



(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)



1-0026765

(51)⁷ C07H 1/06; C07H 3/06; A61K 31/702; (13) B
A61P 1/14

(21) 1-2016-04368

(22) 27/04/2015

(86) PCT/JP2015/062673 27/04/2015

(87) WO 2015/166903 A1 05/11/2015

(30) 2014-095142 02/05/2014 JP

(45) 25/12/2020 393

(43) 27/02/2017 347A

(73) KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (JP)

1-19, Higashi-Shinbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8660, Japan

(72) YAMADA Tetsuya (JP); HATANO Hiroshi (JP); KIMURA Kazumasa (JP);
SOTOYA Hidetsugu (JP); MORI Yoko (JP).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM CHỨA HỢP CHẤT 4'-GALACTOSYL-
LACTOZA CÓ ĐỘ TINH KHIẾT CAO

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm chứa hợp chất 4'-galactosyl-lactoza (4'-GL) có độ tinh khiết cao. Phương pháp này bao gồm các bước: (A) tiến hành sắc ký cột trên than hoạt tính đối với galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL, và rửa giải từng bước bằng nhiều dung dịch nước dung môi hữu cơ, trong đó trong các lần rửa giải liên nhau, các dung dịch nước dung môi hữu cơ được sử dụng sao cho nồng độ dung môi hữu cơ trong dung dịch nước dung môi hữu cơ cao hơn nồng độ dung môi hữu cơ trong dung dịch nước dung môi hữu cơ của lần rửa giải ngay trước đó; và (B) cho thêm dung môi hữu cơ vào phân đoạn cuối được rửa giải trong bước (A), và kết tinh 4'-GL.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm chứa hợp chất 4'-galactosyl-lactoza (4'-galactosyl-lactose: 4'-GL) có độ tinh khiết cao từ galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL ($\text{Gal}\beta 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hợp chất 4'-GL đã được biết là thành phần chính của galacto-oligosacarit, chất này có thể kích thích sự tăng sinh của vi khuẩn Bifido ở ruột. Hợp chất 4'-GL cũng được sử dụng làm chỉ số phân tích của galacto-oligosacarit.

Việc sản xuất galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL trong công nghiệp sử dụng phản ứng trao đổi nhờ β -galactosidaza bằng cách sử dụng lactoza làm nguyên liệu. Tuy nhiên, độ tinh khiết của chính galacto-oligosacarit thường là thấp khi bước tinh chế và bước tương tự không được thực hiện.

Để cải thiện độ tinh khiết bằng cách tinh chế oligosacarit, tài liệu sáng chế 1 bộc lộ phương pháp tinh chế glucosamino oligosacarit trong đó polyme được điều chế bằng cách đưa nhóm carboxylmetyl vào polyme có nhóm hydroxyl được dùng làm bộ lọc sắc ký. Tuy nhiên, tài liệu này không thông báo rằng phương pháp này được dùng để cải thiện độ tinh khiết của các thành phần của galacto-oligosacarit, cụ thể là 4'-GL, bằng cách tinh chế galacto-oligosacarit. Ngay cả các chế phẩm có trên thị trường hiện nay dưới dạng chất chuẩn của 4'-GL cũng không có đủ độ tinh khiết.

Tài liệu sáng chế 2 bộc lộ quy trình tạo ra galactosacarit, đặc biệt là hợp chất 4'-GL và tetrasacarit. Hợp chất 4'-GL được tách bằng cách sử dụng cột chứa hỗn hợp của than hoạt tính và xelit theo tỷ lệ 1:1 và dung môi rửa giải là etanol 10%. Tài liệu sáng chế 3 mô tả phương pháp tinh chế trisacarit bằng cách sắc ký cột trên than hoạt tính. Tài liệu sáng chế 4 đề cập đến chất thay thế chất béo polyeste axit béo alkyl glycosit. Trong ví dụ III, phương pháp tách hợp chất 4'-GL bằng cách sắc ký cột trên than hoạt tính và kết tinh được đề cập. Tài liệu sáng chế 5 đề cập đến phương pháp sản xuất galactosacarit với galactosidaza từ vi sinh vật như *Sporobolomyces* và

Saccharomyces.

Tài liệu sáng chế 1: JP-B-6-55766

Tài liệu sáng chế 2: JP S60 251896A

Tài liệu sáng chế 3: JP 2 904687 B2

Tài liệu sáng chế 4: WO 90/13555 A1

Tài liệu sáng chế 5: JP 2003/325166 A

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp thuận tiện và không đắt tiền để điều chế chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao và có thể dùng làm chất chuẩn tham chiếu cho nhiều phép phân tích.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nhiều nghiên cứu mở rộng để giải quyết các vấn đề nêu trên và đã phát hiện được rằng có thể thu được chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao bằng cách kết hợp bước rửa giải từng bước sử dụng dung môi hữu cơ với bước kết tinh. Sáng chế được hoàn thành dựa trên sự phát hiện này.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao, phương pháp này bao gồm các bước:

(A) tiến hành sắc ký cột trên than hoạt tính đối với galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL, và rửa giải từng bước bằng nhiều dung dịch nước dung môi hữu cơ, trong đó trong các lần rửa giải liên nhau, các dung dịch nước dung môi hữu cơ được sử dụng sao cho nồng độ dung môi hữu cơ trong dung dịch nước dung môi hữu cơ cao hơn nồng độ dung môi hữu cơ trong dung dịch nước dung môi hữu cơ của lần rửa giải ngay trước đó; và

(B) cho thêm dung môi hữu cơ vào phân đoạn cuối được rửa giải trong bước (A), và kết tinh 4'-GL.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao thu được bằng cách sử dụng phương pháp điều chế nêu trên.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Phương pháp điều chế chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao theo sáng chế là phương pháp trong đó bước rửa giải từng bước bằng cách sử dụng dung

môi hữu cơ được kết hợp với bước kết tinh, nhờ đó có thể điều chế được chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL với độ tinh khiết cao từ galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL theo cách thuận tiện và không đắt tiền.

Chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao thu được bằng cách sử dụng phương pháp điều chế chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao theo sáng chế có thể được dùng làm chất chuẩn tham chiếu cho nhiều phép phân tích khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Bước (A) trong phương pháp điều chế chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao của sáng chế (sau đây được gọi là "phương pháp điều chế của sáng chế") là bước trong đó galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL được sắc ký cột trên than hoạt tính, và trong đó việc rửa giải từng bước được thực hiện với nhiều dung dịch nước dung môi hữu cơ, trong đó trong các lần rửa giải liên nhau, các dung dịch nước dung môi hữu cơ được sử dụng sao cho nồng độ dung môi hữu cơ trong các dung dịch nước dung môi hữu cơ cao hơn nồng độ dung môi hữu cơ trong dung dịch nước dung môi hữu cơ của lần rửa giải ngay trước đó.

Không có giới hạn cụ thể về galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL, miễn là chất này là galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL. Ví dụ về các hợp chất galacto-oligosacarit này bao gồm galacto-oligosacarit được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng trao đổi nhờ β -galactosidaza.

Cụ thể, để sản xuất galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL bằng cách sử dụng phản ứng trao đổi nhờ β -galactosidaza, lactoza có thể được hoạt hóa bằng β -galactosidaza, hoặc bằng các vi sinh vật sản sinh β -galactosidaza. Tốt hơn, nếu lactoza có thể được hoạt hóa bằng hỗn hợp của β -galactosidaza và vi sinh vật sử dụng đường để làm tăng tỷ lệ trisacarit trong galacto-oligosacarit.

Ví dụ về các vi sinh vật sản sinh β -galactosidaza bao gồm các vi sinh vật thuộc giống *Kluyveromyces* như *Kluyveromyces lactis*, và các vi sinh vật thuộc giống *Sporobolomyces* như *Sporobolomyces singularis*. Các ví dụ khác bao gồm *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*,

Bifidobacterium longum, và *Bifidobacterium adolescentis*. Các vi sinh vật được ưu tiên là vi sinh vật thuộc giống *Sporobolomyces*, được ưu tiên hơn nữa là *Sporobolomyces singularis*, đặc biệt được ưu tiên là *Sporobolomyces singularis* ISK-##2B6 như đã được thông báo trước đây bởi tác giả của đơn sáng chế này. Chủng *Sporobolomyces singularis* ISK-##2B6 đã được lưu trữ bởi tác giả sáng chế với mã số là FERM P-18817 tại Viện khoa học và công nghệ công nghiệp tiên tiến quốc gia, Trung tâm lưu trữ vi sinh vật sáng chế quốc tế (Tsukuba Center, Chuou Dairoku, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, 305-8566) từ ngày 10 tháng 4 năm 2002 (Lưu ý, từ ngày 01 tháng 4 năm 2013, Trung tâm lưu trữ vi sinh vật sáng chế quốc tế được đổi tên thành Trung tâm lưu trữ vi sinh vật sáng chế quốc tế, Viện công nghệ và đánh giá quốc gia, và chuyển đến địa chỉ 120, 5-8, 2-chome, Kazusa-Kamatari, Kisarazu, Chiba, 292-0818.) Tốt hơn, nếu chủng *Sporobolomyces singularis* JCM5356, chủng gốc của *Sporobolomyces singularis* ISK-##2B6, cũng có thể được sử dụng làm *Sporobolomyces singularis*. Chủng này có sẵn miễn phí từ công ty Riken BRC (3-1-1, Koyadai, Tsukuba, Ibaraki, Japan, 305-0074). Các vi sinh vật này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với hai hoặc nhiều loại vi sinh vật.

Ví dụ về các vi sinh vật sử dụng đường bao gồm *Saccharomyces cerevisiae* và *Saccharomyces unisporus*, nấm men bánh mì thông thường có bán trên thị trường. Các vi sinh vật này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với hai hoặc nhiều loại vi sinh vật. Không có giới hạn cụ thể về các đường được sử dụng bởi các vi sinh vật sử dụng đường. Tuy nhiên, tốt hơn nếu vi sinh vật này là vi sinh vật sử dụng glucoza để làm tăng tỷ lệ trisacarit trong galacto-oligosacarit.

Không có giới hạn về điều kiện cụ thể để sản xuất galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL bằng cách sử dụng các vi sinh vật nêu trên đây. Ví dụ, vi sinh vật sản sinh β -galactosidaza, và tùy ý, vi sinh vật sử dụng đường được cho vào dung dịch chứa lactoza trong nước đã đun nóng (ở nhiệt độ khoảng 40°C), và hỗn hợp này được nuôi cấy trong khoảng 1 ngày trong khi khuấy. Không có giới hạn cụ thể về lượng vi sinh vật sản sinh β -galactosidaza được thêm vào. Ví dụ, vi sinh vật này có thể được thêm vào để làm cho hoạt tính của β -galactosidaza nằm trong khoảng từ 100 đến 600 U/kg lactoza. Cũng không có giới hạn cụ thể về lượng vi sinh vật sử dụng đường được thêm vào. Ví dụ, vi sinh vật này có thể được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ

0,0001 đến 10% khối lượng (từ 1×10^7 đến 1×10^{12} đơn vị tạo khuẩn lạc (cfu)) tính theo bột vi sinh vật khô/kg lactoza. Hoạt tính của β -galactosidaza được xác định theo cách được mô tả trong các ví dụ sản xuất dưới đây. Phản ứng tạo ra galacto-oligosacarit có thể được làm ngừng bằng cách, ví dụ, đun nóng hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ khoảng 85°C , và duy trì nhiệt độ này trong khoảng 10 phút. Tốt hơn, nếu các tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm hoặc lọc sau khi phản ứng.

Phương pháp sắc ký cột trên than hoạt tính có thể được thực hiện bằng cách nạp galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL vào cột đã được nạp than hoạt tính, và tiến hành rửa giải từng bước bằng cách sử dụng dung dịch nước dung môi hữu cơ.

Không có giới hạn cụ thể về loại than hoạt tính được nạp vào cột và than hoạt tính có thể ở dạng, ví dụ, bột hoặc hạt hoặc ở dạng được tán nhỏ. Cũng không có giới hạn cụ thể về phương pháp nạp than hoạt tính vào cột. Ví dụ, than hoạt tính có thể được cho vào nước và nạp vào cột ở dạng huyền phù đặc và được để yên trong cột này. Không có giới hạn cụ thể về lượng than hoạt tính được nạp vào cột, ví dụ, lượng này có thể được nạp đến 1/3 đến 1/4 thể tích cột. Không có giới hạn cụ thể về vật liệu làm cột, ví dụ, vật liệu này có thể là thủy tinh hoặc chất dẻo. Không có giới hạn cụ thể về đường kính và chiều cao của cột và cột này có thể có đường kính, ví dụ, nằm trong khoảng từ 2 đến 15cm, và chiều cao nằm trong khoảng, ví dụ, từ 30 đến 100cm.

Việc rửa giải từng bước bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ được thực hiện sao cho trong các lần rửa giải liên nhau, nồng độ dung môi hữu cơ trong dung dịch nước dung môi hữu cơ cao hơn nồng độ dung môi hữu cơ trong dung dịch nước dung môi hữu cơ của lần rửa giải ngay trước đó. Cụ thể, quá trình rửa giải bắt đầu với việc rửa cột than hoạt tính bằng nước. Sau đó, cho dung dịch nước dung môi hữu cơ đi qua cột này, tiếp đó cho dung dịch nước dung môi hữu cơ khác có nồng độ dung môi hữu cơ cao hơn nồng độ dung môi hữu cơ của lần rửa giải trước đó đi qua cột này. Thuật ngữ "rửa giải từng bước" để chỉ quá trình trong đó dung dịch nước dung môi hữu cơ có nồng độ khác nhau được cho đi qua cột than hoạt tính ít nhất hai lần. Tốt hơn, nếu dung dịch nước dung môi hữu cơ được cho đi qua hai lần. Không có giới hạn cụ thể về lượng dung dịch nước dung môi hữu cơ được dùng để rửa giải (cho đi qua) một lần, ví dụ, lượng nước gấp từ 2 đến 6 lần thể tích của than hoạt tính được sử dụng. Cũng không có giới hạn cụ thể về tốc độ rửa giải từng bước, ví dụ, tốc độ sao cho lượng dung dịch chất

rửa giải di chuyển với tốc độ từ 2 đến 6 cm/phút.

Dung môi hữu cơ được sử dụng trong bước (A) là metanol. Tốt hơn, nếu nồng độ dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 5 đến 40% khối lượng (sau đây được gọi đơn giản là "%"), đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 30%.

Trước tiên, việc rửa giải từng bước bằng cách sử dụng dung dịch nước dung môi hữu cơ được thực hiện với dung dịch nước dung môi hữu cơ có nồng độ dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 10 đến 20%, và sau đó thực hiện với dung dịch nước dung môi hữu cơ có nồng độ dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 15 đến 30%, tốt hơn nếu trước tiên thực hiện với dung dịch nước dung môi hữu cơ có nồng độ dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 15 đến 20%, và sau đó thực hiện với dung dịch nước dung môi hữu cơ có nồng độ dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 20 đến 30%.

Trong khi rửa giải, quá trình cô và pha loãng như bằng cách lọc, ly tâm hoặc giảm áp suất có thể được thực hiện. Phân đoạn cuối được rửa giải trong bước (A) có thể được sử dụng ngay hoặc tốt hơn là được sử dụng sau khi làm khô thành phần chất rắn bằng cách cô.

Trisacarit có mặt trong galacto-oligosacarit được rửa giải đặc hiệu sau bước (A) đã mô tả trên đây. Tỷ lệ trisacarit trong galacto-oligosacarit có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong các ví dụ sản xuất dưới đây.

Bước (B) của phương pháp điều chế theo sáng chế là bước cho thêm dung môi hữu cơ vào phân đoạn cuối được rửa giải trong bước (A), và kết tinh 4'-GL.

Không có giới hạn cụ thể về dung môi hữu cơ được sử dụng trong bước (B), và tốt hơn nếu là dung môi hữu cơ trộn lẫn được với nước. Tốt hơn, nếu dung môi hữu cơ trộn lẫn được với nước là ít nhất một dung môi được chọn từ metanol, axeton và etanol, và đặc biệt tốt hơn nếu là metanol. Không có giới hạn cụ thể về lượng dung môi hữu cơ được thêm vào, ví dụ, lượng nước gấp từ 10 đến 30 lần (theo thể tích) trong phân đoạn được dùng để kết tinh. Không có giới hạn cụ thể về nồng độ dung môi hữu cơ cần được thêm vào, và tốt hơn nếu nồng độ này bằng khoảng 100%.

Việc kết tinh 4'-GL được thực hiện, ví dụ, bằng cách cho thêm dung môi hữu cơ vào phân đoạn cuối được rửa giải trong bước (A), và để yên dung dịch này. Để kết tinh, sóng siêu âm có thể được sử dụng làm ví dụ để dễ kết tủa các tinh thể trước khi để yên

dung dịch này.

Trong bước (B) đã mô tả trên đây, chỉ trisacarit kết tinh và các đường khác (kể cả monosacarit, disacarit và tetrasacarit) không kết tinh. Các chất đồng phân như 4'-GL và $\text{Gal}\beta 1\text{-4Gal}\beta 1\text{-3Glc}$ có mặt trong đường trisacarit trong galacto-oligosacarit, và 4'-GL được kết tinh với tỷ lệ cao hơn so với các chất đồng phân trisacarit khác trong bước (B). Điều này làm tăng tỷ lệ (độ tinh khiết) của 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit. Tỷ lệ 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit có thể được xác định bằng phương pháp được mô tả trong các ví dụ dưới đây.

Sau bước (B), chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL kết tinh có độ tinh khiết cao có thể được xử lý thêm, bao gồm rửa bằng chính dung môi hữu cơ đã dùng để kết tinh, và làm khô.

Chế phẩm thu được bằng cách sử dụng phương pháp điều chế theo sáng chế là chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL với độ tinh khiết cao, cụ thể là bằng 90% hoặc cao hơn, tốt hơn là bằng 94% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là bằng 95% hoặc cao hơn, tính theo hàm lượng 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit có mặt trong chế phẩm này. Chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao thu được bằng cách sử dụng phương pháp điều chế theo sáng chế có hàm lượng chất rắn bằng 95% hoặc cao hơn, và các đường không phải chất đồng phân trisacarit (bao gồm monosacarit, disacarit và tetrasacarit) không kết tinh trong bước kết tinh. Do các chất đồng phân trisacarit này chiếm toàn bộ hàm lượng chất rắn của chế phẩm, hàm lượng 4'-GL trong chế phẩm có thể được xác định theo kết quả của "hàm lượng chất rắn của chế phẩm và tỷ lệ 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit". Chế phẩm này chứa hợp chất 4'-GL với lượng bằng 88% hoặc cao hơn, và tốt hơn là bằng 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là bằng 92% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là bằng 95% hoặc cao hơn.

Chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao thu được theo cách đã mô tả trên đây có thể được sử dụng, ví dụ, làm chất chuẩn tham chiếu cho nhiều phép phân tích khác nhau, hoặc làm nguyên liệu của các sản phẩm như thực phẩm và đồ uống, thuốc.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây dựa vào các ví dụ và ví dụ sản xuất. Tuy nhiên, các ví dụ này không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ sản xuất 1

Tạo ra dung dịch đường

Hòa tan 2kg lactoza trong 2,7kg nước nóng ở nhiệt độ 80°C. Làm nguội hỗn hợp này đến nhiệt độ 40°C và duy trì hỗn hợp ở nhiệt độ này trong bể điều nhiệt. Cho thêm 157g dung dịch tế bào của chủng *Sporobolomyces singularis* YIT10047 (ISK-##2B6; FERM P-18817; hoạt tính β -galactosidaza: 4000 U/kg), và 63g *Saccharomyces cerevisiae* (sản phẩm của công ty Oriental Yeast Co., Ltd.: nấm men thông thường; $6,3 \times 10^{11}$ cfu) vào hỗn hợp này. Hỗn hợp các chất này được cho phản ứng với nhau trong 22 giờ ở nhiệt độ được duy trì bằng 40°C trong khi khuấy. Phản ứng được làm ngừng sau khi tăng nhiệt độ đến 85°C và duy trì ở nhiệt độ này trong 10 phút. Sau phản ứng, hỗn hợp phản ứng được ly tâm ($12000 \times g$, 30 phút), và các tế bào dùng cho phản ứng được loại bỏ để thu được dung dịch đường. Dung dịch đường (sản phẩm) được phân tích bằng phương pháp sắc ký HPLC loại trừ theo kích thước trong các điều kiện dưới đây và tiến hành phân tích thành phần dựa trên chiều dài mạch đường bằng cách sử dụng tỷ lệ % diện tích. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Xác định hoạt tính của β -galactosidaza trong dung dịch tế bào của chủng *Sporobolomyces singularis*

Hoạt tính của β -galactosidaza (U) của dung dịch tế bào chứa chủng *Sporobolomyces singularis* YIT10047 (ISK-##2B6; FERM P-18817) được xác định bằng cách sử dụng phương pháp giống như phương pháp được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2012/141244.

Các điều kiện HPLC

Thiết bị: Shimadzu Prominence UFLC

Cột: SUGAR KS-802 (8,0 ϕ $\times$ 300mm; Showa Denko)

Nhiệt độ cột: 80°C

Lượng bơm: 10 μ l

Pha động: nước tinh khiết

Thời gian phân tích: 30 phút

Tốc độ dòng: 0,5ml/phút

Phát hiện: chỉ số khúc xạ vi sai

Bảng 1

	Sản phẩm	Oligomate 55N ^{*1}
Tetrasacarit và tetrasacarit cao hơn	7,0%	7,1%
Trisacarit	65,6%	34,4%
Disacarit	26,7%	27,5%
Monosacarit	0,7%	31%
*1: Galacto-oligosacarit, sản phẩm của công ty Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd, được sản xuất từ lactoza được hoạt hóa bằng dung dịch tế bào của <i>Sporobolomyces singularis</i> và β -galactosidaza thu được từ <i>Kluyveromyces lactis</i> .		

Từ các kết quả này, đã phát hiện được rằng hàm lượng trisacarit tăng lên khi chủng *Sporobolomyces singularis* và *Saccharomyces cerevisiae* sử dụng đường được sử dụng kết hợp, so với sản phẩm galacto-oligosacarit có bán trên thị trường thu được từ phản ứng của *Sporobolomyces singularis* với β -galactosidaza thu được từ *Kluyveromyces lactis*.

Ví dụ 1

Đánh giá các điều kiện rửa giải (1)

Cô dung dịch đường thu được trong ví dụ sản xuất 1 bằng thiết bị làm bay hơi để thu được dung dịch đường cô đặc có độ Brix bằng 72,3. Pha loãng 1,3g dung dịch đường cô đặc này bằng nước để tạo ra 25ml dung dịch đường loãng. Sau đó, nạp dung dịch đường loãng này vào cột sắc ký hở (đường kính cột: 2cm, chiều cao: 30cm) đã nạp 25ml than hoạt tính (than hoạt tính dùng để sắc ký, sản phẩm của công ty Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) bằng cách sử dụng phương pháp thông thường. Rửa cột đã nạp dung dịch đường loãng bằng nước tinh khiết, và rửa giải đường này bằng cách rửa giải một lần hoặc rửa giải từng bước như được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây. Dung môi được sử dụng với lượng 100ml trong mỗi lần rửa giải. Thời gian của mỗi lần

rửa và rửa giải là khoảng 10 phút. Việc rửa và rửa giải được thực hiện với tốc độ sao cho mức chất lỏng của nước tinh khiết và dung dịch rửa giải giảm với tốc độ 5 cm/phút.

Dung dịch rửa giải thu được sau khi rửa giải lần thứ nhất đối với trường hợp rửa giải một lần, và dung dịch rửa giải thu được sau khi rửa giải lần thứ hai đối với trường hợp rửa giải từng bước trong bảng 2 được thu gom, và cô bằng thiết bị làm bay hơi dưới áp suất giảm. Dung dịch rửa giải tạo thành được điều chỉnh đến nồng độ thích hợp và cho đi qua bộ lọc cỡ 0,45 μ m. Phân tích phần nước lọc bằng phương pháp HPLC loại trừ theo kích thước trong cùng các điều kiện được sử dụng trong ví dụ sản xuất 1, và tiến hành phân tích thành phần dựa trên chiều dài mạch đường đối với mỗi dung dịch rửa giải bằng cách sử dụng tỷ lệ % diện tích. Sau đó, xác định tỷ lệ trisacarit trong tất cả các đường từ kết quả phân tích thành phần dựa trên chiều dài mạch đường. Các kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

	Rửa	Rửa giải lần thứ nhất	Rửa giải lần thứ hai	Tỷ lệ trisacarit trong tất cả các đường
Rửa giải một lần	Nước tinh khiết	Dung dịch metanol 20%	không	70,59%
Rửa giải từng bước 1	Nước tinh khiết	Dung dịch metanol 15%	Dung dịch metanol 20%	95,72%

Như có thể quan sát được từ các kết quả này, việc rửa giải từng bước rửa giải đặc hiệu trisacarit.

Ví dụ 2

Đánh giá các điều kiện rửa giải (2)

Rửa giải đường theo cách giống như trong quá trình rửa giải từng bước 1 của ví dụ 1, chỉ khác là nồng độ dung dịch nước metanol thay đổi như được thể hiện trong bảng 3. Tỷ lệ trisacarit trong tất cả các đường cũng được xác định theo cách giống như cách trong ví dụ 1. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

	Rửa	Rửa giải lần thứ nhất	Rửa giải lần thứ hai	Tỷ lệ trisacarit trong tất cả các đường
Rửa giải từng bước 2	Nước tinh khiết	Dung dịch metanol 5%	Dung dịch metanol 10%	83,07%
Rửa giải từng bước 3	Nước tinh khiết	Dung dịch metanol 10%	Dung dịch metanol 15%	94,06%
Rửa giải từng bước 1	Nước tinh khiết	Dung dịch metanol 15%	Dung dịch metanol 20%	95,72%
Rửa giải từng bước 4	Nước tinh khiết	Dung dịch metanol 20%	Dung dịch metanol 30%	95,47%
Rửa giải từng bước 5	Nước tinh khiết	Dung dịch metanol 25%	Dung dịch metanol 40%	86,24%

Từ các kết quả này, đã phát hiện được rằng tỷ lệ trisacarit trong dung dịch rửa giải sau khi rửa giải lần thứ hai bằng 80% hoặc cao hơn khi dung dịch nước metanol dùng để rửa giải lần thứ nhất có nồng độ metanol nằm trong khoảng từ 5 đến 25%, và dung dịch nước metanol dùng để rửa giải lần thứ hai có nồng độ metanol nằm trong khoảng từ 10 đến 40%. Cụ thể, đã phát hiện được rằng tỷ lệ trisacarit trong dung dịch rửa giải sau khi rửa giải lần thứ hai bằng 90% hoặc cao hơn khi dung dịch nước metanol dùng để rửa giải lần thứ nhất có nồng độ metanol nằm trong khoảng từ 10 đến 20%, và dung dịch nước metanol dùng để rửa giải lần thứ hai có nồng độ metanol nằm trong khoảng từ 15 đến 30%. Cũng đã phát hiện được rằng tỷ lệ trisacarit trong dung dịch rửa giải sau khi rửa giải lần thứ hai cao hơn nữa, bằng 95% hoặc cao hơn, khi dung dịch nước metanol dùng để rửa giải lần thứ nhất có nồng độ metanol nằm trong khoảng từ 15 đến 20%, và dung dịch nước metanol dùng để rửa giải lần thứ hai có nồng độ metanol nằm trong khoảng từ 20 đến 30%.

Ví dụ 3

Đánh giá các điều kiện kết tinh (1)

Cô dung dịch đường được tạo ra theo cách giống như trong ví dụ sản xuất 1 bằng thiết bị làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được dung dịch đường cô có độ Brix bằng 72,3. Pha loãng 22,1g dung dịch đường cô bằng nước tinh khiết để thu được 400ml dung dịch đường loãng. Sau đó, nạp dung dịch đường loãng này vào cột sắc ký hở (đường kính cột: 6cm, chiều cao: 40cm) đã được nạp 400ml than hoạt tính (than hoạt tính dùng để sắc ký, sản phẩm của công ty Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) bằng cách sử dụng phương pháp bình thường. Rửa cột đã nạp dung dịch đường loãng bằng nước tinh khiết, và rửa giải đường theo cách tương tự như trong bước rửa giải từng bước 1 của ví dụ 1, bằng cách sử dụng lần lượt dung dịch nước metanol 15%, và dung dịch nước metanol 20%. Dung môi được sử dụng với lượng 1600ml trong mỗi bước rửa giải. Cô dung dịch rửa giải thu được sau khi rửa giải bằng thiết bị làm bay hơi dưới áp suất giảm và làm khô trong bình làm khô dưới áp suất giảm để thu được 2,3g chất cô (hàm lượng chất rắn bằng 2,3g).

Hòa tan chất cô trong 2,5ml nước tinh khiết. Sau đó, cho 50ml metanol vào dung dịch theo từng phần nhỏ trong khi khuấy hỗn hợp cho đến khi nồng độ metanol cuối đạt 95,2% (theo thể tích). Sau đó, cho hỗn hợp vào sóng siêu âm để thúc đẩy sự kết tinh và để yên hỗn hợp qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Các tinh thể tạo thành được lọc bằng phễu có trang bị bộ lọc và rửa các tinh thể bằng metanol, và làm khô trong bình làm khô. Để khẳng định sự thay đổi nồng độ của 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit sau khi kết tinh, các chất đồng phân trisacarit chứa 4'-GL được định lượng bằng cách sử dụng phương pháp dưới đây, và tỷ lệ 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit được xác định. Tỷ lệ các chất đồng phân trisacarit không phải 4'-GL cũng được xác định. Tỷ lệ 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit của chất cô và tỷ lệ các chất đồng phân trisacarit không phải 4'-GL cũng được xác định trước khi kết tinh theo cách tương tự. Các kết quả được thể hiện trong bảng 4.

Phương pháp định lượng 4'-GL

Cho khoảng 5mg mẫu vào ống thử nghiệm có ren và cô bằng thiết bị làm bay hơi dưới áp suất giảm. Sau khi cô, làm khô mẫu trong bình làm khô dưới áp suất giảm. Sau đó, cho thêm 200μl dung dịch axit axetic chứa khoảng 50 đương lượng hợp chất 2-aminopyridin vào mẫu rắn, và hỗn hợp này được cho phản ứng nhiệt ở nhiệt độ 90°C trong 1 giờ. Sau đó, cho thêm 250μl chất phản ứng boran-dimetylamin điều chế được

với nồng độ 195 mg/ml (axit axetic) vào hỗn hợp phản ứng và đường được khử ở nhiệt độ 80°C trong 50 phút để thu được dẫn xuất pyridylamin hóa. Dẫn xuất pyridylamin hóa được chuyển vào ống Falcon có dung tích 50ml và được pha loãng đến khoảng 25ml bằng nước tinh khiết. Sau đó, cho thêm dung dịch nước natri hydroxit 1M vào dung dịch loãng này để làm cho độ pH có tính axit yếu trở thành độ pH trung tính. Tiếp đó, thẩm tách dung dịch này bằng cách sử dụng thiết bị MicroAcilyzer S1 (sản phẩm của Asahi Kasei). Quá trình thẩm tách được thực hiện với màng thẩm tách AC-120-10 (sản phẩm của Astom), và dung dịch nước natri nitrat 0,5% được dùng làm dung dịch điện cực. Điểm cuối được đặt ở 0A. Cô chất lỏng xử lý bằng thiết bị làm bay hơi dưới áp suất giảm và làm khô bằng bình làm khô dưới áp suất giảm. Hòa tan mẫu trong nước tinh khiết, và phần nước lọc qua bộ lọc cỡ 0,45µm được phân tích bằng phương pháp HPLC. Do quan sát được phản cặn là chất phản ứng pyridylamin hóa, tỷ lệ 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit được xác định từ tỷ lệ % diện tích đỉnh phát hiện được sau khi bắt đầu phân tích 22 phút. Tỷ lệ các chất đồng phân trisacarit khác không phải 4'-GL cũng được xác định. Đỉnh của 4'-GL xuất hiện sau khi bắt đầu phân tích 26,8 phút trong khi đỉnh của Galβ1-4Galβ1-3Glc xuất hiện sau khi bắt đầu phân tích 41,2 phút.

Các điều kiện HPLC

Thiết bị: Shimadzu Prominence UFLC

Cột: PEGASIL ODS SP300 (φ 4,6mm × 250mm; sản phẩm của công ty Senshu Scientific Co., Ltd.)

Nhiệt độ cột: 25°C

Lượng bơm: 10µl

Pha động: dung dịch đệm natri xitrat 0,2M (độ pH = 5,7)

Thời gian phân tích: 70 phút

Tốc độ dòng: 0,5ml/phút

Phát hiện: UV (310nm)

Bảng 4

Các chất đồng phân của trisacarit	Trước khi kết tinh	Sau khi kết tinh
Gal β 1-4Gal β 1-4Glc (4'-GL)	90,0%	95,8%
Gal β 1-4Gal β 1-3Glc	6,8%	1,7%
Chất khác	3,2%	2,5%

Từ các kết quả này, đã phát hiện được rằng độ tinh khiết của 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit có thể được cải thiện sau khi kết tinh bằng metanol. Các tinh thể của sản phẩm có hàm lượng chất rắn ít nhất 95% và các đường không phải chất đồng phân trisacarit không kết tinh trong bước kết tinh. Do các chất đồng phân trisacarit chiếm tất cả hàm lượng chất rắn của tinh thể, tỷ lệ 4'-GL trong chế phẩm bằng 91% hoặc cao hơn ($= 95\% \times 95,8\%$).

Ví dụ 4

Đánh giá các điều kiện kết tinh (2)

Cô dung dịch đường được tạo ra theo cách giống như trong ví dụ sản xuất 1 bằng thiết bị làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được dung dịch đường cô có độ Brix bằng 72,3. Pha loãng 120g dung dịch đường cô bằng nước tinh khiết để thu được 2000ml dung dịch đường loãng. Sau đó, nạp dung dịch đường loãng này vào cột sắc ký hở (đường kính cột: 9cm, chiều cao: 80cm) đã được nạp 2000ml than hoạt tính (than hoạt tính dùng để sắc ký, sản phẩm của công ty Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) bằng cách sử dụng phương pháp thông thường. Rửa cột đã nạp dung dịch đường loãng bằng nước tinh khiết và rửa giải đường này theo cách giống như trong bước rửa giải từng bước 1 của ví dụ 1, bằng cách sử dụng lần lượt dung dịch nước metanol 15%, và dung dịch nước metanol 20%. Dung môi được sử dụng với lượng 8000ml trong mỗi lần rửa giải. Cô dung dịch rửa giải thu được sau khi rửa giải bằng thiết bị làm bay hơi dưới áp suất giảm và làm khô trong bình làm khô dưới áp suất giảm để thu được 12,5g chất cô (hàm lượng chất rắn bằng 12,5g).

Hòa tan chất cô trong 12,5ml nước tinh khiết và chia thành các phần 2,5ml. Sau đó, cho thêm từng phần nhỏ 50ml dung môi là axeton hoặc etanol trộn lẫn được với nước vào dung dịch chất cô cho đến khi nồng độ cuối đạt 95,2% (theo thể tích). Sau

đó, cho hỗn hợp này vào sóng siêu âm để thúc đẩy sự tạo ra tinh thể và để yên hỗn hợp này qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Các tinh thể tạo thành được lọc bằng phễu có trang bị bộ lọc, và rửa các tinh thể bằng chính dung môi hữu cơ đã dùng để kết tinh, và làm khô trong bình làm khô. Để khẳng định sự thay đổi nồng độ 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit sau khi kết tinh, các chất đồng phân trisacarit chứa hợp chất 4'-GL được định lượng theo cách giống như trong ví dụ 3, và tỷ lệ 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit được xác định. Các kết quả được thể hiện trong bảng 5. Bảng 5 cũng thể hiện tỷ lệ 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit sau khi kết tinh bằng metanol được thực hiện trong ví dụ 3.

Bảng 5

Dung môi kết tinh	Tỷ lệ 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit trước khi kết tinh	Tỷ lệ 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit sau khi kết tinh
Axeton	90,0%	94,4%
Etanol	90,0%	94,4%
Metanol	90,0%	95,8%

Từ các kết quả này, đã phát hiện được rằng độ tinh khiết của 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit có thể được cải thiện sau khi kết tinh bằng axeton hoặc etanol, như với trường hợp của metanol. Tuy nhiên, tỷ lệ 4'-GL trong các chất đồng phân trisacarit sau khi kết tinh là cao nhất khi metanol được sử dụng. Đối với trường hợp sử dụng metanol, các tinh thể sản phẩm có hàm lượng chất rắn ít nhất là 95%, và các đường không phải chất đồng phân trisacarit không kết tinh trong bước kết tinh bằng axeton hoặc metanol. Do các chất đồng phân trisacarit chiếm toàn bộ thành phần chất rắn của tinh thể, tỷ lệ 4'-GL trong chế phẩm bằng 89,6% hoặc cao hơn ($= 95\% \times 94,4\%$).

Ví dụ 5- đánh giá với các chủng khác

Tạo ra dung dịch đường theo cách giống như trong ví dụ sản xuất 1, tiến hành pha loãng từng bước trong cùng điều kiện dùng để rửa giải từng bước 1 của ví dụ 1, và 4'-GL được kết tinh trong cùng điều kiện được sử dụng trong ví dụ 3, chỉ khác là dung dịch tế bào của chủng *Sporobolomyces singularis* YIT10047 (ISK-##2B6) được thay

thể bằng dung dịch tế bào của chủng *Sporobolomyces singularis* JCM5356. Dung dịch tế bào này được sử dụng với lượng để tạo ra cùng lượng hoạt tính của β -galactosidaza như được tạo ra với lượng dung dịch *Sporobolomyces singularis* YIT10047 được sử dụng trong ví dụ sản xuất 1. Kết quả là tỷ lệ 4'-GL trong trisacarit trong các tinh thể tạo thành bằng 95% hoặc cao hơn. Các tinh thể này có hàm lượng chất rắn ít nhất bằng 95% và các đường không phải chất đồng phân trisacarit không kết tinh trong bước kết tinh. Do các chất đồng phân trisacarit chiếm toàn bộ thành phần chất rắn của tinh thể, tỷ lệ 4'-GL trong chế phẩm bằng 90,3% hoặc cao hơn ($= 95\% \times 95\%$).

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Phương pháp điều chế chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao của sáng chế tạo ra cách thuận tiện để thu được chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao. Chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao thu được bằng cách sử dụng phương pháp điều chế này có thể dùng làm chất chuẩn tham chiếu cho nhiều phân tích khác nhau hoặc dùng làm nguyên liệu của các sản phẩm như thực phẩm và đồ uống, thuốc.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế chế phẩm chứa hợp chất 4'-galactosyl-lactoza

(4'-galactosyl-lactose: 4'-GL) có độ tinh khiết cao, phương pháp này bao gồm các bước:

(A) tiến hành sắc ký cột trên than hoạt tính đối với galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL, và rửa giải từng bước bằng nhiều dung dịch nước dung môi hữu cơ, trong đó trong các lần rửa giải liên nhau, các dung dịch nước dung môi hữu cơ được sử dụng sao cho nồng độ dung môi hữu cơ trong dung dịch nước dung môi hữu cơ cao hơn nồng độ dung môi hữu cơ trong dung dịch nước dung môi hữu cơ của lần rửa giải ngay trước đó, trong đó dung môi hữu cơ được sử dụng trong bước (A) là metanol và quá trình rửa giải từng bước được thực hiện lần lượt với dung dịch nước dung môi hữu cơ chứa dung môi hữu cơ với nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 20% khối lượng và dung dịch nước dung môi hữu cơ chứa dung môi hữu cơ với nồng độ nằm trong khoảng từ 15 đến 30% khối lượng; và

(B) cho thêm dung môi hữu cơ vào phân đoạn cuối được rửa giải trong bước (A), và kết tinh 4'-GL.

2. Phương pháp điều chế chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao theo điểm 1, trong đó quá trình rửa giải từng bước trong bước (A) được thực hiện lần lượt với dung dịch nước dung môi hữu cơ chứa dung môi hữu cơ với nồng độ nằm trong khoảng từ 15 đến 20% khối lượng, và dung dịch nước dung môi hữu cơ chứa dung môi hữu cơ với nồng độ nằm trong khoảng từ 20 đến 30% khối lượng.

3. Phương pháp điều chế chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dung môi hữu cơ được sử dụng trong bước (B) là ít nhất một dung môi được chọn từ metanol, axeton và etanol.

4. Phương pháp điều chế chế phẩm chứa hợp chất 4'-GL có độ tinh khiết cao theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó galacto-oligosacarit chứa hợp chất 4'-GL được sử dụng trong bước (A) là chất được tạo ra bằng cách sử dụng chủng *Sporobolomyces singularis* và *Saccharomyces cerevisiae*.