



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

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

(11)



2-0002455

(51)⁷ **C12N 1/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00334

(22) 29/08/2018

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/12/2018 369A

(73) Viện Công nghiệp thực phẩm (VN)

301 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) Vũ Nguyên Thành (VN); Đinh Thị Mỹ Hằng (VN); Nguyễn Thanh Thủy (VN); Đặng Thị Kim Anh (VN); Cao Xuân Bách (VN).

(54) **CHŨNG NẤM MEN PICHIA PASTORIS X33 TÁI TỔ HỢP CÓ KHẢ NĂNG SINH
TỔNG HỢP ENZYM SUCROZA ISOMERAZA**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 có khả năng chuyển hóa sucroza thành isomaltuloza được tạo ra bằng công nghệ ADN tái tổ hợp. Chủng nấm men này chứa đoạn gen mã hóa enzym sucroza isomeraza có nguồn gốc lần lượt từ các chủng vi khuẩn *Klebsiella* sp. ISB8, *Kosakonia* sp. ISB10 và *Klebsiella singaporensis* ISB36 được phân lập tại Việt Nam.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến chủng nấm men *Pichia pastoris* tái tổ hợp được tạo ra bằng công nghệ ADN tái tổ hợp. Chủng này có thể được dùng để sản xuất đường chức năng isomaltuloza từ đường mía, nhờ khả năng sinh tổng hợp enzym sucroza isomeraza tái tổ hợp, nhằm ứng dụng trong sản xuất thực phẩm và dược phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Isomaltuloza (6-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructoza), với các tên thương mại là Palatinose, NRGylose hoặc Xtend Isomaltulose là một đồng phân của sucroza và được sản xuất từ sucroza thông qua chuyển hóa enzym, trong đó liên kết 1,2-glycozit giữa glucoza và fructoza được thay thế bằng liên kết 1,6-glycozit. Isomaltuloza có tính chất vật lí, cảm quan gần giống với sucroza và có giá trị năng lượng như sucroza. Khác biệt ở chỗ, isomaltuloza có chỉ số đường huyết (GI) thấp hơn 50% so với sucroza. Hiện nay nhu cầu thay thế việc sử dụng sucroza (GI 65) bằng một loại đường có GI thấp hơn ngày càng gia tăng do những ảnh hưởng không tốt của nó tới sức khoẻ con người như: góp phần làm tăng cân và béo phì, phá hoại hệ miễn dịch, kích thích sự gia tăng của các cholesterol có hại, ảnh hưởng không tốt tới bệnh sâu răng, tiểu đường và loãng xương. Isomaltuloza được đánh giá là một sự thay thế hợp lí cho sucroza bởi rất nhiều ưu điểm như: không gây sâu răng do các liên cầu khuẩn trong răng miệng không có khả năng sử dụng isomaltuloza; do chỉ số đường huyết thấp (GI 32) nên được cơ thể tiêu hoá và hấp thụ chậm hơn rất nhiều so với sucroza, không ảnh hưởng đáng kể tới nồng độ đường và insulin trong máu; không bị lên men bởi phần lớn các vi khuẩn và nấm men, bền trong axit và invertaza, tính chất này có lợi cho việc duy trì độ ngọt trong thực phẩm lên men và đồ uống; không hút ẩm như sucroza và lactoza, do vậy thực phẩm chứa isomaltuloza bền và ổn định hơn; kích thích sự phát triển của Bifidobacteria trong hệ vi thực vật của ruột người, nhiều bằng chứng chứng minh các vi khuẩn này có ích cho sức khoẻ con người và làm chậm lại quá trình lão hoá. Gần đây người ta đã chứng minh rằng isomaltuloza còn tốt cho chức năng của não và làm tăng bộ nhớ.

Enzym sucroza isomeraza (EC 5.4.99.11) (còn gọi là isomaltuloza synthaza) chịu trách nhiệm chuyển hóa sucroza thành isomaltuloza lần đầu tiên được tách chiết từ *Protaminobacter rubrum* (Weidenhagen và Lorenz, 1957). Sucroza isomeraza ngoài ra còn được phát hiện và tách dòng từ nhiều vi sinh vật khác, trong đó có *Protaminobacter rubrum* (Cho và cộng sự, 2007); *Pantoea dispersa* UQ68J, *Klebsiella planticola* UQ14S và *Erwinia rhapontici* WAC2928 (Li và cộng sự, 2013; Mu và cộng sự, 2014); *Enterobacter* sp. FMB-1 (Lee và cộng sự, 2011); *Klebsiella* sp. LX3 (Li và cộng sự, 2003; Zhang và cộng sự, 2002); và *Erwinia rhapontici* (Börnke và cộng sự, 2001).

Trong các năm 2010-2011, nhóm nghiên cứu tại Viện Công nghiệp Thực phẩm đã tiến hành phân loại dựa trên giải trình tự 16S rADN cho thấy các chủng có khả năng sinh tổng hợp isomaltuloza thuộc các loài *Klebsiella variicola*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella* sp. và *Enterobacter* sp. Trong đó, *Klebsiella variicola* và *Enterobacter cloacae* cho tới nay chưa được công bố và các chủng sinh tổng hợp isomaltuloza phân lập được tại Việt Nam là mới về khả năng sinh tổng hợp isomaltuloza (Nguyễn Thị Hoa Mai và cộng sự, 2013). Hiệu suất chuyển hóa cao nhất thành hỗn hợp isomaltuloza của các chủng đạt xấp xỉ 80% với dung dịch đường sucroza nồng độ 25%. Dựa trên các chủng tự nhiên này, các tác giả đã xây dựng được quy trình kỹ thuật sản xuất isomaltuloza từ mía đường sử dụng sinh khối vi sinh vật làm tác nhân chuyển hóa (Nguyễn Thanh Thủy và cộng sự, 2013).

Isomaltuloza đã được ứng dụng vào sản xuất thực phẩm và dược phẩm. Đi đầu trong sản xuất những sản phẩm này là tập đoàn Südzucker của Đức cũng là nhà sản xuất đường lớn nhất của châu Âu, thương hiệu Palatininit®, với 2 sản phẩm là Palatinose™ (kẹo cao su, nước tăng lực, bột dinh dưỡng, bánh quy, chocolate, kem, v.v.) và galenIQ™ (dược). Ngoài ra Cerestar (thuộc tập đoàn Cargill) và Shin Mitsui (Nhật) cũng là các công ty lớn sản xuất các chế phẩm của isomaltuloza. Đường isomaltuloza hiện đang được sử dụng tại Việt Nam ở dạng đường bổ trợ trong sữa cho trẻ em của công ty Cô gái Hà Lan, trong sữa Nutri DiabetCare (cho người tiểu đường), Slim Max (sữa giảm béo) của Nutrifood. Hiện tại chưa có một nhà máy đường nào tại Việt Nam có công nghệ sản xuất isomaltuloza và toàn bộ lượng isomaltuloza tiêu thụ trong thị trường là sản phẩm nhập khẩu. Việc chuyển hóa đường mía (sucroza) thành isomaltuloza sẽ có giá trị lớn về kinh tế, xã hội.

Công nghệ sản xuất isomaltuloza phổ biến nhất hiện nay mà các công ty trên cũng như thế giới đang sử dụng là cố định tế bào hoặc enzym vi sinh vật. Trong đó, cố định tế bào vi sinh vật trong chất mang được sử dụng trực tiếp. Công nghệ này đã được triển khai trong sản xuất công nghiệp tại nhiều nước trên thế giới. Tuy nhiên, công nghệ sản xuất isomaltulose này vẫn tồn tại một số nhược điểm như: vi sinh vật chuyển hóa tiêu thụ đồng thời sucroza, isomaltuloza dẫn tới giảm năng suất chuyển hóa; vi sinh vật cố định rất dễ mất hoạt tính; chi phí tinh chế isomaltuloza cao do bước loại bỏ độc tố của vi sinh vật; quy trình sản xuất phức tạp; và chi phí đầu tư thiết bị cao. Do vậy, trong thời gian gần đây xu hướng sản xuất isomaltuloza ứng dụng enzym tái tổ hợp được quan tâm nhiều hơn. Năm 2011, Lee và cộng sự đã biểu hiện thành công gen mã hóa sucroza isomeraza từ chủng vi khuẩn *Enterobacter* sp. FMB-1 trên nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Tuy nhiên hệ biểu hiện này đồng thời có khả năng sinh tổng hợp invertaza là enzym thủy phân sucroza thành glucoza và fructoza, các loại đường mà nấm men có thể sử dụng dễ dàng. Quá trình này sẽ làm giảm đáng kể hiệu suất chuyển hóa sucroza thành isomaltuloza.

Do đó, vẫn có nhu cầu tìm kiếm hệ biểu hiện gen mã hóa sucroza isomeraza có nguồn gốc từ vi khuẩn vừa có khả năng chuyển hóa tốt sucroza thành isomaltuloza và vừa hạn chế được việc sinh tổng hợp các enzym thủy phân sucroza làm ảnh hưởng đến hiệu suất chuyển hóa này. *Pichia pastoris* là nấm men được sử dụng rộng rãi để biểu hiện enzym tái tổ hợp ứng dụng trong sản xuất thuốc, vacxin... Ưu điểm của *P. pastoris* là không có khả năng sinh tổng hợp enzym invertaza để chuyển hóa sucroza và isomaltuloza. Dựa vào tiềm năng này, chúng tôi đã lựa chọn chủng *P. pastoris* X33 để nghiên cứu xây dựng công nghệ mới sản xuất isomaltuloza từ đường mía bằng chủng tái tổ hợp an toàn.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp enzym sucroza isomeraza, khác biệt ở chỗ, chủng này mang vectơ biểu hiện chứa đoạn gen mã hóa enzym sucroza isomeraza có trình tự được chọn từ một trong các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 2 và 3 có nguồn gốc lần lượt từ các chủng vi khuẩn *Klebsiella* sp. ISB8, *Kosakonia* sp. ISB10 và *Klebsiella singaporensis* ISB36.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là biểu đồ thể hiện sự sàng lọc các chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp có khả năng chuyển hóa đường mía (sucroza).

Hình 2 là biểu đồ đánh giá khả năng tạo đường chức năng isomaltuloza từ đường mía (sucroza) nồng độ cao của chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp.

Hình 3 là biểu đồ đánh giá khả năng tạo đường chức năng isomaltuloza từ nước mía của chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp trên hệ thống lên men 2 lít.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp mang vector biểu hiện chứa đoạn gen mã hóa enzym sucroza isomeraza. Đoạn gen này có trình tự được chọn từ một trong các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 2 và 3, có nguồn gốc lần lượt từ các chủng vi khuẩn *Klebsiella* sp. ISB8, *Kosakonia* sp. ISB10 và *Klebsiella singaporensis* ISB36, là các chủng có khả năng sinh tổng hợp enzym sucroza isomeraza, được phân lập tại Việt Nam do Viện Công Nghiệp Thực Phẩm cung cấp. Đoạn gen này được đưa vào hệ gen của chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 bằng cách sử dụng các vector biểu hiện là pPICZαA hoặc pGAPZαA. Các chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp được tạo ra có khả năng sinh enzym sucroza isomeraza chuyển hóa đường sucroza thành đường chức năng isomaltuloza để ứng dụng trong sản xuất thực phẩm và dược phẩm.

Chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 và các vector biểu hiện pPICZαA hoặc pGAPZαA do hãng Invitrogen, Mỹ cung cấp. Vector biểu hiện *Pichia* chứa các thành phần sau: điểm khởi đầu sao chép pUC cho phép vector có thể nhân bản được trong vi khuẩn *E. coli*; gen Zeo (zeoxin) chống chịu kháng sinh zeoxin được dùng để chọn lọc chủng *Pichia pastoris* tái tổ hợp; hai điểm cắt giới hạn *EcoRI* và *XbaI* là vị trí để chèn đoạn gen mã hóa enzym sucroza isomeraza; *XmaII*, *MssI*, *SacI* là các vị trí cắt giới hạn mở vòng vector trước khi đưa vào *Pichia pastoris*. Yếu tố điều khiển vùng 5' đóng vai trò trong việc tích hợp vector biểu hiện *Pichia* vào hệ gen của *Pichia pastoris* X33; hai yếu tố điều khiển được sử dụng rộng rãi hiện nay là: AOX1 (alcohol oxidase 1) được thiết kế trong vector biểu hiện pPICZαA và GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) được thiết kế trong vector biểu hiện pGAPZαA. Nấm men *Pichia pastoris* X33 được lựa chọn sử dụng làm hệ

biểu hiện chủ đạo do tính bền vững di truyền, khả năng phát triển trên môi trường khoáng chất rẻ tiền, an toàn phù hợp với sản xuất công nghiệp.

Đoạn gen mã hóa enzym sucroza isomeraza có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 được phân lập bằng cách nhân dòng từ hệ gen của chủng vi khuẩn *Klebsiella* sp. ISB8. Đoạn gen mã hóa enzym sucroza isomeraza có trình tự nêu trong SEQ ID NO:2 được phân lập bằng cách nhân dòng từ hệ gen của chủng vi khuẩn *Kosakonia* sp. ISB10. Đoạn gen mã hóa enzym sucroza isomeraza có trình tự nêu trong SEQ ID NO:3 được phân lập bằng cách nhân dòng từ hệ gen của chủng vi khuẩn *Klebsiella singaporensis* ISB36. Các chủng vi khuẩn này được phân lập tại Việt nam và hiện được lưu giữ tại Trung tâm Vi sinh vật Công nghiệp, Viện Công nghiệp Thực phẩm (301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân Hà Nội).

Chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp được tạo ra như sau:

Các chủng vi khuẩn *Klebsiella* sp. ISB8, *Kosakonia* sp. ISB10 hoặc *Klebsiella singaporensis* ISB36 được nuôi cấy trên môi trường thạch LB (0,5% dịch chiết nấm men; 1% trypton; 0,5% NaCl, 1,6% agar, độ pH là 7,0) ở 37°C qua đêm (16 giờ). Lấy 1 vòng que cấy vào ống eppendorf 1,5ml đã bổ sung 500µl đệm SSC (15mM natri xitrat, 150mM NaCl, độ pH là 7,0). Lắc đều và ủ ở 99°C trong 10 phút. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 2 phút. Hút bỏ phần dịch và tiến hành rửa tế bào 1 lần bằng nước cất vô trùng. Thêm khoảng 100µl hạt thủy tinh có đường kính 0,2 - 0,5mm (Roth, Đức), 100µl dung dịch phenol/cloroform (tỉ lệ 1:1) và 100µl nước cất vô trùng. Lắc ở 1400 vòng/phút trong 10 phút trên máy Thermocomfort (Eppendorf, Đức) sau đó ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch trong phía trên có chứa ADN được bảo quản ở -20°C.

Các đoạn gen có độ dài từ 1713 đến 1728 nucleotit mã hóa enzym sucroza isomeraza lần lượt được khuếch đại từ ADN tổng số của chủng vi khuẩn *Klebsiella* sp. ISB8, *Kosakonia* sp. ISB10 hoặc *Klebsiella singaporensis* ISB36 bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đã được bổ sung các trình tự nhận biết của enzym giới hạn *EcoRI* và *XbaI* (Bảng 1). Để đảm bảo giảm thiểu các lỗi có thể gặp trong PCR, enzym Phusion High-Fidelity ADN polymeraza (Thermo scientific, Mỹ) được sử dụng. Phản ứng PCR được thực hiện bao gồm các thành phần: 5ng ADN khuôn là ADN tổng số được tách chiết từ vi khuẩn, 10pmol mồi xuôi và mồi ngược, 200µM dNTPs, 1IU enzym trong đệm Phusion High-Fidelity ADN polymeraza với chế độ nhiệt: 98°C trong 30 giây; 25 chu kì phản ứng (98°C: 10 giây; 60°C: 10 giây; 72°C: 30 giây); 72°C trong 10 phút trên thiết bị GenAmp®

PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystem, Mỹ). Sản phẩm PCR được xử lý bằng enzym giới hạn *EcoRI*, *XbaI* (Thermo scientific, Mỹ) và vector pPICZαA, pGAPZαA (Invitrogen, Mỹ) cũng đã được mở vòng bằng các enzym tương ứng. Các sản phẩm cắt giới hạn được tinh chế bằng Kit GenJET Gel extraction (Thermo scientific, Mỹ).

Bảng 1. Danh sách môi sử dụng trong thí nghiệm nhân dòng gen mã hóa sucroza isomeraza

Tên môi	Trình tự môi (5' → 3')	Chủng vi khuẩn	Mã, độ dài (bp)
Kleb-LX3-Enter-SZ62-F	AGCTGAATTCGCACCATCCTTGAATCAG	<i>Klebsiella</i> sp. ISB8	SEQ ID NO: 1 1713
Kleb-LX3-AXMC-R	TTGTTCTAGATTACCGCAGCTTATACAC		
Entero-FMB1-F	AGCTGAATTCGCGTATAGTGCAGAACTTC	<i>Kosakonia</i> sp. ISB10	SEQ ID NO: 2 1728
Entero-FMB1-R	TTGTTCTAGATTACTGGAGTTCATAAAC		
Kleb-LX3-Enter-SZ62-F	AGCTGAATTCGCACCATCCTTGAATCAG	<i>Klebsiella</i> <i>singaporensis</i> ISB36	SEQ ID NO: 3 1713
Kleb-LX3-AXMC-R	TTGTTCTAGATTACCGCAGCTTATACAC		

Sản phẩm sau khi tinh chế là các trình tự SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 và SEQ ID NO:3 sẽ được nối vào plasmid pPICZαA hoặc pGAPZαA (đã được xử lý enzym giới hạn *EcoRI* và *XbaI*) theo các tỷ lệ nồng độ 3:1. Thành phần của phản ứng trong tổng thể tích 10μl như sau: 1μl đệm 10× của T4 ADN ligaza; 1μl T4 ADN ligaza 400U/ml; 4μl vector và 4μl ADN. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 16°C trong 16 giờ.

Sản phẩm sau khi gắn kết được biến nạp vào vi khuẩn *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) bằng phương pháp sốc nhiệt theo kỹ thuật của Sambrook và Russell (2001). Vi khuẩn chứa plasmid tái tổ hợp được sàng lọc trên môi trường thạch LB chứa 25mg/l zeoxin ở điều kiện 37°C trong 24 giờ. Khuẩn lạc phát triển trên môi trường trên được cấy chuyển sang ống Fancol chứa 5ml môi trường lỏng LB - 25mg/l zeoxin và nuôi cấy lắc ở 37°C trong 16 giờ. Sinh khối vi sinh vật được thu hồi bằng ly tâm ở 10000×g, 4°C trong 5 phút. Plasmid được tách chiết sử dụng kit tách chiết plasmid của Thermo scientific theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trình tự gen được kiểm tra bằng phương pháp “dideoxy chain termination” sử dụng các môi α-factor (5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3') và 3'AOX (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC -3') trên thiết bị AB-377 của hãng Applied Biosystems.

Các vector biểu hiện chứa các đoạn gen mã hóa enzym sucroza isomeraza được mở vòng bằng một trong những enzym giới hạn: *Xma*II, *Mss*I, *Sac*I (Thermo scientific, Mỹ). Sản phẩm sau mở vòng được làm sạch bằng kit tinh chế plasmid của Thermo scientific và định lượng bằng thiết bị Nanodrop 2000 (Thermo scientific, Mỹ). Plasmid sau mở vòng (5µg) được biến nạp vào tế bào *P. pastoris* X33 sử dụng thiết bị xung điện GenPulser (Bio-Rad, Mỹ) ở 2,5kV trong 4 mili giây. Tế bào *P. pastoris* X33 được ủ trong 1M sorbitol sau đó trải lên các đĩa môi trường thạch YPDS (1% dịch chiết nấm men, 2% Bacto pepton, 2% glucoza, 1M sorbitol và 2% agar) chứa 100mg/l zeoxin và ủ ở 30°C. Sau 4 ngày nuôi cấy, các khuẩn lạc tạo ra được làm sạch và kiểm tra hoạt tính sucroza isomeraza.

Chủng *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp phát triển tốt trên môi trường YPD (cao nấm men 1%, pepton 2%, glucoza 2% và agar 2%) ở nhiệt độ trong giải từ 20-32°C và hiện đang được bảo quản bằng các phương pháp đông khô, bảo quản trong nitơ lỏng theo kỹ thuật thường quy cho nấm men (Hunter-Cevera và Belt, 1996) và lưu giữ tại Trung tâm Vi sinh vật Công nghiệp, Viện Công nghiệp Thực phẩm.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Sàng lọc chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp có khả năng chuyển hóa đường mía (sucroza)

Để lựa chọn chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp mang gen mã hóa enzym sucroza isomeraza có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1, có nguồn gốc từ chủng vi khuẩn *Klebsiella* sp. ISB8 có khả năng chuyển hóa đường mía cao nhất, tiến hành nuôi biểu hiện enzym sucroza isomeraza trên môi trường chứa 20% sucroza. 5 chủng nấm men tái tổ hợp X33.SI8.2, X33.SI8.3, X33.SI8.4, X33.SI8.7 và X33.SI8.8 có khả năng chuyển hóa sucroza được hoạt hóa trên môi trường YPD ở 30°C. Sau 48 giờ, chuyển một vòng que cấy sinh khối tế bào nấm men vào 25mL YPD lỏng và tiến hành nuôi lắc 150 vòng/phút ở 30°C. Sau 2 ngày, toàn bộ sinh khối tế bào được chuyển vào 25mL dung dịch sucroza 40% và tiếp tục nuôi lắc 150 vòng/phút ở 30°C qua đêm (16 giờ). Quá trình chuyển hóa sucroza được kiểm tra bằng cách phân tích hàm lượng các loại đường trong môi trường bằng phương pháp HPLC.

Kết quả phân tích HPLC cho thấy, các chủng nấm men *Pichia pastoris* tái tổ hợp X33.SI8.2, X33.SI8.3, X33.SI8.4, X33.SI8.7 và X33.SI8.8 đều có khả năng chuyển hóa sucroza thành isomaltuloza với hiệu suất chuyển hóa đạt từ 19,2% đến 23,4% sau 16 giờ, ngoài ra sản phẩm phụ trehaluloza cũng được tạo thành. Trong khi chủng đối chứng *Pichia pastoris* X33 kiểu dại không chuyển hóa được sucroza (Hình 1). Chủng *Pichia pastoris* X33.SI8.3 có hiệu suất đồng phân hóa sucroza cao nhất đạt 23,4% được đặt mã số *Pichia pastoris* CNTP 9100.

Ví dụ 2: Đánh giá khả năng tạo đường chức năng isomaltuloza từ đường mía (sucroza) nồng độ cao của chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp.

Chủng *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp mang gen mã hóa enzym sucroza isomeraza có trình tự nêu trong SEQ ID NO:3, có nguồn gốc từ chủng vi khuẩn *Klebsiella singaporensis* ISB36 với mã số *Pichia pastoris* CNTP 9102 được lấy ra từ nitơ lỏng và hoạt hóa trên môi trường YPD. Sau 48 giờ, chuyển một vòng que cấy sinh khối tế bào nấm men vào 20mL môi trường YPD20 (cao nấm men 1%, pepton 2%, glucoza 20%) và tiến hành nuôi lắc ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ với tốc độ lắc 150 vòng/ phút. Sau khi tăng sinh, 3mL sinh khối tế bào được chuyển vào bình tam giác 100mL chứa 27mL môi trường YPS (cao nấm men 1%, pepton 2% và glucoza 0,5%) chứa lượng đường mía sucroza từ 20 đến 50% và được nuôi biểu hiện ở nhiệt độ 30°C với tốc độ lắc 150 vòng/ phút. Quá trình chuyển hóa đường mía sucroza được kiểm tra sau 0, 16 và 21 giờ bằng cách hút 1mL sinh khối ly tâm thu dịch để phân tích hàm lượng các loại đường trong môi trường bằng phương pháp HPLC.

Kết quả cho thấy, sau 16 giờ chủng *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp đã chuyển hóa hoàn toàn lượng sucroza có trong môi trường biểu hiện YPS với nồng độ từ 20-40% sucroza. Và sau 21 giờ, môi trường YPS chứa 45 hoặc 50% sucroza cũng đã được chuyển hóa hoàn toàn (Hình 2). Hiệu suất chuyển hóa ở các môi trường YPS chứa 20-45% sucroza đều đạt khoảng 89% so với lượng đường tổng số, và môi trường YPS chứa 50% sucroza hiệu suất chỉ đạt 84,5%.

Ví dụ 3: Đánh giá khả năng tạo đường chức năng isomaltuloza từ nước mía của chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp trên hệ thống lên men 2 lít.

Chủng *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp mang gen mã hóa enzym sucroza isomeraza có trình tự nêu trong SEQ ID NO:2, có nguồn gốc từ chủng vi khuẩn *Kosakonia* sp. ISB10

với mã số *Pichia pastoris* CNTP 9101 được lấy ra từ nitơ lỏng và hoạt hóa trên môi trường YPD. Sau 48 giờ, chuyển một vòng que cấy sinh khối tế bào nấm men vào 50mL nước mía đã đun sôi 100°C, 5 phút và tiến hành nuôi lắc ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ với tốc độ lắc 150 vòng/ phút. Sau khi tăng sinh, sinh khối tế bào được chuyển vào hệ thống lên men Jupiter bioreactor 2 lít (Solaris biotech, Ý) chứa 450mL nước mía đã đun sôi 100°C, 5 phút và tiến hành nuôi biểu hiện ở nhiệt độ 30°C với tốc độ khuấy 400-700 vòng/ phút. Quá trình sinh trưởng tế bào và chuyển hóa đường mía sucroza được kiểm tra sau mỗi 1 giờ bằng cách hút 1mL sinh khối để đo độ đục (OD 600nm) và 1mL sinh khối để phân tích hàm lượng các loại đường trong môi trường bằng phương pháp HPLC.

Kết quả cho thấy, sau 16 giờ chủng nấm men tái tổ hợp *Pichia pastoris* X33 đã chuyển hóa hoàn toàn lượng sucroza có trong môi trường nước mía và isomaltuloza tạo thành 166g/L đạt tới 90,24% so với lượng đường tổng số (Hình 3).

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp được tạo ra theo giải pháp hữu ích có khả năng chuyển hóa sucroza cao, không tiêu thụ sucroza hay sản phẩm isomaltuloza tạo thành, rất thích hợp để ứng dụng trong sản xuất isomaltuloza từ đường mía, là nguồn nguyên liệu dồi dào tại Việt Nam. Sản phẩm đường isomaltuloza được tạo ra có giá trị kinh tế cao hơn rất nhiều so với đường mía, góp phần tạo giá trị gia tăng cho sản xuất nông nghiệp, cung cấp nguyên liệu cho ngành sản xuất thực phẩm và dược phẩm trong nước và xuất khẩu.

Các tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thanh Thủy, Nguyễn Thị Hoa Mai, Đinh Thị Mỹ Hằng, Vũ Nguyên Thành. Công nghệ sản xuất Isomaltuloza từ sucroza sử dụng vi khuẩn *Enterobacter* sp. ISB-25. Tạp chí Khoa học và Công nghệ T. 51, S. 2. 2013, 173-184.
2. Nguyen Thi Hoa Mai, Nguyen Thanh Thuy, Dinh Thi My Hang, Vu Nguyen Thanh. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella variicola* ISB-6. Tạp chí Công nghệ Sinh học T. 11, S. 2. 2013, 311-317.
3. Börnke F, Hajirezaei M, Sonnewald U. Cloning and characterization of the gen cluster for palatinose metabolism from the phytopathogenic bacterium *Erwinia rhapontici*. J Bacteriol. 2001, 183, 2425-2430.
4. Cho MH, Park SE, Lim JK, Kim JS, Kim JH, Kwon DY, Park CS. Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food. Biotechnol Lett. 2007, 29, 453-458.
5. Hunter-Cevera J. C., Belt A. (1996) Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (Editors: Hunter-Cevera J. C., Belt A.) 263 pp. Academic Press.
6. Lee GY, Jung JH, Seo DH, Hansin J, Ha SJ, Cha J, Kim YS, Park CS. Isomaltuloza production via yeast surface display of sucrose isomerase from *Enterobacter* sp. FMB-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresour Technol. 2011, 102:9179-9184.
7. Li S, Xu H, Yu J, Wang Y, Feng X, Ouyang P. Enhancing isomaltulose production by recombinant *Escherichia coli* producing sucrose isomerase: culture medium optimization containing agricultural wastes and cell immobilization. Bioprocess Biosyst Eng. 2013; 36:1395-1405.
8. Li X, Zhao C, An Q, Zhang D. Substrate induction of isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX3. J Appl Microbiol. 2003, 95, 521-527.
9. Mu W, Li W, Wang X, Zhang T, Jiang B. Current studies on sucrose isomerase and biological isomaltulose production using sucrose isomerase. Appl Microbiol Biotechnol. 2014; 98:6569-6582.
10. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York 2: 112-122.

11. Weidenhagen R, Lorenz S. (1957). German Patent DE 1 049 800.
12. Zhang D, Li X, Zhang LH. Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp. strain LX3: gen cloning and characterization and engineering of thermostability. Appl Environ Microbiol. 2002, 68, 2676-2682.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp enzym sucroza isomeraza, khác biệt ở chỗ, chủng này mang vector biểu hiện chứa đoạn gen mã hóa enzym sucroza isomeraza có trình tự được chọn từ một trong các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 2 và 3 có nguồn gốc lần lượt từ các chủng vi khuẩn *Klebsiella* sp. ISB8, *Kosakonia* sp. ISB10 và *Klebsiella singaporensis* ISB36.
2. Chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vector biểu hiện được sử dụng là vector pPICZ α A hoặc pGAPZ α A.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghiệp thực phẩm

<120> Chủng nấm men *Pichia pastoris* X33 tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp enzym sucroza isomeraza

<160> 3

<210> 1

<211> 1713

<212> ADN

<213> *Klebsiella* sp. ISB 8

<400> 1

> SEQ ID NO: 1

```

GCACCATCCT TGAATCAGGA TATTCTCGTT CAAAAGGAAA GTGAATATCC TGCATGGTGG 60
AAAGAAGCTG TTTTTTATCA GATCTATCCT CGCTCATTTA AAGACACCAA TGATGATGGC 120
ATTGGCGATA TTCGCGGTAT CATTGAAAAG CTGGACTATC TGAAATCGCT CGGTATTGAC 180
GCTATCTGGA TAAATCCCCA TTATGACTCT CCGAACACAG ATAACGGCTA TGACATCAGT 240
AATTATCGTC AGATAATGAA AGAGTATGGC ACAATGGAGG ATTTTGATAA CCTTGTTGCC 300
GAAATGAAAA AACGAAATAT GCGCTTAATG ATCGACGTGG TCATTAACCA TACCAGTGAT 360
CAACACCCGT GGTATTATTCA GAGTAAAAGC GATAAAAACA ACCCTTATCG TGACTATTAT 420
TTCTGGCGTG ACGGAAAAGA TAATCAGCCA CCTAATAATT ACCCCTCATT TTTCGGCGGC 480
TCGGCATGGC AAAAAGATGC AAAGTCAGGA CAGTACTATT TACACTATTT TGCCAGACAG 540
CAACCTGATC TCAACTGGGA TAACCCGAAA GTACGTGAGG ATCTTTACGC AATGCTCCGC 600
TTCTGGCTGG ATAAAGGCGT TTCAGGCATG CGATTTGATA CGGTGGCAAC TTATTCCAAA 660
ATCCCGGGAT TTCCCAATCT GACACCTGAA CAACAGAAAA ATTTTGCTGA ACAATACACC 720
ATGGGGCCTA ATATTCATCG ATACATTGAG GAAATGAACC GGAAAGTTCT GTCCCGGTAT 780
GATGTGGCCA CCGCGGGTGA AATTTTTTGGC GTCCCGCTGG ATCGTTTCGTC GCAGTTTTTT 840
GATCGCCGCC GACATGAGCT GAATATGGCG TTTATGTTTG ACCTCATTCG TCTCGATCGC 900
GACAGCAATG AACGCTGGCG TCACAAGTCG TGGTCGCTCT CTCAGTTCCTG CCAGATCATC 960
AGCAAAATGG ATGTCACGGT CGGAAAGTAT GGCTGGAACA CGTTCTTCTT AGATAACCAT 1020
GACAACCCCC GTGCGGTATC TCACTTCGGG GATGACAGGC CGCAATGGCG GGAGGCGTCG 1080
GCTAAGGCAC TGGCGACGAT TACCCTCACT CAGCGGGCGA CGCCGTTTAT TTATCAGGGT 1140
TCAGAGCTGG GAATGACTAA TTATCCCTTC AGGCAACTCA ACGAATTTGA CGACATCGAG 1200
GTCAAAGGTT TCTGGCAGGA TTATGTCCAG AGTGGAAAAG TCACGGCCAC AGAGTTTCTC 1260
GATAATGTGC GCCTGACGAG CCGCGATAAC AGCAGAACAC CTTTCCAGTG GAATGACACC 1320
CTGAATGCTG GTTTTACTCG CGGAAAGCCG TGGTTTCACA TCAACCCAAA CTATGTGGAG 1380
ATCAACGCCG AACGCGAAGA AACCCGCGAA GATTCAGTGC TGAATTACTA TAAAAAATG 1440
ATTCAGCTAC GCCACCATAT CCCTGCTCTG GTATATGGCG CCTATCAGGA TCTTAATCCA 1500
CAGGACAATA CCGTTTATGC CTATACCCGA ACGCTGGGTA ACGAGCGTTA TCTGGTCGTG 1560
GTGAACTTTA AGGAGTACCC GGTCCGCTAT ACTCTCCCGG CTAATGATGC CATCGAGGAA 1620
GTGGTCATTG ATACTCAGCA GCAGGCGGCT GCGCCGCACA GCACATCCCT GTCATTGAGC 1680
CCCTGGCAGG CAGGTGTGTA TAAGCTGCGG TAA

```

1713

<210> 2

<211> 1728

<212> ADN

<213> *Kosakonia* sp. ISB10

<400> 2

> SEQ ID NO: 2

```

GCGTATAGTG CAGAAACTTC CGTCACTCAG AGTATACAGA CTCAGAAGGA GAGTACACTT 60
CCGGCATGGT GGAAAGAAGC TGTATTTTAT CAAATTTTAT CCCGCTCATT TAAAGATACG 120
AACGGAGATG GGATAGGTGA CATTCGCGGC ATTATAGAAA AACTGGACTA TCTTAAATCA 180
TTAGGGATAG ATGCAATCTG GATTAATCCA CATTACGACT CACCTAACAC TGATAATGGT 240
TATGATATCA GAGACTACGA AAAAATTATG CAAGAGTACG GAACTATGGA GGATTTTGAC 300
ACGTTAGTTT CAGAAATGAA AAAGCGTAAT ATGCGGTAA TGATAGACGT GGTAATTAAT 360
CATACAAGCG ATCAACACCC CTGGTTTATT CAAAGTAAAA GCAGTAAAGA AAACCCATAT 420
CGTGAATATT ATTTCTGGCG TGACGGTAAG GATAATCAGC CACCCAATAA TTACCCCTCA 480
TTCTTTGGCG GCTCTGCATG GCAAAAAGAT GATAAACAG GACAATATTA TCTCCATTAT 540
TTTGCCAGAC AGCAGCCTGA CCTTAACTGG GATAATCCGA AGGTGCGAGG CGATCTTTAC 600
GCCATGCTCC GCTTCTGGCT TGATAAGGGC GTGTCCGGGA TGCGGTTTGA CACCGTTGCA 660
ACGTATTCGA AGATTCCGGG CTTCCCCGAT CTGACGCCAG AGCAGCAGAA AAATTTTGCA 720
GAGCAGTATA CAATGGGGCC GAATATCCAT CGTTATCTAC AAGAAATGAA ACAGGAAGTC 780
CTTTCCCGGT ATGATGTAGT GACGGCAGGC GAAATATTCG GTGTTCCCTCT CGAGCGCTCG 840
TCTGATTTTT TTGACCGTCG TCGCAATGAA CTGGATATGT CGTTTATGTT TGACTTAATC 900
CGTCTCGATC GCGACAGCAA TGAACGCTGG CGTCATAAAA AATGGACGCT TTCTCAGTTT 960
CGTCAGATTA TCAACAAAAT GGATTCTAAC GCCGGAGAGT ATGGATGGAA CACCTTCTTT 1020
TTGGACAATC ATGATAACCC GCGGGCAGTG TCTCATTTTG GGGATGACAG CCCTCAGTGG 1080
ATAGAGCCTT CCGCTAAGGC ATTAGCGACA ATCATTCTGA CCCAGCGTGC GACACCTTTC 1140
ATTTTTCAGG GGTGAGAACT GGGAATGACC AATTATCCCT TTAAAAAGCT GAATGAATTT 1200
GACGATATTG AAGTCAAAGG TTTCTGGCAG GATTATGTCC AGACCGGAAA AGTGTCTGGCT 1260
GAAGAATTTA TTGATAACGT ACGCCTGACA AGCCGTGATA ACAGCAGGAC CCCTTTTCAG 1320
TGGAACGACC GTAAGAACGC CGGTTTTACC AGTGGAAGGC CCTGGTTCAG AATTAATCCA 1380
AACTATGTTG AAATTAACGC TGACAAAGAA TTAATCCGTA ATGACTCTGT GCTCAATTAT 1440
TATAAGGAAA TGATCAAGTT GCGGCATAAA ACCCCTGCGC TCATATACGG CACCTATAAA 1500
GATATCAGTC CTGAAGATGA TAGTGTCTAT GCTTATACCA GAACCCTTGG AAAGGAACGC 1560
TATCTTGTCG TAATAAACTT TACCGAAAAG ACAGTTCGTT ATCCTCTGCC GAAAAATAAT 1620
GTTATCAAAA GCATCTTAAT TGAGGCCAAT CAGAATAAAA CCGCCGAAAA ACAGAGTACA 1680
GTCTTAACAT TGAGTCCCTG GCAGGCTGGG GTTTATGAAC TCCAGTAA 1728

```

<210> 3

<211> 1713

<212> ADN

<213> *Klebsiella singaporensis* ISB36

<400> 3

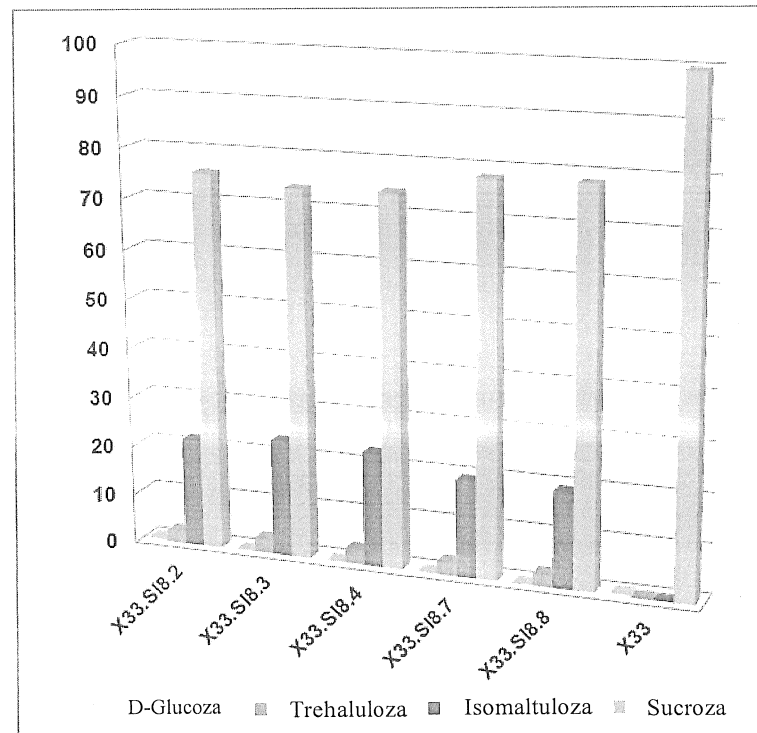
> SEQ ID NO: 3

```

GCACCATCCT TGAATCAGGA TATTCACGTT CAAAAGGAAA GTGAATATCC TGCATGGTGG 60
AAAGAAGCTG TTTTTTATCA GATCTATCCT CGCTCATTTA AAGACACCAA TGATGATGGC 120
ATTGGCGATA TTCGCGGTAT TATTGAAAAG CTGGACTATC TGAAATCGCT CGGTATTGAC 180
GCTATCTGGA TCAATCCCCA TTACGACTCT CCGAACACCG ATAACGGCTA TGACATCAGT 240
AATTATCGTC AGATAATGAA AGAGTATGGC ACAATGGAGG ATTTTGATAG CCTTGTTGCC 300
GAAATGAAAA AACGAAATAT GCGCTTAATG ATCGACGTGG TCATTAACCA TACCAGTGAT 360
CAACACCCGT GGTTTATTCA GAGTAAAAGC GATAAAAACA ACCCTTATCG TGACTATTAT 420
TTCTGGCGTG ACGGAAAAGA TAATCAGCCA CCTAATAATT ACCCCTCATT TTTCGGCGGC 480
TCGGCATGGC AAAAAGATGC AAAGTCAGGA CAGTACTATT TACACTATTT TGCCAGACAG 540
CAACCTGATC TCAACTGGGA TAACCCGAAA GTACGTGAGG ATCTTTACGC AATGCTCCGC 600
TTCTGGCTGG ATAAAGGCGT TTCAGGCATG CGATTTGATA CGGTGGCAAC TTATTCCAAA 660
ATCCCGGGAT TTCCAATCT GACACCTGAA CAACAGAAAA ATTTTGCTGA ACAATACACC 720
ATGGGGCCTA ATATTCATCG ATACATTGAG GAAATGAACC GGAAAGTTCT GTCCCGGTAT 780
GATGTGGCCA CCGCGGGTGA AATTTTTTGGC GTCCCGCTGG ATCGTTCGTC GCAGTTTTTTT 840
GATCGCCGCC GACATGAGCT GAATATGGCG TTTATGTTTG ACCTCATTCG TCTCGATCGC 900
GACAGCAATG AACGCTGGCG TCACAAGTCG TGGTCGCTCT CTCAGTTCCG CCAGATCATC 960
AGCAAAATGG ATGTCACGGT CGGAAAGTAT GGCTGGAACA CGTTCTTCTT AGATAACCAT 1020
GACAACCCCC GTGCGGTATC TCACTTCGGG GATGACAGGC CGCAATGGCG GGAGGCGTCG 1080
GCTAAGGCAC TGGCGACGAT TACCCTCACT CAGCGGGCGA CGCCGTTTAT TTATCAGGGT 1140
TCAGAGCTGG GAATGACTAA TTATCCCTTC AGGCAACTCA ACGAATTTGA CGACATCGAG 1200
GTCAAAGGTT TCTGGCAGGA TTATGTCCAG AGTGGAAAAG TCACGGCCAC AGAGTTTCTC 1260
GATAATGTGC GCCTGACGAG CCGCGATAAC AGCAGAACAC CTTTCCAGTG GAATGACACC 1320
CTGAATGCTG GTTTTACTCG CGGAAAGCCG TGGTTTCACA TCAACCCAAA CTATGTGGAG 1380
ATCAACGCCG AACCGGAAGA AACCCGCGAA GATTGAGTGC TGAATTACTA TAAAAAATG 1440
ATTGAGCTAC GCCACCATAT CCCTGCTCTG GTATATGGCG CCTATCAGGA TCTTAATCCA 1500
CAGGACAATA CCGTTTATGC CTATACCCGA ACGCTGGGTA ACGAGCGTTA TCTGGTCGTG 1560
GTGAACTTTA AGGAGTACCC GGTCCGCTAT ACTCTCCCGG CTAATGATGC CATCGAGGAA 1620
GTGGTCATTG ATACTCAGCA GCAGGCGGCT GCGCCGCACA GCACATCCCT GTCATTGAGC 1680
CCCTGGCAGG CAGGTGTGTA TAAGCTGCGG TAA

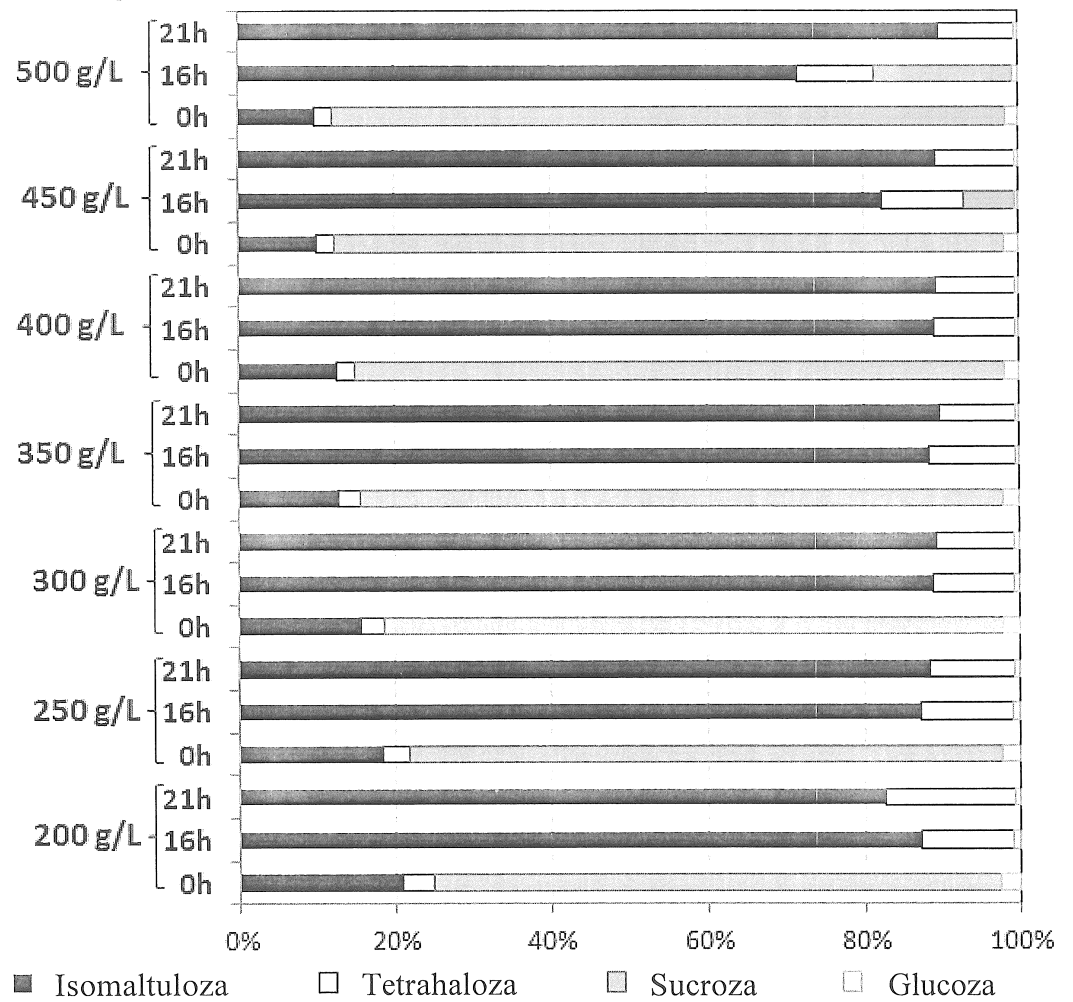
```

1713

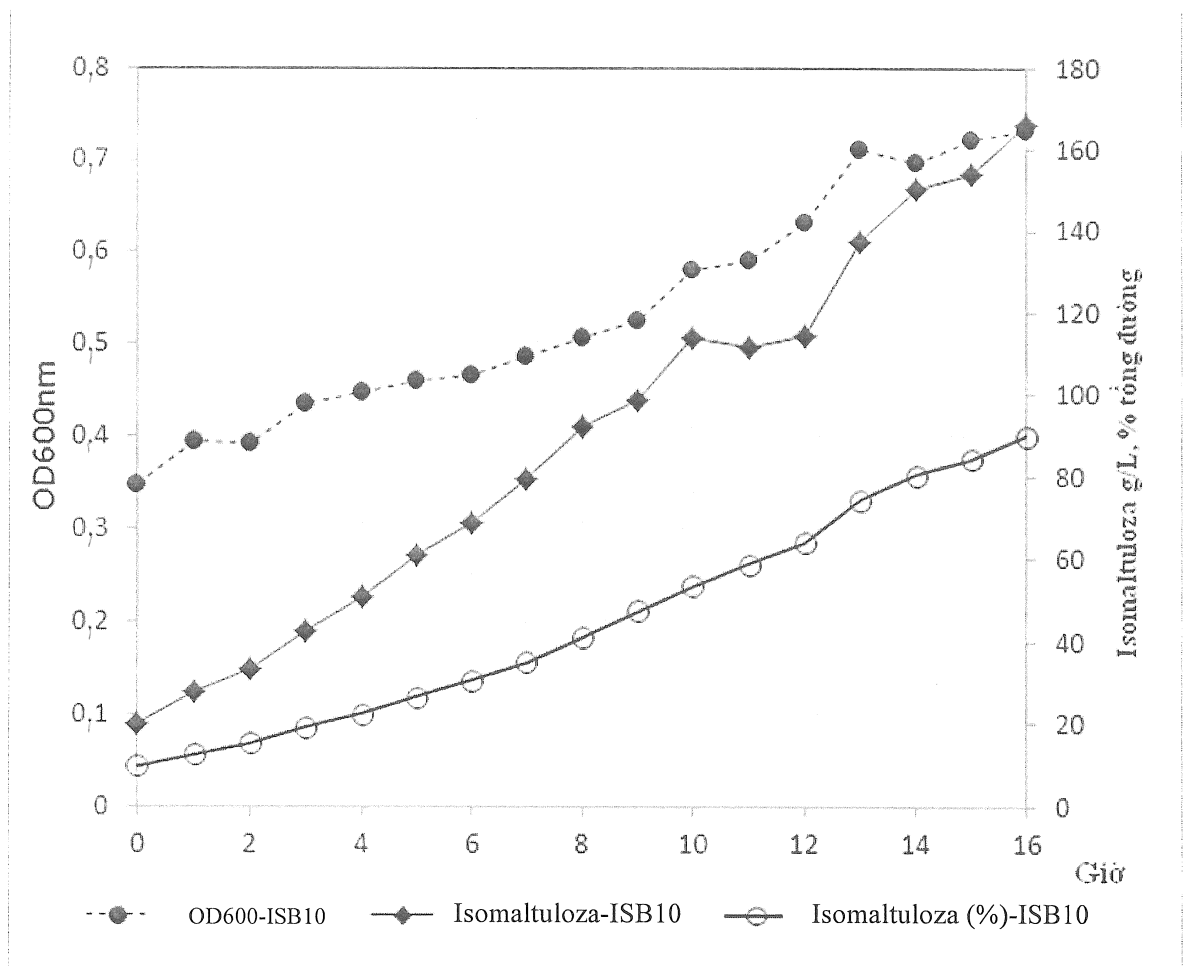


Hình 1

Môi trường sucroza



Hình 2



Hình 3