



(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)



1-0026063

(51)⁷ C12N 1/20; C12P 13/08; C12R 1/15; (13) B
C12N 15/01

(21) 1-2014-00822

(22) 06/02/2012

(86) PCT/KR2012/000856 06/02/2012

(87) WO2013/024947 21/02/2013

(30) 10-2011-0081146 16/08/2011 KR

(45) 26/10/2020 391

(43) 26/05/2014 314A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

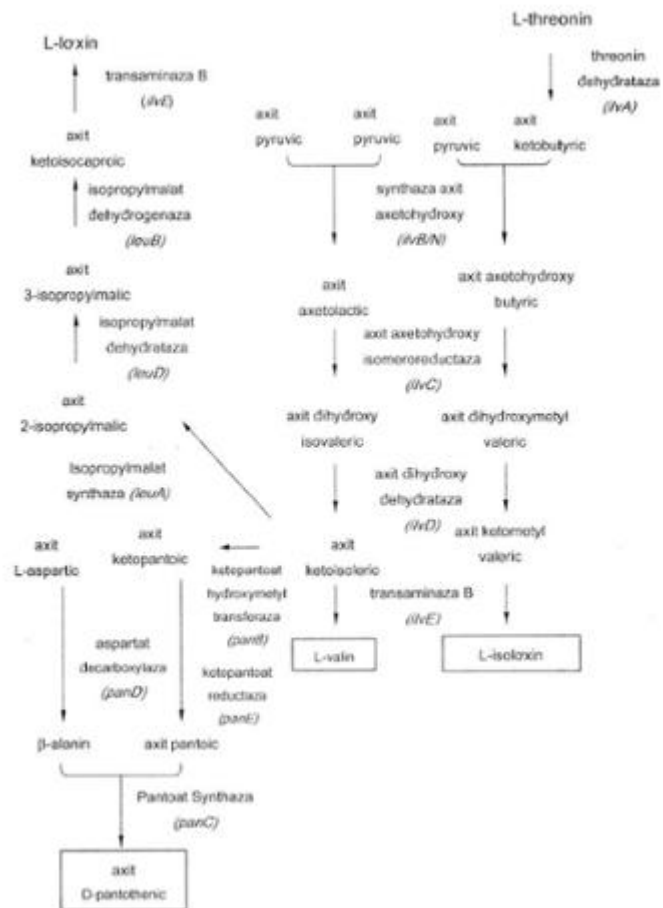
330, Dongho-ro, Ssangnim-dong, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea

(72) KIM, Hye Won (KR); LEE, Ji Hye (KR); HWANG, Soo Youn (KR); KIM, Jong Hyun (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) VI SINH VẬT CHO SẢN LƯỢNG L-VALIN TĂNG CAO VÀ PHƯƠNG PHÁP
SẢN XUẤT L-VALIN BẰNG CÁCH SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật cho sản lượng L-valin tăng cao và phương pháp sản xuất L-valin bằng cách sử dụng vi sinh vật này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* chịu được L-valin và các dẫn xuất nó cho sản lượng L-valin tăng cao, và phương pháp sản xuất L-valin bằng cách sử dụng chủng này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật cho sản lượng L-valin tăng cao và phương pháp sản xuất L-valin bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các L-axit amin được dùng trong ngành công nghiệp dược phẩm, cụ thể là dùng làm thuốc cho người, ngoài ra nó còn được dùng trong ngành công nghiệp thực phẩm và làm thức ăn cho động vật, và các ứng dụng khác nữa. Cụ thể, trong số 9 axit amin thiết yếu, có ba axit amin có mạch nhánh đó là các axit amin: L-valin, L-loxin, và L-isoloxin. Không giống như các axit amin khác chủ yếu chuyển hóa trong gan, các axit amin có mạch nhánh chủ yếu chuyển hóa trong mô cơ bắp và đóng vai trò làm nguồn năng lượng trong quá trình luyện tập. Vì các axit amin mạch nhánh đã được biết đến là đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì và phát triển của cơ bắp trong quá trình tập luyện, nhu cầu sử dụng chúng ngày càng tăng. Cụ thể, L-valin đã được dùng làm thành phần trong thức ăn gia súc, vì đã có báo cáo cho thấy rằng L-valin có năng lượng khử cao và có tác dụng cải thiện đặc tính tiết sữa ở lợn nái. L-valin còn được dùng trong các dung dịch tiêm truyền và axit amin tổng hợp dùng cho mục đích y học, trong các loại thuốc bổ và là các chất phụ gia của đồ uống.

Vi sinh vật được sử dụng để sản xuất L-axit amin là vi khuẩn coryneform, đặc biệt là *Corynebacterium glutamicum*. Do vi khuẩn coryneform đóng vai trò khá quan trọng trong sản xuất công nghiệp, nên phương pháp sản xuất L-axit amin bằng cách sử dụng các vi sinh vật này được cải tiến không ngừng. Ví dụ, đã biết đến các cải tiến cải thiện phương pháp khuấy và đưa oxy vào, hoặc thành phần của môi trường nuôi cấy như nồng độ đường trong quá trình lên men. Để cải thiện sản lượng L-axit amin thu được từ các vi sinh vật này, các phương pháp chọn lọc và chọn lọc đột biến được sử dụng rộng rãi. Ví dụ, có phương pháp chọn lọc và sử dụng vi sinh vật chịu được các chất chống chuyển hóa như dẫn xuất isoloxin, isoloxin hydroxamat (Kisumi M et al., (1972) Journal of Bacteriology 110: 761-763), dẫn xuất của L-valin, 2-thiazol alanin

(Tsuchida T et al., (1975) *Agricultural and Biological Chemistry*, Japan 39: 1319-1322) hoặc dẫn xuất lōxin, α -aminobutyrate (Ambe-Ono Y et al., (1996) *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 60: 1386-1387), hoặc khuyết dưỡng chất chuyển hoá có vai trò điều hoà và sản xuất L-axit amin (Eva Radmacher et al., (2002) *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68 p.2246-2250).

Một trong số các axit amin mạch nhánh này, L-valin được sinh tổng hợp trong vi sinh vật, bắt đầu từ axit pyruvic thông qua axit axetolactic, axit dihydroxy isovaleric, và axit ketoisovaleric. Các hợp chất chuyển hoá trung gian này được tạo ra do hoạt tính xúc tác của synthaza axit axetohydroxy, isomeroeductaza axit axetohydroxy, dehydrataza axit dihydroxy, và transaminaza B. Tuy nhiên, các enzym này còn tham gia vào quá trình sinh tổng hợp L-isolōxin bắt đầu từ axit ketobutyric và axit pyruvic, và L-lōxin còn được sinh tổng hợp từ chất chuyển hoá trung gian, axit ketoisovaleric thông qua axit 2-isopropylmalic, axit 3-isopropylmalic, và axit ketoisocaproic. Do đó, vì các enzym được sử dụng trong quá trình sinh tổng hợp các axit amin mạch nhánh, cụ thể là L-valin, L-isolōxin, và L-lōxin là giống nhau, nên khó sản xuất chỉ một trong số các axit amin mạch nhánh nêu trên bằng cách lên men công nghiệp. Ngoài ra, vì có sự ức chế ngược của sản phẩm cuối L-valin hoặc các dẫn xuất của chúng đến quá trình tổng hợp L-valin, nên khó sản xuất công nghiệp L-valin.

Để giải quyết các vấn đề này, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để tạo ra vi sinh vật sản xuất L-valin có tính chịu được L-valin hoặc các dẫn xuất của chúng để sản xuất L-valin, và ví dụ bằng phương pháp sử dụng vi sinh vật chịu được axit D, L-aminobutyric (công bố đơn sáng chế Laid-Open của Nhật số S63-160592), phương pháp sử dụng vi sinh vật chịu được thiazol alanin và khuyết dưỡng với lōxin, isolōxin, hoặc threonin (công bố đơn sáng chế Laid-Open của Nhật số S52-116), phương pháp sử dụng vi sinh vật chịu được amnioethylxystein (công bố đơn sáng chế Laid-Open của Nhật No. S58-2678), phương pháp sử dụng vi sinh vật chịu được L-valin trong môi trường có bổ sung axit axetic và có tính nhạy với axit pyruvic trong môi trường được bổ sung glucoza (patent Mỹ số 5,521,074, patent Hàn Quốc số 1995-0005133), phương pháp sử dụng vi sinh vật chịu được polyketit (patent Hàn Quốc số 1996-0016871) hoặc các phương pháp tương tự.

Tuy nhiên, các vi sinh vật sản xuất L-valin được phát triển hiện nay chịu được

chỉ một hoặc một số chất liệu trong L-valin hoặc các dẫn xuất của nó, và do đó vẫn cần phát triển vi sinh vật sản xuất L-valin chịu được các chất khác nhau tham gia vào quá trình kiểm soát ngược sinh tổng hợp L-valin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã rất nỗ lực để phát triển vi sinh vật có khả năng sản xuất L-valin với hiệu suất cao hơn các chủng thông thường khác. Kết quả là, các tác giả đã phát hiện được rằng chủng đột biến, thu được vi sinh vật sản xuất axit glutamic, sản xuất L-valin với hiệu suất cao, và chịu được các dẫn xuất L-isoloxin và các dẫn xuất L-valin khác nhau, cụ thể là axit α -aminobutyric (ABA), α -hydroxyvalin (AHV), thiazol alanin (TA), và norvalin (NV), nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Giải pháp kỹ thuật

Đối tượng của sáng chế là đề xuất chủng *Corynebacterium glutamicum* đột biến KCCM11201P sản xuất L-valin.

Một đối tượng nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất L-valin bằng cách sử dụng chủng đột biến này.

Hiệu quả của sáng chế

Vi sinh vật coryneform theo sáng chế chịu được L-valin, L-isoloxin và các dẫn xuất của chúng, và do đó không bị tác động bởi sự ức chế ngược của L-valin, kết quả là cho sản lượng L-valin tăng cao. Do đó, phương pháp sản xuất L-valin bằng cách sử dụng vi sinh vật theo sáng chế được sử dụng để tạo ra L-valin với hiệu quả cao và hiệu suất cao.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

FIG. 1 thể hiện quá trình sinh tổng hợp L-valin là sản phẩm cuối theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng *Corynebacterium glutamicum* đột biến KCCM11201P để sản xuất L-valin.

Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ "L-valin" dùng để chỉ L-axit amin có công thức hóa học $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, là một trong số các axit amin

thiết yếu và có cấu trúc là axit amin mạch nhánh, cùng với L-loxin và L-isoloxin.

Quá trình sinh tổng hợp L-valin ở vi sinh vật được thể hiện trên FIG. 1, trong đó L-valin được sinh tổng hợp bắt đầu từ axit pyruvic thông qua axit axetolactic, axit dihydroxy isovaleric, và axit ketoisovaleric. Ngoài ra, quá trình sinh tổng hợp được xúc tác bằng enzym như synthaza axit axetohydroxy, isomeroeductaza axit axetohydroxy, dehydrataza axit dihydroxy, và transaminaza B. Tuy nhiên, các enzym này được sử dụng giống nhau trong quá trình sinh tổng hợp các axit amin mạch nhánh, cụ thể là, L-valin, L-isoloxin, và L-loxin, và do đó khó tạo ra chỉ một trong các axit amin mạch nhánh này bằng cách lên men công nghiệp. Đặc biệt là, có sự ức chế ngược do sản phẩm cuối L-valin hoặc các dẫn xuất của nó, điều này dẫn đến việc khó thực hiện sản xuất công nghiệp L-valin. Để giải quyết vấn đề này, các tác giả tạo ra chủng đột biến theo sáng chế chứa vi sinh vật mới mà chịu được L-valin hoặc dẫn xuất của nó để bỏ sự ức chế ngược, nhờ đó tạo ra sản lượng L-valin tăng cao.

Tốt hơn nữa, chủng đột biến theo sáng chế có tính chịu được valin hoặc các dẫn xuất của nó, isoloxin hoặc các dẫn xuất của nó.

Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ "dẫn xuất" dùng để chỉ các hợp chất đã biết là gây ra ức chế ngược trong quá trình sinh tổng hợp sản phẩm cuối L-valin để giảm khả năng sản xuất L-valin trong vi sinh vật, và ví dụ các dẫn xuất L-isoloxin có thể là axit α -aminobutyric và các dẫn xuất L-valin, alpha-hydroxyvalin, thiazol alanin, và norvalin hoặc các chất tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Tốt hơn nữa, chủng đột biến có thể chịu được một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm valin, axit α -aminobutyric, alpha-hydroxyvalin, thiazol alanin, và norvalin. Tốt hơn nữa, vi sinh vật này chịu được tất cả valin, axit α -aminobutyric, alpha-hydroxyvalin, thiazol alanin, và norvalin.

Thông thường, đã biết rằng quá trình sinh tổng hợp L-valin bị ức chế khi L-valin được tích lũy đến một mức nhất định trong tế bào. Do đó, chủng này chịu được các dẫn xuất giảm được quá trình ức chế do L-valin và do đó L-valin có thể được tạo ra ở nồng độ cao. Theo một phương án của sáng chế, các tác giả sáng chế sử dụng phương pháp chọn lọc vi sinh vật có khả năng sản xuất lượng L-valin cao bằng cách sử dụng các dẫn xuất này. Ngoài ra, vì L-isoloxin là một axit amin được tạo ra bởi quá trình sinh tổng hợp giống hệt quá trình sinh tổng hợp L-valin, có thể cũng chọn được

chúng có khả năng sản xuất L-valin với hàm lượng cao bằng cách xét xem chủng này có thể chịu được các dẫn xuất isoloxin. Do đó, các dẫn xuất isoloxin cũng được dùng để chọn lọc chủng có khả năng sản xuất L-valin nồng độ cao.

Theo sáng chế, chủng đột biến cho sản lượng L-valin tăng cao được chọn từ chủng gốc bằng cách gây đột biến. Về điểm này, đột biến ở vi sinh vật có thể được gây ra bởi nhiều kỹ thuật đã biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bất kỳ một yếu tố gây đột biến vật lý và hóa học bất kỳ đều có thể được sử dụng. Ví dụ về gây đột biến hóa học thích hợp theo sáng chế bao gồm N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG), diepoxybutan, etyl metan sulfonat, các hợp chất mù tạc, hydrazin, và axit nitơ, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Ngoài ra, ví dụ về yếu tố gây đột biến vật lý có thể bao gồm ánh sáng tử ngoại và bức xạ gamma, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Khi gây ra đột biến, chủng gốc bị ảnh hưởng bởi yếu tố gây đột biến ở cường độ đủ để lại một số lượng nhất định các quần thể sống sót. Số lượng này thay đổi tùy thuộc vào loại yếu tố gây đột biến, và phụ thuộc vào mức độ đột biến gây ra ở quần thể sống sót ở một tỷ lệ giết chết nhất định. Ví dụ, tỷ lệ gây chết mong muốn cho NTG nên để khoảng 10%-50% quần thể ban đầu. Axit nitơ gây đột biến nên để lại khoảng 0,01% đến 0,1% quần thể ban đầu và gây đột biến bằng ánh sáng tử ngoại nên để lại khoảng 1,0%. Theo một phương án của sáng chế, NTG được sử dụng để gây ra đột biến ở chủng gốc, để tạo ra chủng đột biến cho sản lượng L-valin tăng cao.

Theo một ví dụ của sáng chế, *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10661 sản xuất L-axit glutamic (công bố đơn patent Hàn Quốc số 1988-0016543; số công bố 1990-0007948) được sử dụng làm chủng gốc, để tạo ra chủng đột biến cho sản lượng L-valin tăng cao, do đặc tính tạo ra 1 phân tử axit glutamic trong quá trình sinh tổng hợp L-valin. Do đó, tạo ra ngẫu nhiên gây đột biến trong quá trình *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10661 sản xuất axit glutamic là chủng gốc, và vi sinh vật được rải lên môi trường tối thiểu được bổ sung dẫn xuất isoloxin, axit α -aminobutyric (ABA) và các dẫn xuất valin, alpha-hydroxyvalin (AHV), thiazol alanin (TA) và norvalin (NV). Sau đó, chọn lọc chủng đột biến có tính chịu đựng chung với các dẫn xuất ở mỗi nồng độ trong số 20 mM, 20 mM, 40 mM và 50 mM, và được ký hiệu là *Corynebacterium glutamicum* CA08-0072. Ngoài ra, khẳng định được rằng sản xuất L-valin của chủng đột biến có tính chịu đựng chung được tăng lên 4 lần hoặc cao hơn

so với giá trị ở chủng gốc (xem Bảng 1). Chủng đột biến CA08-0072 *Corynebacterium glutamicum* được nộp lưu ở cơ quan lưu giữ quốc tế, Korean Culture Center of Microorganisms, ở 361-221, Hongje-1-dong, Seodaemon-gu, Seoul, Korea, vào 13/7/2011, có số truy cập KCCM11201P.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất L-valin, bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến này trong môi trường nuôi cấy.

Tốt hơn nếu, phương pháp sản xuất L-valin có thể còn bao gồm bước thu hồi L-valin ra khỏi môi trường nuôi cấy chứa chủng đột biến.

Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ "nuôi cấy" dùng để chỉ sự phát hiện vi sinh vật ở điều kiện không chế nhân tạo. Theo sáng chế, phương pháp nuôi cấy chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* CA08-0072 (KCCM11201P) để sản xuất L-valin có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy *Corynebacterium glutamicum* đã biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cụ thể, ví dụ về phương pháp nuôi cấy bao gồm nuôi cấy gián đoạn, nuôi cấy liên tục, và nuôi cấy cấp liệu gián đoạn, nhưng không chỉ giới hạn ở các biện pháp này. Các phương pháp khác nhau được bộc lộ trong, ví dụ, "Biochemical Engineering" (James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp138-176, 1991) hoặc các tài liệu tương tự.

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy phải đáp ứng yêu cầu để môi trường nuôi cấy một chủng nhất định. Môi trường nuôi cấy của chủng *Corynebacterium* được mô tả (ví dụ trong, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981). Nguồn cacbon có thể có thể bao gồm các đường và hydrat cacbon như glucoza, sacaroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza, dầu và các chất béo như dầu đậu tương, dầu hướng dương, dầu lạc, và dầu chất béo, các axit béo như axit palmitic, axit stearic, và axit linolic, các rượu như glyxerol và etanol, và các axit hữu cơ như axit axetic. Các chất này có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp. Nguồn nitơ có thể dùng có thể bao gồm pepton, dịch chiết nấm men, nước chiết thịt, nước chiết malt, nước ngô, bột đậu tương và ure, hoặc các hợp chất vô cơ như amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat và amoni nitrat. Nguồn nitơ có thể có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp. Nguồn phospho có thể dùng có thể bao gồm kali dihydro phosphat hoặc đikali hydro phosphat hoặc các muối chứa natri tương ứng. Ngoài ra, môi trường nuôi

cây phải bao gồm các muối kim loại như magie sulfat và sắt (III) sulfat là các chất cần thiết cho sự phát triển. Ngoài các chất nêu trên, các chất thiết yếu cho sự phát triển, như axit amin và các vitamin, có thể được đưa vào. Các tiền chất thích hợp cũng có thể được cho vào môi trường nuôi cấy. Các chất được đề cập trên đây có thể được cho thích hợp vào môi trường nuôi cấy trong nuôi cấy gián đoạn hoặc nuôi cấy liên tục trong quá trình nuôi cấy.

Độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh thích hợp bằng cách bổ sung các hợp chất kiềm như natri hydroxit, kali hydroxit, và amoniac, hoặc các hợp chất có tính axit như axit phosphoric và axit sulfuric. Có thể ức chế sự tạo bọt khí bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt như este polyglycol axit béo. Để duy trì điều kiện hiếu khí, có thể phun oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ, không khí) vào môi trường nuôi cấy. Thông thường, nhiệt độ của môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 20 đến 45°C. Quá trình nuôi cấy có thể được tiếp tục cho đến khi quá trình sản xuất L-valin đạt đến mức mong muốn. Mục tiêu này thường đạt được trong thời gian từ 10 đến 160 giờ. L-valin có thể được giải phóng vào môi trường nuôi cấy hoặc nằm trong tế bào.

Phương pháp sản xuất L-valin theo sáng chế bao gồm bước thu hồi L-valin từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy. Phương pháp thu hồi L-valin từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy có thể được thực hiện theo phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách ly tâm, lọc, phương pháp sắc ký trao đổi anion, kết tinh, và HPLC, nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp này. Theo một phương án của sáng chế, dịch nổi trên bề mặt, thu được bằng cách ly tâm môi trường nuôi cấy ở tốc độ thấp và thu hồi sinh khối, được tách riêng bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion.

Cách thức thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết bằng cách tham khảo các Ví dụ sau đây. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và sáng chế không được dự định là chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chọn lọc chủng đột biến bằng cách gây đột biến nhân tạo

Để thu được chủng đột biến cho sản lượng L-valin tăng cao, gây đột biến vi sinh vật bằng cách sử dụng phương pháp sau.

Trước tiên, chủng gốc, *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10661 (công bố đơn Hàn Quốc số 1990-0007948) sản xuất axit glutamic được hoạt hoá trước bằng cách nuôi cấy trên môi trường hoạt hoá trong thời gian 16 giờ, sau đó được nuôi cấy trong thời gian 14 giờ trên môi trường nhân giống đã được tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút. Sau đó, 5 ml môi trường nuôi cấy được thu gom và rửa bằng 100 mM dung dịch đệm xitrat. Cho NTG (N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin) vào ở nồng độ cuối 200 mg/L. Sau 20 phút, rửa môi trường này bằng 100 mM dung dịch đệm phosphat. Chủng đã được xử lý bằng NTG này được cấy trải lên môi trường tối thiểu và đo tỷ lệ chết. Kết quả, tỷ lệ chết là 85%.

Để thu được chủng đột biến có tính chịu đựng chung với axit α -aminobutyric (ABA), alpha-hydroxyvalin (AHV), thiazol alanin (TA) và norvalin (NV), chủng đã được xử lý bằng NTG này được cấy trải lên môi trường tối thiểu chứa ABA, AHV, TA và NV ở nồng độ cuối lần lượt là 20 mM, 20 mM, 40 mM và 50 mM. Sau đó, các chủng này được nuôi cấy ở 30°C trong thời gian 5 ngày để thu được chủng đột biến có tính chịu đựng chung với cả ABA, AHV, TA và NV.

Chủng đột biến thu được này được ký hiệu là *Corynebacterium glutamicum* CA08-0072 đã được nộp lưu ở Korean Culture Center of Microorganisms vào ngày 13/7/2011 với số truy cập KCCM11201P.

Các môi trường được sử dụng trong các Ví dụ 1 và 2 có thành phần sau đây.

<Môi trường hoạt hoá>

Dịch chiết thịt bò 1%, Polypepton 1%, natri clorua 0,5%, dịch chiết nấm men 1%, thạch 2%, pH 7,2.

<Môi trường nhân giống>

Glucosa 5%, Bacto Pepton 1%, natri clorua 0,25%, dịch chiết nấm men 1%, Ure 0,4%, pH 7,2.

<Môi trường tối thiểu>

Glucosa 1,0%, Amoni Sulfat 0,4%, Magie Sulfat 0,04%, Kali dihydro phosphat 0,1%, Urê 0,1%, Thiamin 0,001%, Biotin 200 μ g/L, thạch 2%, pH 7,0.

Ví dụ 2: Kiểm tra sản lượng L-valin của chủng đột biến sản xuất L-valin

Để xác định sản lượng L-valin, chủng *Corynebacterium glutamicum* CA08-0072 (KCCM11201P) có tính chịu đựng chung với nồng độ cao ABA, AHV, TA, và NV thu được ở Ví dụ 1, được nuôi cấy theo phương pháp sau.

Chủng gốc *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10661 và chủng đột biến được cấy vào bình thót cổ có vách ngăn ở góc 250 ml chứa 25 ml môi trường nhân giống và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 20 giờ bằng cách lắc ở tốc độ 200 vòng/phút để thu được môi trường nuôi cấy nhân giống. Sau đó, 1 ml của mỗi trong số môi trường nuôi cấy nhân giống được cấy vào bình thót cổ có vách ngăn ở góc 250 ml chứa 24 ml của môi trường sản xuất sau, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 72 giờ bằng cách lắc ở tốc độ 200 vòng/phút để tạo ra L-valin.

Môi trường sản xuất được sử dụng trong Ví dụ 2 có thành phần sau.

<Môi trường sản xuất>

Glucosa 5%, amoni sulfat 2%, kali dihydro phosphat 0,1%, magie sulfat heptahydrat 0,05%, CSL (nước ngô) 2,0%, biotin 200 µg/L, pH 7,2.

Sau khi nuôi cấy xong, tiến hành sắc ký lỏng tốc độ cao để xác định lượng L-valin tạo ra. Nồng độ của L-valin trong môi trường nuôi cấy của chủng thử nghiệm được tổng kết trong Bảng 1, sau đây.

Bảng 1: So sánh sản lượng L-valin của *Corynebacterium glutamicum* CA08-0072 (KCCM11201P)

	<i>Corynebacterium glutamicum</i> KFCC 10661 (chủng gốc)	<i>Corynebacterium glutamicum</i> CA08-0072 (chủng đột biến)
Nồng độ L-valin (g/L)	0,5	2,1

Như được thể hiện trên Bảng 1, chủng gốc, *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10661 tạo ra 0,5 g/L L-valin, còn chủng đột biến *Corynebacterium glutamicum* CA08-0072 theo sáng chế tạo ra 2,1 g/L L-valin, tức là sản lượng L-valin của chủng đột biến cao hơn chủng gốc 4 lần hoặc cao hơn nữa.

Kết quả nêu trên cho thấy rằng chủng đột biến trên chịu được L-valin, L-isoloxin và các dẫn xuất của chúng không bị tác động bởi cơ chế ức chế ngược, do đó có thể tạo ra L-valin với hiệu suất và năng suất cao.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Corynebacterium glutamicum* đột biến KCCM11201P sản xuất L-valin.
2. Chủng đột biến KCCM11201P theo điểm 1, trong đó chủng đột biến này chịu được L-valin, L-isoloxin, và các dẫn xuất của chúng, trong đó dẫn xuất của L-isoloxin này là axit α -aminobutyric (ABA: α -aminobutyric acid), và dẫn xuất của L-valin được chọn từ nhóm bao gồm α -hydroxyvalin (AHV: α -hydroxyvaline), thiazol alanin (TA: thiazole alanine) và norvalin (NV: norvaline).
3. Phương pháp sản xuất L-valin bao gồm bước nuôi cấy chủng đột biến KCCM11201P theo điểm 1 trong môi trường nuôi cấy.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu hồi L-valin ra khỏi môi trường nuôi cấy KCCM11201P.
5. Phương pháp theo điểm 3, trong đó quá trình nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 45°C trong điều kiện ưa khí trong thời gian từ 10 đến 160 giờ.

