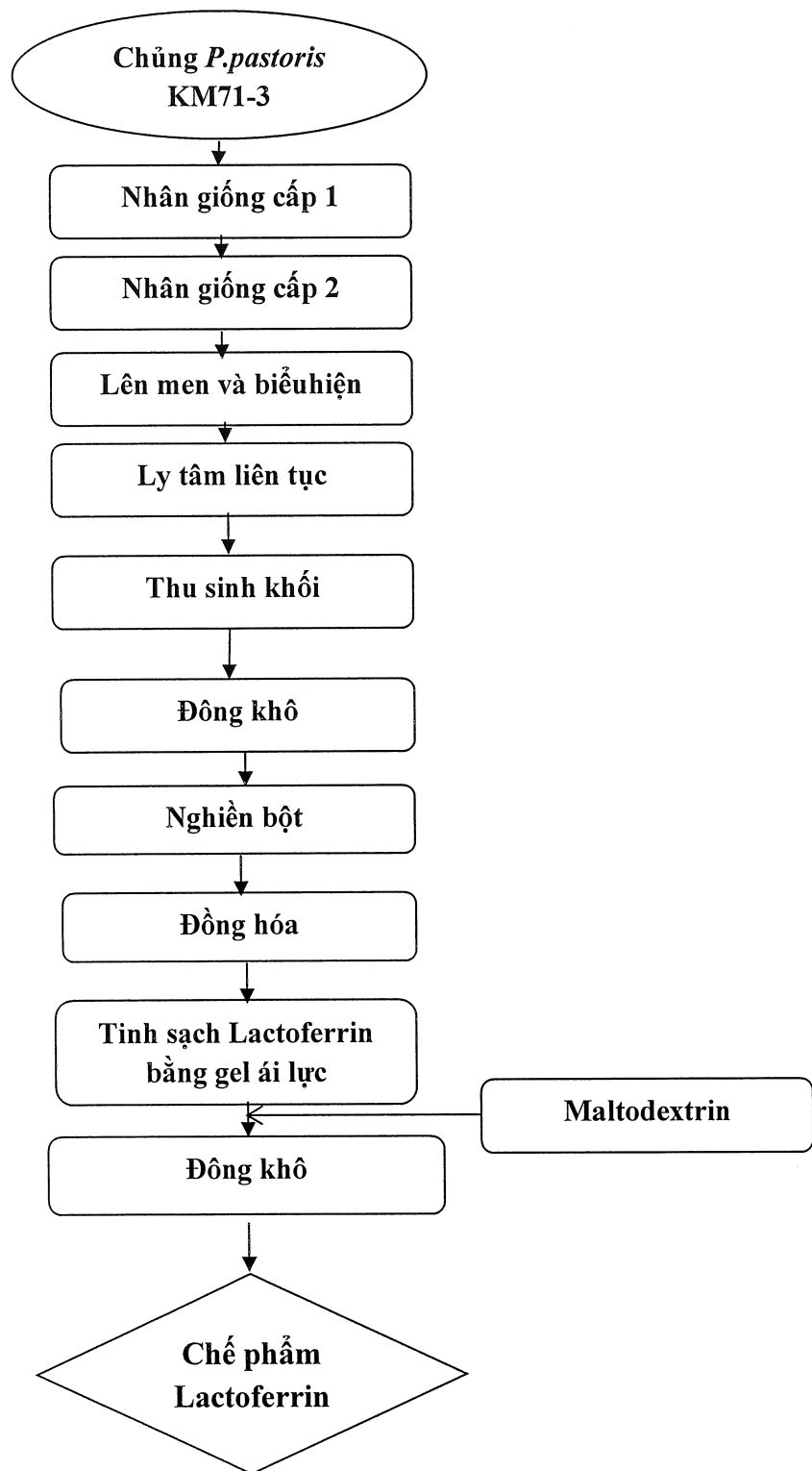
dịch lên men *P. pastoris* thu được ở bước i) được ly tâm bằng hệ thống ly tâm liên tục với lưu lượng dòng ra 80 lít/giờ để thu hồi sinh khối, sinh khối được tiến hành đông khô và nghiền nhỏ, rây thu bột mịn;

iii) tách và tinh sạch protein lactoferrin:

bột sinh khối thu được ở bước iii) được ủ chiết trong đệm 1X PBS, pH 7,4; thời gian 24 giờ ở 4 °C; sau đó đồng hoá ở 1200 bar và ly tâm thu dịch, protein lactoferrin được tinh sạch bằng sắc kí ái lực sử dụng Ni^{2+} ;

iv) đông khô và tạo chế phẩm chứa lactoferrin:

Lactoferrin sau tinh sạch ở bước iii) được trộn với maltodextrin theo tỷ lệ thích hợp để đạt hàm lượng Lactoferrin $\geq 80\%$ và đông khô tạo chế phẩm dạng bột.



Hình 1