



- (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} C12P 21/00; C12N 9/42; C12N 1/00; (13) B
C12N 15/56



1-0048992

-
- (21) 1-2021-00546 (22) 27/06/2019
(86) PCT/JP2019/025547 27/06/2019 (87) WO/2020/008987 09/01/2020
(30) 2018-127519 04/07/2018 JP; 2018-211690 09/11/2018 JP
(45) 25/07/2025 448 (43) 26/04/2021 397A
(73) KAO CORPORATION (JP)
14-10, Nihonbashi Kayabacho 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-8210 Japan
(72) SHIBATA, Nozomu (JP); ARAI, Toshiharu (JP).
(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)
-

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PROTEIN

(21) 1-2021-00546

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp vi sinh vật hiệu quả và không đắt để sản xuất protein. Phương pháp sản xuất protein này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật trong điều kiện cung cấp hỗn hợp glucoza và amoniac.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein bằng cách sử dụng vi sinh vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nấm sợi sản xuất xenlulaza và xylanaza khác nhau, và thu hút sự chú ý vì nấm phân hủy polysaccarit thực vật. Cụ thể là, *Trichoderma* có khả năng sản xuất xenlulaza và xylanaza cùng một lúc với số lượng lớn, và đang được nghiên cứu làm vi sinh vật để sản xuất enzym phân hủy sinh khối trên cơ sở xenlulaza.

Trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật, glucoza trước đây thường được sử dụng làm nguồn cacbon. Tuy nhiên, khi có glucoza, cơ chế kiểm soát được gọi là ức chế dị hóa gây ra sự giảm hoặc bão hòa năng suất chất của vi sinh vật. Các yếu tố phiên mã miền rộng CreA, CreB, CreC, CreD và các yếu tố tương tự đã được báo cáo là liên quan đến quá trình ức chế dị hóa của nấm sợi chẳng hạn như *Aspergillus* (Tài liệu sáng chế 1). Có thể điều chỉnh sự ức chế dị hóa của *Aspergillus* bằng cách kiểm soát các yếu tố phiên mã này, nhưng vẫn chưa thu được kết quả xứng đáng. Đối với *Trichoderma*, việc phân tích cơ chế ức chế dị hóa đang được tiến hành (Tài liệu sáng chế 2 và Tài liệu phi sáng chế 1). Tuy nhiên, phần lớn cơ chế ức chế dị hóa của *Trichoderma* vẫn chưa rõ ràng và việc tránh ức chế vẫn chưa đạt được.

Việc sản xuất protein chẳng hạn như enzym bởi vi sinh vật có thể cần chất cảm ứng ngoài nguồn cacbon. Ví dụ, sự biểu hiện gen alpha-amylaza của *Aspergillus oryzae* được gây ra bởi tinh bột, mantoza và tương tự. Sự biểu hiện các gen xenlulaza chính cbh1, cbh2, egl1 và egl2 của *Trichoderma* được gây ra bởi xenluloza, xenlobioza và tương tự (Tài liệu phi sáng chế 2). Tinh bột, mantoza, xenluloza và xenlobioza có thể cũng được sử dụng làm nguồn cacbon để nuôi cấy. Trong quá trình sản xuất xenlulaza sử dụng vi sinh vật, xenluloza vi tinh thể như Avicel thường được sử dụng.

Tài liệu sáng chế 3 bộc lộ phương pháp sản xuất xenlulaza bằng vi sinh vật bằng cách sử dụng licnoxenluloza thay vì xenluloza nguyên chất làm chất cảm ứng. Trong Tài liệu sáng chế 3, xenlulaza được sản xuất bằng cách nuôi cấy *Trichoderma* với glucoza được cung cấp làm nguồn cacbon và axit phosphoric hoặc nước amoniac được cung cấp làm chất điều chỉnh độ pH trong môi trường nuôi cấy chứa vật liệu trên cơ sở xenluloza. Tài liệu phi sáng chế 3 bộc lộ axit amin được sản xuất bởi *Corynebacterium* với sacarit được cung cấp nhiều lần hoặc liên tục vào môi trường nuôi cấy. Tài liệu sáng chế 4 và Tài liệu phi sáng chế 4 bộc lộ lysin được sản xuất lên men bằng cách cung cấp dung dịch hỗn hợp glucoza và amoniac cho quá trình nuôi cấy, và bổ sung nguồn cacbon và nguồn nitơ đồng thời kiểm soát giá trị pH, và phương pháp này làm tăng năng suất của lysin.

Tài liệu sáng chế 1: JP-A-2015-39349

Tài liệu sáng chế 2: JP-A-11-512930

Tài liệu sáng chế 3: US 2008/0199908A

Tài liệu sáng chế 4: CN 101967501C

Tài liệu phi sáng chế 1: Appl. Environ. Microbiol., 63: 1298-1306 (1997)

Tài liệu phi sáng chế 2: Curr. Genomics, 14: 230-249 (2013)

Tài liệu phi sáng chế 3: Tạp chí Công nghệ sinh học, 104: 155-172 (2003)

Tài liệu phi sáng chế 4: Tạp chí của Trung Quốc về quy trình kỹ thuật, 11(3):
492-496 (2011)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất protein, trong đó phương pháp này bao gồm nuôi cấy vi sinh vật trong điều kiện cung cấp hỗn hợp glucoza và amoniac.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện lượng tích lũy (A) và lượng hàng giờ (B) của glucoza được cung cấp cho quá trình nuôi cấy trong mỗi Ví dụ 1 và Ví dụ so sánh 2.

Fig. 2 thể hiện sự thay đổi phụ thuộc vào thời gian của tốc độ khuấy trong quá trình nuôi cấy trong mỗi Ví dụ 1 và Ví dụ so sánh 1 và 2.

Fig. 3 thể hiện lượng tương đối của protein được sản xuất trong mỗi Ví dụ 1 và Ví dụ so sánh 1 và 2. Mỗi giá trị là giá trị tương đối so với lượng protein được

sản xuất vào ngày thứ 4 của quá trình nuôi cấy trong Ví dụ so sánh 1, được xác định là 100%.

Fig. 4 thể hiện lượng tương đối của protein được sản xuất trong mỗi Ví dụ 2 và Ví dụ so sánh 3. Mỗi giá trị là giá trị tương đối so với lượng protein được sản xuất trong Ví dụ so sánh 3, được xác định là 100%.

Fig. 5 thể hiện lượng hàng giờ của glucoza được cung cấp cho quá trình nuôi cấy được nuôi cấy sử dụng dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 2,5% trong Ví dụ 2.

Fig. 6 thể hiện lượng tương đối của protein được sản xuất trên mỗi nguồn cacbon được sử dụng trong mỗi Ví dụ 2 và Ví dụ so sánh 3. Mỗi giá trị là giá trị tương đối so với lượng protein được sản xuất trong Ví dụ so sánh 3, được xác định là 100%.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tất cả các tài liệu sáng chế, tài liệu phi sáng chế và các ấn phẩm khác được trích dẫn ở đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Như được sử dụng ở đây, "ngược chiều" và "xuôi chiều" đối với gen có nghĩa là ngược chiều và xuôi chiều theo hướng phiên mã của gen. Ví dụ, "gen nằm xuôi chiều vùng khởi động" có nghĩa là gen hiện diện ở phía 3' của vùng khởi động trong sợi cảm giác ADN, và ngược chiều của gen có nghĩa là vùng ở phía 5' của gen trong sợi cảm giác ADN.

Như được sử dụng ở đây, "liên kết một cách có thể hoạt động" giữa vùng khởi động và gen có nghĩa là vùng khởi động và gen được liên kết theo cách mà vùng khởi động có thể gây ra sự phiên mã của gen. Cách thực hiện đối với "liên kết một cách có thể hoạt động" giữa vùng khởi động và gen đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được sử dụng ở đây, "hoạt động của vùng khởi động" có nghĩa là hoạt động thúc đẩy sự biểu hiện gen nằm xuôi chiều vùng khởi động, cụ thể hơn là hoạt động thúc đẩy sự chuyển gen nằm xuôi chiều vùng khởi động từ ADN sang mRNA.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "nội tại" được sử dụng liên quan đến các chức năng, đặc tính và đặc điểm của tế bào được sử dụng để chỉ ra rằng các chức năng, đặc tính và đặc điểm vốn có trong tế bào. Ngược lại, thuật ngữ "ngoại lai" được sử dụng để chỉ các chức năng, đặc tính và đặc điểm không sẵn có trong tế bào, mà được đưa vào từ bên ngoài. Ví dụ, gen hoặc polynucleotit "ngoại lai" là gen hoặc polynucleotit được đưa vào tế bào từ bên ngoài. Gen hoặc polynucleotit ngoại lai có thể là gen hoặc polynucleotit có nguồn gốc từ sinh vật giống hệt loài với tế bào trong đó gen hoặc polynucleotit ngoại lai đã được đưa vào, hoặc gen hoặc polynucleotit có nguồn gốc từ sinh vật khác loài với tế bào (tức là, gen hoặc polynucleotit khác loài).

Như được sử dụng ở đây, "đồng nhất ít nhất 90%" liên quan đến trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit có nghĩa là đồng nhất 90% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 95% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 96% hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 97% hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 98% hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 99% hoặc lớn hơn.

Như được sử dụng ở đây, đồng nhất trình tự nucleotit và trình tự axit amin được tính bằng phương pháp Lipman-Pearson (Science, 1985, 227: 1435-1441). Cụ thể, sự đồng nhất được tính bằng cách thực hiện phân tích với kích thước đơn vị để so sánh (ktup) bằng 2 bằng cách sử dụng chương trình phân tích tương đồng (Tìm kiếm sự tương đồng) của phần mềm xử lý thông tin gen Genetyx-Win.

Cần phát triển kỹ thuật nuôi cấy hiệu quả và không đắt để sản xuất protein chẳng hạn như enzym bởi vi sinh vật. Bằng cách nuôi cấy theo mẻ trong đó glucoza được cung cấp nhiều lần hoặc liên tục cho quá trình nuôi cấy, sự ức chế dị hóa có thể bị ngăn chặn để cải thiện năng suất protein bằng vi sinh vật. Tuy nhiên, được dự đoán rằng trong quá trình sản xuất protein bằng cách nuôi cấy theo mẻ, việc kiểm soát chính xác nồng độ glucoza trong nuôi cấy là cần thiết vì quá trình tổng hợp protein không tiến hành đầy đủ khi lượng glucoza nhỏ, và mặt khác, việc cung cấp lượng lớn glucoza gây ra sự ức chế dị hóa. Hơn nữa, được dự đoán rằng do quá trình sản xuất protein bằng cách nuôi cấy theo mẻ yêu

cầu cung cấp nguồn nitơ ngoài glucoza, cần lắp đặt các dây chuyền cung cấp tương ứng để kiểm soát nồng độ glucoza và nguồn nitơ.

Các tác giả sáng chế đã sản xuất protein chẳng hạn như enzym bằng cách trộn dung dịch nước amoniac, được biết đến với vai trò là nguồn nitơ và chất điều chỉnh độ pH, với glucoza trước, và nuôi cấy vi sinh vật trong khi cung cấp hỗn hợp thu được. Kết quả là, trái ngược với dự đoán được mô tả ở trên, được phát hiện ra rằng protein có thể được sản xuất với năng suất cao mà không yêu cầu kiểm soát chính xác nồng độ glucoza và chỉ sử dụng một dây chuyền cung cấp. Hơn nữa, thật bất ngờ, được phát hiện ra rằng phương pháp này cải thiện hơn nữa năng suất protein so với phương pháp trong đó dung dịch nước amoniac và glucoza được cung cấp riêng biệt.

Theo sáng chế, năng suất protein của vi sinh vật có thể được cải thiện theo cách thực hiện thuận tiện. Phương pháp theo sáng chế cải thiện hơn nữa năng suất protein so với phương pháp trong đó dung dịch nước amoniac và glucoza được cung cấp riêng biệt. Hơn nữa, phương pháp theo sáng chế liên quan đến số lượng nhỏ dây chuyền cung cấp, không yêu cầu kiểm soát chính xác việc cung cấp, và do đó làm giảm lượng thời gian, nhân công và chi phí dùng cho việc nuôi cấy trong khi cải thiện năng suất protein so với phương pháp trong đó dung dịch nước amoniac và glucoza được cung cấp riêng biệt.

Phương pháp sản xuất protein theo sáng chế bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật trong điều kiện cung cấp hỗn hợp glucoza và amoniac.

Hỗn hợp glucoza và amoniac là hỗn hợp lỏng được chuẩn bị bằng cách trộn glucoza và amoniac. Ví dụ, hỗn hợp là hỗn hợp của glucoza, amoniac và dung môi của chúng (ví dụ, nước). Tốt hơn là, hỗn hợp là hỗn hợp được chuẩn bị bằng cách trộn glucoza hoặc dung dịch nước của nó, và amoniac, muối của nó hoặc dung dịch nước của nó, và nước nếu cần. Tốt hơn nữa là, hỗn hợp là hỗn hợp thu được bằng cách trộn glucoza, và dung dịch nước amoniac, và nước nếu cần. Để chuẩn bị hỗn hợp glucoza và amoniac, glucoza và amoniac có thể được trộn với tỷ lệ khối lượng tốt hơn là từ 0,5 đến 10 : 1, tốt hơn nữa là từ 2 đến 8 : 1. Khi tỷ lệ glucoza quá cao, tế bào có xu hướng thực hiện sự chuyển tiếp từ trạng thái sản xuất enzym sang trạng thái phát triển, dẫn đến giảm năng suất enzym. Mặt khác, khi tỷ lệ glucoza quá thấp, lượng nguồn cacbon không đủ, và kết quả là, không thể mong đợi sự cải thiện năng suất enzym. Khi chuẩn bị hỗn hợp glucoza và amoniac, lượng glucoza được bổ sung vào có thể được điều chỉnh tốt hơn là từ 2 đến 90 g, tốt hơn nữa là từ 5 đến 80 g trên mỗi 100 mL hỗn hợp thu được. Khi lượng glucoza được bổ sung vào hỗn hợp quá nhỏ, một lượng lớn hỗn hợp được cung cấp vào môi trường nuôi cấy, do đó thiết bị nuôi cấy bị quá tải. Mặt khác, khi lượng glucoza được bổ sung vào hỗn hợp quá lớn, rất khó kiểm soát lượng hỗn hợp được cung cấp cho quá trình nuôi cấy. Ví dụ, hỗn hợp có thể

được chuẩn bị bằng cách trộn lượng glucoza thích hợp và dung dịch nước amoniac để có thể đạt được tỷ lệ glucoza so với amoniac được mô tả ở trên và/hoặc lượng glucoza được bổ sung vào, hoặc có thể được chuẩn bị bằng cách trộn một lượng glucoza bất kỳ và dung dịch nước amoniac, và sau đó pha loãng hỗn hợp thu được với nước một cách thích hợp để có thể đạt tỷ lệ glucoza so với amoniac được mô tả ở trên và/hoặc lượng glucoza được bổ sung vào.

Độ pH của hỗn hợp glucoza và amoniac ở 25°C tốt hơn là độ pH kiềm, tốt hơn nữa là 8 hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn là 9 hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 10 hoặc lớn hơn, và tốt hơn là 13 hoặc nhỏ hơn. Tốt hơn là, độ pH của hỗn hợp được điều chỉnh nằm trong phạm vi được mô tả ở trên bằng cách sử dụng chất điều chỉnh độ pH chẳng hạn như chất kiềm nếu cần. Độ pH của hỗn hợp có thể được đo bằng cách sử dụng máy đo độ pH thông thường. Ví dụ, sử dụng điện cực hàn phức hợp đo độ pH (ví dụ, Ground Glass Sleeve Type do HORIBA, Ltd. sản xuất) được kết nối với máy đo độ pH (pH/Ion Meter F-52 do HORIBA Ltd. sản xuất). Dung dịch nước kali clorua bão hòa (3,33 mol/L) được sử dụng làm chất lỏng bên trong điện cực pH. Phép đo được thực hiện ở 25°C. Tốt hơn là, hỗn hợp glucoza và amoniac được sử dụng làm chất điều chỉnh độ pH tốt hơn là cho nuôi cấy.

Hỗn hợp glucoza và amoniac có thể chứa thêm các chất khác có thể được bổ sung một cách điển hình vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật. Các chất khác

tốt hơn là các chất không làm suy giảm chức năng điều chỉnh độ pH của hỗn hợp, và các ví dụ của chúng bao gồm muối hữu cơ, muối vô cơ, các chất điều chỉnh độ pH khác, nguồn cacbon và nguồn nitơ ngoài glucoza và amoniac, chất hoạt động bề mặt, và chất khử bọt.

Trong phương pháp theo sáng chế, hỗn hợp glucoza và amoniac được cung cấp cho nuôi cấy vi sinh vật. Lượng hỗn hợp được cung cấp vào môi trường nuôi cấy tốt hơn là 8 g/giờ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 6 g/giờ hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn nữa là từ 0,05 đến 8 g/giờ, thậm chí tốt hơn nữa là từ 0,1 đến 6 g/giờ trên mỗi lít (L) môi trường nuôi cấy ban đầu (môi trường nuôi cấy không được cung cấp hỗn hợp) xét về lượng glucoza được bổ sung vào hỗn hợp. Khi lượng glucoza được cung cấp lớn, ức chế dị hóa có thể xảy ra. Mặt khác, lượng hỗn hợp (toàn bộ) được cung cấp vào môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh thích hợp theo hàm lượng glucoza hoặc amoniac, hoặc độ pH của môi trường nuôi cấy như được mô tả bên dưới, và không bị giới hạn đặc biệt. Từ quan điểm về hiệu quả kinh tế, lượng hỗn hợp (toàn bộ) được cung cấp có thể được điều chỉnh tới khoảng từ 0,1 đến 10 g/giờ, tốt hơn là khoảng từ 0,3 đến 8 g/giờ trên mỗi lít (L) môi trường nuôi cấy ban đầu.

Tốt hơn là, độ pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh bằng cách cung cấp hỗn hợp glucoza và amoniac vào nuôi cấy vi sinh vật theo phương pháp của sáng chế. Trong trường hợp này, lượng hỗn hợp được cung cấp và thời

gian cung cấp hỗn hợp phụ thuộc vào độ pH của môi trường nuôi cấy mà hỗn hợp được cung cấp. Thích hợp, môi trường nuôi cấy ban đầu có độ pH xác định trước được chuẩn bị theo cách thực hiện thông thường, tiếp theo là nuôi cấy trong khi hỗn hợp glucoza và amoniac được cung cấp theo cách như vậy sao cho môi trường nuôi cấy sau khi được cung cấp duy trì giá trị pH xác định trước. Trong khi tốt hơn là chỉ sử dụng hỗn hợp glucoza và amoniac để điều chỉnh độ pH của môi trường nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy, có thể sử dụng kết hợp chất điều chỉnh độ pH khác. Việc đo độ pH của môi trường nuôi cấy và kiểm soát lượng được cung cấp dựa trên giá trị độ pH có thể được thực hiện bằng cách sử dụng bình lên men có sẵn trên thị trường hoặc tương tự. Độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được thiết lập tới giá trị thích hợp tùy theo loài sinh vật và loại protein được sản xuất. Ví dụ, khi vi sinh vật là nấm sợi, môi trường nuôi cấy được duy trì ở độ pH tốt hơn là từ 3 đến 7, tốt hơn nữa là từ 3,5 đến 6. Nói chung, độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được đo bằng điện cực được cung cấp trong bình lên men. Thích hợp, độ pH của môi trường nuôi cấy theo sáng chế là giá trị được đo bằng cảm biến pH chẳng hạn như Điện cực pH có thể hấp tiệt trùng F-635 (Broadley-James Corp) hoặc cảm biến pH 405-DPAS-SC-K8S (METTLER TOLEDO) ở nhiệt độ môi trường nuôi cấy 28°C.

Theo sáng chế, môi trường nuôi cấy ban đầu được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật (môi trường nuôi cấy mà hỗn hợp glucoza và amoniac không được cung

cấp) có thể là môi trường nuôi cấy thường được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật. Ví dụ, môi trường nuôi cấy ban đầu có thể chứa các thành phần khác nhau thường có trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật, chẳng hạn như nguồn cacbon, nguồn nitơ, các muối kim loại chẳng hạn như muối magie, muối kẽm, sulfat, phosphat, chất điều chỉnh độ pH, chất hoạt động bề mặt và chất khử bọt. Chế phẩm gồm các thành phần trong môi trường nuôi cấy có thể được chọn thích hợp. Môi trường nuôi cấy ban đầu có thể là bất kỳ trong số môi trường nuôi cấy tổng hợp, môi trường nuôi cấy tự nhiên và môi trường nuôi cấy bán tổng hợp, hoặc có thể là môi trường nuôi cấy có sẵn trên thị trường. Môi trường nuôi cấy ban đầu tốt hơn là môi trường nuôi cấy lỏng.

Tốt hơn là, vi sinh vật được nuôi cấy với sự hiện diện của chất gây ra sự biểu hiện gen mã hóa protein đích theo phương pháp của sáng chế. Điều này cho phép nâng cao hơn nữa năng suất protein đích. Cụ thể hơn, môi trường nuôi cấy vi sinh vật có thể chứa chất cảm ứng. Ví dụ, chất cảm ứng có thể được chứa trong môi trường nuôi cấy ban đầu, được cung cấp cho nuôi cấy, hoặc vừa được chứa vừa được cung cấp. Các ví dụ được ưu tiên về chất cảm ứng bao gồm xenluloza và xenlobioza, và một hoặc cả hai chất có thể được sử dụng. Xenluloza hoặc xenlobioza trong môi trường nuôi cấy có thể được tiêu thụ như nguồn cacbon trong khi hoạt động như chất cảm ứng. Nồng độ xenluloza hoặc xenlobioza trong môi trường nuôi cấy tốt hơn là từ 1 đến 15% khối lượng/thể

tích dưới dạng tổng nồng độ xenluloza và xenlobioza. Ví dụ, khi xenluloza hoặc xenlobioza được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ban đầu, nồng độ xenluloza hoặc xenlobioza trong môi trường nuôi cấy ban đầu tốt hơn là từ 1 đến 15% khối lượng/ thể tích dưới dạng tổng nồng độ xenluloza và xenlobioza. Được biết rằng sự biểu hiện gen xenlulaza của nấm sợi chẳng hạn như *Trichoderma* được gây ra bởi xenluloza, xenlobioza hoặc tương tự, và ức chế dị hóa được gây ra bởi glucoza (Tài liệu sáng chế 2 và Tài liệu phi sáng chế 1 và 2). Do đó, phương pháp theo sáng chế sử dụng chất cảm ứng một cách thích hợp để sản xuất xenlulaza bằng nấm sợi.

Ngoài ra, gen mã hóa protein đích được liên kết với vùng khởi động được gây ra bởi xenluloza hoặc xenlobioza, chẳng hạn như vùng khởi động của gen mã hóa xenlulaza của nấm sợi (được gọi là vùng khởi động gen xenlulaza của nấm sợi), nhờ đó biểu hiện gen của protein đích có thể được gây ra bởi xenluloza hoặc xenlobioza. Do đó, theo phương án ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, vi sinh vật được nuôi cấy với sự hiện diện của ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm xenluloza và xenlobioza, vi sinh vật chứa vùng khởi động được gây ra bởi xenluloza hoặc xenlobioza, và gen mã hóa protein đích được liên kết hoạt động xuôi chiều vùng khởi động.

Các ví dụ về vùng khởi động được gây ra bởi xenluloza hoặc xenlobioza bao gồm vùng khởi động của gen xenlulaza hoặc gen xylanaza của nấm sợi. Các

ví dụ về vùng khởi động của gen xenlulaza của nấm sợi bao gồm vùng khởi động của gen xenlulaza của nấm *Trichoderma*, và các ví dụ được ưu tiên của chúng bao gồm vùng khởi động của gen xenlulaza của *Trichoderma reesei* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Các ví dụ về vùng khởi động của gen xylanaza của nấm sợi bao gồm vùng khởi động của gen xylanaza của nấm *Trichoderma*, và các ví dụ được ưu tiên của chúng bao gồm vùng khởi động của gen xylanaza của *Trichoderma reesei* có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 3. Các ví dụ thêm nữa về vùng khởi động được gây ra bởi xenluloza hoặc xenlobioza bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit có sự đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự nucleotit bất kỳ trong số các trình tự nucleotit SEQ ID NO: 1 đến 3 và có hoạt động vùng khởi động được gây ra bởi xenluloza hoặc xenlobioza.

Vùng khởi động có thể là vùng khởi động nội tại với vi sinh vật được nuôi cấy theo phương pháp của sáng chế, hoặc vùng khởi động ngoại lai được đưa vào vi sinh vật. Liên kết của vùng khởi động như vậy với gen mã hóa protein đích có thể được thực hiện theo cách thực hiện đã biết chẳng hạn như phương pháp enzym giới hạn hoặc phương pháp tái tổ hợp tương đồng. Ví dụ, vector hoặc đoạn ADN có polynucleotit chứa gen mã hóa protein đích được đưa vào tế bào vi sinh vật, và polynucleotit được kết hợp xuôi chiều vùng khởi động đích trong bộ gen, nhờ đó vùng khởi động và gen mã hóa protein đích được liên kết hoạt động trên bộ gen. Ngoài ra, vector hoặc đoạn ADN có trình tự vùng khởi

động và polynucleotit chứa gen mã hóa protein đích được liên kết xuôi chiều trình tự vùng khởi động có thể được cấu tạo, và được đưa vào tế bào vi sinh vật. Nếu cần, vectơ hoặc đoạn ADN có thể có thêm các dấu hiệu chọn lọc chẳng hạn như gen kháng thuốc kháng sinh và gen liên quan đến hiện tượng dinh dưỡng thụ động.

Vectơ có thể là vectơ có khả năng tự tăng lên nhiều và sao chép bên ngoài nhiễm sắc thể chẳng hạn như plasmit, hoặc có thể là vectơ được kết hợp trong nhiễm sắc thể. Loại vectơ được ưu tiên phụ thuộc vào loài vi sinh vật mà vectơ được đưa vào. Các ví dụ được ưu tiên về vectơ đối với nấm sợi bao gồm, nhưng không giới hạn ở, plasmit chứa AMA1 hoạt động như yếu tố tự sao chép ở vi sinh vật *Aspergillus*.

Để đưa vectơ hoặc đoạn ADN vào vi sinh vật, có thể sử dụng phương pháp biến nạp tổng quát, chẳng hạn như phương pháp điện di, phương pháp biến nạp, phương pháp chuyển nạp, phương pháp liên hợp, phương pháp nguyên sinh chất, phương pháp súng hạt hoặc phương pháp vi khuẩn nông.

Vi sinh vật có vectơ đích hoặc đoạn ADN được đưa vào trong đó có thể được chọn bằng cách sử dụng điểm đánh dấu sự lựa chọn. Ví dụ, khi dấu hiệu lựa chọn là gen kháng thuốc kháng sinh, vi sinh vật có vectơ đích hoặc đoạn ADN được đưa vào trong đó có thể được chọn bằng cách nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy chứa kháng sinh. Ví dụ, khi điểm đánh dấu sự lựa

chọn là gen liên quan đến hiện tượng dinh dưỡng thụ động chẳng hạn như gen liên quan đến tổng hợp axit amin hoặc gen liên quan đến tổng hợp bazơ, gen này được đưa vào vật chủ có hiện tượng dinh dưỡng thụ động, tiếp theo bằng cách sử dụng sự tồn tại hoặc không tồn tại của hiện tượng dinh dưỡng thụ động như một chỉ số để từ đó chọn vi sinh vật có vector đích hoặc đoạn ADN được đưa vào trong đó. Ngoài ra, trình tự ADN của vi sinh vật có thể được kiểm tra bằng PCR hoặc tương tự để xác nhận việc đưa vào vector đích hoặc đoạn ADN.

Gen mã hóa protein đích, được liên kết với vùng khởi động, có thể được liên kết với peptit tín hiệu kích thích bài tiết. Do liên kết với peptit tín hiệu kích thích bài tiết, protein đích được biểu hiện được tiết ra bên ngoài tế bào, và do đó protein đích có thể được phân lập từ dịch nổi nuôi cấy mà không phá hủy tế bào vi sinh vật. Các ví dụ về peptit tín hiệu kích thích bài tiết bao gồm peptit tín hiệu có nguồn gốc từ xenlobiohydrolaza 1 của *Trichoderma reesei*, alpha-amylaza của *Aspergillus oryzae*, glucoamylaza của *Rhizopus oryzae* hoặc yếu tố alpha của *Saccharomyces cerevisiae*.

Các ví dụ về protein đích được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm oxidoreductaza, transferaza, hydrolaza, lyaza, isomeraza, ligaza hoặc synthetaza, enzym tiêu đường, lactat synthetaza (LDH v.v.), enzym chu trình axit tricarboxylic (TCA). Protein đích có thể là protein nội tại đối với vi sinh vật được nuôi cấy bằng phương pháp theo sáng chế, hoặc có thể là protein ngoại lai.

Các ví dụ được ưu tiên về protein đích bao gồm các enzym liên quan đến quá trình phân hủy sinh khối hoặc đường hóa sinh khối. Các ví dụ về enzym liên quan đến quá trình phân hủy sinh khối hoặc đường hóa sinh khối bao gồm xenlulaza (ví dụ, β -endoglucanaza, xenlobiohydrolaza và β -glucosidaza), hemixenlulaza (ví dụ, endoxylanaza, β -xylosidaza, arabinofuranosidaza, glucuronidaza, axetylxylan esteraza, mannanaza, β -mannosidaza và esteraza axit ferulic), và xylanaza. Trong số này, xenlulaza được ưu tiên. Enzym liên quan đến quá trình phân hủy sinh khối hoặc đường hóa sinh khối tốt hơn là enzym có nguồn gốc từ nấm sợi, tốt hơn nữa là enzym có nguồn gốc từ nấm *Trichoderma*.

Các ví dụ về vi sinh vật được nuôi cấy theo phương pháp của sáng chế bao gồm vi khuẩn, nấm men và nấm sợi. Trong số này, nấm sợi được ưu tiên. Các ví dụ về nấm sợi bao gồm *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Rhizopus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyptocladium*, *Trametes* và *Trichoderma*. Trong số này, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia* và *Trichoderma* được ưu tiên, và *Trichoderma* được ưu tiên hơn. Là nấm *Trichoderma*,

Trichoderma reesei và các biến thể của chúng được ưu tiên. Các ví dụ về *Trichoderma reesei* và các biến thể của chúng bao gồm chủng *Trichoderma reesei* QM9414 và các biến thể của chúng.

Các điều kiện nuôi cấy vi sinh vật theo sáng chế có thể được xác định một cách thích hợp theo thông thường tùy thuộc vào loài vi sinh vật và quy mô nuôi cấy.

Sau đó, protein đích được thu thập từ quá trình nuôi cấy. Khi protein này được tiết ra trong dịch nổi nuôi cấy, protein có thể được thu thập từ dịch nổi nuôi cấy. Khi protein được chứa trong các tế bào, các tế bào bị phá hủy, và phần chứa protein được chiết xuất, và sử dụng để thu thập protein. Protein có thể được thu thập bằng phương pháp thường được sử dụng trong lĩnh vực này, chẳng hạn như gạn, tách màng, ly tâm, thẩm tách bằng điện, sử dụng nhựa trao đổi ion, chưng cất, tách muối hoặc sự kết hợp các phương pháp đó. Protein đích được thu thập có thể được phân lập hoặc tinh chế thêm.

Khi protein đích được tiết ra trong dịch nổi nuôi cấy, vi sinh vật được sử dụng để sản xuất protein theo sáng chế có thể được sử dụng nhiều lần. Nghĩa là, các tế bào vi sinh vật được tách ra khỏi dịch nổi nuôi cấy được thu thập, gieo lại vào môi trường nuôi cấy ban đầu, và nuôi cấy trong khi hỗn hợp glucoza và amoniac được cung cấp, nhờ đó protein đích có thể được sản xuất lại.

Phương pháp sản xuất protein theo sáng chế có thể là phương pháp theo mẻ trong đó việc nuôi cấy vi sinh vật được luân phiên với việc thu thập protein được tích lũy trong quá trình nuôi cấy và thay thế môi trường nuôi cấy, hoặc phương pháp bán liên tục hoặc liên tục trong đó việc nuôi cấy vi sinh vật và thu thập protein được thực hiện song song trong khi vi sinh vật và môi trường nuôi cấy được thay thế một phần không liên tục hoặc liên tục.

Như các phương án minh họa của sáng chế, các chất, phương pháp sản xuất, cách sử dụng, phương pháp và tương tự sau được bộc lộ ở đây. Cần lưu ý rằng sáng chế không bị giới hạn ở các phương án này.

(1) Phương pháp sản xuất protein, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật trong điều kiện cung cấp hỗn hợp glucoza và amoniac.

(2) Phương pháp theo điểm (1), trong đó tốt hơn là, việc nuôi cấy được thực hiện với sự hiện diện của ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm xenluloza và xenlobioza.

(3) Phương pháp theo điểm (2), trong đó tốt hơn là, vi sinh vật chứa vùng khởi động cảm ứng xenluloza hoặc vùng khởi động cảm ứng xenlobioza, và

vùng khởi động:

tốt hơn là vùng khởi động gen xenlulaza của nấm sợi hoặc vùng khởi động gen xylanaza của nấm sợi,

tốt hơn nữa là vùng khởi động gen xenlulaza của nấm *Trichoderma* hoặc

vùng khởi động gen xylanaza của nấm *Trichoderma*.

(4) Phương pháp theo điểm (3), trong đó tốt hơn là, gen mã hóa protein được liên kết xuôi chiều vùng khởi động.

(5) Phương pháp theo điểm (4), trong đó tốt hơn là, vùng khởi động là vùng khởi động gen xenlulaza của nấm sợi, và protein là enzym.

(6) Phương pháp theo điểm (4) hoặc (5), trong đó tốt hơn là protein là enzym, tốt hơn là enzym liên quan đến quá trình phân hủy sinh khối hoặc đường hóa sinh khối, tốt hơn nữa là xenlulaza, và

enzym liên quan đến quá trình phân hủy sinh khối hoặc đường hóa sinh khối tốt hơn là enzym có nguồn gốc từ nấm sợi, tốt hơn nữa là enzym có nguồn gốc từ nấm *Trichoderma*, thậm chí tốt hơn nữa là xenlulaza có nguồn gốc từ nấm sợi, thậm chí tốt hơn nữa là xenlulaza có nguồn gốc từ nấm *Trichoderma*.

(7) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (6), trong đó hỗn hợp được cung cấp với lượng tốt hơn là 8 g/giờ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 6 g/giờ hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn nữa là từ 0,05 đến 8 g/giờ, thậm chí tốt hơn nữa là từ 0,1 đến 6 g/giờ trên mỗi lít (L) môi trường nuôi cấy ban đầu xét về lượng glucoza được bổ sung vào hỗn hợp.

(8) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (7), trong đó bằng cách cung cấp hỗn hợp, độ pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh tốt hơn là từ 3 đến 7, tốt hơn nữa là từ 3,5 đến 6.

(9) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (8), trong đó hỗn hợp chứa glucoza và amoniac ở tỷ lệ khối lượng tốt hơn là từ 0,5 đến 10 : 1, tốt hơn nữa là từ 2 đến 8 : 1.

(10) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (9), trong đó tốt hơn là, hỗn hợp chứa glucoza với lượng từ 2 đến 90 g trên mỗi 100 mL.

(11) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (10), trong đó độ pH của hỗn hợp tốt hơn là độ pH kiềm, tốt hơn nữa là 8 hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 9 hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 10 hoặc lớn hơn, và tốt hơn là 13 hoặc nhỏ hơn ở 25°C.

(12) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (11), trong đó vi sinh vật tốt hơn là nấm sợi.

(13) Phương pháp theo điểm (12), trong đó nấm sợi tốt hơn là nấm *Trichoderma*.

(14) Phương pháp theo điểm (13), trong đó nấm *Trichoderma* tốt hơn là *Trichoderma reesei*.

(15) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (2) đến (12), trong đó vi sinh vật tốt hơn là nấm sợi, và protein tốt hơn là enzym liên quan đến quá trình phân hủy sinh khối hoặc glycosyl hóa sinh khối, và tốt hơn nữa là xenlulaza.

(16) Phương pháp theo điểm (15), trong đó nấm sợi tốt hơn là nấm *Trichoderma*.

(17) Phương pháp theo điểm (16), trong đó nấm *Trichoderma* tốt hơn là *Trichoderma reesei*.

(18) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (2) đến (17), trong đó nồng độ xenluloza hoặc xenlobioza trong môi trường nuôi cấy tốt hơn là từ 1 đến 15% khối lượng/thể tích dưới dạng tổng nồng độ xenluloza và xenlobioza.

(19) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (18), trong đó tốt hơn là, phương pháp này còn bao gồm bước thu thập protein từ quá trình nuôi cấy vi sinh vật.

(20) Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (19), trong đó tốt hơn là, phương pháp này bao gồm bước chuẩn bị hỗn hợp glucoza và amoniac hoặc muối của chúng, và cung cấp hỗn hợp đã chuẩn bị vào môi trường nuôi cấy.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn trên cơ sở các Ví dụ, mà không nên được hiểu là hạn chế sáng chế. Trong các ví dụ bên dưới, "%" có nghĩa là "% khối lượng/thể tích" trừ khi có quy định khác. Độ pH của mỗi dung dịch nước amoniac và dung dịch nước amoniac/glucoza được đo ở 25°C bằng

máy đo độ pH (pH/Ion F-52 Meter của HORIBA Ltd.) được kết nối với điện cực hàn phức hợp đo độ pH (Ground Glass Sleeve Type của HORIBA, Ltd.) (chất lỏng bên trong điện cực pH: dung dịch nước kali clorua bão hòa (3,33 mol/L)). Độ pH của môi trường nuôi cấy được đo bằng cảm biến pH của Điện cực pH có thể hấp tiệt trùng F-635 (Broadley-James Corp) hoặc Cảm biến pH 405-DPAS-SC-K8S (METTLER TOLEDO) được cung cấp trong bình lên men.

Ví dụ 1

Chủng *Trichoderma reesei* X3AB1 (J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2012, 174: 1-9; sau đây, được gọi là chủng X3AB1) được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chứa xenluloza để sản xuất protein chứa xenlulaza. Là giai đoạn tiền nuôi cấy, 50 mL môi trường nuôi cấy được bổ sung vào bình 500 mL, bào tử của chủng X3AB1 được cấy 1×10^5 tế bào/mL, và việc nuôi cấy lắc được thực hiện ở tốc độ 220 vòng/phút (PRXYg-98R của PRECI CO., LTD.) ở 28°C. Thành phần môi trường nuôi cấy như sau: glucoza 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,14%, KH_2PO_4 0,2%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03%, Pepton Bacto 0,1% (BD Difco), chiết xuất nấm men Bacto 0,05% (BD Difco), Tween 80 0,1%, nguyên tố vi lượng 0,1% và đệm tartrat 50 mM (pH 4,0). Thành phần của nguyên tố vi lượng như sau: 6 mg H_3BO_3 , 26 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 40 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 8 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ và 200 mg ZnCl_2 được pha loãng thành 100 mL bằng nước cất.

Quá trình nuôi cấy chính được thực hiện sau 2 ngày tiền nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy ban đầu trong quá trình nuôi cấy chính chứa xenluloza bột 10% (KC FLOCK W100 của Nippon Paper Industries Co., Ltd.), và các thành phần môi trường nuôi cấy khác: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,42%, KH_2PO_4 0,2%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03%, Pepton Bacto 0,1%, chiết xuất nấm men Bacto 0,05%, Tween 80 0,1%, nguyên tố vi lượng 0,1% và chất chống nổi bọt PE-L 0,2%. Dung dịch tiền nuôi cấy được cấy với lượng 10% (% thể tích/thể tích) trong bình lên men thể tích 1 lít BMZ-01KP2 (Biott) chứa 500 mL môi trường, và quá trình nuôi cấy được thực hiện trong 4 ngày. Bình lên men được thiết lập như sau: nhiệt độ: 28°C , tốc độ sục khí: 0,5 vvm, pH: $4,5 \pm 0,1$, và tốc độ khuấy: được thay đổi để duy trì $\text{DO} = 3,0$ ppm. Glucoza được hòa tan trong dung dịch nước amoniac 10%, và dung dịch này được pha loãng thích hợp để chuẩn bị hỗn hợp glucoza và amoniac (sau đây, được gọi là dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 20%). Trong quá trình nuôi cấy, dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 20% (pH 11,3) được cung cấp một cách thích hợp vào dung dịch nuôi cấy. Lượng dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 20% cung cấp được kiểm soát sao cho độ pH của dung dịch nuôi cấy được duy trì trong phạm vi xác định trước được mô tả ở trên.

Ví dụ so sánh 1

Vi sinh vật được nuôi cấy theo cách giống như trong Ví dụ 1 ngoại trừ

việc thay vì dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 20%, dung dịch nước amoniac 5% (pH 12,3) được cung cấp.

Ví dụ so sánh 2

Vi sinh vật được nuôi cấy theo cách giống như trong Ví dụ 1 ngoại trừ việc thay vì dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 20%, dung dịch nước amoniac 10% (pH 12,7) được cung cấp để điều chỉnh độ pH, và dung dịch nước glucoza 40% được cung cấp từ đây chuyển cung cấp khác trong các điều kiện như được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Lượng cung cấp (g/L môi trường nuôi cấy ban đầu/giờ)
0-6	0
6-9	0,05
9-12	0,1
12-15	0,15
15-20	0,25
20-22	0,3

22-25	0,4
25-27	0,45
27-31	0,5
31-39	0,6
39-46	0,5
46-56	0,45
56-60	0,4
60-61	0,3
61-62	0,15
62-65	0,1
65-69	0,05

Thử nghiệm 1: Lượng glucoza được cung cấp

Trọng lượng của dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 20% (pH 11,3) và dung dịch nước glucoza 40% được cung cấp vào dung dịch nuôi cấy trong mỗi Ví dụ 1 và Ví dụ so sánh 2 được theo dõi bằng cân điện tử. Trọng lượng glucoza được cung cấp vào dung dịch nuôi cấy được tính từ hàm lượng glucoza được

chứa trong dung dịch nước và trọng lượng riêng của dung dịch nước. Fig. 1A thể hiện lượng tích lũy của glucoza được cung cấp vào dung dịch nuôi cấy và Fig. 1B thể hiện sự thay đổi phụ thuộc vào thời gian của lượng glucoza được cung cấp hàng giờ vào dung dịch nuôi cấy trong mỗi Ví dụ 1 và Ví dụ so sánh 2. Lượng tích lũy cũng như lượng glucoza được cung cấp hàng giờ trong Ví dụ 1 và Ví dụ so sánh 2 về cơ bản là theo cùng một đường cong.

Thử nghiệm 2: Hành vi khuấy

Fig. 2 thể hiện sự thay đổi phụ thuộc vào thời gian về tốc độ khuấy của bình lên men trong mỗi Ví dụ 1 và Ví dụ so sánh 1 và 2. Vì tốc độ khuấy được thiết lập để thay đổi sao cho DO = 3,0 ppm được duy trì, sự thay đổi tốc độ khuấy về cơ bản tương ứng với sự thay đổi nhu cầu oxy trong quá trình nuôi cấy. So với Ví dụ so sánh 1, tốc độ khuấy có xu hướng tăng trong Ví dụ so sánh 2, và tốc độ khuấy có xu hướng giảm trong Ví dụ 1. Thực tế này chỉ ra rằng khi hỗn hợp glucoza và amoniac được cung cấp, một số hiện tượng đã xảy ra làm giảm tốc độ khuấy (nhu cầu oxy) so với trường hợp glucoza và amoniac được cung cấp riêng biệt.

Thử nghiệm 3: Lượng protein được sản xuất

Dung dịch nuôi cấy thu được trong Ví dụ 1 và Ví dụ so sánh 1 và 2 được ly tâm. Sau đó, các tế bào nấm được tách ra khỏi dịch nổi bằng bộ lọc màng 25CS020AN (Advantech). Nồng độ protein trong dịch nổi được đo bằng phương

pháp Bradford. Nồng độ protein của dịch nổi được tính trên cơ sở đường chuẩn với γ -globulin bò làm protein chuẩn bằng cách sử dụng Quick Start Protein Assay (BioRad) dựa trên phương pháp Bradford, và nồng độ protein được xác định là lượng protein được sản xuất. Fig. 3 thể hiện lượng tương đối của protein được sản xuất vào ngày thứ 3 và ngày thứ 4 của quá trình nuôi cấy trong Ví dụ 1 và Ví dụ so sánh 1 và 2 so với lượng protein được sản xuất vào ngày thứ 4 của quá trình nuôi cấy trong Ví dụ so sánh 1, được xác định là 100%. Trong Ví dụ 1, năng suất cao hơn năng suất trong Ví dụ so sánh 1 ở cả ngày thứ 3 và ngày thứ 4 của quá trình nuôi cấy. Trong Ví dụ so sánh 2, năng suất thấp hơn năng suất trong Ví dụ so sánh 1. Thực tế này cho thấy rằng khi cung cấp hỗn hợp glucoza và amoniac, năng suất protein được cải thiện so với trường hợp không cung cấp glucoza, hoặc cung cấp glucoza và amoniac riêng biệt với lượng như nhau. Hơn nữa, so sánh với Ví dụ so sánh 2 chỉ ra rằng quan trọng là trộn glucoza và amoniac trước khi cung cấp.

Ví dụ 2

Bằng cách sử dụng chủng *Trichoderma reesei* X3AB1, protein chứa xenlulaza được sản xuất theo cách giống như trong Ví dụ 1. Các tế bào được nuôi cấy trước trong 2 ngày theo cách giống như trong Ví dụ 1, tiếp theo thực hiện nuôi cấy chính. Môi trường nuôi cấy ban đầu được sử dụng trong nuôi cấy chính giống hệt môi trường nuôi cấy trong Ví dụ 1. Dung dịch tiền nuôi cấy

được cấy với lượng 10% (% thể tích/thể tích) trong bình lên men thể tích 250 mL BJR-25NA1S-8M (Biott) chứa 100 mL môi trường nuôi cấy ban đầu. Việc lắp đặt bình lên men giống như trong Ví dụ 1. Glucoza được hòa tan trong dung dịch nước ammoniac 10%, và dung dịch này được pha loãng thích hợp để chuẩn bị hỗn hợp có nồng độ glucoza và amoniac khác nhau. Hỗn hợp glucoza và ammoniac được chuẩn bị như sau và hỗn hợp này có độ pH từ 10,9 đến 11,9: dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 2,5% (sau đây gọi là 5N2,5G), dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 5% (sau đây gọi là 5N5G), dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 10% (sau đây gọi là 5N10G), dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 20% (sau đây gọi là 5N20G), dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 30% (sau đây gọi là 5N30G), dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 40% (sau đây gọi là 5N40G) và dung dịch nước amoniac 5%/glucoza 50% (sau đây gọi là 5N50G). Các hỗn hợp glucoza và ammoniac này được cung cấp vào dung dịch nuôi cấy một cách thích hợp trong quá trình nuôi cấy. Lượng hỗn hợp glucoza và amoniac cung cấp được kiểm soát sao cho độ pH của dung dịch nuôi cấy được duy trì trong phạm vi xác định trước được mô tả ở trên. Quá trình nuôi cấy được kết thúc vào thời điểm khi độ pH của dung dịch nuôi cấy vượt quá 5,5.

Ví dụ so sánh 3

Vi sinh vật được nuôi cấy theo cách giống như trong Ví dụ 2 ngoại trừ việc thay vì hỗn hợp glucoza và amoniac, dung dịch nước amoniac 5% được

cung cấp.

Thử nghiệm 4: Lượng protein được sản xuất

Nồng độ protein trong dịch nuôi từ nuôi cấy ở cuối quá trình nuôi cấy, thu được trong mỗi Ví dụ 2 và Ví dụ so sánh 3 được đo bằng phương pháp Bradford như trong Thử nghiệm 3. Fig. 4 thể hiện lượng tương đối của protein được sản xuất trong Ví dụ 2 so với lượng protein được sản xuất trong Ví dụ so sánh 3, được xác định là 100%. Trong Ví dụ 2, năng suất cao hơn năng suất trong Ví dụ so sánh 3 khi nuôi cấy sử dụng hỗn hợp của nồng độ glucoza và amoniac bất kỳ.

Fig. 5 thể hiện sự thay đổi phụ thuộc vào thời gian của lượng glucoza được cung cấp hàng giờ vào môi trường nuôi cấy sử dụng 5N2,5G trong Ví dụ 2. Lượng glucoza được cung cấp hàng giờ vào môi trường nuôi cấy với 5N2,5G rất nhỏ so với trong Ví dụ 1. Lượng protein được sản xuất trên mỗi lượng nguồn cacbon (bột xenluloza và glucoza) được sử dụng để nuôi cấy được tính. Fig. 6 thể hiện lượng tương đối của protein được sản xuất trên mỗi nguồn cacbon trong Ví dụ 2 so với lượng protein được sản xuất trong Ví dụ so sánh 3, được xác định là 100%. Lượng protein được sản xuất trên mỗi nguồn cacbon có xu hướng được cải thiện tại thời điểm sử dụng hỗn hợp glucoza và ammoniac nồng độ thấp, và giảm khi nồng độ glucoza trong hỗn hợp tăng lên. Do đó, được chỉ ra rằng việc cải thiện năng suất protein bằng cách cung cấp hỗn hợp glucoza và amoniac là kết quả từ việc cải thiện lượng protein được sản xuất trên mỗi nguồn cacbon.

Các kết quả trên cho thấy rằng việc cung cấp hỗn hợp glucoza và amoniac có tác dụng cải thiện không chỉ lượng protein được sản xuất trên mỗi lần nuôi cấy mà còn cả lượng protein được sản xuất trên mỗi nguồn cacbon được sử dụng, và việc cung cấp hỗn hợp này có hiệu quả ngay cả khi glucoza được cung cấp với lượng rất nhỏ 0,1 g/L/giờ hoặc nhỏ hơn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất protein, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật trong điều kiện cung cấp hỗn hợp glucoza và amoniac, trong đó, trong hỗn hợp, glucoza và amoniac có tỷ lệ khối lượng từ 0,5 đến 10:1.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quá trình nuôi cấy được thực hiện với sự hiện diện của ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm xenluloza và xenlobioza.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó vi sinh vật chứa vùng khởi động cảm ứng xenluloza hoặc vùng khởi động cảm ứng xenlobioza.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó gen mã hóa protein được liên kết xuôi chiều vùng khởi động.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó vùng khởi động là vùng khởi động gen xenlulaza của nấm sợi, và protein là enzym.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó protein là xenlulaza.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hỗn hợp được cung cấp với lượng 8 g/giờ hoặc nhỏ hơn trên mỗi lít môi trường nuôi cấy ban đầu xét về lượng glucoza được bổ sung vào hỗn hợp.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó độ pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh từ 3 đến 7 bằng cách cung cấp hỗn hợp.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hỗn hợp chứa glucoza với lượng từ 2 đến

90 g trên mỗi 100 mL.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hỗn hợp có tính kiềm ở 25°C.

11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật là nấm sợi.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó nấm sợi là nấm *Trichoderma*.

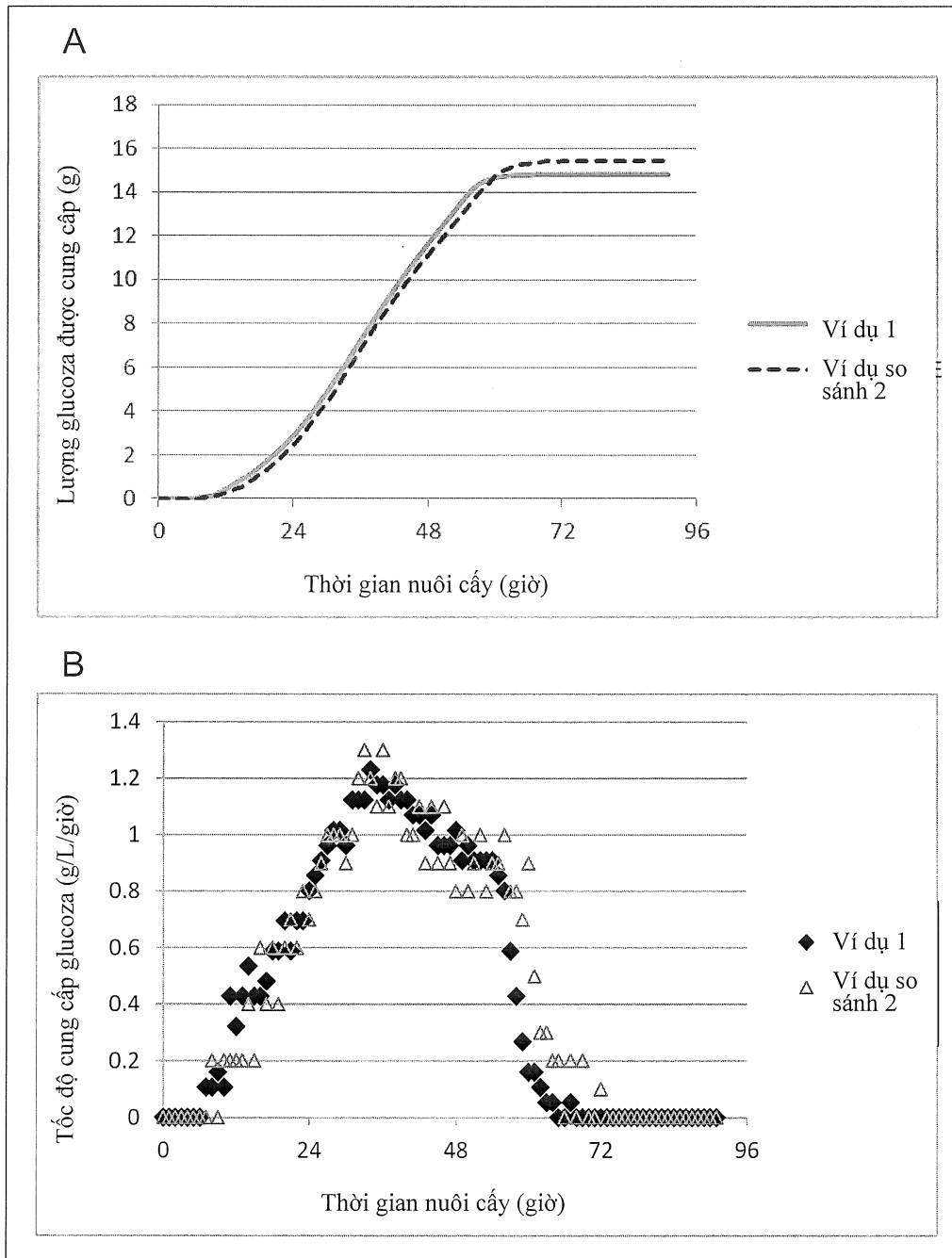
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó nấm *Trichoderma* là *Trichoderma reesei*.

14. Phương pháp theo điểm 2, trong đó protein là enzym liên quan đến quá trình phân hủy sinh khối hoặc đường hóa sinh khối.

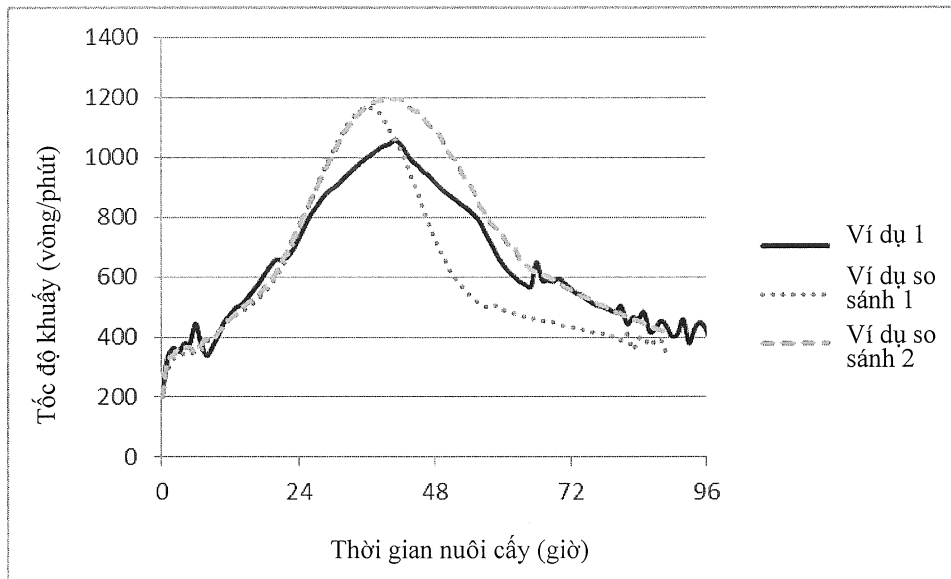
15. Phương pháp theo điểm 2, trong đó tổng nồng độ xenluloza hoặc xenlobioza trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật từ 1 đến 15% khối lượng/thể tích.

16. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu thập protein từ quá trình nuôi cấy vi sinh vật.

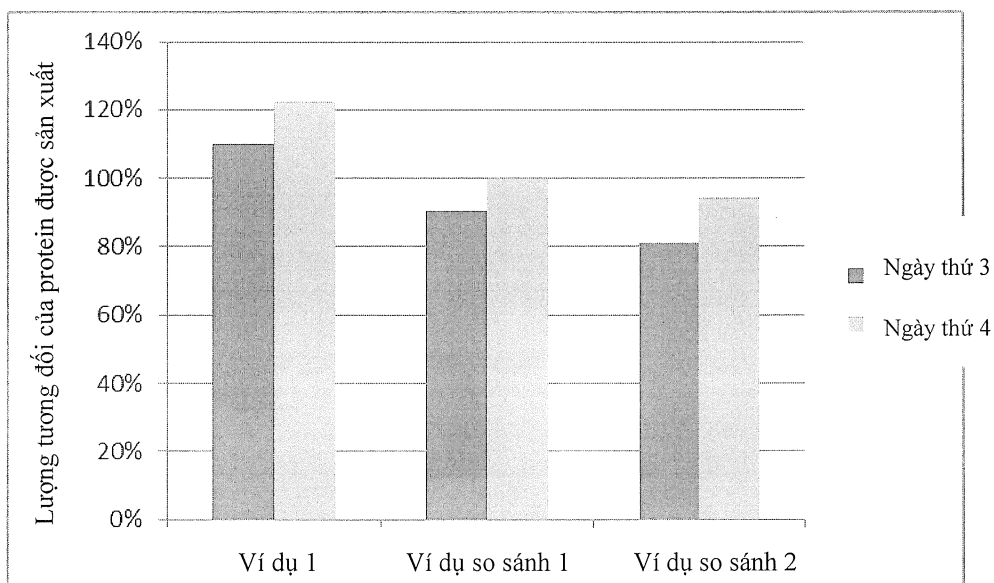
[FIG. 1]



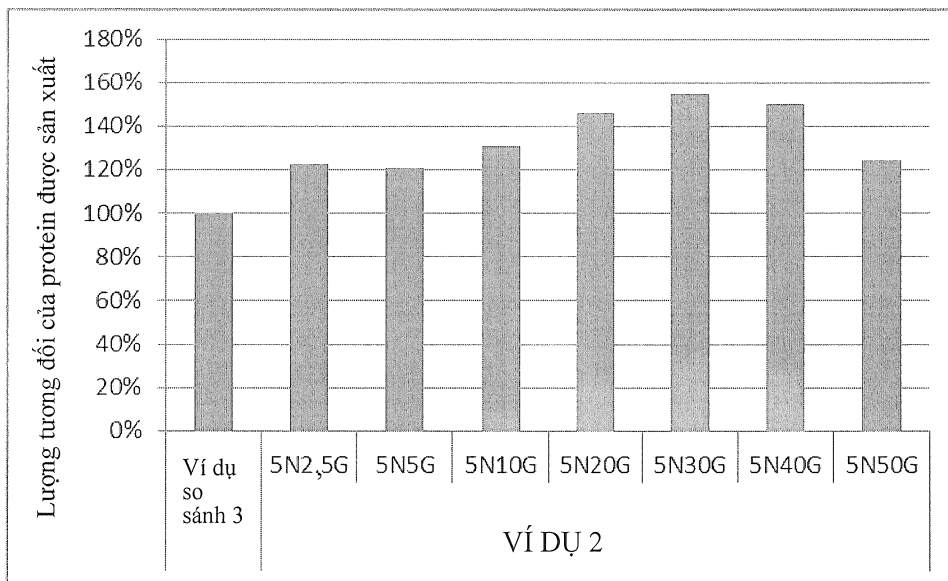
[FIG. 2]



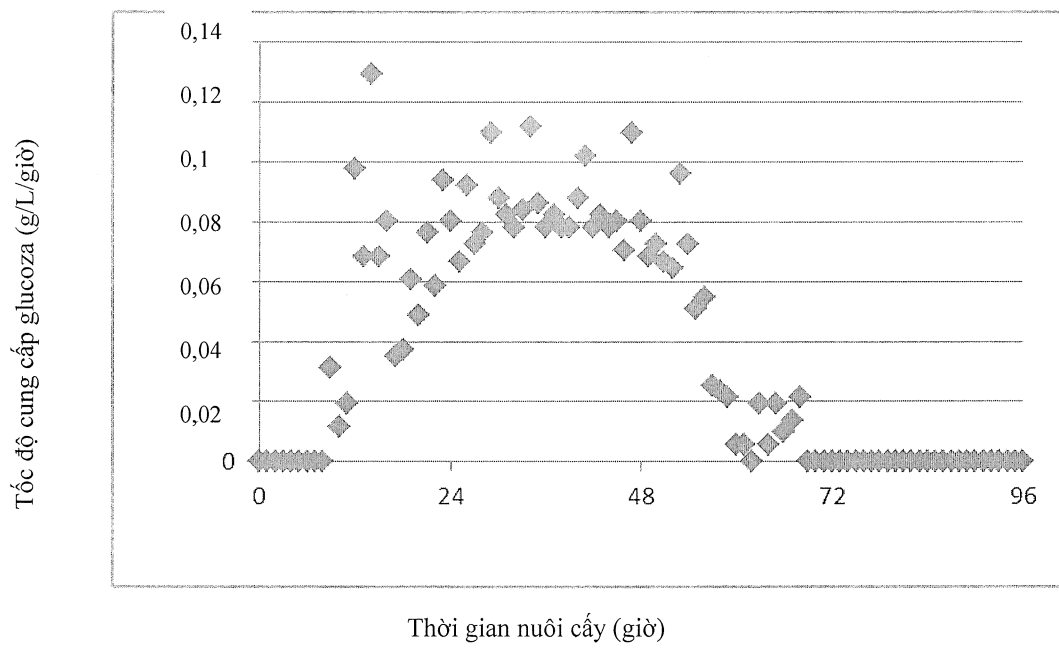
[FIG. 3]



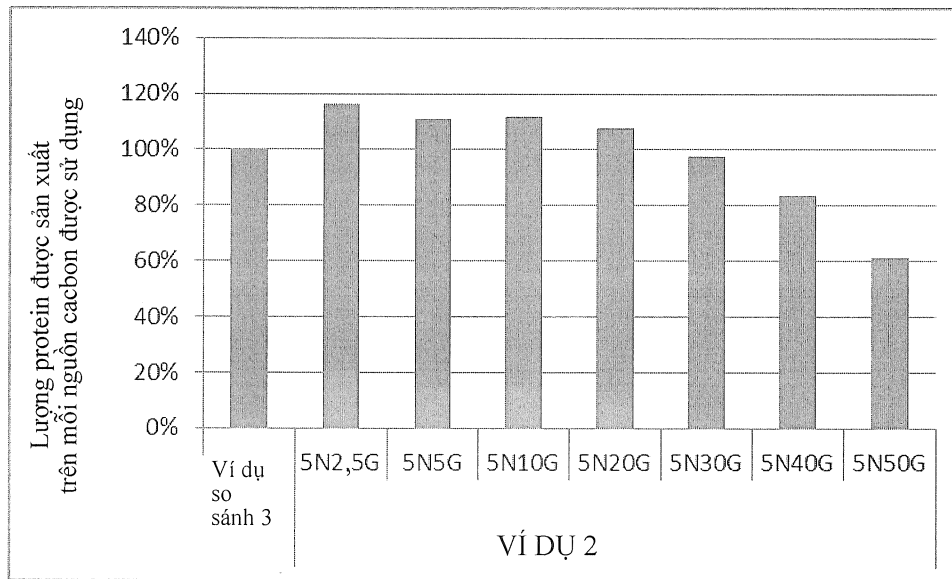
[FIG. 4]



[FIG. 5]



[FIG. 6]



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Kao corporation

<120> Phương pháp sản xuất protein

<130> KS1628

<150> JP 2018-127519

<151> 2018-07-04

<150> JP 2018-211690

<151> 2018-11-09

<160> 3

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 1640

<212> ADN

<213> Trichoderma reesei

<220>

<223> Vùng khởi động cbh1

<400> 1

tgcaaagttt tgtttcggct acggtgaaga actggatact tgttgtgtct tctgtgtatt 60

tttgtggcaa caagaggcca gagacaatct attcaaacac caagcttgct cttttgagct 120

acaagaacct gtgggggtata tatctagagt tgtgaagtcg gtaatccccg tgatatagtaa 180

tacgagtcgc atctaaatac tccgaagctg ctgcgaaccc ggagaatcga gatgtgctgg 240

aaagcttcta gcgagcggct aaattagcat gaaaggctat gagaaattct ggagacggct 300

tgttgaatca tggcgttcca ttcttcgaca agcaaagcgt tccgtcgcag tagcaggcac 360

tcattcccga aaaaactcgg agattcctaa gtagcgatgg aaccggaata atataatagg 420

caatacattg agttgcctcg acggttgcaa tgcaggggta ctgagcttgg acataactgt 480

tccgtacccc acctcttctc aacctttggc gtttcctga ttcagcgtac ccgtacaagt 540

cgtaatcact attaaccag actgaccgga cgtgttttgc ccttcatttg gagaaataat 600

gtcattgcga tgtgtaattt gcctgcttga ccgactgggg ctgttcgaag ccggaatgta 660

ggattgttat ccgaactctg ctcgtagagg catgttgtga atctgtgtcg ggcaggacac 720

gcctcgaagg ttcacggcaa gggaaaccac cgatagcagt gtctagtagc aacctgtaaa 780

gccgcaatgc agcatcactg gaaaatacaa accaatggct aaaagtacat aagttaatgc 840

ctaaagaagt catataccag cggctaataa ttgtacaatc aagtggctaa acgtaccgta 900

atttgccaac ggcttgtggg gttgcagaag caacggcaaa gccccacttc cccacgtttg 960

tttcttact cagtccaatc tcagctgggt atcccccaat tgggtcgctt gtttgttccg 1020

gtgaagtgaa agaagacaga ggtaagaatg tctgactcgg agcgttttgc atacaaccaa 1080

gggcagtgat ggaagacagt gaaatgttga cattcaagga gtatttagcc agggatgctt 1140

gagtgtatcg tgtaaggagg tttgtctgcc gatacgacga atactgtata gtcacttctg 1200

atgaagtggc ccatattgaa atgtaagtcg gcaactgaaca ggcaaaaagat tgagttgaaa 1260

ctgcctaaga tctcgggcc cgggccttc ggcctttggg tgtacatgtt tgtgctccgg 1320

gcaaatgcaa agtgtggtag gatogaacac actgctgcct ttaccaagca gctgagggta 1380

tgtgatagge aaatgttcag gggccactgc atggtttcga atagaaagag aagcttagcc 1440

aagaacaata gccgataaag atagcctcat taaacggaat gagctagtag gcaaagtcag 1500

cgaatgtgta tatataaagg ttcgaggtcc gtgcctccct catgctctcc ccatctactc 1560

atcaactcag atcctccagg agacttgtag accatctttt gaggcacaga aaccaatag 1620

tcaaccgggg actgogcatc 1640

<210> 2

<211> 1477

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

<220>

<223> Vùng khởi động eg11

<400> 2

tttcagcaat gcgtggcggtt ggcaggcgac ttcgcggcag tgcattgagcg atattcgggg 60

togttgaagc cgacgttcac gccggagatt ggcattgatcc cagtgcctta catcatcggg 120

gcaaatgcc ggcattcctgt tgtgcggcgg gaggccttgg gtcttttgag gcggcaaccg 180

atccggggagg cggtttgga tagcgttggt gttgccaggg tagtggagag gataatggag 240

attgaggagg ttgggtttga gaagtgggaa atgatacaga gtatggaaca ggttcoggtg 300

tggcagaggg ttgagacgct gtcttgggca catgtcgtcg tcgatggaca gtctgcgggc 360

agagtggaca ttaactatac gttctgcgcg cgagagggat cgcattattga gtctttcatg 420

atgtaataag cttgggcttg acagcgttct attgccagtg tatcaacgaa gtggtatgta 480

ccatcgtgct ctgtccagac gttttgggtca ggtcgacaaa caggcttttc ttctattct 540

ctttctttga tatatacag cttagaaatg tgtcaaaaag aacagaaacc tcttttgatg 600

tagttatgcg catgctagac tgctcctggt tcatgtgggtt acaacaaaca gtctgatcga 660

cttogaatac ttggactgat gaaggttgta cagattgctg acagatgctg taatgcagag 720

caaggctgta gattccataa aaccagttgc ttcgcctgct gtggctctgg agaaccaaaag 780

agacgtgtct cgggagggta agtggatcgc aatctatgag agaagcccag tctaagagag 840

gaccatctcg ccaggggaag atgaagctgg ttacaactga tttgttttcc cgtctgccac 900

catggtatag agcctggacc aatcaggcta aatcattgta tacaataagc ctagagaaaa 960

cctgaaatct gtctcgtcc tttgtccggt gtctaattat cgttattttt cgaacgatga 1020

tacagtatga gttttgccga aattttgcta aaggactat cgacggggga cacaagggtt 1080

gagtctgtat aacggctcga aacagcagct ggtagcagga atccaggccc gcgtttcatt 1140

tggattcatt ttcccatatt ccccttgacg aaggatacga cagtagcatt ggaaaccgta 1200

aatgacggca aaaagcatgg ttctgctcag atactccaag ccaacctatc gggctcctgga 1260

ggctatttcc aacatctcat agcctaacag aaataacgga agtcggcatc tgtatcgctc 1320

aaactgacca gacgagcccg ccatatcgag gcagagttac tctgtgttgc aaatccaact 1380

tataaagaca acaaccgcaa actttgtctt gtcgccatca gattgttcgc caagcacctc 1440

ccccccccc tatcttagtc cttcttggtg tcccaaa 1477

<210> 3

<211> 1084

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

<220>

<223> Vùng khởi động xyn3

<400> 3

gggaattccg tgattgacaa aatctattcg tatcaaactg tcatgccgcc gtctccagtc 60

tcctcacgct atgggtgcttg atatacataa gggggggacg ttgaatatat gttcccagtt 120

tacctccaca taagaaatat ctcccttgga cggctctctgc aattttgcc tcaagactct 180

gcagacaatc cctctgtgct ttaaaacccc cgagtatccc ggtcacctga tggcgcaagt 240

ctcaacttcc ccaggatgcc gtctcctcat ctccgtgatg gtaacaaccg catataaggg 300

acttttgtct tcttttaggt tcggacgagg gggttctttc ccagatcaat gccttgaccg 360

aaactgtcaa gatggctata taggacactg tcaatthttgc catttcagtc cgggtattta 420

gacttaaaag cacctagtat ttatggttaa taaatctccg ggcaaaggte tctttccgtg 480

cgtgtctgat gggttatgct aagctcatct ccgcagacag ggtagtaaca gaggtagccg 540

ttccttgaa agacggttaa ttgacttctt gactttgact gtccaattcg catggctaatt 600

tgccgcaaaa atgatgcat atggccccgt gggcacaact ttctcacaag tctctgggtg 660

cttgactgag gtcgatggtg tgctctttct tcccaactat acaagtctaa actcctcagt 720

aaatcgatac aaggtaaatt taaactctct ggttactctt cctaccaaaa ggccctgggtt 780

acatttcgtg tatacccagag gcggctgaat ctgggggact cacatagggtg gatgcaatgt 840

gctattagcc agctacgcat atacaatcaa acattgaaaa tcaaaggata tacaacaact 900

ttgacgattt tccataaatt ggcatcatct ttctgagtc tgatggatgt cagacagcaa 960

gcggacaagc tggctcatga ctcaatctc ogaatacacc gcatcatcta ggagccattc 1020

tcacctcgaa acttctacca tctttccact gagtttcaat tgaggoggac accatggaag 1080

cacc 1084