



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11) 
1-0022507

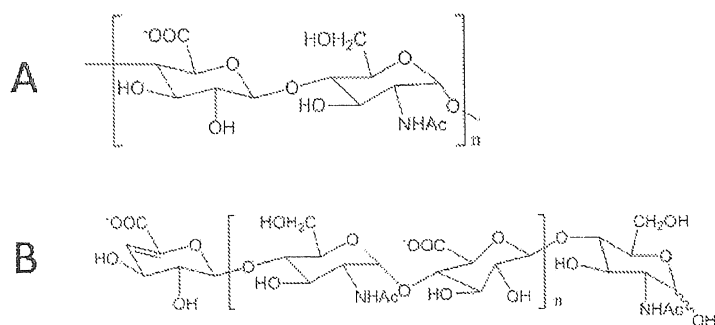
(51)⁷ C12P 19/04, C08B 37/10, C12N 1/20

(13) B

- (21) 1-2012-00612 (22) 30.08.2010
(86) PCT/US2010/047183 30.08.2010 (87) WO2011/028668 10.03.2011
(30) 61/275,675 01.09.2009 US
(45) 25.12.2019 381 (43) 25.01.2013 298
(73) Rensselaer Polytechnic Institute (US)
Office of Technology Commercialization 110 8th Street, Troy, NY 12180-3590,
United States of America
(72) WANG, Zhenyu (US), LINHARDT, Robert, J. (US), DORDICK, Jonathan, S. (US),
BHASKAR, Ujjwal (US)
(74) Công ty Luật TNHH AMBYS Hà Nội (AMBYS HANOI)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HEPAROSAN TỪ ESCHERICHIA COLI K5 VÀ HEPAROSAN ĐƯỢC SẢN XUẤT BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập tới phương pháp sản xuất heparosan từ môi trường lên men chứa Escherichia, coli K5 thích hợp cho việc sản xuất trong công nghiệp, thể hiện sản lượng và độ tinh khiết vượt trội, thể tích canh trường nhỏ hơn, sinh trưởng nhanh hơn, và chi phí thấp hơn. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập tới heparosan được sản xuất bằng phương pháp này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất và tinh sạch heparosan, thích hợp cho sản xuất heparosan trong công nghiệp và cho sản xuất heparin theo công nghệ sinh học. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp cải tiến để sản xuất heparosan nhờ quá trình lên men *Escherichia coli* K5(*E. coli*), phân tách polysacarit K5, và tinh sạch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Heparin và heparan sulfat là các phân tử quan trọng trong sinh học liên quan đến chống đông máu, nhiễm vi rút và vi khuẩn, quá trình hình thành mạch, viêm, ung thư và sinh trưởng. [Linhardt (2003) "Heparin: structure and activity," *J Med Chem*, 46: 2551-2554. Linhardt RJ, Toida T. (2004) "Role of glycosaminoglycans in cellular communication," *Acc Chem Res*, 37: 431-438]. Heparin được phát hiện có phổ ứng dụng rộng bao gồm phẫu thuật, oxy hóa tim phổi và thẩm tách thận, điều trị huyết khối tĩnh mạch và hội chứng mạch vành cấp. [Linhardt "Heparin: an important drug enters its seventh decade." *Chem. Ind.* 2, 45-50 (1991); Agnelli et al. "Enoxaparin plus compression stockings compared with compression stockings alone in the prevention of venous thromboembolism after elective neurosurgery" *N Engl J Med* 339 (2), 80-5 (1998)]. Ngoài ra, heparin được phủ trên bề mặt của các mạch máu và các thiết bị y tế như ống nghiệm và máy lọc máu nhân tạo, để tạo thành bề mặt chống đông máu.

Heparin hiện được điều chế từ mô động vật ở lượng xấp xỉ 100 tấn/năm, nhưng heparin này có thể bị lẫn tạp chất với các sản phẩm sinh học khác. [Linhardt *Chem. Ind.* 2, 45-50 (1991)]. Heparin bị lẫn tạp chất chondroitin sulfat bị sulfat hóa quá mức dẫn đến tử vong gần 100 người Mỹ vào năm 2008. [Guerrini, et al. "Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events." *Nature Biotechnology* 26, 669-675 (2008)].

Tiền chất sinh tổng hợp của heparin thuộc sinh vật có nhân điển hình (eukaryotic) trong tự nhiên, heparosan, là polysacarit với đơn vị disacarit [$\rightarrow 4$) axit β -

D-glucuronic (GlcA) (1→4) *N*-acetyl- α -D-glucosamin (GlcNAc) (1→)_n, lặp lại được thể hiện trên Fig.1.

Ngoài ra, heparosan còn được sinh tổng hợp như là nang polysaccharit trong vi khuẩn bao gồm *Escherichia coli* K5 và *Pasteurella multocida*. [Lindahl U et al. (1998) “Regulated diversity of heparan sulfate” *J Biol Chem* 273(39):24979-24982]. Khởi đầu quá trình tổng hợp heparosan K5 được báo cáo là liên quan đến axit 2-keto-3-deoxyoctulosonic. [Finke A et al. (1991) “Biosynthesis of the *Escherichia coli* K5 polysaccharide, a representative of group II capsular polysaccharides: polymerization in vitro and characterization of the product” *J Bacteriol* 173(13):4088-94]. Sau đó heparosan K5 được kéo dài thông qua hoạt tính xen kẽ của các glycotransferaza KfiA và KfiC mà bổ sung GlcNAc và GlcA vào đầu không khử của chuỗi polysaccharit đang sinh trưởng. [Hodson N et al. (2000) “Identification that KfiA, a protein essential for the biosynthesis of the *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide, is an α -UDP-GlcNAc glycosyltransferase. The formation of a membrane-associated K5 biosynthetic complex requires KfiA, KfiB, and KfiC.” *J Biol Chem* 275(35):27311-5]. Sau khi được tổng hợp, chuỗi heparosan được vận chuyển lên trên bề mặt tế bào thông qua con đường bao gồm 6 protein: KpsC, KpsD, KpsE, KpsM, KpsS và KpsT. [McNulty C et al (2006) “The cell surface expression of group 2 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*: the role of KpsD, RhsA and a multi-protein complex at the pole of the cell” *Mol Microbiol* 59(3):907-22]. Chuỗi heparosan K5 được cho là được bám trên bề mặt tế bào thông qua sự thể lipid tại đầu khử của polysaccharit thành phân tử axit phosphatidic trong màng ngoài của *E. coli*. [Jann B, Jann K. (1990) “Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*” *Curr Top Microbiol Immunol* 150:19-42]. Các phần heparosan polysaccharit có thể được lấy đi từ *E. coli* K5 thông qua hoạt tính của heparosan lyaza K5, và enzym có nguồn gốc từ thể thực khuẩn mà tách chuỗi heparosan thông qua cơ chế loại bỏ β -elimination. [Manzoni M et al. (1996) “Production of K5 polysaccharides of different molecular weight by *Escherichia coli*” *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 11(4):301-311. Manzoni M, et al. (2000) “Influence of the culture conditions on extracellular lyase activity related to K5 polysaccharide.” *Biotechnology Letters* 22(1):81-85]. [The gene

encoding K5 lyase is integrated into the *E. coli* K5 DNA and its expression may be inducible. Manzoni M, et al. (2000). *Biotechnology Letters* 22(1):81-85]. Hoạt tính lyaza K5 có thể tác động đến lượng heparosan được giải phóng vào trong môi trường nuôi cấy cũng như cấu trúc và đặc tính trọng lượng phân tử của cả heparosan được liên kết tế bào và heparosan được giải phóng tế bào (Fig.1B). Heparosan K5 được ước tính là có trọng lượng phân tử (M_w) 20,000 và bao gồm hai thành phần con chính với trọng lượng phân tử trung bình khối lượng M_w là 16,000 và 1,500. Tỷ lệ của hai thành phần con này tương ứng với M_w tổng và bị ảnh hưởng bởi hoạt tính của lyaza K5 [Vann WF et al (1981) "The structure of the capsular Polysaccharide (K5 Antigen) of Urinary-Tract-Infective Escherichia-Coli 010-K5-H4 - a Polymer Similar to Desulfo-Heparin" *European Journal of Biochemistry* 116(2):359-364; Manzoni (2000) *Biotechnology Letters* 22(1):81-85].

Các nghiên cứu quy mô phòng thí nghiệm cho thấy rằng heparosan với trọng lượng phân tử trung bình khối lượng (M_w) > 10,000, thu được từ chủng *E. coli* K5 có thể được biến đổi theo cách enzym thành polysaccharit chống đông tương tự heparin. [Lindahl et al. (2005) "Generation of "Neoheparin" from *E. coli* K5 capsular polysaccharide" *J Med Chem* 48(2):349-352; Zhang et al. (2008) "Solution structures of chemoenzymatically synthesized heparin and its precursors" *Journal of the American Chemical Society* 130(39):12998-13007. Ngoài ra, heparosan cũng có thể được sử dụng trong nhiều đơn đăng ký sáng chế (WO 2009/014559)].

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế mô tả quy trình lên men *E. coli* E5 với năng suất heparosan cao và hiệu quả thu hồi heparosan tinh sạch cao thích hợp cho sản xuất heparosan trong công nghiệp.

Sáng chế đề cập đến phương pháp cải tiến để sản xuất heparosan nhờ quá trình lên men *E. coli* K5, phân tách polysaccharit K5, và tinh sạch.

Theo một phương án, phương pháp này bao gồm (a) nuôi cấy *E. coli* K5 trong môi trường xác định với glucoza là nguồn cacbon chính; (b) gắn heparosan lên pha rắn

có quá trình rửa giải tiếp sau; và (c) kết tủa heparosan từ dịch rửa giải. Phương pháp này thích hợp để sản xuất heparosan về cơ bản là tinh khiết, mà ít nhất tinh khiết 90%.

Trong các phương án liên quan, phương pháp này bao gồm hai pha nuôi cấy, cụ thể là pha sinh trưởng theo mẻ và pha sinh trưởng theo mẻ được tiếp liệu, trong đó (a) môi trường được sử dụng trong giai đoạn sinh trưởng theo mẻ bao gồm (trên lít) glucoza với lượng khoảng 20g, thiamin với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 300mg, KH_2PO_4 với lượng khoảng 13,5g; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ với lượng khoảng 4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng khoảng 1,4g, axit xitric với lượng khoảng 1,7g, và dung dịch kim loại vi lượng với lượng khoảng 10ml (trên 1L); trong đó dung dịch kim loại vi lượng về cơ bản gồm (trên L của HCl 5M) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 10g, CaCl_2 với lượng 2g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 2,2g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ với lượng 0,5g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ với lượng 1g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ với lượng 0,1g, và $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ với lượng 0,02g và trong đó; (b) dung dịch tiếp liệu sử dụng trong giai đoạn sinh trưởng theo mẻ được tiếp liệu gồm (trên lít): glucoza với lượng 250-1000g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng khoảng 20g và thiamin với lượng nằm trong khoảng từ 0,15 đến 0,5g, và tùy ý KH_2PO_4 với lượng khoảng 47g.

Trong các phương án liên quan, oxy được cung cấp bằng không khí được phun vào. Không khí có thể được bổ sung oxy. Ưu tiên, oxy hòa tan được duy trì tại khoảng 20%. Trong một số phương án, oxy tinh khiết được sử dụng.

Trong các phương án liên quan khác, các điều kiện bao gồm nhiệt độ được duy trì tại nhiệt độ khoảng 37°C, và độ pH được duy trì tại khoảng 7. Độ pH có thể được duy trì bằng cách bổ sung dung dịch amoniac, hoặc khí amoniac. Trong một số phương án, dung dịch amoniac thường có nồng độ là 25 đến 35%, bao gồm khoảng 30%, chẳng hạn 29%.

Trong các phương án cụ thể, môi trường tiếp liệu sử dụng trong giai đoạn theo mẻ được tiếp liệu, được tiếp liệu tại tốc độ xác định trước bởi công thức:

$$MS(t) = F(t) S_{F(t)} = \left(\frac{\mu}{Y_{\frac{x}{s}}} + m \right) X(t_0) V(t_0) \exp [\mu(t - t_0)]$$

trong đó MS là lưu lượng theo khối lượng của nguồn cacbon (g/h); F là lưu lượng tiếp liệu (L/h); S_F là nồng độ cơ chất cacbon trong nguồn tiếp liệu (g/l); X là nồng độ tế bào (g/l dcw); m là hệ số duy trì riêng (g/g dcw/h); V là thể tích canh trường (L); t_0 là thời gian bắt đầu tiếp liệu; t là thời gian xử lý; μ là tốc độ sinh trưởng riêng (h^{-1}); và $Y_{x/s}$ là sản lượng tế bào trên cơ chất cacbon (g/g).

Ngoài ra, phương pháp còn bao gồm bước gắn và rửa giải heparosan ra khỏi môi trường nuôi cấy. Theo một phương án, heparosan thu được từ phần nổi không chứa tế bào. Trong phương án khác, heparosan được thu từ các tế bào bằng cách rửa với dung dịch chất tẩy rửa như SDS (ví dụ, SDS 1%), kết hợp với khuấy trộn.

Sau khi loại bỏ tế bào, bước gắn và rửa giải có thể bao gồm trộn nhựa trao đổi anion với phần nổi canh trường và loại bỏ phần nổi, rửa nhựa bằng natri clorua 50mM trong đệm natri axetat tại độ pH = 4, rửa giải với natri clorua 1M trong đệm natri axetat tại độ pH = 4.

Theo cách khác, bước gắn và rửa giải có thể được thực hiện bằng chitosan. Trong một phương án, phần nổi canh trường được trộn với dung dịch chitosan mà được cho kết tủa. Chất kết tủa được phân tách, rửa chẳng hạn bằng nước hoặc đệm pha loãng khác, và được rửa giải với bazơ mạnh như NaOH có nồng độ khoảng 1M. Bước gắn và rửa giải bằng chitosan có thể được thực hiện ngoài quá trình trao đổi anion.

Sau khi gắn và rửa giải, heparosan được kết tủa từ dịch rửa giải, như với etanol hoặc metanol. Theo một phương án, 3 thể tích của etanol được sử dụng. Chất kết tủa tạo thành thường được rửa và làm khô.

Phương pháp này cũng bao gồm bước khử pyrogen tùy ý, chẳng hạn bằng quá trình oxy hóa, bao gồm với hydro peroxit.

Phương pháp theo sáng chế thu được hiệu suất heparosan cao, với độ tinh khiết cao, trong các thể tích canh trường nhỏ, trong khoảng thời gian ngắn, và với lượng tạp

chất thấp. Do đó, sáng chế thích hợp để sản xuất heparosan trong công nghiệp. Sản lượng heparosan có thể thu được trong quy trình lên men nhỏ hơn 60 giờ, nhỏ hơn 48 giờ, và nhỏ hơn 40 giờ, không bao gồm tăng sinh chủng giống. Trong các phương án khác, thể tích canh trường ban đầu là 3 lít tại pha theo mẻ, làm việc tới 7 lít trong pha tiếp liệu, và các tỷ lệ tương tự. Do đó, trong các phương án liên quan, quá trình nuôi cấy tạo ra heparosan với lượng ít nhất 10g/l, ít nhất 11g/l, ít nhất 12g/l, ít nhất 13g/l, ít nhất 14g/l, và ít nhất 15g/l. Heparosan về cơ bản là tinh khiết ít nhất là 90%, ít nhất 95%, ít nhất 97%, hoặc ít nhất 99%. Trong các phương án liên quan, heparosan nhỏ hơn 1% ADN và nhỏ hơn 2% protein. Heparosan thích hợp để xử lý thành heparin. Trong một phương án, heparosan có số trọng lượng phân tử trung bình số ít nhất là 10, 20, 30, 40, 50, hoặc 60 kDa, chẳng hạn khoảng 58kDa; trọng lượng phân tử trung bình ít nhất 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 hoặc 90kDa, chẳng hạn khoảng 84kDa, và chỉ số độ rộng phân bố (PDI) nhỏ hơn 2,0, bao gồm nhỏ hơn 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, hoặc 1,3, bao gồm khoảng 1,4.

Trong các phương án khác, sáng chế bao gồm việc sử dụng heparosan được sản xuất bằng các phương pháp ở trên trong điều chế được, chẳng hạn phủ thiết bị y tế. Trong các phương án liên quan, heparosan được sử dụng để sản xuất heparin. Tương tự, sáng chế đề cập đến phương pháp sử dụng heparosan hoặc heparin được sản xuất bởi phương pháp nêu trên để sản xuất thuốc.

Trong các phương án khác, sáng chế đề cập đến heparosan được sản xuất bằng phương pháp nêu trên, bao gồm heparosan với độ tinh khiết ít nhất 90%, ít nhất 95%, và hơn nữa. Trong các phương án liên quan, sáng chế đề cập đến heparin được sản xuất từ heparosan đã nêu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình mô tả cấu trúc của heparosan. A là đơn vị disacarit lặp lại của heparosan, B là cấu trúc của chuỗi heparosan thu được từ sự hoạt hóa heparosan K5 lyaza.

Fig.2 là ảnh phổ ^1H -NMR (600 MHz) heparosan được điều chế trong quá trình nuôi cấy bằng máy lắc nhanh. A là biểu đồ chùm của heparosan thu hồi từ: 1. Môi trường LB, 2. Môi trường LB có $\text{MW}_{\text{Avg}} > 3,000$, 3. Môi trường LB có $\text{MW}_{\text{Avg}} < 3,000$, và biểu đồ lồng thể hiện phép phân tích PAGE của các mẫu 1, 2 và 3. B là heparosan thu hồi từ môi trường M9. C là heparosan thu hồi từ môi trường xác định glycerol. D là heparosan thu hồi từ môi trường xác định glucoza.

Fig.3 là quy trình sản xuất heparosan trong thiết bị lên men 7 lít. Bảng A thể hiện biểu đồ tiếp liệu glucoza (màu đen), biểu đồ pH (màu xanh) và biểu đồ oxy hòa tan (% DO) (màu đỏ) như là hàm thời gian lên men (giờ). Bảng B thể hiện biểu đồ sinh trưởng tế bào (tổng DCWg, ▲) và quá trình sản xuất heparosan (g, ■) như là hàm thời gian lên men (giờ).

Fig.4 là hình mô tả đặc điểm của heparosan được tinh sạch từ phần nổi của thiết bị lên men 7 lít. A là ảnh phổ từ ^1H -NMR (600 MHz) của heparosan. B là ảnh phổ từ ^{13}C -NMR của heparosan được điều chế trên môi trường M9 chứa ^{13}C glucoza và ^{15}N amoniac sulfat. C là ảnh FT-MS của chuỗi heparosan có trọng lượng phân tử trung bình 4551,81 (mức độ polyme hóa =24) được tinh sạch bằng PAGE điều chế (Ly et al., 2010).

Fig.5 là hình ảnh PAGE được sử dụng cho phân tích MW của các heparosan bằng cách nhuộm màu xanh Alcian. A là các chuẩn phân tử mở rộng khoảng gel gradien. Các dải chứa: 1 là thước đo phân tử HA (30 kD-310 kD), 2 là thước đo phân tử heparosan (6,4 kD-14,1 kD). B là các heparosan được điều chế trong các máy lắc nhanh trong các môi trường khác nhau. Các dải chứa: 1 là heparosan từ môi trường M9, 2 là heparosan từ môi trường tổng hợp glyxerol, 3 là heparosan từ môi trường tổng hợp glucoza, và 4 là heparosan từ môi trường LB. C là các heparosan được điều chế trong thiết bị lên men 7 lít được lấy mẫu tại các thời điểm khác nhau. Các dải chứa: 1-6 là heparosan được lấy mẫu từ thiết bị lên men tại 4,5 giờ; 12,6 giờ; 14,5 giờ; 20 giờ; 32,9 giờ; và 37,6 giờ sau khi bắt đầu lên men.

Fig.6 là đồ thị minh họa tiến trình theo thời gian của các đặc tính trọng lượng phân tử của heparosan được sản xuất trong thiết bị lên men 7 lít. Được thể hiện là các xu hướng của M_N (■), M_W (●) và PDI (◆).

Fig.7 là đồ thị thể hiện biểu đồ độ pH (■) và biểu đồ oxy hòa tan (% DO) (◆) như là hàm thời gian lên men (giờ) trong thiết bị lên men 20 lít.

Fig.8 là biểu đồ sinh trưởng của tế bào (DCW g/l, (■)) và nồng độ heparosan trong phần nổi của quá trình lên men (g/l, (◆)) tiến trình thời gian trong thiết bị lên men 20 lít.

Fig.9 là ảnh phổ $^1\text{H-NMR}$ của các mẫu heparosan được tinh sạch.

Fig.10 là đồ thị thể hiện nồng độ heparosan trong phần nổi sau kết tủa sử dụng các lượng chitosan khác nhau từ 10ml của dung dịch heparosan tinh khiết có nồng độ 1mg/ml.

Fig.11 là đồ thị thể hiện phần trăm thu hồi sử dụng các lượng chitosan khác nhau từ 10ml của dung dịch heparosan tinh khiết có nồng độ 1mg/ml.

Fig.12 là đồ thị thể hiện phần trăm thu hồi sử dụng các lượng chitosan khác nhau từ 10ml của các mẫu dịch lên men được pha loãng 5 lần.

Mô tả chi tiết sáng chế

Heparosan là polysacarit có đơn vị disacarit $[\text{Glc}\alpha\text{-(1-4)}\text{GlcNAcR(1-4)}]_n$ lặp lại. Do exopolysacarit K5 được sản xuất từ heparosan mà các tác giả của sáng chế phân tách và tinh sạch heparosan có mặt trong môi trường nuôi cấy nhờ quá trình phân tách và tinh sạch, “heparosan” trong ngữ cảnh nhất định có thể hiểu là heparosan kết hợp với vi khuẩn, và. Nghĩa của heparosan sẽ được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực liên quan.

Escherichia coli K5 là các biến thể của *E. coli* mà tạo ra exopolysacarit K5. Các chủng *E. coli* K5 thích hợp có thể lấy từ các bộ sưu tập công cộng như ATCC (American Type Culture Collection, USA), chẳng hạn chủng *E. coli* ATCC23506. Các

chủng *Escherichia coli* K5 cũng có thể được phân lập từ các nguồn lâm sàng, và/hoặc được biến đổi gen.

Như được sử dụng ở đây "lên men" chỉ quá trình sinh trưởng vi khuẩn và sản xuất exopolysacarit, cụ thể là exopolysacarit K5.

Như được sử dụng ở đây, "được phân tách" có nghĩa là heparosan được tách ra từ môi trường nuôi cấy và các tế bào vi khuẩn và tồn tại ở lượng đủ để cho phép phát hiện ra nó hoặc sử dụng nó.

Như được sử dụng ở đây, "về cơ bản là tinh khiết" có nghĩa là heparosan về cơ bản không chứa các cơ chất khác ở mức thực hành và phù hợp cho mục đích sử dụng của nó. Heparosan về cơ bản là tinh khiết ít nhất là 90% tinh khiết. Tốt hơn là, tỷ lệ không chứa tạp chất của vật liệu lớn hơn 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc thậm chí lớn hơn 99%. Mức độ tinh khiết có thể được đánh giá bằng các phương pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật.

Như được sử dụng ở đây, dạng số ít có nghĩa là một hoặc nhiều hơn một, trừ khi được nêu rõ có nghĩa chỉ là một.

Thuật ngữ "khoảng" được sử dụng theo nghĩa hiểu của người có trình độ trong lĩnh vực trong ngữ cảnh mà từ "khoảng" thay đổi thuật ngữ được nêu. Đối với giá trị về số, "khoảng" có thể được coi là bao gồm khoảng dao động 10% quanh giá trị được nêu.

Lên men *E. coli* K5 để sản xuất heparosan

Nhiều yếu tố phải được xem xét để xác định các điều kiện phù hợp cho quá trình lên men.

Nói chung, *E. coli* có thể sinh trưởng ở nhiều môi trường và khoảng pH, nhiệt độ, O₂ và điều kiện khác nhau. Tuy nhiên, không giống với các chủng được thích ứng cho thí nghiệm, *E. coli* K5 không được nghiên cứu về gen, sự sinh trưởng và chức năng ở quy mô rộng.

Các biến thể trong điều kiện sinh trưởng có thể ảnh hưởng đến (a) tốc độ sinh trưởng vi khuẩn, (b) mật độ tế bào tối đa, (c) sản xuất nang exopolysacarit K5, (d) mức độ biến đổi của nang K5 bởi *E. coli* K5, thể thực khuẩn cư trú bên trong *E. coli* K5, và các yếu tố khác, (e) giải phóng nang exopolysacarit K5 vào trong môi trường, (f) xác định xem liệu heparosan polysacarit được tạo ra có khoảng kích thước thích hợp để xử lý thành heparin hay không, và (g) lượng và loại tạp chất. Ví dụ, điều kiện kích thích sự phân ly tế bào có thể làm tăng sản lượng exopolysacarit K5 trong phần nổi canh trường, nhưng cũng có thể làm tăng sự suy thoái nang exopolysacarit K5 và số và lượng tạp chất trong phần nổi.

Tầm quan trọng của tạp chất bất kỳ liên quan đến tính dễ dàng loại bỏ nó qua quá trình tinh sạch và các bước xử lý tiếp theo, xác định xem liệu tạp chất có cản trở việc xử lý tiếp theo heparosan thành heparin hay không, và liệu tạp chất có gây nguy hiểm cho con người hoặc động vật hay không. *E. coli* K5 là tác nhân gây bệnh đã biết, và do đó các độc tố và yếu tố liên quan đến động lực phải bị loại bỏ. Lipopolysacarit (LPS) là tạp chất thông thường của các phần chiết từ vi khuẩn Gram âm, và được biết đến là chất kích thích miễn dịch và độc tố có hiệu nghiệm. Các axit nucleic cũng có thể cũng là chất kích thích miễn dịch. Cả LPS và axit nucleic đều có lõi polysacarit, và vì vậy có thể cùng tinh sạch với heparosan. Các tạp chất khác có thể bao gồm các polysacarit không heparosan hoặc các dẫn xuất của heparosan.

Để sản xuất dược phẩm và thuốc, nguồn và bản chất của môi trường sinh trưởng có thể đóng vai trò quan trọng. Ví dụ, môi trường phức chất thu được bằng cách thủy phân protein động vật hoặc thực vật rất ưu việt cho quá trình sinh trưởng và sản xuất *E. coli* K5, nhưng thể hiện sự thay đổi giữa các mẻ và có thể chứa các kháng nguyên và các tạp chất khác.

Các yếu tố khác phải được xem xét để sản xuất heparosan trên quy mô công nghiệp bao gồm thể tích canh trường, thời gian và nhiệt độ lên men. Do đó, các thể tích môi trường nhỏ hơn và điều kiện sinh trưởng nhanh hơn có thể thích hợp. Việc xác định môi trường sinh trưởng, mà sử dụng nhiều nguyên liệu có sẵn, được chuẩn hóa và rẻ, cũng thích hợp;

Các điều kiện sinh trưởng cũng phải thể hiện được là có khả năng theo tỉ lệ. Do đó, việc xác định điều kiện tối ưu trong thể tích canh trường 5ml cũng phải được thể hiện trên các quy mô lớn hơn, như 5 lít, 20 lít, 100 lít và hơn nữa. Tương tự, quy trình phải là quy trình mạnh và có thể tái sản xuất được, và do đó không dễ bị ảnh hưởng bởi những thay đổi điều kiện nhỏ.

Từ các yếu tố nêu trên, việc xác định các điều kiện thích hợp cho sản xuất heparosan trong công nghiệp đóng vai trò quan trọng. Các tác giả của sáng chế đã xác định điều kiện sinh trưởng và nuôi cấy thích hợp cho *E. coli* K5 để tạo điều kiện cho sản xuất, phân tách và tinh sạch heparosan, mà có thể thích ứng với sản xuất công nghiệp.

Môi trường là môi trường được xác định với glucoza là nguồn cacbon, mà được thay đổi tùy theo pha sinh trưởng. Thành phần của môi trường cho sự sinh trưởng theo mẻ với lượng tính theo lít như sau: glucoza với lượng khoảng 20g, thiamin với lượng 10-300mg, KH_2PO_4 với lượng khoảng 13,5g; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ với lượng khoảng 4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng khoảng 1,4g, axit xitric với lượng khoảng 1,7g, và kim loại vi lượng với lượng khoảng 10ml dung dịch. Dung dịch kim loại vi lượng bao gồm (trên lít của HCl 5M) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 10g, CaCl_2 với lượng 2g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 2,2g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ với lượng 0,5g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ với lượng 1g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ với lượng 0,1g, và $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ với lượng 0,02g. Dung dịch tiếp liệu trong quá trình nuôi cấy theo mẻ được tiếp liệu bao gồm (trên lít): glucoza với lượng 250-1000g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 20g và thiamin với lượng 0,15 - 0,5g, và có thể được bổ sung thêm KH_2PO_4 với lượng 47g. Trong một số phương án, dung dịch tiếp liệu là glucoza với lượng 700g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 20g và thiamin với lượng 0,2g. Trong phương án khác, dung dịch tiếp liệu là glucoza với lượng 700g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 20g, KH_2PO_4 với lượng 47g và thiamin với lượng 0,4g.

Canh trường nhân giống được chuẩn bị bằng cách nuôi chủng *E. coli* K5 qua đêm tại nhiệt độ 37°C trong bình hình nón. Canh trường nhân giống sau đó được cấy chuyển vào trong thiết bị lên men. Quá trình lên men trong thiết bị lên men bao gồm hai pha: pha sinh trưởng theo mẻ, và pha mà sử dụng sự kết hợp của các phương pháp

tiếp liệu theo hàm số mũ và bổ sung DO-stat. Pha sinh trưởng theo mẻ bắt đầu sau khi canh trường nhân giống được cấy chuyển vào thiết bị lên men. Nhiệt độ được duy trì ở khoảng 37°C, và độ pH được duy trì nằm trong khoảng từ 6 đến 8 bằng cách bổ sung NH₄OH khi độ pH giảm.

Pha lên men thứ hai bắt đầu sau khi oxy hòa tan thể hiện sự tăng mạnh và glucoza trong môi trường bị cạn. Tốc độ tiếp liệu glucoza thường được tính toán theo phương trình sau nhưng với sự linh hoạt:

$$M_s(t) = F(t)S_F(t) = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m \right) X(t)V(t) = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m \right) X(t_0)V(t_0)\exp[\mu(t - t_0)]$$

trong đó: M_s là lưu lượng theo khối lượng của nguồn cacbon (g/h); F là lưu lượng tiếp liệu (l/h); S_F là nồng độ cơ chất cacbon trong quá trình tiếp liệu (g/l); X là nồng độ tế bào (g/l dcw); m là hệ số duy trì riêng (g/g dcw/h); V là thể tích canh trường (l); t_0 là thời gian bắt đầu tiếp liệu; t là thời gian xử lý; μ là tốc độ sinh trưởng riêng (h⁻¹); $Y_{X/S}$ là sản lượng tế bào trên cơ chất cacbon (g/g).

Trong toàn bộ quy trình tiếp liệu, μ được đặt nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,4.

Trong một số phương án, có thể có sự tạm dừng trong quá trình tiếp liệu, là các điểm kiểm tra để đảm bảo glucoza không bị tiếp liệu quá nhiều và chất có độc tính như axetat trong môi trường nuôi cấy thấp. Trong các điểm kiểm tra này, việc tiếp liệu được bắt đầu lại sau khi quan sát thấy sự tăng mạnh của nồng độ oxy hòa tan, mà thể hiện rằng glucoza trong canh trường bị cạn. Trong quy mô lớn hơn, những quan sát này được thực hiện liên tục bằng các đầu dò, hoặc bằng phương pháp lấy mẫu tự động và phân tích trong suốt quá trình lên men.

Thông thường, quá trình lên men tiếp tục cho đến khi không quan sát thấy sự tăng nồng độ tế bào. Sau đó, dừng tiếp liệu và dụng cụ khuấy của thiết bị lên men tiếp tục khuấy thêm khoảng 30-60 phút nữa thì dừng để dịch chuyển thêm polysaccharit K5 dạng nang ra khỏi bề mặt tế bào và đi vào môi trường.

Tinh sạch heparosan từ canh trường lên men

Trong một phương án ví dụ, bước tinh sạch heparosan có thể bao gồm (a) bước tạo phần nổi canh trường hoặc chất lọc, (b) gắn heparosan lên pha rắn, như nhựa, và rửa giải heparosan từ đó; (c) kết tủa với rượu và (d) khử pyrogen. Các bước gắn, kết tủa và khử pyrogen khác có thể được bỏ sung.

Trong bước (a), canh trường được ly tâm hoặc lọc để tách phần nổi ra khỏi hạt tế bào. Formalin hoặc các chất khác có thể được bổ sung vào canh trường để bất hoạt tế bào vi khuẩn. Về cơ bản, heparosan được thu hồi từ phần nổi, nhưng cũng có thể được thu hồi bằng cách rửa các tế bào, bao gồm bằng chất tẩy rửa như natri dodecyl sulfat và bằng cách khuấy cơ học, tiếp đến bằng việc tạo hạt và chiết heparosan ra khỏi phần nổi.

Trong bước (b), heparosan được gắn lên pha rắn mà ưu tiên gắn heparosan. Ví dụ, nhựa, như nhựa trao đổi anion, được bổ sung vào phần nổi từ bước (a). Hỗn hợp được khuấy để gắn heparosan trong phần nổi lên trên nhựa. Sau đó, hỗn hợp được lọc để tách nhựa ra khỏi dung dịch. Sau đó, chất rắn đã tách được rửa để loại bỏ các tạp chất không gắn và được rửa giải.

Đối với nhựa trao đổi anion, sẽ bao gồm bước rửa bằng dung dịch có nồng độ muối thấp để loại bỏ các tạp chất không liên kết, và rửa giải với dung dịch natri clorua 1-2M. Ngoài ra, chitosan cũng có thể được sử dụng để liên kết heparosan. Mặc dù chitosan có thể được bổ sung ở dạng dung dịch, và do đó không ở "pha rắn", nhưng nó kết tủa và từ đó mang theo heparosan ra khỏi phần nổi. Tương tự, heparosan có thể được chạy qua cột thích hợp chứa pha rắn, được rửa và rửa giải.

Trong bước (c), dịch rửa giải heparosan thu được từ bước (b) được kết tủa, chẳng hạn bằng cách bổ sung 1 đến 5 phần thể tích ethanol hoặc metanol. Bước này không chỉ cô đặc heparosan mà còn loại bỏ chọn lọc các tạp chất. Sau đó, chất kết tủa được phân tách bằng ly tâm và được rửa bằng rượu 50-80%.

Trong bước (d), chất kết tủa được hòa tan trong nước, và trải qua bước khử pyrogen để bất hoạt lipolysacarit còn lại và các tạp chất khác. Thông thường, điều này được thực hiện với chất oxy hóa như hydro peroxit, nhưng các peroxit khác hoặc các chất tẩy rửa khác đã được biết đến cũng có thể sử dụng. Heparosan thu được được kết tủa lại, như ở trên, và được làm khô.

Phân tích

Heparosan thu được được phân tích để xác định hiệu suất, độ tinh khiết và tính phù hợp cho việc xử lý thêm. Một số công cụ phân tích cũng có thể được sử dụng.

Chế phẩm disacarit có thể được phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao – khối phổ ion hóa phun điện tử (high performance liquid chromatography – electrospray ionization – HPLC-ESI-MS) sau khi tiêu hủy một phần heparosan. [Bhattacharyya S et al. (2010) “Cell-bound IL-8 increases in bronchial epithelial cells after arylsulfatase B silencing due to sequestration with chondroitin-4-sulfate,” *Am J Respir Cell and Molec Biol* 42, 51-61]. ^1H -NMR và ^{13}C -NMR cũng có thể được sử dụng trên heparosan chưa tiêu hủy và thích hợp để xác định nồng độ và độ tinh khiết của heparosan. [Wang Z, Zhang Z, McCallum SA, Linhardt RJ. 2009. Định lượng cộng hưởng từ hạt nhân để kiểm soát sự sản xuất polysacarit nang heparosan K5. *Anal Biochem*. 398(2):275-7]. Heparosan cũng có thể được xác định bằng phép phân tích carbozol theo báo cáo của Bitter T, Muir HM. (1962) “A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction.” *Analytical Biochemistry* 4(4):330.

Hàm lượng ADN có thể được xác định bằng hấp thụ UV. Hàm lượng protein có thể được xác định bằng, các kit thử đã biết, như Kit thử nghiệm protein BCA Micro theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đặc tính trọng lượng phân tử của heparosan tinh sạch được xác định bằng phép so sánh với thang trọng lượng phân tử đã biết của heparosan hoặc axit hyluronic, và được sử dụng để tính giá trị trung bình, số lượng và sự phân bố trọng lượng phân tử.

Hàm lượng pyrogen có thể được xác định bằng thử nghiệm dịch thủy phân tế bào máu động vật họ Sam (limulus amoebocyte lysate - LAL).

Sáng chế có thể được hiểu rõ hơn khi tham khảo các ví dụ sau đây, mà được đưa ra để minh họa các phương án nhất định của sáng chế mà không mang tính giới hạn. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng các biến thể có thể được thực hiện mà không xa rời tinh thần của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Vật liệu

Bình phản ứng sinh học có thể thanh trùng được bằng thủy tinh, 7 lít từ hãng Applikon (Schiedam, Netherlands) được sử dụng làm thiết bị lên men. Phần mềm BioXpert V1.5 được sử dụng để kiểm soát vận hành lên men và thu thập dữ liệu. Bọt Difco™ LB broth được mua từ hãng BD (Franklin Lakes, NJ). Hầu hết các hóa chất được sử dụng để tạo môi trường tổng hợp từ hãng Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Chất chống tạo bọt 204 từ Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Các bình lắc có vách ngăn từ hãng Corning (Corning, NY). Cột trao đổi ion DEAE Sepharose Fast Flow từ hãng GE Healthcare (Piscataway, NJ) được sử dụng để tinh sạch heparosan. Các cột tạo xoáy Vivapure D Mini H từ hãng Sartorius Stedim Biotech (Aubagne, France). Kit thử nghiệm Micro BCA Protein từ hãng Thermo Scientific (Rockford, IL). Enzym được sử dụng để phân hủy heparosan cho phân tích disacarit được biểu hiện và tinh sạch trong phòng thí nghiệm của chúng tôi như được mô tả trong tài liệu Han et al.(2009) “Structural snapshots of heparin depolymerization by heparin lyase I” J Biol Chem 284(49):34019-27. HPLC-MS được thực hiện trên công cụ Agilent 1100 instrument (Santa Clara, California). Các tấm silicagel TLC từ EMD (Gibbstown, NJ). Vật liệu để điều chế thang heparosan MW và xác định heparosan M_w được mô tả chi tiết trong tài liệu Ly M, et al (2010) “Analysis of E. coli K5 capsular polysaccharide heparosan” Anal Bioanal Chem (DOI: 10.1007/s00216-010-3679-7). Bộ select _HA™ LoLadder, thước đo phân tử hyaluronan, được thu từ Hyalose (Oklahoma City, OK).

Sinh trưởng *E. coli* K5 trong các bình lắc 2,8L

E. coli K5 từ bộ sưu tập chủng giống của Mỹ (American Type Culture Collection -ATCC #23506) được bảo quản đông lạnh trong 1ml môi trường M9, LB, glycerol và môi trường glucoza, với glycerol 25%. Bình lắc 250ml chứa 25ml môi trường cùng loại được cấy chuyển với 0,5ml *E. coli* đã tan băng. Thu được canh trường khi quá trình sinh trưởng theo hàm mũ bị chậm lại đạt xấp xỉ 1,1g trọng lượng tế bào khô (DCW)/L với môi trường nuôi cấy M9, 5,4g DCW/L cho môi trường tổng hợp glycerol, 5,6g DCW/L cho môi trường tổng hợp glucoza, và 1,9g DCW/L cho môi trường LB. Canh trường *E. coli* K5 (300ml) tiếp đến được sinh trưởng trong các bình lắc 2,8L được cấy chuyển với 5% thể tích tế bào trong pha sinh trưởng theo hàm mũ chậm. Canh trường được lắc tại 220 vòng/phút và tại nhiệt độ 37°C cho đến tận 1-4 giờ sau khi sinh trưởng đạt tới pha ổn định và sau đó được thu lại để thu hồi heparosan. Môi trường được sử dụng trong bình lắc 2,8L để lên men bao gồm: 1. Môi trường LB: Difco™ LB broth, Lennox, 20g/l. 2. Môi trường M9: glucoza với lượng 2g/l, MgSO₄ với lượng 0,12g/l, CaCl₂ với lượng 0,011g/l, thiamin-HCl với lượng 0,337g/l, Na₂HPO₄ với lượng 6g/l, KH₂PO₄ với lượng 3g/l, NaCl với lượng 0,5g/l, NH₄Cl với lượng 1g/l. 3. Môi trường xác định Glycerol: glycerol với lượng 20g/l, thiamin với lượng 20mg/l, KH₂PO₄ với lượng 13,5g; (NH₄)₂HPO₄ với lượng 4g, MgSO₄·7H₂O với lượng 1,4g, axit xitric với lượng 1,7g, và dung dịch kim loại vi lượng với lượng 10ml. Dung dịch kim loại vi lượng bao gồm (trên lít HCl 5M) FeSO₄·7H₂O với lượng 10g, CaCl₂ với lượng 2g, ZnSO₄·7H₂O với lượng 2,2g, MnSO₄·4H₂O với lượng 0,5g, CuSO₄·5H₂O với lượng 1g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O với lượng 0,1g, và Na₂B₄O₇·10H₂O với lượng 0,02g [Wang FL, Lee SY (1998) “High cell density culture of metabolically engineered Escherichia coli for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium” Biotechnology and Bioengineering 58(2-3):325-328]. 4. Môi trường xác định Glucoza: mỗi lít glucoza với lượng 20g, thiamin với lượng 20mg, KH₂PO₄ với lượng 13,5g; (NH₄)₂HPO₄ với lượng 4g, MgSO₄·7H₂O với lượng 1,4g, axit xitric với lượng 1,7g, và dung dịch kim loại vi lượng với lượng 10ml. Dung dịch kim loại vi lượng bao gồm (trên lít HCl 5M) FeSO₄·7H₂O với lượng 10g, CaCl₂ với lượng 2g, ZnSO₄·7H₂O với lượng 2,2g,

MnSO₄·4H₂O với lượng 0,5g, CuSO₄·5H₂O với lượng 1g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O với lượng 0,1g, và Na₂B₄O₇·10H₂O với lượng 0,02g [Wang and Lee (1998), id].

Sinh trưởng *E. coli* K5 trong thiết bị lên men 7 lít

Quy trình lên men bao gồm giai đoạn sinh trưởng theo mẻ và giai đoạn sinh trưởng theo mẻ được tiếp liệu. Thành phần của môi trường cho sinh trưởng theo mẻ trong quy trình lên men: (mỗi lít) glucoza với lượng 20g, thiamin với lượng 20mg, KH₂PO₄ với lượng 13,5g; (NH₄)₂HPO₄ với lượng 4g, MgSO₄·7H₂O với lượng 1,4g, axit xitric với lượng 1,7g, và dung dịch kim loại vi lượng với lượng 10 ml. Dung dịch kim loại vi lượng bao gồm (trên 1 lít HCl 5M) FeSO₄·7H₂O với lượng 10g, CaCl₂ với lượng 2g, ZnSO₄·7H₂O với lượng 2,2g, MnSO₄·4H₂O với lượng 0,5g, CuSO₄·5H₂O với lượng 1g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O với lượng 0,1g, và Na₂B₄O₇·10H₂O với lượng 0,02g. Dung dịch tiếp liệu được sử dụng trong giai đoạn theo mẻ bổ sung bao gồm (trên lít): glucoza với lượng 700g, MgSO₄·7H₂O với lượng 20g và thiamin với lượng 0,2g. [Wang and Lee (1998), id].

Giai đoạn sinh trưởng theo mẻ bắt đầu với bước cấy chuyển canh trường nhân giống (DCW 5,6g/l với lượng 300ml) thu được từ bình lắc trong giai đoạn sinh trưởng theo hàm mũ chậm. Nhiệt độ được duy trì tại nhiệt độ khoảng 37°C, và độ pH được duy trì tại xấp xỉ 7 (bằng cách bổ sung dung dịch amoniac 29%). Không khí được thổi vào trong thiết bị lên men để cung cấp oxy, và tốc độ của dụng cụ khuấy được cài đặt tới 520 vòng/phút (RPM).

Giai đoạn thứ hai của quy trình lên men bắt đầu sau khi glucoza trong môi trường sinh trưởng theo mẻ đã cạn và oxy hòa tan thể hiện sự tăng mạnh. Sau đó, dung dịch tiếp liệu được tiếp liệu theo hàm số mũ theo phương trình 1:

$$Ms(t) = F(t) S_{F(t)} = \left(\frac{\mu}{Y_{x/s}} + m \right) X(t_0) V(t_0) \exp [\mu(t - t_0)] \quad (1)$$

trong đó MS là lưu lượng theo khối lượng của nguồn cacbon (g/h); F là lưu lượng tiếp liệu (L/h); S_F là nồng độ cơ chất cacbon trong nguồn tiếp liệu (g/l); X là nồng độ tế

bào (g/l dcw); m là hệ số duy trì riêng (g/g dcw/h); V là thể tích canh trường (L); t_0 là thời gian bắt đầu tiếp liệu; t là thời gian quy trình; μ là tốc độ sinh trưởng riêng (h^{-1}); và $Y_{x/s}$ là sản lượng tế bào trên cơ chất cacbon (g/g) [Lee SY. 1996. “High cell-density culture of *Escherichia coli*”. Trends Biotechnol 14(3):98-105]. Trị số μ nằm trong khoảng từ $0,10 - 0,15 \text{ h}^{-1}$ được sử dụng trong nghiên cứu này để cho phép nhân giống tế bào đủ trong khi tránh tích tụ của các sản phẩm phụ độc hại do tốc độ sinh trưởng cao hơn. “Bơm axit” được gắn vào thiết bị lên men được sử dụng để thực hiện chức năng tiếp liệu glucoza thay vì bổ sung axit thực, và bơm bazơ được sử dụng để bổ sung dung dịch amoniac 29% để duy trì pH ổn định và cung cấp cho canh trường nguồn nitơ. Bơm thứ ba được sử dụng để bổ sung chất chống bọt 204 vào trong canh trường khi canh trường tạo bọt vượt quá mức độ cài đặt được kiểm soát bởi vòng phản hồi thông qua bộ phận kiểm soát kỹ thuật số của thiết bị lên men. Tốc độ tiếp liệu glucoza đạt được bằng cách lập trình thời gian bật-tắt “bơm axit” trong khoảng thời gian một phút. Phương trình $T_{\text{on}} = 0,72 * \exp[0,0023 * (t - 420)]$ được sử dụng trong khoảng thời gian từ 7 giờ đến 24 giờ của thời gian lên men đã trôi qua, trong đó T_{on} là thời gian “bơm axit” được bật trong khoảng thời gian một giây trong suốt khoảng thời gian một phút. Tốc độ tiếp liệu glucoza giảm xuống sau 24 giờ khi quan sát thấy sự hạn chế khí oxy. Việc kiểm soát độ pH được thực hiện theo cách thủ công bằng cách sử dụng bơm bazơ để bổ sung dung dịch amoniac hydroxit 29%. Độ pH được kiểm soát chặt chẽ hơn bằng cách sử dụng chương trình tùy chỉnh được viết trong phần mềm BioXpert V1.5. Tốc độ của dụng cụ khuấy và/hoặc tốc độ dòng không khí được tăng lên khi oxy hòa tan giảm xuống dưới 20% bão hòa không khí. Oxy tinh khiết được trộn với không khí để cho ra oxy hòa tan đủ sau 24 giờ lên men. Việc tiếp liệu glucoza được dừng lại theo định kỳ để đảm bảo rằng các tế bào đã dùng hết glucoza, và các sản phẩm phụ độc hại (chẳng hạn axetat) không tạo thành trong môi trường. Việc tiếp liệu được bắt đầu lại sau khi quan sát thấy đỉnh oxy hòa tan, cho thấy sự cạn kiệt glucoza và tạo thành của độc tố bởi các sản phẩm. [Johnston WA, et al. (2003) “Tracking the acetate threshold using DO-transient control during medium and high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* in complex media” Biotechnol Bioeng 84(3):314-23]. Các mẫu được thu từ thiết bị lên men theo định kỳ. Các mẫu lấy ra

được ly tâm tại 12000 x g trong khoảng thời gian 30 phút để tách phần nổi ra khỏi các tế bào *E. coli*.

Xác định nồng độ heparosan trong phần nổi lên men

Nồng độ heparosan trong phần nổi lên men được đo bằng cả phép phân tích carbazol và NMR. Trong thử nghiệm carbazol của heparosan, 0,5ml phần nổi lên men thu hồi được bằng ly tâm được sử dụng cho cột xoáy khử muối Millipore YM-3 (1200 x g) để loại bỏ muối và các phân tử nhỏ. Phần được giữ lại chứa heparosan thô được thu hồi và làm khô lạnh. Heparosan thô đã làm khô được hoàn nguyên với 0,5ml nước cất và trải qua thử nghiệm carbazol. Nồng độ của heparosan được tính từ đồ thị chuẩn tạo ra bằng cách sử dụng heparosan tinh khiết. Trong thử nghiệm NMR, heparosan (1ml), được thu hồi tương tự từ phần nổi canh trường, được đông khô và sau đó hòa tan trong 400 μ L D₂O chứa 71 μ g natri terephthalat (tiêu chuẩn nội bộ) sau đó chuyển sang ống NMR cho ¹H-NMR tại 600 MHz. Nồng độ heparosan được tính toán từ tỷ lệ giữa vùng tích hợp của nhóm N-acetyl trong heparosan và vùng tích hợp của tiêu chuẩn nội bộ.

Thu hồi nhanh mẫu heparosan trong quy trình lên men để phân tích

Heparosan được thu hồi nhanh từ phần nổi lên men và được tinh sạch một phần bằng cách sử dụng cột xoáy Vivapure D Mini H. Phần nổi (1ml), được thu hồi từ các tế bào bằng quá trình ly tâm (12000 x g), được trộn với 1ml đệm A (50mM natri clorua, 20mM natri axetat, pH=4). Sau đó, hỗn hợp được điều chỉnh tới pH=4 và được tải lên trên cột Vivapure D Mini H được cân bằng trước. Sau đó, cột được rửa bằng đệm A và được rửa giải bằng đệm B (natri clorua 1M, natri axetat 20mM, pH = 4). Các mẫu đã rửa giải sau đó được kết tủa với 3 thể tích ethanol được để qua đêm tại nhiệt độ -20°C (trong máy kết đông chống nỏ) và chất kết tủa thu được được rửa với ethanol 75%, được hòa tan trong nước và được đông khô. Độ tinh khiết của các mẫu thu được sau đó được kiểm tra bởi ¹H-NMR.

Tinh sạch heparosan

Heparosan được thu hồi khi kết thúc lên men trong bình lắc hoặc là thiết bị lên men 7 lít bằng cách ly tâm canh trường tại 12000 x g trong khoảng thời gian 30 phút. Phần nổi thu được được điều chỉnh tới độ pH = 4 bằng cách bổ sung axit axetic bằng và sau đó được lọc qua phễu Pyrex Buchner với đĩa xốp (kích thước lỗ 40-60µm). Nhựa chảy nhanh DEAE-Sepharose được nhồi vào trong cột có kích thước phù hợp (< 20mg heparosan/ml nhựa phòng). Đầu tiên, cột được cân bằng với natri clorua 50mM trong đệm natri axetat 20mM tại độ pH = 4. Sau đó, phần nổi lên men được tải lên trên cột và cột được rửa bằng 3 thể tích natri clorua 50mM trong 20mM đệm natri axetat tại pH = 4. Sau đó, heparosan được rửa giải ra khỏi cột bằng natri clorua 1mM trong đệm natri axetat 20mM tại độ pH = 4. Heparosan mà được rửa giải ra khỏi cột được kết tủa bằng cách bổ sung 3 thể tích etanol và bảo quản dung dịch này qua đêm tại nhiệt độ -20°C trong máy kết đông chống nổ. Chất kết tủa được thu hồi bằng cách ly tâm tại 12000g trong khoảng thời gian 30 phút. Hạt được rửa với etanol 75%, ly tâm lại và hạt tạo thành hoặc là được đông khô để bảo quản hoặc là được sử dụng trực tiếp cho bước tẩy rửa tiếp theo. Heparosan cũng có thể được tinh sạch từ hạt tế bào bằng cách bổ sung SDS 0,02% SDS, tiếp đến khuấy mạnh, ly tâm và sắc ký DEAE.

Trong bước tẩy rửa, heparosan đầu tiên được hòa tan trong natri clorua 1M tại nồng độ khoảng 15g/l. Độ pH của dung dịch được điều chỉnh tới 9,5 bằng NaOH 1M và hydro peroxit (30%) được bổ sung để thu được nồng độ cuối 1,5%. Hỗn hợp được ủ qua đêm tại nhiệt độ trong phòng, sau đó heparosan được kết tủa bằng cách bổ sung 3 thể tích etanol và được để qua đêm tại nhiệt độ -20°C (trong máy kết đông chống nổ). Hạt tạo thành được rửa với etanol 75%, được hòa tan trong nước và được làm khô.

Phân tích disacarit của heparosan

Heparosan (10mg/ml) được hòa tan trong đệm natri phosphat 200mM tại pH = 7 và được xử lý bằng 1mU mỗi heparin lyaza 1, 2 và 3 tại nhiệt độ 30°C qua đêm. Sản phẩm disacarit tạo thành được trải qua sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)-ion hóa phun điện tử (ESI)-khối phổ (MS) trên công cụ thu giữ Agilent Ion và chế phẩm

disacarit được xác định. Phép phân tích LC-MS được thực hiện trên hệ thống LC-MS (LC/MSD trap MS; Agilent, Santa Clara, CA). Các dung dịch A và B dùng cho phép sắc ký lỏng hiệu năng cao là axetonitril 15% và 65% tương ứng, chứa cùng nồng độ của NH_4HCO_3 37,5mM và tributylamin 11,25mM. Bước tách được thực hiện trên cột C-18 (Agilent) bằng cách sử dụng dung dịch A trong khoảng thời gian 20 phút, tiếp đến bằng gradient tuyến tính từ 20 đến 45 phút dung dịch B 0–50%. Dòng thải từ cột đi vào nguồn khối phổ ion hóa phun điện tử (ESI-MS), để tiếp tục dò tìm bởi MS. Giao diện phun điện tử được cài đặt chế độ ion hóa âm tính với hiệu điện thế 400V, đầu ra mao dẫn 240,0V, và nguồn nhiệt độ 325⁰C, để thu được lượng dư ion tối đa trong phổ quét đầy đủ (150–1,500 Da, 10 lần quét đầy đủ/giây). Nitơ được sử dụng làm khí làm khô (5l/phút) và khí trung hòa (20 psi). [Bhattacharyya S, Am J Respir Cell and Molec Biol 42, 51-61].

Phân tích NMR của heparosan

¹H-NMR và ¹³C-NMR được tiến hành trên phổ kế Bruker 600 MHz NMR. Các mẫu heparosan được điều chế tại nồng độ 2mg/ml trong D₂O (99,99+ nguyên tử %), được sấy thăng hoa để loại bỏ các proton trao đổi và tái hòa tan trong D₂O và được chuyển vào các ống NMR 5mm chuẩn. Sự thu nhận phổ được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm TOPSPIN 2.0. Tất cả các phổ được thu nhận tại nhiệt độ 298K (24,85°C).

Thử nghiệm hàm lượng ADN và protein

Hàm lượng ADN trong sản phẩm heparosan cuối cùng được xác định bằng cách đo sự hấp thụ UV của dung dịch heparosan 0,1mg/ml tại 260nm và 320nm. Nồng độ ADN được tính toán là nồng độ (μg/ml) = (chỉ số đọc A₂₆₀ – chỉ số đọc A₃₂₀) × hệ số pha loãng × 50μg/ml. Hàm lượng protein được thử nghiệm bằng cách sử dụng Kit thử nghiệm Proten BCA Micro theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phân tích trọng lượng phân tử của heparosan

Thang chuẩn heparosan của các khối lượng phân tử đã biết, được điều chế từ polysacarit heparosan K5 đã tẩy rửa bằng phương pháp điện di polyacrylamit điều chế liên tục sử dụng Mini Prep Cell (Biorad, Hercules, CA) apparatus (Ly et al., 2010). Các phân đoạn heparosan được mô tả đặc điểm bởi phương pháp khối phổ biến đổi Fourier (FT-MS) và được trộn lại để điều chế thang trọng lượng phân tử chuẩn để xác định các đặc tính trọng lượng phân tử của heparosan (Ly et al., 2010). Các thước đo phân tử của hyaluronan (HA), mà cũng là polysacarit tuyến tính với cùng mật độ điện tích như N-acetylheparosan, được sử dụng làm tiêu chuẩn cho khoảng trên của mẫu.

Cả HA và các thước đo phân tử heparosan được sử dụng làm bộ chuẩn cho phép phân tích trọng lượng phân tử của các heparosan được điều chế trong môi trường nuôi cấy khác nhau và tại các thời điểm lên men khác nhau. Gel polyacrylamit gradient (4-15%) có kích thước 0,75mm x 6,8cm x 8,6cm được sử dụng trong các phép phân tích trọng lượng phân tử heparosan. Các mẫu heparosan (25µg) được tải lên trên các gel và sau đó được trải qua quá trình điện di (200V trong khoảng thời gian 20 phút) và được nhuộm màu xanh Alcian trong khoảng thời gian 1 giờ, và sau đó được khử nhuộm màu bằng etanol 25% /axit axetic 10% (Ly et al., 2010). Các gel được quét và các hình ảnh kỹ thuật số này được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm máy tính UN-SCANIT. Thu được biểu đồ mật độ hình ảnh dạng điểm như là hàm cự ly di chuyển. Từ dữ liệu này, đặc tính trọng lượng phân tử của các mẫu heparosan được mô tả đặc điểm từ đồ thị chuẩn thu được.

Kết quả

Quy trình lên men *E. coli* K5 trong các bình lắc để điều chế heparosan

E. coli K5 được sinh trưởng trong các bình lắc cho đến tận 1-4 giờ sau khi đạt được pha ổn định. Quy trình lên men được kéo dài qua pha ổn định để tích tụ lượng tối đa heparosan trong môi trường, phù hợp với các báo cáo cho rằng sự có mặt của heparosan trong môi trường làm chậm sự sinh trưởng của tế bào, [Manzoni M et al. (1993) Journal of Bioactive and Compatible Polymers 8(3):251-257]. Sản lượng

heparosan từ các canh trường trong bình nằm trong khoảng từ 70-500mg/l. Độ tinh khiết của heparosan thu hồi từ các canh trường trong bình trong tất cả các trường hợp > 85% theo ước tính bởi NMR Wang Z et al (2009) Anal Biochem. 398(2):275-7. [Zhang ZQ et al (2008) "Solution structures of chemoenzymatically synthesized heparin and its precursors" Journal of the American Chemical Society 130(39):12998-13007]. Heparosan thu hồi từ môi trường tổng hợp, bao gồm môi trường M9, môi trường glucoza, và môi trường glycerol, thể hiện các mức độ tinh khiết cao hơn (>95%) so với heparosan thu hồi từ môi trường LB, mà thể hiện các đỉnh bổ sung trong NMR, đồng nhất với khoảng 85% độ tinh khiết (Fig.2). Phép phân tích heparosan lấy từ môi trường LB bằng phương pháp điện di gel polyacrylamit (PAGE) thể hiện dải M_w thấp, tương ứng với thành phần môi trường mà cùng tinh sạch với heparosan. Tạp chất này có thể được loại bỏ bằng cách sử dụng cột xoay cắt bỏ trọng lượng phân tử (molecular weight cut-off - MWCO) (Fig.2).

Thành phần disacarit của heparosan được xác định bằng HPLC-MS (không được trình bày) sau khi hoàn thành phân hủy với heparin lyaze 1, 2 và 3, và thể hiện sự có mặt của disacarit m/z 378,2. Disacarit tương ứng với $\Delta U A(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-GlcNAc$, phù hợp với cấu trúc lặp đồng đều của heparosan, $\rightarrow 4)-\beta-D-GlcA(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-GlcNAc(1 \rightarrow$. Để xác nhận cấu trúc này heparosan đánh dấu $^{13}C'$ và $^{15}N'$ được điều chế bằng cách nuôi cấy *E. coli* K5 trong môi trường M9 chứa ^{13}C -glucoza và ^{15}N -amoni clorua đánh dấu đều. Cấu trúc của ^{13}C -, ^{15}N -heparosan đánh dấu đều thu hồi được xác nhận bởi việc phân hủy hoàn toàn với heparin lyaza 1, 2 và 3, sau đó là bởi HPLC-MS, mà thể hiện disacarit đơn m/z 392,9. Chênh lệch 15 amu giữa m/z 378,2 và 392,9 phù hợp với sự làm giàu đồng vị ^{13}C và ^{15}N đầy đủ và xác nhận cấu trúc lặp của heparosan.

Quy trình lên men *E. coli* K5 trong thiết bị lên men 7 lít

Tốc độ tiếp liệu đã tăng theo hàm mũ để theo kịp sự sinh trưởng theo hàm mũ của *E. coli*. Trong giai đoạn tiếp liệu, quá trình phải dừng lại nhiều lần để đảm bảo rằng không có sự tăng dần glucoza trong môi trường, mà có thể dẫn đến sự tích tụ axetat và ức chế sự sinh trưởng của *E. coli*. Việc tiếp liệu được bắt đầu lại chỉ sau khi

quan sát thấy sự tăng oxy hòa tan, xác nhận glucoza bị cạn (Fig.3). Trong các giai đoạn sau của quy trình lên men (sau 22 giờ), oxy hòa tan trở nên hạn chế. Tăng cường khuấy và đưa oxy tinh khiết vào để tối đa nồng độ oxy hòa tan trong canh trường. Bất chấp những nỗ lực này, mức oxy hòa tan vẫn rất thấp sau 31 giờ. Giảm tốc độ tiếp liệu glucoza khi oxy trở thành dưỡng chất hạn chế. Trong suốt quy trình lên men, độ pH được duy trì nằm trong khoảng từ 6 đến 8 bằng cách bổ sung NH_4OH . Sau 37,5 giờ lên men, mật độ tế bào đạt được là 85g DCW/L, và nồng độ heparosan trong phần nổi lên men được xác định là 15g/l. Tốc độ sinh trưởng tổng thể được tính là $0,12 \text{ giờ}^{-1}$, tốc độ sản xuất tổng thể là $1,2 \text{ g/h}$, và tốc độ sản xuất theo thể tích là $0,4 \text{ g/l.h}$. Heparosan được tinh sạch từ quy trình lên men là heparosan có độ tinh khiết cao, đánh giá từ phổ $^1\text{H-NMR}$ (Figure 4A). Ngoài ra, các thử nghiệm ADN và protein BCA cho thấy rằng $<1\%$ ADN và $<2\%$ protein tồn tại trong vật liệu heparosan cuối cùng.

Mô tả đặc điểm cấu trúc của heparosan

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HPLC-MS và Fourier Transform (FT)–MS (Figure 4) xác nhận cấu trúc chung của heparosan là $\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA (1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAc (1}\rightarrow$ (Fig.1A). FT-MS của phân đoạn heparosan có mức độ polyme hóa (dp) là 24, thu được bằng cách sử dụng phương pháp điện di điều chế được thể hiện trong Fig.4C. Phổ này cũng cho thấy sự có mặt của gốc ΔUA uronat không no (Fig.1B) tại đầu không khử của một số chuỗi polysacarit. Sự có mặt của gốc ΔUA đầu cuối thích hợp với hoạt tính của heparosan lyazan K cũng tồn tại trong chủng *E. coli* K5. Phép phân tích FT-MS cho thấy heparosan thu hồi từ phần nổi lên men chứa hỗn hợp heparosan được kết thúc bằng gốc ΔUA và bằng gốc GlcA. Kết quả này thích hợp với một số heparosan trong môi trường được lấy ra từ bề mặt tế bào bằng lực cắt và một số được giải phóng vào môi trường bằng quá trình phân hủy heparosan lyaza. Heparosan được tách ra khỏi phần nổi được xử lý bằng $\beta\text{-glucuronidaza}$, enzyme exolytic có khả năng loại bỏ GlcA nhưng không loại bỏ DUA ra từ đầu không khử của chuỗi heparosan. Việc quan sát GlcA được giải phóng sử dụng sắc ký lớp mỏng (dữ liệu không được trình bày) khẳng định rằng một số chuỗi heparosan mà được đưa vào trong phần nổi được kết thúc bằng GlcA.

Đặc điểm MW của heparosan

Các heparosan thu hồi từ *E. coli* K5 sinh trưởng trong các bình lắc, được phân tích bằng PAGE so với thang chuẩn heparosan tinh sạch (Fig.5 và Bảng 1). Heparosan, thu hồi từ phần nổi trong các canh trường trong bình sinh trưởng trên môi trường M9, môi trường tổng hợp glycerol, môi trường phức chất LB thể hiện sự chênh lệch M_n hoặc M_w nhỏ. Heparosan thu hồi từ phần nổi trong môi trường tổng hợp glucoza có M_n và M_w thấp nhất. Heparosan thu hồi từ hạt thể hiện M_w cao hơn heparosan thu hồi từ phần nổi lên men (dữ liệu không được trình bày).

Tiếp đến, các mẫu từ thiết bị lên men được lấy tại nhiều thời điểm khác nhau trong suốt quá trình lên men và heparosan được tinh sạch bằng cột xoay Vivapure D Mini H. Độ tinh khiết của các mẫu tạo thành được xác nhận là $> 85\%$ từ các phần nổi lên men bởi $^1\text{H-NMR}$. Phép phân tích PAGE (Fig.5B) thể hiện sự tăng ban đầu ở trọng lượng phân tử heparosan, tiếp đến không có những thay đổi khác ở trọng lượng phân tử khi thời gian lên men tăng (Fig.6). Chỉ số độ rộng phân bố của heparosan ($\text{PDI} = M_w/M_n$) thay đổi một chút trong suốt quá trình lên men.

Thảo luận

Trong nghiên cứu này, sản lượng heparosan cao trong phần nổi lên men (15g/l) đạt được trong canh trường ở thiết bị lên men theo mẻ được tiếp liệu được sinh trưởng trên môi trường xác định chứa glucoza. Điều này so sánh với sản lượng gần đây được báo cáo của heparosan là 10,2g/l từ cùng loài vi sinh vật được sinh trưởng trên môi trường xác định chứa glycerol (Công bố patent US số 2008/0032349). Tốc độ sản xuất theo thể tích cũng được tăng so với báo cáo trước đây. Ngoài ra, glucoza, là nguồn cacbon rẻ hơn so với glyxerol, khiến quy trình lên men này kinh tế hơn. Quy trình lên men theo mẻ được tiếp liệu sinh trưởng tại quy mô 3L có thể đóng vai trò làm mẫu thử cho quy trình lên men trên quy mô phòng thí nghiệm lớn hơn, dẫn đến việc sản xuất heparosan công nghiệp. Các quy trình nghiên cứu quy mô lớn hiện nay được thực hiện trong phòng thí nghiệm của chúng tôi tăng từ 3L đến 750L thể tích làm việc, mà sẽ cung cấp nền tảng cho quy mô lớn lên tới khoảng 100,000L thể tích làm việc cần cho

sự sản xuất heparosan quy mô lớn (100 tấn) để cung cấp nguyên liệu cho tổng hợp heparin công nghệ sinh học. Khả năng sử dụng tốc độ tiếp liệu glucoza nhanh hơn trong quy trình lên men và các mức oxy cao hơn trong thiết bị lên men đang được tìm hiểu để tăng tốc độ sản xuất heparosan.

Việc sử dụng môi trường xác định chứa glucoza làm nguồn cacbon vừa làm giảm chi phí lên men vừa làm giảm tính phức tạp về môi trường, khiến quy trình tinh sạch dễ hơn. Heparosan được tinh sạch từ môi trường LB phức chất ít tinh khiết hơn nhờ các thành phần của môi trường phức chất và các bước tinh sạch bổ sung được yêu cầu so với heparosan được tinh sạch từ môi trường xác định chứa glucoza.

Heparosan, tách ra khỏi phần nổi canh trường do việc thải vào môi trường trong suốt quy trình lên men qua hoạt tính kết hợp của lyaza K5 và lực cắt. Việc tăng cường đưa heparosan vào trong môi trường làm tăng sản lượng heparosan trong phần nổi, làm giảm chi phí của quy trình tinh sạch ở giai đoạn thu hồi.

Sự có mặt của lyaza K5 góp phần vào việc giải phóng nang heparosan thích hợp vào trong môi trường, làm tăng sản lượng heparosan. Đồng thời, sự có mặt của heparosan lyaza K5 dẫn đến thu được gốc sacarit không tự nhiên, Δ UA, tại đầu không khử của chuỗi mà có thể cần xử lý tiếp theo. Heparosan lyaza K5 còn làm tăng chỉ số độ rộng phân bố của heparosan, mà có thể làm phức tạp quá trình xử lý tiếp theo thành heparin. Đặc tính trọng lượng phân tử của heparin theo công nghệ sinh học gắn liền với đặc tính trọng lượng phân tử của heparosan. Phương pháp hiện nay điều chế heparosan với đặc tính thích hợp để xử lý thành heparin. Do đó, các tác giả sáng chế đã cho thấy rằng trong sự có mặt của lyaza vẫn có thể điều chế heparosan với đặc tính trọng lượng phân tử mong muốn bằng cách kiểm soát kỹ các điều kiện lên men và thời gian xử lý lên men.

Việc kiểm soát hoạt tính lyaza K5 trong tương lai có thể là một biện pháp để kiểm soát tốt các biện pháp kiểm soát heparosan.

Bảng 1. Trọng lượng phân tử trung bình số (M_N), trọng lượng phân tử trung bình khối (M_W) và chỉ số độ rộng phân bố (PDI) của heparosan thu hồi từ các môi trường khác nhau trong bình lắc 2,8L.

Môi trường	M_N	M_W	PDI
M9	54.000	82.000	1,5
Glyxerol	50.000	79.000	1,6
Glucosa	25.000	44.000	1,8
LB	54.000	68.000	1,3

Ví dụ 2: Báo Cáo Quy Trình Lên Men 20L (lên men theo mẻ được tiếp liệu pH)

Môi trường

Môi trường xác định Glucosa: (trên L) glucosa với lượng 20g, thiamin với lượng 20mg, KH_2PO_4 với lượng 13,5g; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ với lượng 4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 1,4g, axit xitric với lượng 1,7g, và dung dịch kim loại vi lượng với lượng 10ml. Dung dịch kim loại vi lượng bao gồm (trên lít HCl 5M) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 10g, CaCl_2 với lượng 2g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 2,2g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ với lượng 0,5g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ với lượng 1g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ với lượng 0,1g, và $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ với lượng 0,02g. Dung dịch tiếp liệu được sử dụng trong giai đoạn theo mẻ được tiếp liệu bao gồm (trên lít): glucosa với lượng 700g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 20g, KH_2PO_4 với lượng 47g và thiamin với lượng 0,4g. Môi trường R, mà là môi trường chứa glucosa được sử dụng trong các quy trình lên men, được điều chế như sau:

Phần A của môi trường R: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , và axit xitric đã bổ sung vào khoảng 8L nước kết hợp khuấy từ, dung dịch kim loại vi lượng (100X dung dịch gốc) được bổ sung, độ pH được điều chỉnh tới 6,80, sau đó nước được bổ sung vào 9L. Phần A được vô trùng trong thiết bị lên men tại nhiệt độ 121°C trong khoảng thời gian 45 phút.

Phần B của môi trường R: MgSO_4 và dung dịch glucoza được tạo ra là dung dịch gốc 10X và được vô trùng riêng với nồi hấp tại nhiệt độ 110°C trong khoảng thời gian 20 phút (cũng có thể được vô trùng bằng thiết bị lọc).

Dung dịch tiếp liệu: Glucoza, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và KH_2PO_4 47g được hòa tan trong 1lít nước với nhiệt và khuấy, và được vô trùng bằng nồi hấp tại nhiệt độ 115°C trong khoảng thời gian 20 phút. Thiamin được hòa tan trong nước và sau đó được vô trùng bằng thiết bị lọc.

Quy trình vận hành

Ngày 1:

Bốn ống nuôi cấy 5ml được cấy chuyển vào môi trường tổng hợp glucoza mô tả ở trên (môi trường R) với chủng *E. coli* K5 (được bảo quản trong máy kết đông ở nhiệt độ -80°C) vào buổi sáng, được sinh trưởng trong tủ ủ tại nhiệt độ 37°C lắc tại tốc độ 220 vòng trên phút trong khoảng thời gian 10 giờ. Bốn canh trường được chuyển vào 500ml môi trường trong bình lắc có vách ngăn 2,8L vào buổi tối và được sinh trưởng tại nhiệt độ 37°C lắc với tốc độ 220 vòng trên phút trong khoảng thời gian 10 giờ.

Ngày 2:

Đầu dò độ pH của thiết bị lên men và đầu đo DO được vô trùng và được hiệu chuẩn tại nhiệt độ sinh trưởng (37°C). Ba bơm được cài đặt: bơm 1 - NH_4OH để điều chỉnh độ pH; bơm 2 – dung dịch tiếp liệu; bơm 3 – chống tạo bọt.

Phần B của môi trường R được bổ sung vào thiết bị lên men để trộn với phần A và được cấy chuyển với 500ml canh trường nhân giống. Độ pH được duy trì tại 6,8 bằng cách bơm NH_4OH vào. Bơm dung dịch tiếp liệu xảy ra khi quan sát thấy đỉnh độ pH và đỉnh DO. Bơm tiếp liệu được lập trình để cho ra 100% sản lượng (khoảng 6,7g xung glucoza) khi $\text{pH} > 6,8$. Tốc độ khuấy và/hoặc lưu lượng không khí được tăng lên để duy trì DO trên 20%. Dòng oxy tinh khiết được bổ sung khi DO không được duy trì trên 20% bằng cách thay đổi tốc độ khuấy và lưu lượng không khí.

Ngày 3:

Dừng lên men khi trị số OD^{600} của canh trường bắt đầu giảm. Thu và ly tâm canh trường. Heparosan được thu hồi từ phần nổi.

Đồ thị màu xanh trên Fig.7 là xu hướng DO (oxy hòa tan trong canh trường). Do mật độ tế bào cao tiêu thụ oxy rất nhanh, nên DO trở về gần 0 vài giờ trước khi thu, trong khi dòng oxy tinh khiết vẫn được duy trì. Quá trình lên men được dừng lại vài giờ sau khi $OD 600$ (mật độ quang của canh trường tại bước sóng ánh sáng 600nm) bắt đầu giảm. Dừng lên men bằng cách tắt dòng oxy, dừng khuấy và sau đó bắt đầu thu.

Lấy mẫu:

Xấp xỉ 40ml mẫu được lấy để đo mật độ quang học tại 600nm, sau đó ly tâm tại 12000 x g trong khoảng thời gian 30 phút để tách phần nổi ra khỏi các tế bào *E. coli*. Phần nổi và hạt tế bào được kết đông riêng rẽ.

Phân tích mẫu lên men:

Trọng lượng tế bào khô (dry cell weight - DCW) được đo bằng cách cân hạt tế bào khô trên cân. Nồng độ heparosan trong phần nổi được đo bằng phương pháp định lượng NMR hoặc thử nghiệm carbazol theo phương pháp kết tủa etanol của Song J-M et al. (2009) ["A simple method for hyaluronic acid quantification in culture broth" Carbohydrate Polymers 78 (2009) 633–634. Wang Z et al (2009) Anal Biochem. 398(2):275-7].

Kết quả được trình bày trên các Fig.7, Fig.8 và Fig.9.

Heparosan được tạo ra trong giai đoạn lên men này có trọng lượng phân tử trung bình số là khoảng 58,000 Da, trọng lượng phân tử trung bình khối là khoảng 84,000 Da, và chỉ số độ rộng phân bố (PDI) là khoảng 1,4. Độ tinh khiết được ước tính tại 95% hoặc lớn hơn.

Ví dụ 3: Tinh sạch heparosan bằng sắc ký chitosan

Chitosan là polysacarit tuyến tính bao gồm D-glucosamin liên kết β -(1-4) và N-acetyl-D-glucosamin được phân bố ngẫu nhiên cung cấp phương án thay thế cho nhựa trao đổi anion để tinh sạch sắc ký heparosan. Nhóm amino trong chitosan (khoảng pK_a 6,5) khiến nó được tích điện dương và có thể hòa tan trong điều kiện axit và do đó thích hợp để tinh sạch dựa vào ái lực của heparosan tích điện âm. Tinh sạch heparosan dựa vào chitosan có thể dễ dàng được kiểm soát dựa vào nồng độ chitosan và pH ban đầu. Hơn thế nữa, chitosan không đắt, nguồn cung dồi dào, và có khả năng phân hủy sinh học. Ví dụ này mô tả phương pháp tách dựa vào chitosan hòa tan để thu hồi hiệu quả heparosan trực tiếp từ dịch lên men. Phương pháp tách dựa vào sự trung hòa điện tích này sử dụng điện thế của chitosan có thể được sử dụng để tinh sạch các đại phân tử tích điện âm khác từ hỗn hợp lên men phức tạp.

Dịch lên men từ 7 lít dịch lên men *Escherichia coli* K5 được ly tâm tại tốc độ 7000 vòng trên phút trong khoảng thời gian 30 phút để loại bỏ các tế bào.

1. Định lượng hàm lượng heparosan dựa vào NMR trong phần nổi được thực hiện.
2. pH của phần nổi được điều chỉnh tới 4 sử dụng dung dịch HCl tiếp đến ly tâm tại 7000 vòng trên phút trong khoảng thời gian 1 giờ để loại bỏ tạp chất bất kỳ kết tủa.
3. Tiếp đến, phần nổi được pha loãng 5 lần sử dụng nước khử ion (deionized – DI) pH = 4.
4. Dung dịch chitosan 10mg/ml được điều chế bằng cách hòa tan chitosan trong dung dịch axit axetat 1%. Đối với mỗi 10mg heparosan, 2,5mg chitosan được bổ sung vào phần nổi bằng cách sử dụng dung dịch chitosan nồng độ 10mg/ml.
5. Sau đó, hỗn hợp được khuấy trong khoảng thời gian 10 phút tại nhiệt độ trong phòng để đảm bảo trộn dung dịch tạo thành phù hợp. Tiếp đến ủ hỗn hợp tại nhiệt độ 4°C qua đêm.

6. Phức chất chất đa điện phân chitosan-heparosan tạo thành chất kết tủa lắng xuống và được thu hồi bằng cách sử dụng ly tâm tại tốc độ 8000 vòng trên phút trong khoảng thời gian 1 giờ.

7. Tiếp đến rửa chất kết tủa bằng nước DI pH = 4 và ly tâm chất kết tủa này lại tại tốc độ 8000 vòng trên phút trong khoảng thời gian 1 giờ.

8. Chitosan mất đi bản chất cation của nó dưới điều kiện bazơ dẫn đến sự phá vỡ của phức chất tĩnh điện, thu được heparosan tự do trong dung dịch và chitosan không hòa tan. Hạt đã rửa được cho vào trong dung dịch NaOH 1M và được ủ qua đêm để thu hồi heparosan trong dung dịch. Chitosan không hòa tan được loại bỏ hoặc là qua lọc hoặc là ly tâm tại 10000 vòng trên phút trong khoảng thời gian 2 giờ. Bước này có thể được ghép với bước trao đổi cation hoặc bước trao đổi anion để loại bỏ tạp chất khác dẫn đến sự tinh sạch thêm heparosan thu được.

Ví dụ 3A

Bằng cách sử dụng quy trình trên, heparosan được tinh sạch từ dịch lên men sử dụng nhựa lưu lượng nhanh DEAE sepharosa trong chế độ cột tiếp đến kết tủa với 4 thể tích etanol. Sau đó, heparosan thu hồi được thẩm tách bằng cách sử dụng các màng 3500 MWCO chống nước DI. Sau đó, dung dịch đã thẩm tách được sấy thăng hoa sau khi giảm thể tích bằng cách sử dụng thiết bị bay hơi quay.

Dung dịch 1mg/ml của heparosan đã tinh sạch này sau đó được điều chế bằng cách hòa tan nó trong nước khử ion pH = 4. Sáu mẫu khác nhau được điều chế bằng cách sử dụng 10ml dung dịch 1mg/ml và bổ sung các lượng chitosan khác nhau trong khoảng 2-6mg sử dụng dung dịch chitosan 10mg/ml trong axit axetic 1%. Các mẫu được ủ tại nhiệt độ 4°C qua đêm. Phức chất đa điện phân kết tủa được thu hồi bằng cách ly tâm các mẫu này tại tốc độ 8000 vòng trên phút trong khoảng thời gian 1 giờ. Dung dịch NaOH 1M sau đó được bổ sung vào các hạt tạo thành không cần rửa bằng nước DI độ pH = 4. Chitosan không hòa tan được loại bỏ bằng cách ly tâm tại tốc độ 10000 vòng trên phút trong khoảng thời gian 2 giờ. Các mẫu được thu hồi và phân nôi

sau đó được phân tích sự có mặt của heparosan bằng cách sử dụng thử nghiệm carbazol.

Theo thử nghiệm carbazol, đạt được hiệu suất thu hồi 100% heparosan tại độ pH = 4 bằng cách bổ sung 4mg chitosan vào 10ml dung dịch heparosan 1mg/ml.

Ví dụ 3B

Trong thử nghiệm bổ sung, phần nổi tạo thành sau quá trình ly tâm sau lên men được điều chỉnh bằng cách bổ sung axit clohydric tới pH = 4. Tiếp đến ly tâm tại tốc độ 8000 vòng trên phút trong khoảng thời gian 1 giờ để loại bỏ tạp chất kết tủa. Sau đó phần nổi được điều chỉnh quay trở về độ pH = 4 sử dụng dung dịch NaOH 1M. Định lượng mẫu đã điều chỉnh độ pH này bằng NMR cho thấy không có sự mất mát heparosan trong các mẫu này.

Sau đó, các mẫu này được làm loãng 5 lần bằng cách sử dụng nước DI có độ pH = 4. Tiếp đến, 6 mẫu này với mỗi mẫu 10ml được tạo ra bằng cách bổ sung chitosan trong khoảng 2-8mg trên mỗi mẫu bằng cách sử dụng dung dịch chitosan 10mg/ml trong axit axetic 1%. Các mẫu được ủ tại nhiệt độ 4°C qua đêm. Phức chất đa điện phân kết tủa được thu hồi bằng cách ly tâm các mẫu này tại tốc độ 8000 vòng trên phút trong khoảng thời gian 1 giờ. Dung dịch NaOH 1M sau đó được bổ sung vào các hạt tạo thành không cần rửa bằng nước DI có độ pH = 4. Chitosan không hòa tan được loại bỏ bằng cách ly tâm tại tốc độ 10000 vòng trên phút trong khoảng thời gian 2 giờ. Các mẫu được thu hồi và phần nổi sau đó được phân tích sự có mặt của heparosan bằng cách sử dụng thử nghiệm carbazol. Các thử nghiệm carbazol các mẫu cho thấy tinh sạch khoảng 70% heparosan từ dịch lên men.

Sáng chế đề xuất phương pháp tinh sạch hiệu quả để thu hồi heparosan từ dịch lên men. Chitosan được sử dụng trong bước này rẻ, dễ tìm, tương thích sinh học và có khả năng phân hủy sinh học. Các đặc điểm này khiến nó trở nên lý tưởng để sử dụng là chất kết tủa để tinh sạch heparosan, mà có thể được biến đổi bằng enzym thành heparin có thể truyền trong tĩnh mạch. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất bước cô đặc quan trọng, từ đó làm giảm thể tích làm việc liên quan đến quy trình này so với các

bước kết tủa etanol thường được sử dụng. Thể tích làm việc với cách kết tủa etanol, ví dụ, trong một số trường hợp vượt quá thể tích lên men. Bản chất tương thích sinh học và phân hủy sinh học của chitosan khiến nó thích hợp hơn so với các polycation khác mà có bản chất độc hại như xetylpýridini clorua (CPC) và Poly(diallyldimetyl amoni clorua). Ngoài ra, phương pháp này có khả năng tinh sạch các polysaccharit khác như axit hyaluronic và các protein axit cũng như ADN.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất việc thu hồi polysaccharit dạng nang từ vi khuẩn, heparosan K5 với hiệu quả về chi phí từ dịch lên men bằng cách sử dụng phương pháp kết tủa với tiềm năng sử dụng trong phát triển heparin theo công nghệ sinh học. Phương pháp này sử dụng các polycation thu được một cách tự nhiên, mà tương thích sinh học và có khả năng phân hủy sinh học, từ đó cung cấp công nghệ tinh sạch hiệu quả và an toàn đối với các loại thuốc dùng trong tĩnh mạch như heparin. Sản lượng cao thu được bằng phương pháp này khiến nó trở nên lý tưởng là bước cô đặc từ đó giảm thể tích làm việc. Tính dễ dàng thu hồi của bước này và tính tương thích của nó với các bước khác trong quy trình tổng hợp enzym hóa học heparin theo công nghệ sinh học khiến nó trở nên lý tưởng để sử dụng làm quy trình tinh sạch. Phương pháp này có khả năng loại bỏ các polysaccharit và protein dạng anion khác được dẫn xuất từ quy trình lên men vi khuẩn cũng như các loại tích điện âm cao như ADN.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất heparosan về cơ bản là tinh khiết từ *Escherichiacoli* K5, bao gồm các bước:

(a) nuôi cấy *E. coli* K5 trong môi trường xác định với glucoza là nguồn cacbon chính, trong đó việc nuôi cấy này bao gồm giai đoạn sinh trưởng theo mẻ và giai đoạn sinh trưởng theo mẻ được tiếp liệu, trong đó:

(i) môi trường được sử dụng trong giai đoạn sinh trưởng theo mẻ bao gồm (trên lít) glucoza với lượng khoảng 20g, thiamin với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 300mg, KH_2PO_4 với lượng khoảng 13,5g; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ với lượng khoảng 4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng khoảng 1,4g, axit xitric với lượng khoảng 1,7g, và khoảng 10ml dung dịch kim loại vi lượng; trong đó dung dịch kim loại vi lượng bao gồm về cơ bản (trên lít HCl 5M) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 10g, CaCl_2 với lượng 2g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với lượng 2,2g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ với lượng 0,5g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ với lượng 1g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ với lượng 0,1g, và $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ với lượng 0,02g và trong đó,

(ii) môi trường tiếp liệu được sử dụng trong giai đoạn sinh trưởng theo mẻ được tiếp liệu bao gồm (trên lít): glucoza với lượng nằm trong khoảng từ 250 đến 1000g, MgSO_4 với lượng 20g, thiamin với lượng nằm trong khoảng từ 0,15 đến 0,5g, và tùy ý, KH_2PO_4 với lượng 47g, và

(iii) trong đó oxy được cung cấp bởi không khí được phun vào có hoặc không có oxy bổ sung;

(b) gấn heparosan lên pha rắn, có quy trình rửa giải tiếp sau; và

(c) kết tủa heparosan từ dịch rửa giải;

trong đó, heparosan về cơ bản là tinh khiết này là tối thiểu 90% tinh khiết.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó oxy hòa tan được duy trì tại khoảng 20%.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ được duy trì tại nhiệt độ khoảng 37°C , và độ pH được duy trì tại khoảng 7.

4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó độ pH đã nêu được duy trì bằng cách bổ sung dung dịch amoniac 29%.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường được sử dụng trong giai đoạn theo mẻ được tiếp liệu, được tiếp liệu tại tốc độ được xác định bởi công thức:

$$Ms(t) = F(t) S_{F(t)} = \left(\frac{\mu}{Y_{x/s}} + m \right) X(t_0) V(t_0) \exp [\mu(t - t_0)]$$

trong đó, M_s là lưu lượng theo khối lượng của nguồn cacbon (g/h); F là lưu lượng tiếp liệu (L/h); S_F là nồng độ cơ chất cacbon trong nguồn tiếp liệu (g/l); X là nồng độ tế bào (g/l dcw); m là hệ số duy trì riêng (g/g dcw/h); V là thể tích canh trường (L); t_0 là thời gian bắt đầu tiếp liệu; t là thời gian xử lý; μ là tốc độ sinh trưởng riêng (h^{-1}); và $Y_{x/s}$ là sản lượng tế bào trên cơ chất cacbon (g/g).

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lượng heparosan của phần nổi canh trường được thu lại là hơn 12g/l.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó việc lên men đã nêu là ít hơn 48 giờ, không bao gồm việc nhân giống.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước gắn và rửa giải bao gồm (i) loại bỏ tế bào, (ii) trộn nhựa trao đổi anion với phần nổi canh trường và loại bỏ phần nổi, (iii) rửa nhựa bằng natri clorua 50mM trong đệm natri axetat tại độ pH = 4, và (iv) rửa giải với natri clorua 1M trong đệm natri axetat tại độ pH = 4.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước gắn và rửa giải bao gồm (i) loại bỏ các tế bào, (ii) trộn dung dịch chitosan với phần nổi canh trường, (iii) kết tủa chitosan và phân tách chất kết tủa, (iv) rửa chitosan, và (v) rửa giải heparosan bằng NaOH có nồng độ khoảng 1M.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước kết tủa heparosan từ chất rửa giải đã nêu bao gồm việc kết tủa etanol.

11. Phương pháp theo điểm 1, phương pháp còn bao gồm việc khử pyrogen bằng hydro peroxit.

12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó heparosan nhỏ hơn 1% ADN và nhỏ hơn 2% protein.
13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó heparosan có trọng lượng phân tử trung bình số là khoảng 58.000Da, trọng lượng phân tử trung bình khối là khoảng 84.000Da, và chỉ số độ rộng phân bố (polydispersity index - PDI) là khoảng 1,4.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó heparosan ít nhất có độ tinh khiết 95%.
15. Heparosan được sản xuất bởi phương pháp theo điểm 1.
16. Heparin được sản xuất từ heparosan theo điểm 15.

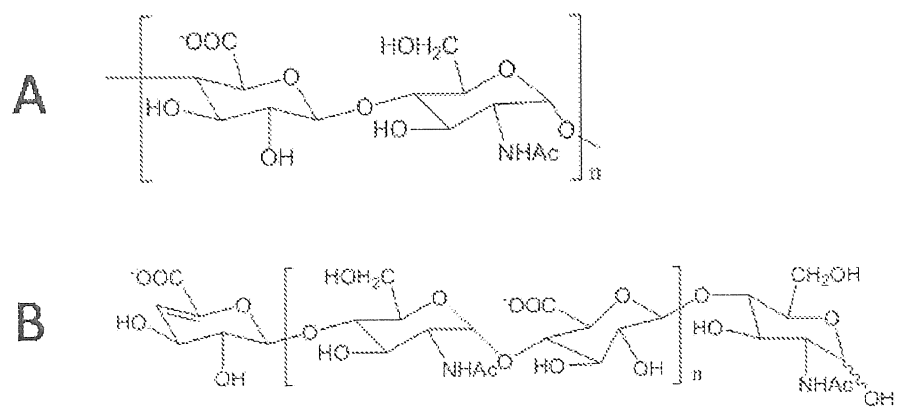


FIG.1

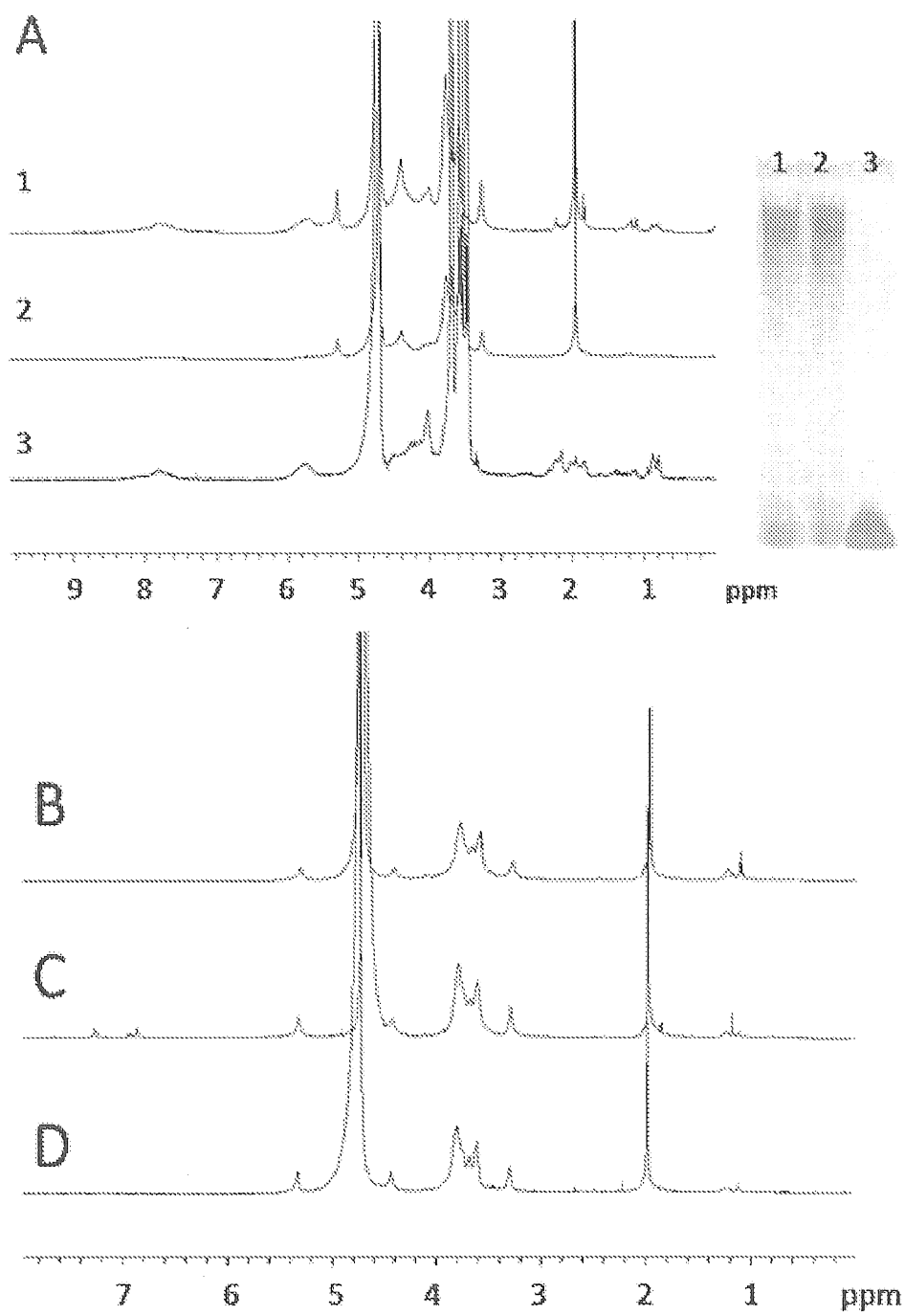


FIG.2

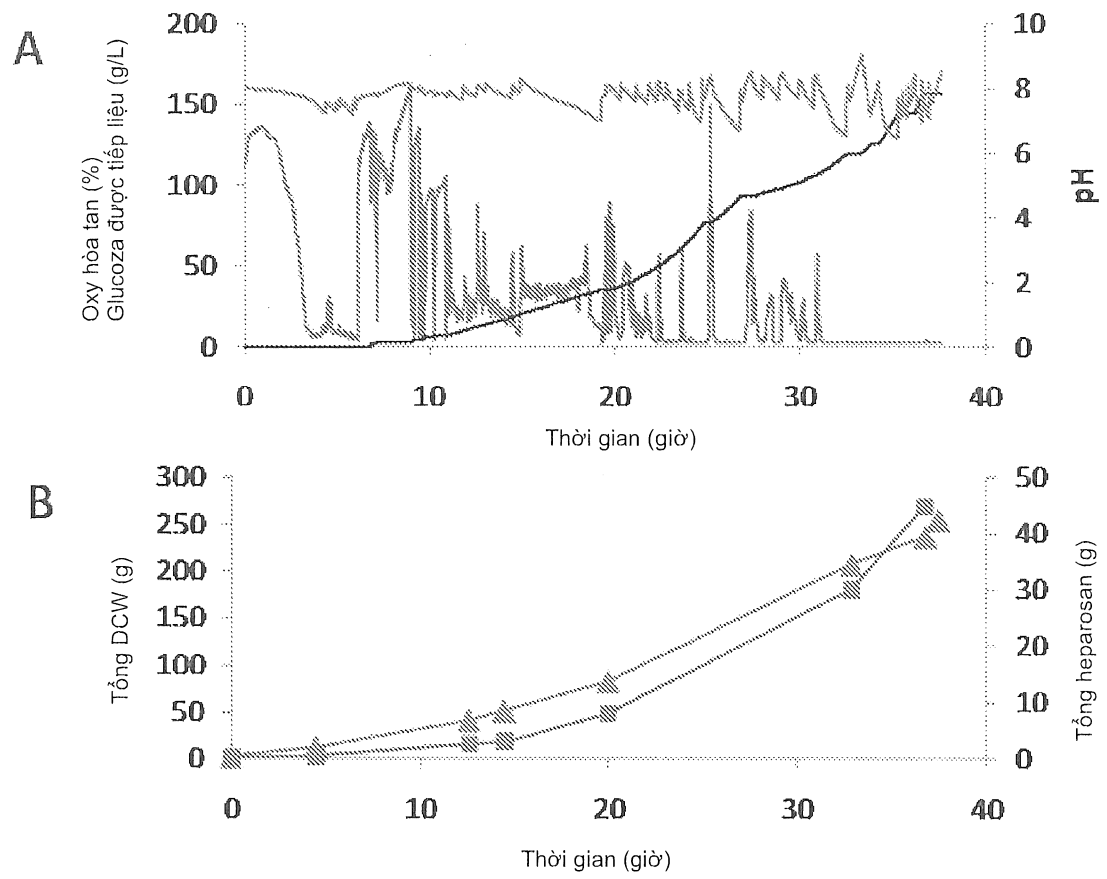


FIG.3



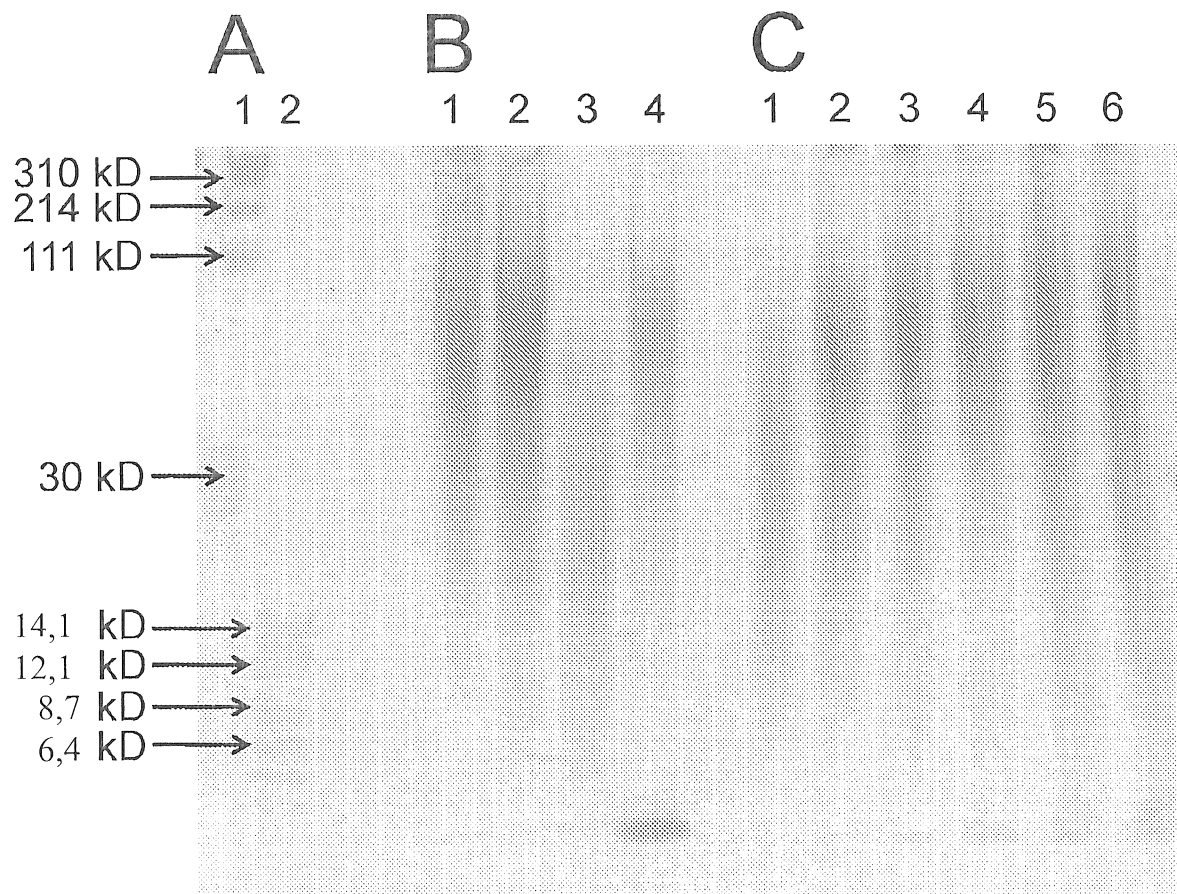


FIG.5

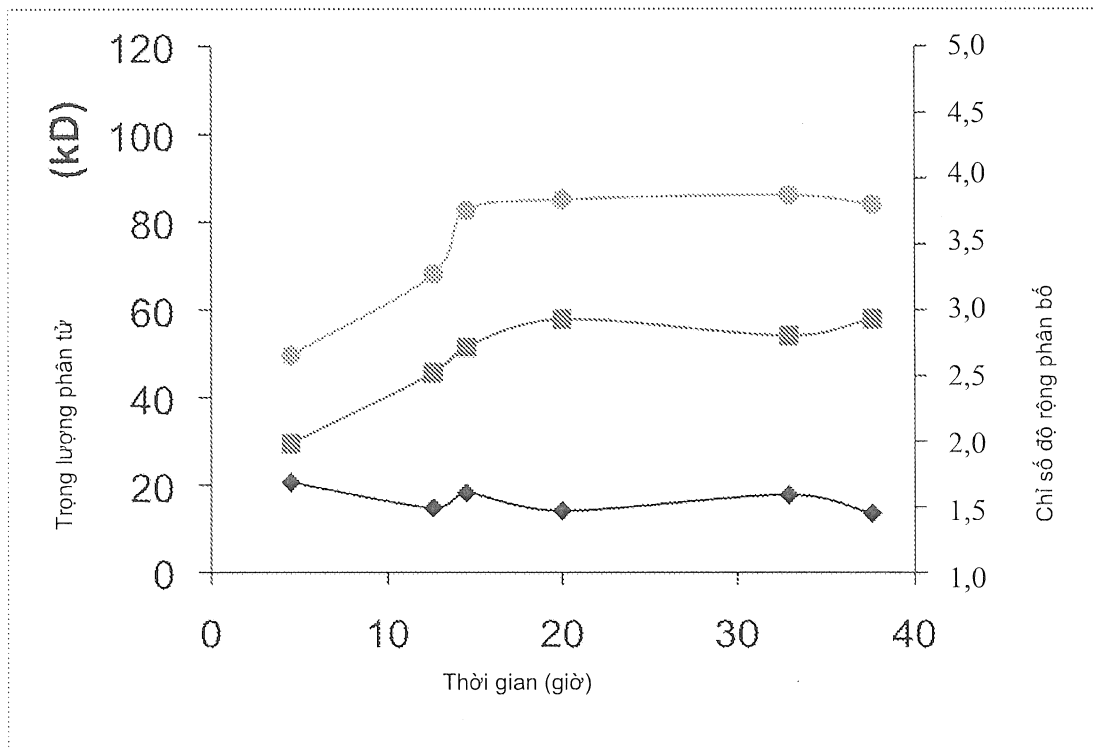


FIG.6

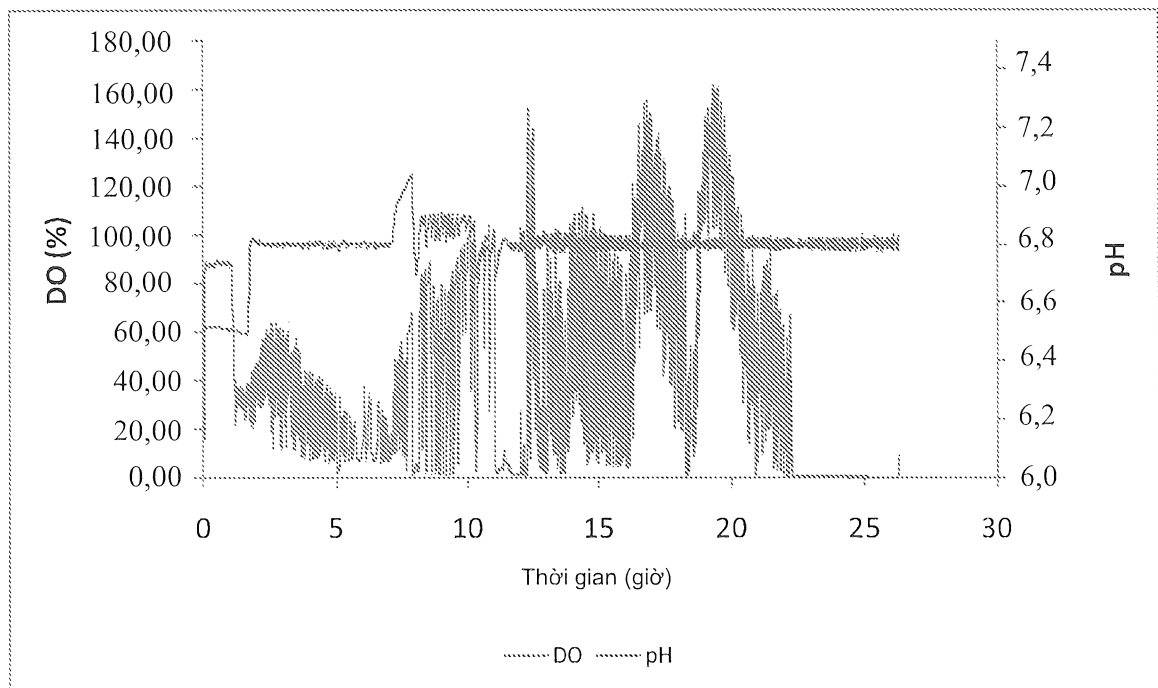


FIG.7

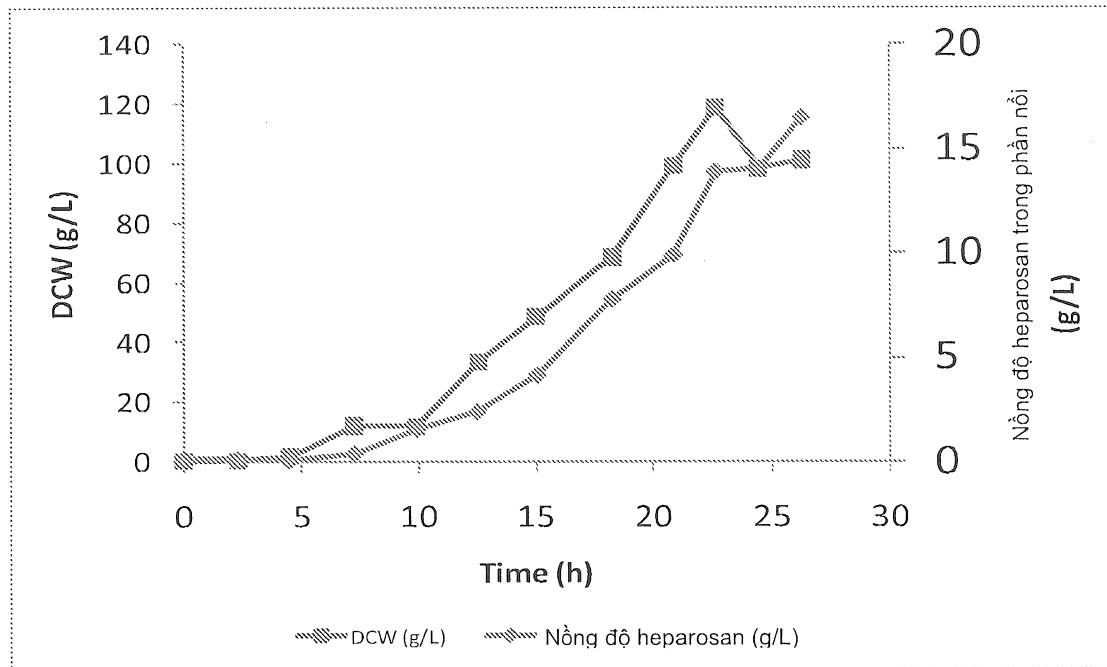


FIG.8

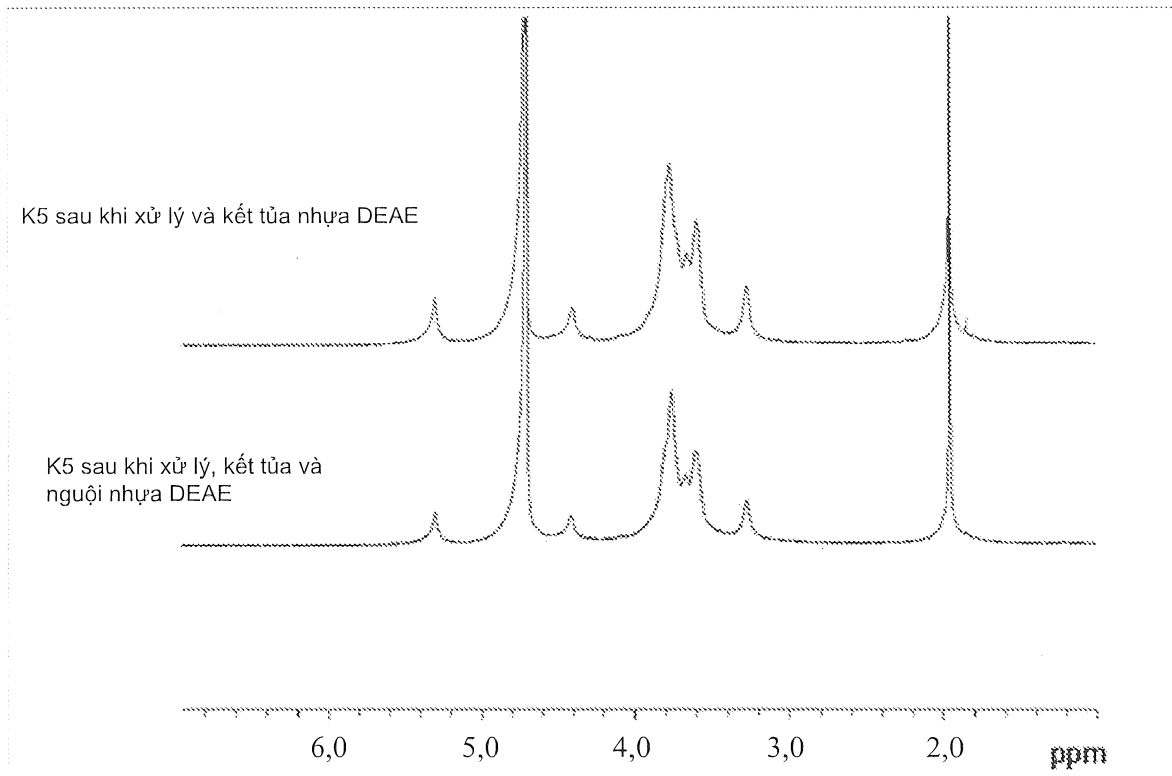


FIG.9

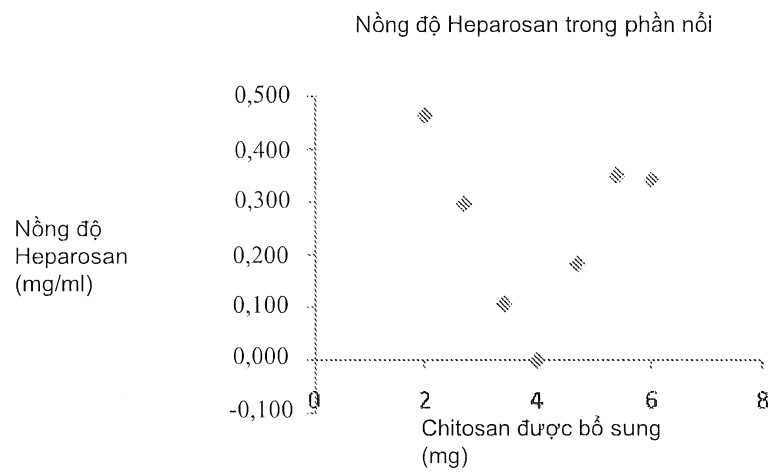


FIG.10

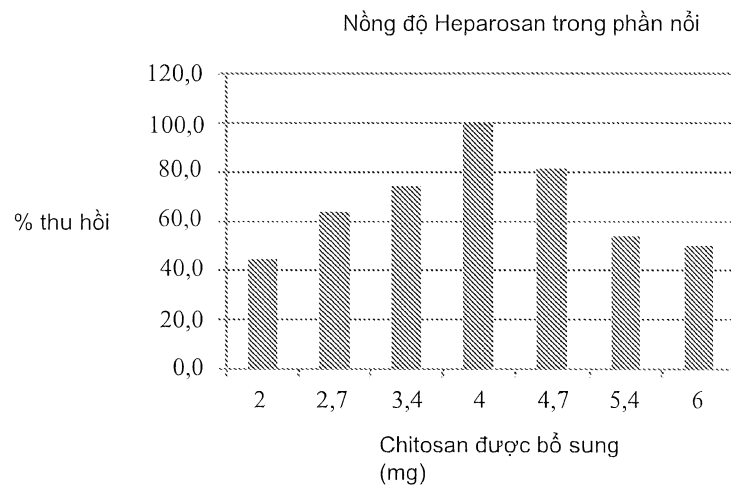


FIG.11

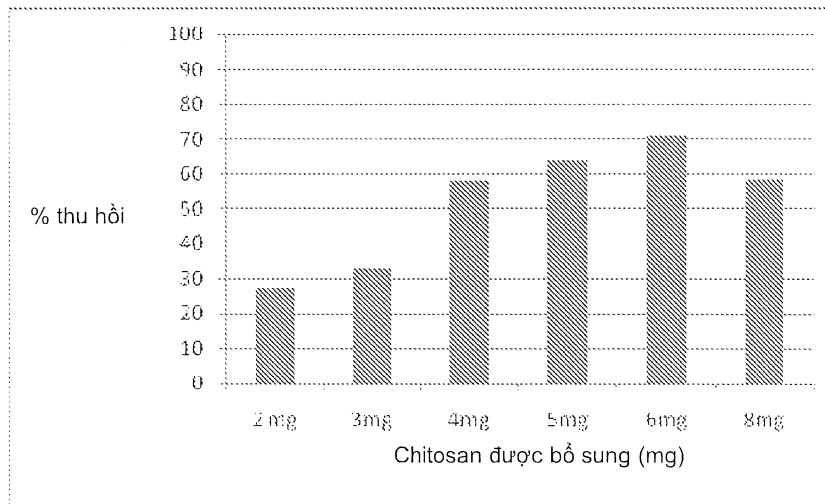


FIG.12