



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} C12N 9/20; C12N 15/81; C11B 3/00; (13) B
C12N 15/55



1-0047772

-
- (21) 1-2021-04565 (22) 27/12/2019
(86) PCT/CN2019/128973 27/12/2019 (87) WO2020/135658 02/07/2020
(30) 201811625457.6 28/12/2018 CN
(45) 25/06/2025 447 (43) 25/10/2021 403A
(73) WILMAR (SHANGHAI) BIOTECHNOLOGY RESEARCH & DEVELOPMENT
CENTER CO., LTD (CN)
Area A No 118 Gaodong Road, Gaodong Industrial Park, Pudong New District,
Shanghai 200137, China
(72) XUAN, Yaoji (CN); NIU, Qiwen (CN); XU, Zhengjun (CN).
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)
-

- (54) POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH PHOSPHOLIPAZA C, PHÂN TỬ AXIT
NUCLEIC VÀ CHẾ PHẨM ENZYM

(21) 1-2021-04565

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit có hoạt tính phospholipaza C. Polypeptit này có: 1) trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID No: 2, bao gồm các thay thế axit amin xảy ra ở một hoặc nhiều vị trí, trong đó một hoặc nhiều vị trí được chọn từ các vị trí 6, 8, 10, 104, và 205 trong trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID No: 2 hoặc phối hợp bất kỳ của chúng; hoặc 2) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với 1), và ít nhất một trong số các vị trí 6, 8, 10, 104 và 205 khác biệt với các vị trí 6, 8, 10, 104, và 205 trong trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID No: 2. Sáng chế cũng đề cập đến phân tử axit nucleic để mã hóa polypeptit, vector bao gồm phân tử axit nucleic này, và tế bào bao gồm phân tử axit nucleic hoặc vector này. Sáng chế đề xuất việc sử dụng polypeptit, phân tử axit nucleic, vector, và tế bào này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất polypeptit có hoạt tính phospholipaza C, phân tử axit nucleic để mã hóa polypeptit và chế phẩm enzyme bao gồm polypeptit .

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Loại nhựa là bước quan trọng trong quá trình tinh chế dầu và chất béo. Quá trình loại nhựa truyền thống bằng cách hydrat hóa có chi phí kinh tế cao, tiêu thụ nhiều nguyên vật liệu và năng lượng và gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã được dành để áp dụng việc loại nhựa bằng enzyme trong quá trình loại nhựa của quá trình tinh chế dầu và chất béo. So với phương pháp truyền thống, phương pháp loại nhựa bằng enzyme có các lợi thế lớn về bảo vệ môi trường, hiệu quả kinh tế, và chất lượng, v.v., vì có thể cải thiện các lợi ích kinh tế, làm giảm tiêu thụ và phát xạ năng lượng và làm giảm ô nhiễm môi trường sinh thái. Một loại trong số các enzyme được sử dụng trong quá trình loại nhựa của dầu và chất béo là phospholipaza. Phospholipaza C (PLC) thể hiện các lợi thế đáng kể, như tăng hiệu suất của các diacylglycerol (DAG) và giảm thất thoát sản lượng dầu, so với các enzyme khác để loại nhựa.

Phospholipaza C đặc hiệu phosphatidylcholin từ *Bacillus cereus* (BC-PC-PLC) là phospholipaza C được nghiên cứu trước đây. Chiều dài đầy đủ của BC-PC-PLC là 283 axit amin, bao gồm peptit tín hiệu gồm 24 axit amin và peptit dẫn gồm 14 axit amin. Peptit trưởng thành gồm 245 các axit amin (xem, ví dụ, Johansen, T., Holm, T., Guddal, P.H., Sletten, K., Haugli, F.B., Little, C. (1988). "Cloning and sequencing of gene encoding the phosphatidylcholine-preferring phospholipase C of *Bacillus cereus*." *Gene* 65(2):293-304).

Đã có báo cáo rằng các vị trí hoạt động của BC-PC-PLC kiểu đại là Glu4, Asp55, Tyr56, Glu146, Ser64, Thr65, Phe66, Phe70, Ile80, Thr133, Asn134, Leu135, Ser143 (xem, ví dụ, Hough, e., Hansen, L.K., birkes, B., jynge, K., Hansen, S., hordvik, A., little, C., Dodson, e., derewenda, Z. (1989) "High-resolution (1,5 Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*." *Nature*. 338:357-60).

Cấu trúc tinh thể của BC-PC-PLC đã được báo cáo, gồm có nhiều vùng xoắn và ít nhất ba vị trí gắn kết Zn^{2+} , với vị trí xúc tác ở axit aspartic ở vị trí 55 (ví dụ, xem Hough, e., Hansen, L.K., birknes, B., jynge, K., Hansen, S., hordvik, A., little, C., Dodson, e., derewenda, Z. (1989) "High-resolution (1,5 Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*." *Nature*. 338:357-60). Sự biểu hiện không đồng nhất của BC-PC-PLC ít được nghiên cứu. Đã có báo cáo rằng BC-PC-PLC được biểu hiện trong *Bacillus subtilis* và *Pichia pastoris* (chẳng hạn, xem Durban, M.A., silbersack, J., schweder, T., Schauer, F., bornscheuer, U.T. (2007) High level expression of recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74(3):634-639; và Seo, K. H, Rhee J. I. (2004) High-level expression of recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Pichia pastoris* and its characterization. *Biotechnol Lett* 26(19):1475-1479).

Tuy nhiên, độ ổn định nhiệt của phospholipaza C đã biết kém, có thể không chịu được trên 60°C. Do đó, nhiệt độ loại nhựa tối ưu cần phải được kiểm soát ở 50°C, làm hạn chế việc chấp nhận nó trong công nghiệp. Nếu độ ổn định nhiệt của phospholipaza C có thể được cải thiện một cách hữu hiệu, có thiên vị cho sự chấp nhận trong công nghiệp của phospholipaza C vì các lý do bao gồm: thứ nhất, nhiệt độ cao hơn trong quá trình loại nhựa có thể làm giảm độ nhớt của dầu, cải thiện sự tách dầu và phospholipit, làm giảm dầu bị cuốn theo phospholipit, và gia tăng hơn nữa sản lượng của dầu; thứ hai, hiện nay, PLC và PLA1 được sử dụng phối hợp để loại nhựa sâu. CN201480017114.5 bộc lộ PLA1 mới với nhiệt độ loại nhựa tối ưu bằng 65°C, nên PLC bền nhiệt hơn được ưa thích hơn cho quá trình loại nhựa cùng với PLA1. Ngoài ra, đôi khi nhiệt độ của dầu thô sẽ vượt quá 50°C trong quá trình bảo quản, đặc biệt là khi thời tiết có nhiệt độ cao, nên nếu nhiệt độ phản ứng tối ưu của PLC thấp hơn 50°C, cần nước lạnh nhiều hơn để làm nguội dầu thô, dẫn đến tiêu thụ năng lượng lớn. Do đó, sẽ có giá trị kinh tế và thực tiễn to lớn khi phát triển được một polypeptit mới với hoạt tính phospholipaza C bền nhiệt.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất polypeptit có hoạt tính phospholipaza C, trong đó polypeptit này có 1) trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 với các sự thay thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí, trong đó một hoặc nhiều vị trí được chọn

từ nhóm bao gồm: vị trí 6, 8, 10, 104, 205 hoặc phối hợp bất kỳ của chúng của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2; hoặc

2) có độ tương đồng ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 97%, tốt hơn nữa là ít nhất 98%, tốt hơn nữa là ít nhất 99% với 1), và ít nhất một trong số các vị trí 6, 8, 10, 104 và 205 khác biệt với vị trí 6, 8, 10, 104 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2.

Theo một số phương án, các sự thay thế axit amin xảy ra ở tất cả vị trí 6, 8, 10, 104 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2.

Theo một số phương án, axit amin lysin ở vị trí 6 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng prolin, glyxin, hydroxyprolin, serin hoặc threonin.

Theo một số phương án, lysin ở vị trí 6 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng prolin.

Theo một số phương án, axit amin lysin ở vị trí 8 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng isoleuxin, leuxin, valin, methionin, alanin, phenylalanin hoặc n-leuxin.

Theo một số phương án, lysin ở vị trí 8 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng isoleuxin.

Theo một số phương án, axit amin glyxin ở vị trí 10 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng threonin hoặc serin.

Theo một số phương án, glyxin ở vị trí 10 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng threonin.

Theo một số phương án, axit amin lysin ở vị trí 104 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng glyxin hoặc prolin.

Theo một số phương án, lysin ở vị trí 104 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng glyxin.

Theo một số phương án, axit amin serin ở vị trí 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng tyrosin, tryptophan, phenylalanin, hoặc threonin.

Theo một số phương án, serin ở vị trí 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng tyrosin.

Theo một số phương án, trình tự axit amin của polypeptit bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID No: 4.

Theo một số phương án, trình tự axit amin của polypeptit gồm có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID No: 4.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập, trong đó polypeptit này có độ đồng nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 97%, tốt hơn nữa là ít nhất 98%, và tốt hơn nữa là ít nhất 99% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID No: 4, và polypeptit phân lập có prolin, isoleuxin, threonin, glyxin và tyrosin ở các gốc axit amin tương ứng với vị trí 6, 8, 10, 104 và 205 của SEQ ID NO: 4, tương ứng. Tốt hơn là, polypeptit này thu được từ *Bacillus subtilis*.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit như được mô tả theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai.

Theo một số phương án, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự axit nucleic thể hiện trong SEQ ID No: 3.

Theo một số phương án, trình tự của phân tử axit nucleic là như được thể hiện trong SEQ ID No: 3.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất vector chứa phân tử axit nucleic như được mô tả theo khía cạnh thứ ba.

Theo một số phương án, vector là vector biểu hiện.

Theo một số phương án, vector được thiết kế để biểu hiện trong các tế bào có nhân điển hình hoặc chưa có nhân điển hình.

Theo một số phương án, vector được thiết kế để biểu hiện trong các tế bào vi khuẩn, các tế bào nấm, các tế bào nấm men, các tế bào động vật có vú, các tế bào côn trùng, hoặc các tế bào thực vật.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất tế bào bao gồm phân tử axit nucleic như được mô tả theo khía cạnh thứ ba hoặc vector như được mô tả theo khía cạnh thứ tư.

Theo một số phương án, tế bào là tế bào có nhân điển hình hoặc tế bào chưa có nhân điển hình.

Theo một số phương án, tế bào là tế bào vi khuẩn, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, hoặc tế bào thực vật.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất phospholipaza C được tạo ra bởi tế bào như được mô tả theo khía cạnh thứ năm.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất việc sử dụng polypeptit như được mô tả theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai, hoặc polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic như được mô tả theo khía cạnh thứ ba, hoặc polypeptit được mã hóa bởi vector như được mô tả theo khía cạnh thứ tư, hoặc cạnh thang lên men, phần cô hoặc polypeptit được biểu hiện bởi tế bào như được mô tả theo khía cạnh thứ năm, hoặc phospholipaza C như được mô tả theo khía cạnh thứ sáu dưới dạng phospholipaza C.

Theo một số phương án, sử dụng là sử dụng trong quá trình loại nhựa của dầu và chất béo.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất chế phẩm enzym, bao gồm polypeptit như được mô tả theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai, hoặc polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic như được mô tả theo khía cạnh thứ ba, hoặc polypeptit được mã hóa bởi vector như được mô tả theo khía cạnh thứ tư, hoặc polypeptit được biểu hiện bởi tế bào như được mô tả theo khía cạnh thứ năm, hoặc phospholipaza C như được mô tả theo khía cạnh thứ sáu, và ít nhất một enzym loại nhựa.

Theo một số phương án, ít nhất một enzym loại nhựa được chọn từ nhóm bao gồm: phospholipaza A₁, phospholipaza A₂, phospholipaza B, phospholipaza D, pectinaza và mananaza.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất việc sử dụng polypeptit như được mô tả theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai, hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả theo khía cạnh thứ ba, hoặc vector như được mô tả theo khía cạnh thứ tư, hoặc tế bào như được mô tả theo khía cạnh thứ năm, hoặc chế phẩm enzym như được mô tả theo khía cạnh thứ tám trong quá trình điều chế enzym để loại nhựa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đường cong chuẩn của hoạt tính phospholipaza.

Fig.2 thể hiện sự so sánh độ ổn định nhiệt giữa PLC-9-49 và PLC-N63DN131SN134D-Y56H, trong đó các vòng tròn thể hiện PLC-9-49 và các hình tam giác thể hiện PLC-N63DN131SN134D-Y56H.

Fig.3 thể hiện lượng tăng DAG của quá trình loại nhựa bằng PLC-9-49 và PLC-N63DN131SN134D-Y56H ở 55°C và 60°C, tương ứng, so với dầu thô.

Mô tả trình tự

SEQ ID No: 1 là trình tự axit nucleic mã hóa PLC-N63DN131SN134D-Y56H.

SEQ ID No: 2 là trình tự axit amin của PLC-N63DN131SN134D-Y56H.

SEQ ID No: 3 là trình tự axit nucleic mã hóa PLC-9-49.

SEQ ID No: 4 là trình tự axit amin của PLC-9-49.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Như được sử dụng ở đây, phosphatidylcholin phospholipaza C đặc hiệu và phospholipaza C lựa chọn phosphatidylcholin có cùng ý nghĩa và có thể hiểu một cách dễ dàng bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Như được sử dụng ở đây, chữ viết tắt, PC-PLC, có nghĩa là để chỉ phosphatidylcholin phospholipaza C đặc hiệu hoặc phospholipaza C lựa chọn phosphatidylcholin.

Như được sử dụng ở đây, ví dụ về phosphatidylcholin phospholipaza C đặc hiệu là phosphatidylcholin phospholipaza C đặc hiệu của *Bacillus cereus*, được viết tắt là BC-PC-PLC ở đây. Cần phải hiểu rằng BC-PC-PLC có thể thể hiện không chỉ phosphatidylcholin phospholipaza C đặc hiệu kiểu đại của *Bacillus cereus*, nhưng cũng thể hiện thể đột biến thu được dựa trên phosphatidylcholin phospholipaza C đặc hiệu kiểu đại như vậy ở đây.

Trong trường hợp trong đó vị trí của axit amin được biểu thị bằng các con số ở đây, các con số dùng để chỉ vị trí axit amin trong SEQ ID No: 2. SEQ ID No: 2 là trình tự axit amin của thể đột biến phosphatidylcholin phospholipaza C đặc hiệu PLC-N63DN131SN134D-Y56H của *Bacillus cereus*.

Các chữ viết tắt có một chữ hoặc có ba chữ của các axit amin được sử dụng quốc tế được sử dụng ở đây.

Thuật ngữ “polypeptit”, “peptit” và “protein” được sử dụng ở đây có thể được sử dụng thay cho nhau để chỉ polyme được tạo ra bởi sự liên kết của nhiều axit amin nhờ các liên kết peptit. Các axit amin có thể là các axit amin xuất hiện trong tự nhiên hoặc các chất tương tự được tổng hợp nhân tạo.

Các thuật ngữ “axit nucleic” và “polynucleotit” được sử dụng ở đây có thể được sử dụng thay cho nhau, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở ADN, ARN, v.v.. Các nucleotit

có thể là các nucleotit xuất hiện trong tự nhiên hoặc các chất tương tự được tổng hợp nhân tạo.

Các tế bào như được sử dụng ở đây có thể là các tế bào có nhân điển hình hoặc các tế bào chưa có nhân điển hình, chẳng hạn, nhưng không bị giới hạn ở các tế bào vi khuẩn, các tế bào nấm, các tế bào nấm men, các tế bào động vật có vú, các tế bào côn trùng hoặc các tế bào thực vật.

Thuật ngữ “sự thay thế bảo toàn” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ sự thay đổi trong thành phần axit amin của protein mà không làm thay đổi đáng kể hoạt tính của protein. Do đó, “sự thay thế bảo toàn” của trình tự axit amin đặc hiệu dùng để chỉ sự thay thế của các axit amin không quan trọng đối với hoạt tính protein, hoặc sự thay thế của các axit amin bằng các axit amin khác với các tính chất tương tự (như độ axit, độ bazơ, điện tích dương hoặc âm, phân cực hoặc không phân cực, v.v.), sao cho ngay cả sự thay thế của các axit amin quan trọng sẽ không làm thay đổi đáng kể hoạt tính.

Thuật ngữ “đột biến bão hòa ngẫu nhiên” được sử dụng ở đây dùng để chỉ quá trình sử dụng các codon thoái biến NNK trong các đoạn môi PCR đối với vị trí cần được đột biến, mà có thể bao gồm tất cả 20 axit amin để đạt được đột biến bão hòa. Trong lúc đó, do nhiều vị trí được chọn để gây đột biến, sự phối hợp là ngẫu nhiên. Phương pháp này được gọi là đột biến bão hòa ngẫu nhiên theo sáng chế.

Đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này là tạo ra các thay thế bảo toàn bằng các axit amin có các chức năng tương tự. Chẳng hạn, các thay thế axit amin bảo toàn khác đối với mỗi axit amin được liệt kê như sau:

Sự thay thế bảo toàn của alanin (ALA) là valin (Val)*, leuxin (Leu) và isoleuxin (Ile);

Sự thay thế bảo toàn của arginin (Arg) là lysin (Lys)*, glutamin (Gln) và asparagin (Asn);

Sự thay thế bảo toàn của asparagin (Asn) là glutamin (Gln)*, histidin (His), lysin (Lys), arginin (Arg) và axit aspartic (Asp);

Sự thay thế bảo toàn của axit aspartic (Asp) là axit glutamic (Glu)* và asparagin (Asn);

Sự thay thế bảo toàn của xystein (Cys) là serin (Ser);

Sự thay thế bảo toàn của glutamin (Gln) là asparagin (Asn)*, histidin (His) và lysin (Lys);

Sự thay thế bảo toàn của axit glutamic (Glu) là axit aspartic (Asp)*, axit γ -hydroxyglutamic (Gla);

Sự thay thế bảo toàn của glyxin (Gly) là prolin (Pro);

Sự thay thế bảo toàn của histidin (His) là asparagin (Asn), glutamin (Gln), lysin (Lys), arginin (Arg)*;

Sự thay thế bảo toàn của isoleuxin (Ile) là leuxin (Leu)*, valin (Val), methionin (Met), alanin (Ala), phenylalanin (Phe) và n-leuxin (Nle);

Sự thay thế bảo toàn của leuxin (Leu) là n-leuxin (Nle), isoleuxin (Ile)*, valin (Val), methionin (Met), alanin (Ala), phenylalanin (Phe);

Sự thay thế bảo toàn của lysin (Lys) là arginin (Arg)*, glutamin (Gln), asparagin (Asn) và ornithin (Orn);

Sự thay thế bảo toàn của methionin (Met) là leuxin (Leu)*, isoleuxin (Ile), phenylalanin (Phe) và n-leuxin (Nle);

Sự thay thế bảo toàn của phenylalanin (Phe) là leuxin (Leu)*, valin (Val), isoleuxin (Ile) và alanin (Ala);

Sự thay thế bảo toàn của prolin (Pro) là glyxin (Gly)*, hydroxyprolin (Hyp), serin (Ser), threonin (Thr);

Sự thay thế bảo toàn của serin (Ser) là threonin (Thr);

Sự thay thế bảo toàn của threonin (Thr) là serin (Ser);

Sự thay thế bảo toàn của tryptophan (Trp) là tyrosin (Tyr);

Sự thay thế bảo toàn của tyrosin (Tyr) là tryptophan (Trp), phenylalanin (Phe)*, threonin (Thr) và serin (Ser);

Sự thay thế bảo toàn của valin (Val) là isoleuxin (Ile), leuxin (Leu)*, methionin (Met), phenylalanin (Phe), Alanin (Ala) và n-leuxin (Nle).

Trong đó * là sự thay thế bảo toàn được ưu tiên.

Ngoài ra, xem Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W.H. Freeman and company, New York (xuất bản lần thứ hai, 1992).

Mô tả phương án

Trong đơn CN201510946696.1 trước đây của tác giả sáng chế, bốn axit amin của BC-PC-PLC (nghĩa là các axit amin ở các vị trí 56, 63, 131 và 134) bị đột biến thành histidin (Y56H), axit aspartic (N63D), serin (N131S) và axit aspartic (N134D), tương ứng. Trình tự axit amin đột biến được thể hiện trong SEQ ID No: 2, và trình tự mã hóa được thể hiện trong SEQ ID No: 1, mà ở đây còn được gọi là “PLC-N63DN131SN134D-Y56H”. Hoạt tính enzym đặc hiệu của PLC-N63DN131SN134D-Y56H cao hơn hoạt tính của BC-PC-PLC kiểu đại, nhưng thể đột biến như vậy không ổn định và không thể chịu được nhiệt độ trên 60°C, với nhiệt độ loại nhựa tối ưu bằng 50°C, hạn chế việc sử dụng thể đột biến này trong công nghiệp.

Thứ nhất, nhiệt độ cao hơn trong quá trình loại nhựa có thể làm giảm độ nhớt của dầu, cải thiện sự tách của dầu và phospholipit, làm giảm dầu bị cuốn theo phospholipit, và gia tăng hơn nữa sản lượng của dầu; thứ hai, hiện nay, PLC và PLA1 được sử dụng phối hợp đối với quá trình loại nhựa sâu. CN201480017114.5 bộc lộ PLA1 mới với nhiệt độ loại nhựa tối ưu bằng 65°C (xem đoạn [0173] của CN105073985A), nên mong muốn có một PLC chịu nhiệt tốt hơn để phối hợp với nhiệt độ loại nhựa như vậy trong quá trình loại nhựa cùng với PLA1. Ngoài ra, đôi khi nhiệt độ của dầu thô sẽ vượt quá 50°C trong quá trình bảo quản, đặc biệt là trong điều kiện thời tiết có nhiệt độ cao, nên nếu nhiệt độ phản ứng tối ưu của PLC thấp hơn 50°C, cần đến lượng nước lạnh nhiều hơn để làm mát dầu thô, dẫn đến tiêu thụ lượng năng lượng lớn. Do đó, để cải thiện độ ổn định nhiệt và/hoặc khả năng áp dụng của phospholipaza C, tác giả sáng chế đã cải tiến PLC-N63DN131SN134D-Y56H, và tạo ra các phát minh khác nhau của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất polypeptit có hoạt tính phospholipaza C. Polypeptit này có 1) trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 với các thay thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí, trong đó một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm vị trí 6, 8, 10, 104, 205 hoặc phối hợp bất kỳ của chúng có trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2; hoặc 2) có độ tương đồng ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 97%, tốt hơn nữa là ít nhất 98%, tốt hơn nữa là ít nhất 99% với 1), và ít nhất một trong số các vị trí 6, 8, 10, 104 và 205 khác biệt với vị trí 6, 8, 10, 104 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2.

Theo một số phương án, các sự thay thế axit amin xảy ra ở tất cả các vị trí 6, 8, 10, 104 và 205 trong trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2.

Theo một số phương án, axit amin ở vị trí 6 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng một axit amin khác.

Theo một số phương án, axit amin ở vị trí 8 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng một axit amin khác.

Theo một số phương án, axit amin ở vị trí 10 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng một axit amin khác.

Theo một số phương án, axit amin ở vị trí 104 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng một axit amin khác.

Theo một số phương án, axit amin ở vị trí 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng một axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6 và 8 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6 và 10 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6 và 104 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 8 và 10 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 8 và 104 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 8 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 10 và 104 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 10 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 104 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6, 8 và 10 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6, 8 và 104 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6, 8 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6, 10 và 104 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6, 10 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6, 104 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 8, 10 và 104 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 8, 10 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 8, 104 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 10, 104 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6, 8, 10 và 104 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6, 8, 10 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6, 8, 104 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 6, 10, 104 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, các axit amin ở các vị trí 8, 10, 104 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng các axit amin khác.

Theo một số phương án, axit amin lysin ở vị trí 6 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng prolin, glyxin, hydroxyprolin, serin hoặc threonin.

Theo một số phương án, lysin ở vị trí 6 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng prolin.

Theo một số phương án, axit amin lysin ở vị trí 8 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng isoleuxin, leuxin, valin, methionin, alanin, phenylalanin hoặc n-leuxin.

Theo một số phương án, lysin ở vị trí 8 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng isoleuxin.

Theo một số phương án, axit amin glyxin ở vị trí 10 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng threonin hoặc serin.

Theo một số phương án, axit amin glyxin ở vị trí 10 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng threonin.

Theo một số phương án, axit amin lysin ở vị trí 104 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng glyxin hoặc prolin.

Theo một số phương án, axit amin lysin ở vị trí 104 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng glyxin.

Theo một số phương án, axit amin serin ở vị trí 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng tyrosin, tryptophan, phenylalanin, hoặc threonin.

Theo một số phương án, serin ở vị trí 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng tyrosin.

Theo một số phương án, trình tự axit amin của polypeptit bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID No: 4.

Theo một số phương án, trình tự axit amin của polypeptit gồm có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID No: 4.

Sáng chế cũng xem xét các biến thể chức năng của polypeptit như được mô tả theo khía cạnh thứ nhất. Theo một số phương án, biến thể chức năng là biến thể thay thế bảo toàn.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập, trong đó polypeptit này có độ tương đồng ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 97%, tốt hơn nữa là ít nhất 98%, tốt hơn nữa là ít nhất 99% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID No: 4, và polypeptit phân lập có prolin, isoleuxin, threonin, glyxin và tyrosin ở các gốc axit amin tương ứng với các vị trí 6, 8, 10, 104 và 205 của SEQ ID NO: 4, tương ứng.

Theo một số phương án, polypeptit này thu được từ *Bacillus subtilis*.

Theo một số phương án, polypeptit này có độ tương đồng ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, ít nhất lớn hơn hoặc bằng 99,5% với trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 4.

Theo một số phương án, polypeptit này có độ tương đồng ít nhất 97,2%, ít nhất 97,6%, ít nhất 98%, ít nhất 98,4%, ít nhất 98,8%, ít nhất 99,2%, ít nhất lớn hơn hoặc bằng 99,6% với trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 4.

Theo một số phương án, gốc axit amin của polypeptit phân lập tương ứng với vị trí 6 của SEQ ID NO: 4 là prolin.

Theo một số phương án, gốc axit amin của polypeptit phân lập tương ứng với vị trí 8 của SEQ ID NO: 4 là isoleuxin.

Theo một số phương án, gốc axit amin của polypeptit phân lập tương ứng với vị trí 10 của SEQ ID NO: 4 là threonin.

Theo một số phương án, gốc axit amin của polypeptit phân lập tương ứng với vị trí 104 của SEQ ID NO: 4 là glyxin.

Theo một số phương án, gốc axit amin của polypeptit phân lập tương ứng với vị trí 205 của SEQ ID NO: 4 là tyrosin.

Theo một số phương án, gốc axit amin của polypeptit phân lập tương ứng với vị trí 6 của SEQ ID NO: 4 là prolin, và/hoặc gốc axit amin của polypeptit phân lập tương ứng với vị trí 8 của SEQ ID NO: 4 là isoleuxin, và/hoặc gốc axit amin của polypeptit phân lập tương ứng với vị trí 10 của SEQ ID NO: 4 là threonin, và/hoặc gốc axit amin của polypeptit phân lập tương ứng với vị trí 104 của SEQ ID NO: 4 là glyxin, và/hoặc gốc axit amin của polypeptit phân lập tương ứng với vị trí 205 của SEQ ID NO: 4 là tyrosin.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit như được mô tả theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai. Sáng chế xem xét các phân tử axit

nucleic khác nhau có thể thu được dựa trên sự thoái hóa của các codon hoặc sự ưu tiên codon của các loài khác nhau.

Theo một số phương án, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự axit nucleic thể hiện trong SEQ ID No: 3.

Theo một số phương án, trình tự của phân tử axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID No: 3.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất vector chứa phân tử axit nucleic như được mô tả theo khía cạnh thứ ba.

Theo một số phương án, vector là vector biểu hiện.

Theo một số phương án, vector được thiết kế để biểu hiện trong tế bào có nhân điển hình hoặc chưa có nhân điển hình.

Theo một số phương án, vector được thiết kế để biểu hiện trong tế bào vi khuẩn, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, hoặc tế bào thực vật.

Theo một số phương án, vector là plasmid.

Các vector thích hợp đối với tế bào có nhân điển hình hoặc tế bào chưa có nhân điển hình đã được biết đến đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này, và nhiều vector ban đầu hiện có trên thị trường. Các ví dụ về các vector bao gồm nhưng không bị giới hạn ở nhiều vector được sử dụng trong các ví dụ của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất tế bào bao gồm phân tử axit nucleic như được mô tả theo khía cạnh thứ ba hoặc vector như được mô tả theo khía cạnh thứ tư.

Theo một số phương án, tế bào là tế bào có nhân điển hình hoặc tế bào chưa có nhân điển hình.

Theo một số phương án, tế bào là tế bào vi khuẩn, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, hoặc tế bào thực vật.

Theo một số phương án, tế bào là tế bào *Pichia pastoris*.

Theo một số phương án, tế bào là tế bào *Bacillus subtilis*.

Theo một số phương án, tế bào là tế bào *Escherichia coli*.

Đối với tế bào chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế, phân tử axit nucleic có thể nằm bên ngoài nhiễm sắc thể (chẳng hạn, trong vector) hoặc được hợp nhất vào trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ

cách làm thế nào để hợp nhất phân tử axit nucleic vào trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ và cách làm thế nào để đưa vector vào trong tế bào chủ nhờ quá trình biến nạp hoặc chuyển nhiễm.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất phospholipaza C được tạo ra bởi tế bào như được mô tả theo khía cạnh thứ năm. Người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết cách tạo ra peptit hoặc protein đích bằng tế bào chủ được thao tác kỹ thuật di truyền.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất việc sử dụng polypeptit như được mô tả theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai, hoặc polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic như được mô tả theo khía cạnh thứ ba, hoặc polypeptit được mã hóa bởi vector như được mô tả theo khía cạnh thứ tư, hoặc canh thang lên men, phân cô hoặc polypeptit được biểu hiện bởi tế bào như được mô tả theo khía cạnh thứ năm, hoặc phospholipaza C như được mô tả theo khía cạnh thứ sáu dưới dạng phospholipaza C.

Theo một số phương án, sử dụng là sử dụng trong quá trình loại nhựa của dầu và chất béo.

Ứng dụng của phosphatidylcholin phospholipaza C đặc hiệu trong quá trình loại nhựa của dầu và chất béo là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phospholipaza C có thể thủy phân phospholipit thành phần thân kinh đệm trong dầu để tạo ra phần phosphat ưa nước và DAG ưa mỡ. Phần thân kinh đệm được loại bỏ dưới dạng phần ưa nước được loại bỏ bằng nước. DAG làm tăng sản lượng của dầu. Chẳng hạn, quá trình loại nhựa bằng enzym bao gồm gia nhiệt dầu thô đến 60°C, bổ sung dung dịch phospholipaza C, khuấy trộn trong thiết bị phản ứng trong 2 giờ sau khi trộn cắt tốc độ cao, và sau đó ly tâm để tách pha nước và pha dầu.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất chế phẩm enzym, bao gồm polypeptit như được mô tả theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai, hoặc polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic như được mô tả theo khía cạnh thứ ba, hoặc polypeptit được mã hóa bởi vector như được mô tả theo khía cạnh thứ tư, hoặc polypeptit được biểu hiện bởi tế bào như được mô tả theo khía cạnh thứ năm, hoặc phospholipaza C như được mô tả theo khía cạnh thứ sáu, và ít nhất một enzym loại nhựa.

Theo một số phương án, ít nhất một enzym loại nhựa được chọn từ nhóm bao gồm: phospholipaza A₁, phospholipaza A₂, phospholipaza B, phospholipaza D, pectinaza và mananaza.

Theo một số phương án, chế phẩm enzym bao gồm polypeptit như được mô tả theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai và ít nhất một enzym loại nhựa.

Theo một số phương án, chế phẩm enzym bao gồm polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic như được mô tả theo khía cạnh thứ ba và ít nhất một enzym loại nhựa.

Theo một số phương án, chế phẩm enzym bao gồm polypeptit được mã hóa bởi vector như được mô tả theo khía cạnh thứ tư và ít nhất một enzym loại nhựa.

Theo một số phương án, chế phẩm enzym bao gồm polypeptit được biểu hiện bởi tế bào như được mô tả theo khía cạnh thứ năm và ít nhất một enzym loại nhựa.

Theo một số phương án, chế phẩm enzym bao gồm phospholipaza C như được mô tả theo khía cạnh thứ sáu và ít nhất một enzym loại nhựa.

Theo một số phương án, chế phẩm enzym bao gồm polypeptit như được mô tả theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai, và/hoặc polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic như được mô tả theo khía cạnh thứ ba, và/hoặc polypeptit được mã hóa bởi vector như được mô tả theo khía cạnh thứ tư, và/hoặc polypeptit được biểu hiện bởi tế bào như được mô tả theo khía cạnh thứ năm, và/hoặc phospholipaza C như được mô tả theo khía cạnh thứ sáu, và ít nhất một enzym loại nhựa.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất việc sử dụng polypeptit như được mô tả theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai, hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả theo khía cạnh thứ ba, hoặc vector như được mô tả theo khía cạnh thứ tư, hoặc tế bào như được mô tả theo khía cạnh thứ năm, hoặc chế phẩm enzym như được mô tả theo khía cạnh thứ tám trong quá trình điều chế enzym để loại nhựa.

Cần phải hiểu rằng phần mô tả chi tiết nêu trên chỉ để hiểu rõ nội dung của sáng chế bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này, và không được dự định làm giới hạn sáng chế ở khía cạnh bất kỳ. Người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ thực hiện các thay đổi khác nhau đối với các phương án.

Ví dụ thực hiện sáng chế

The sau đây các ví dụ được cung cấp để mô tả tiếp sáng chế mà không có bất kỳ giới hạn nào.

Nguyên liệu thử nghiệm

Các nguyên liệu chính được sử dụng trong các ví dụ của sáng chế là như sau:

1. Chủng

Pichia pastoris SMD1168 (Invitrogen, số catalog C17500), *Escherichia coli* DH5 α (TAKARA, số catalog D9057A).

2. Môi trường và dung dịch nuôi cấy

Môi trường lỏng LB: phần chiết nấm men 0,5%, trypton 1%, NaCl 1%, pH=7,0.

Môi trường rắn LB: Môi trường lỏng LB với aga 1,5% được bổ sung.

Môi trường lỏng YPD: phần chiết nấm men 1%, pepton 2%, glucoza 2%.

Môi trường rắn YPD: Môi trường lỏng LB với aga 2% được bổ sung.

Môi trường rắn MGYS: bazơ nitơ của nấm men (YNB) (chứa amoni sulfat và không có axit amin) 1,34%, glyxerol 1%, sorbitol 1M, D-biotin $4 \times 10^{-5}\%$, aga 2%.

Môi trường sàng lọc BMM-phospholipit đậu nành: bazơ nitơ của nấm men (YNB) (chứa amoni sulfat, không có axit amin) 1,34%, D-biotin $4 \times 10^{-5}\%$, metanol 0,5% (được bổ sung sau khi khử trùng), nhũ tương lexithin đậu nành 2%, dung dịch đệm axit xitric natri xitrat 0,1M (pH = 6,6), aga 2%, và $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 10 μM được bổ sung.

Điều chế nhũ tương phospholipit đậu nành 2%: 2g phospholipit đậu nành và 100ml H_2O được cân và làm đồng nhất ở 8000rpm bằng máy đồng nhất hóa tốc độ cao trong 1 phút.

Môi trường lỏng BMGY: phần chiết nấm men 1%, pepton 2%, bazơ nitơ của nấm men (YNB) (chứa amoni sulfat, không có axit amin) 1,34%, glyxerol 1%, D-biotin $4 \times 10^{-5}\%$, dung dịch đệm kali dihydro phosphat-dikali hydro phosphat 0,1M (pH = 6,0).

BMMY môi trường lỏng: phần chiết nấm men 1%, pepton 2%, bazơ nitơ của nấm men (YNB) (chứa amoni sulfat và không có axit amin) 1,34%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,3%, metanol 0,5% (được bổ sung sau khi khử trùng), D-biotin $4 \times 10^{-5}\%$ (được bổ sung sau khi khử trùng), dung dịch đệm axit xitric-natri xitrat 0,1M (pH = 6,6).

3. Xác định hoạt tính enzym: phương pháp pNPPC

3.1. Vẽ đồ thị đường cong chuẩn của hoạt tính phospholipaza

0,01391g p-nitrophenol được cân và hòa tan trong 50ml nước vô khuẩn để pha chế dung dịch làm việc 2mmol/l. Xem bảng 1, các tác nhân khác nhau được bổ sung, đường cong chuẩn được tạo ra, và đường cong chuẩn thu được được thể hiện trong Fig.1. Điều

kiện để xác định hoạt tính enzym của mẫu phù hợp với điều kiện để tạo ra đường cong chuẩn.

Bảng 1: Các lượng của các tác nhân được bổ sung khi vẽ đồ thị đường cong chuẩn của hoạt tính phospholipaza.

Số	1	2	3	4	5	6	7
pNP 2,0mmol/l (μl)	0	7,5	15	22,5	30	37,5	45
ddH ₂ O (μl)	62,5	55	47,5	40	32,5	25	17,5
Dung dịch đệm cơ chất (ml)	562,5	562,5	562,5	562,5	562,5	562,5	562,5
tổng pNP (umol)	0	0,06	0,12	0,18	0,24	0,30	0,36

Sau khi các dung dịch nêu trên được trộn, nó được xử lý ở 37°C trong 15 phút, sau đó 500μl NaOH 0,5N được bổ sung. Hệ số hấp thụ ở 410nm được đo.

3.2. Điều chế dung dịch đệm phản ứng

Dung dịch đệm axit boric-natri borat 0,1M (pH = 7,6) chứa pNPPC 20mm.

600μl dung dịch đệm nêu trên được sử dụng, 25μl được bổ sung, và phản ứng ở 37°C trong 15 phút, sau đó 500μl NaOH 0,5N được bổ sung. Phản ứng được dừng lại và hệ số hấp thụ ở 410nm được xác định.

4. Tính hoạt tính enzym:

Hoạt tính enzym được tính theo công thức sau đây:

Hoạt tính enzym của mẫu (U/ml) = A (hệ số hấp thụ ở 410 nm) × 0,1935 × hệ số làm loãng × 10/15

5. Các tác nhân thử nghiệm nồng độ protein:

Bộ kit thử nghiệm nồng độ protein Modified Bradford (có sẵn từ Shanghai Sangon Bioengineering Co., Ltd.).

6. Các enzym được sử dụng trong thử nghiệm:

Sal I (có sẵn từ New England Biotechnology (Beijing) Co., Ltd.);

Polymeaza ADN: PrimeSTAR®HS DNA polymeaza (có sẵn từ Takara (Dalian) Co., Ltd.);

Ligaza ADN T4 (có sẵn từ Fermentas Co., Ltd.).

Ví dụ 1

Xây dựng và sàng lọc thư viện thể đột biến phospholipaza C

Vectơ pmAO-PLC-N63DN131SN134D-Y56H được điều chế theo phương pháp được mô tả trong CN 201510946696,1.

Vectơ pmAO-PLC-N63DN131SN134D-Y56H được sử dụng làm khuôn, thư viện của các axit amin ở các vị trí 6, 8, 10, 104 và 205 để gây đột biến bão hòa ngẫu nhiên được xây dựng bởi Synbio Technologies (Suzhou) Co., Ltd.. Thư viện plasmit này được biến nạp vào trong *E. coli* DH5 α , và tất cả các dòng vô tính *E. coli* thu được được rửa vào trong môi trường lỏng LB (chứa ampicilin 100 μ g/ml), được nuôi cấy ở 37°C trong 4 giờ. Plasmit này được chiết và tuyến tính hóa bằng Sall, và mảnh khoảng 8,5KB được thu hồi. 500ng vectơ được sử dụng và biến nạp vào trong các tế bào có đủ khả năng của chủng *Pichia pastoris* M314 bằng cách điện di. Các thể biến nạp được cấy lên các đĩa MGYS và ủ ở 30°C trong ba ngày để thu được thư viện thể đột biến *Pichia pastoris* của PLC-N63DN131SN134D-Y56H. Các dòng vô tính đơn trên đĩa được chọn ra và cấy lên đĩa sàng lọc BMM-phospholipit đậu nành. Các dòng vô tính với vòng tròn kết tủa màu trắng được chọn. Chủng đột biến thu được và được chỉ định là PLC-9-49.

Ví dụ 2

Phân tích trình tự của thể đột biến phospholipaza C

Chủng PLC-9-49 được cấy trong 3ml môi trường lỏng YPD ở 30°C qua đêm, và sau đó ADN hệ gen được chiết. ADN hệ gen của chủng PLC-9-49 được sử dụng làm khuôn. Khuếch đại PCR được thực hiện với PrimeSTAR®HS DNA polymeaza và cặp đoạn mồi AOX1-5/AOX1-3 để thu được trình tự ADN của chủng PLC-9-49, trong đó,

Trình tự của đoạn mồi AOX1-5 là 5'- GACTGGTTCCAATTGACAACG-3';

Trình tự của đoạn mồi AOX1-3 là 5'- GGCAAATGGCATTCTGACATCCTC-3'.

Các trình tự thu được được gửi đến Shanghai Sangon Bioengineering Co., Ltd. và được xác định trình tự bằng cặp đoạn mồi AOX1-5/AOX1-3. Các kết quả của việc xác định trình tự ADN của PLC-9-49 được thể hiện trong SEQ ID No: 3. Sau khi sắp thẳng hàng, so với SEQ ID No: 1, một vài bazơ trong SEQ ID No: 3 bị đột biến, trong đó lysin ở vị trí 6 bị đột biến thành prolin, lysin ở vị trí 8 bị đột biến thành isoleuxin, glyxin ở vị trí 10 bị đột biến thành threonin, lysin ở vị trí 104 bị đột biến thành glyxin, và serin ở vị

trí 205 bị đột biến thành tyrosin. Trình tự axit amin của PLC-9-49 được thể hiện trong SEQ ID No: 4.

Ví dụ 3

Phân tích độ ổn định nhiệt của thể đột biến PLC-9-49

Chủng PLC-9-49 và chủng PLC-N63DN131SN134D-Y56H được sử dụng và hoạt hóa trong YPD lỏng, và sau đó ủ trong môi trường BMGY ở 30°C qua đêm ở 220rpm. Giống nuôi cấy được cấy vào môi trường BMMY, trong đó OD₆₀₀ ban đầu bằng 6.

Trước tiên, việc gây cảm ứng được thực hiện bằng metanol 2%, được bổ sung metanol 1% sau 48 giờ và 56 giờ, tương ứng, và được lấy mẫu ở 72 giờ. Các mẫu thu được được cô 40 lần bằng cách khử muối siêu lọc bằng các ống siêu lọc có ngưỡng trọng lượng phân tử bằng 40kDa. Các mẫu đã được xử lý được bổ sung vào dung dịch đệm (dung dịch đệm axit xitric-natri xitrat 20mM (pH=6,6), ZnSO₄ 10uM).

Canh thang lên men đã được cô bằng cách siêu lọc được giữ ở 60°C, 65°C, 70°C và 75°C trong 2 giờ, và 0,5μl canh thang lên men đã được cô được bổ sung vào 600μl dung dịch đệm phản ứng pNPPC và phản ứng ở 37°C trong 15 phút, sau đó 500μl NaOH 0,5N được bổ sung để dừng phản ứng, và hệ số hấp thụ được đo ở 410nm. Theo đường cong chuẩn, hoạt tính của phospholipaza C được tính đối với mỗi mẫu lên men.

Độ ổn định nhiệt của PLC-9-49 và PLC-N63DN131SN134D-Y56H được thể hiện trên Fig.2. Sau khi xử lý ở 60°C trong 2 giờ, khả năng sống sót của thể đột biến PLC-9-49 còn lại 91%, trong lúc khả năng sống sót của PLC-N63DN131SN134D-Y56H giảm xuống 44%. Sau khi xử lý ở 70°C trong 2 giờ, khả năng sống sót của thể đột biến PLC-9-49 còn lại 83%, trong lúc khả năng sống sót của PLC-N63DN131SN134D-Y56H giảm xuống 13%. Sau khi xử lý ở 75°C trong 2 giờ, khả năng sống sót của thể đột biến PLC-9-49 còn lại 61%, trong lúc khả năng sống sót của PLC-N63DN131SN134D-Y56H giảm xuống 3%.

Có thể nhận thấy rằng độ ổn định nhiệt của PLC-9-49 cao hơn đáng kể độ ổn định nhiệt của PLC-N63DN131SN134D-Y56H.

Ví dụ 4

Thử nghiệm loại nhựa PLC-9-49

100g dầu đậu nành thô được gia nhiệt đến 55°C và 60°C, tương ứng để loại nhựa. Các mẫu PLC-9-49 và PLC-N63DN131SN134D-Y56H 50ppm được bổ sung tương ứng

để thu được pha nước 3% trong hệ thống, và cắt trong 1 phút bằng máy cắt tốc độ cao (10000 vòng/phút), khuấy trộn ở 55°C và 60°C (750 vòng/phút) trong 2 giờ, gia nhiệt đến 85°C và giữ trong 5 phút. Mẫu được ly tâm ở 12000rpm trong 10 phút, và khoảng 10g mẫu dầu ở trên được sử dụng. Mức DAG được xác định bằng HPLC. Lượng tăng DAG của mẫu PLC-9-49 và mẫu PLC-N63DN131SN134D-Y56H so với dầu thô được thể hiện trên Fig.3. Việc loại nhựa bằng cách sử dụng PLC-9-49 ở 60°C làm tăng lượng tăng của DAG khoảng 10% so với ở 55°C, trong lúc việc loại nhựa bằng cách sử dụng PLC-N63DN131SN134D-Y56H ở 60°C làm giảm lượng tăng của DAG khoảng 9,4% so với ở 55°C.

Có thể nhận thấy rằng nhiệt độ loại nhựa của PLC-9-49 cao hơn khoảng 5°C so với nhiệt độ loại nhựa của PLC-N63DN131SN134D-Y56H. Do đó, khả năng áp dụng công nghiệp của PLC-9-49 tốt hơn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit có hoạt tính phospholipaza C, trong đó polypeptit này bao gồm:

trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 với các thay thế axit amin ở một vài vị trí, trong đó một vài vị trí này là các vị trí 6, 8, 10, 104 và 205 của trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2; trong đó,

axit amin lysin ở vị trí 6 trong trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng prolin, glyxin, hydroxyprolin, serin hoặc threonin,

axit amin lysin ở vị trí 8 được thay thế bằng isoleuxin, leuxin, valin, methionin, alanin, phenylalanin hoặc n-leuxin,

axit amin glyxin ở vị trí 10 được thay thế bằng threonin hoặc serin,

axit amin lysin ở vị trí 104 được thay thế bằng glyxin hoặc prolin, và

axit amin serin ở vị trí 205 được thay thế bằng tyrosin, tryptophan, phenylalanin, hoặc threonin,

trong đó,

axit amin lysin ở vị trí 6 trong trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 2 được thay thế bằng prolin,

axit amin lysin ở vị trí 8 được thay thế bằng isoleuxin,

axit amin glyxin ở vị trí 10 được thay thế bằng threonin,

axit amin lysin ở vị trí 104 được thay thế bằng glyxin, và

axit amin serin ở vị trí 205 được thay thế bằng tyrosin,

và trong đó trình tự axit amin của polypeptit bao gồm trình tự axit amin thể hiện trong SEQ ID No: 4.

2. Phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit theo điểm 1.

3. Phân tử axit nucleic theo điểm 2, trong đó phân tử axit nucleic này có trình tự axit nucleic thể hiện trong SEQ ID No: 3.

4. Vector bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 2 hoặc 3.

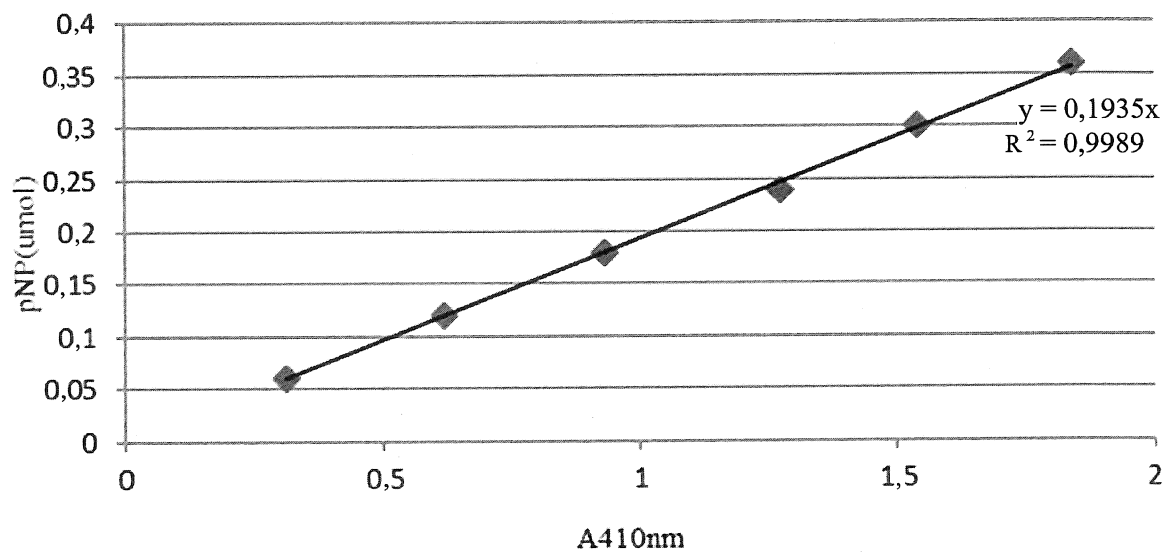
5. Vector theo điểm 4, trong đó vector này là vector biểu hiện.

6. Vector theo điểm 5, trong đó vector này được thiết kế để biểu hiện trong tế bào có nhân điển hình hoặc tế bào chưa có nhân điển hình.

7. Vector theo điểm 6, trong đó vector này được thiết kế để biểu hiện trong tế bào vi khuẩn, tế bào nấm, tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật.
8. Vector theo điểm 6, trong đó vector này được thiết kế để biểu hiện trong tế bào nấm men.
9. Tế bào bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 2 hoặc 3 hoặc vector theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 8.
10. Tế bào theo điểm 9, trong đó tế bào này là tế bào có nhân điển hình hoặc tế bào chưa có nhân điển hình.
11. Tế bào theo điểm 10, trong đó tế bào này là tế bào vi khuẩn, tế bào nấm, tế bào động vật có vú hoặc tế bào côn trùng.
12. Tế bào theo điểm 10, trong đó tế bào này là tế bào nấm men.
13. Phospholipaza C được tạo ra bởi tế bào theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 12.
14. Chế phẩm enzym, bao gồm polypeptit theo điểm 1, hoặc polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic theo điểm 2 hoặc 3, hoặc polypeptit được mã hóa bởi vector theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ điểm 4 đến 8, hoặc polypeptit được biểu hiện bởi tế bào theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ điểm 9 đến 12, hoặc phospholipaza C theo điểm 13 và ít nhất một enzym loại nhựa.
15. Chế phẩm enzym theo điểm 14, trong đó ít nhất một enzym loại nhựa được chọn từ nhóm bao gồm: phospholipaza A₁, phospholipaza A₂, phospholipaza B, phospholipaza D, pectinaza và mananaza.

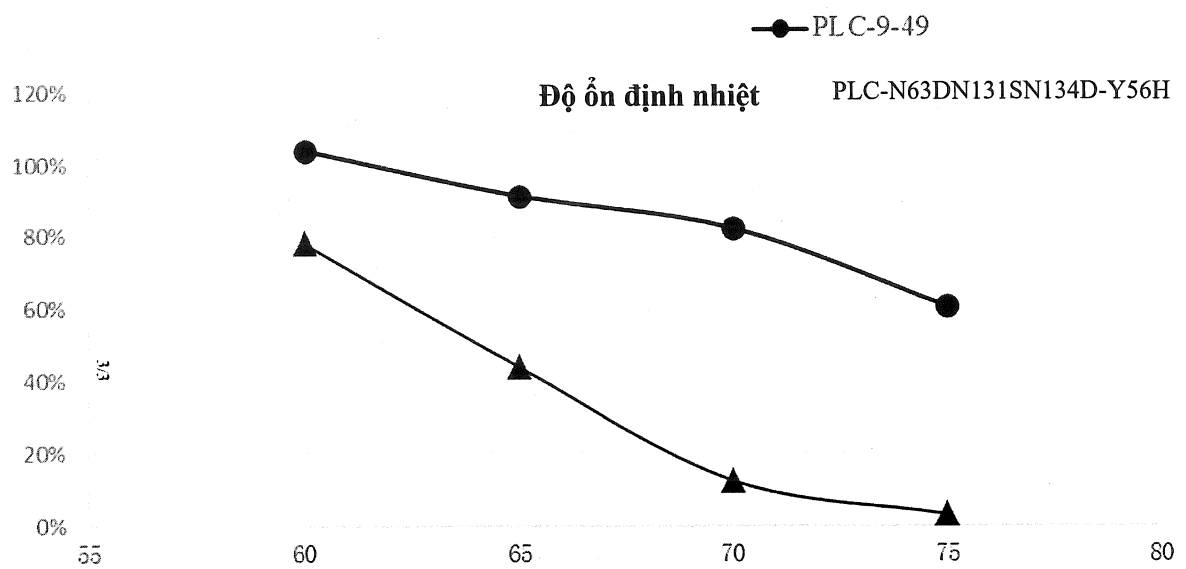
1/3

Fig. 1



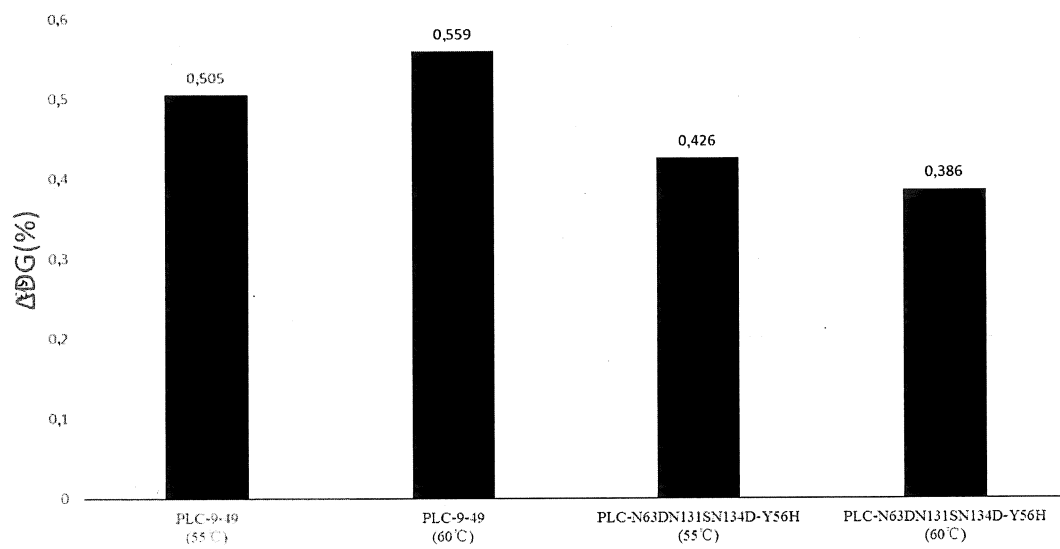
2/3

Fig. 2



3/3

Fig.3



Danh mục trình tự

<110> WILMAR (SHANGHAI) BIOTECHNOLOGY RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER CO., LTD

<120> POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH PHOSPHOLIPAZA C VÀ SỬ DỤNG NÓ

<130> 19A592

<150> CN 201811625457.6

<151> 2018-12-28

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 738

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit nucleic mã hóa PLC-N63DN131SN134D-Y56H

<400> 1

tggtcagctg aggacaagca taaggaaggt gtgaatagtc acttatggat cgtgaaccgt	60
gccattgata taatgtctag gaatacaact ctggttaagc aagatagagt tgctcaattg	120
aatgaatggc gtacagagct agagaatggc atctacgctg ctgatcatga aaaccctat	180
tacgatgaca gtaccttcgc ttctcacttt tacgatccag acaacggaaa gacatatatc	240
ccattcgcca agcaagctaa ggagactgga gctaagtact tcaagttggc tggagagtca	300
tacaagaata aagacatgaa gcaggccttc ttttatcttg ggttgctcatt gcattatttg	360
ggcgatgtca accaacctat gcatgccgca tcctttacgg acctgtccta tccacagggt	420
tttactcca agtacgagaa ctttgtcgat actattaaag acaactacaa agttaccgat	480
gggaacggat attggaattg gaaaggcacc aacctgaag aatggattca cggtgcagca	540
gtagttgcaa aacaggacta ctctggaatt gtcaatgaca ataccaaaga ttggtttggtg	600
aaagccgcag tctcccagga atatgcagat aaatggagag ctgaagttac acctatgact	660
ggtaaacgac taatggatgc ccaaagagtt actgctggtt acattcaatt atggttcgac	720
acttacgggtg acaggtaa	738

<210> 2

<211> 245

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của PLC-N63DN131SN134D-Y56H

<400> 2

Trp Ser Ala Glu Asp Lys His Lys Glu Gly Val Asn Ser His Leu Trp	
1 5 10 15	
Ile Val Asn Arg Ala Ile Asp Ile Met Ser Arg Asn Thr Thr Leu Val	
20 25 30	

Lys Gln Asp Arg Val Ala Gln Leu Asn Glu Trp Arg Thr Glu Leu Glu
 35 40 45
 Asn Gly Ile Tyr Ala Ala Asp His Glu Asn Pro Tyr Tyr Asp Asp Ser
 50 55 60
 Thr Phe Ala Ser His Phe Tyr Asp Pro Asp Asn Gly Lys Thr Tyr Ile
 65 70 75 80
 Pro Phe Ala Lys Gln Ala Lys Glu Thr Gly Ala Lys Tyr Phe Lys Leu
 85 90 95
 Ala Gly Glu Ser Tyr Lys Asn Lys Asp Met Lys Gln Ala Phe Phe Tyr
 100 105 110
 Leu Gly Leu Ser Leu His Tyr Leu Gly Asp Val Asn Gln Pro Met His
 115 120 125
 Ala Ala Ser Phe Thr Asp Leu Ser Tyr Pro Gln Gly Phe His Ser Lys
 130 135 140
 Tyr Glu Asn Phe Val Asp Thr Ile Lys Asp Asn Tyr Lys Val Thr Asp
 145 150 155 160
 Gly Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Lys Gly Thr Asn Pro Glu Glu Trp Ile
 165 170 175
 His Gly Ala Ala Val Val Ala Lys Gln Asp Tyr Ser Gly Ile Val Asn
 180 185 190
 Asp Asn Thr Lys Asp Trp Phe Val Lys Ala Ala Val Ser Gln Glu Tyr
 195 200 205
 Ala Asp Lys Trp Arg Ala Glu Val Thr Pro Met Thr Gly Lys Arg Leu
 210 215 220
 Met Asp Ala Gln Arg Val Thr Ala Gly Tyr Ile Gln Leu Trp Phe Asp
 225 230 235 240
 Thr Tyr Gly Asp Arg
 245

<210> 3
 <211> 738
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit nucleic mã hóa PLC-9-49

<400> 3
 tggtcagctg aggaccctca tattgaaact gtgaatagtc acttatggat cgtgaaccgt 60
 gccattgata taatgtctag gaatacaact ctggttaagc aagatagagt tgctcaattg 120
 aatgaatggc gtacagagct agagaatggc atctacgctg ctgatcatga aaaccctat 180
 tacgatgaca gtaccttcgc ttctcacttt tacgatccag acaacggaaa gacatatatc 240
 ccattcgcca agcaagctaa ggagactgga gctaagtact tcaagttggc tggagagtca 300
 tacaagaatg gggacatgaa gcaggccttc ttttatcttg ggttgctcatt gcattatttg 360
 ggcatgtca accaacctat gcatgccgca tcctttacgg acctgtccta tccacagggt 420
 tttcactcca agtacgagaa ctttgtcgat actattaaag acaactacaa agttaccgat 480
 gggaacggat attggaattg gaaaggcacc aaccctgaag aatggattca cgggtgcagca 540
 gtagttgcaa aacaggacta ctctggaatt gtcaatgaca ataccaaaga ttggtttgtg 600
 aaagccgcag tctatcagga atatgcagat aaatggagag ctgaagttac acctatgact 660
 ggtaaacgac taatggatgc ccaaagagtt actgctggtt acattcaatt atggttcgac 720

738

<213> trình tự nhân tạo

<223> trình tự axit amin của PLC-9-49

[illegible]