



(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)



1-0030998

(51)⁸ C12P 7/02

(13) B

(21) 1-2017-04507

(22) 16/03/2016

(86) PCT/CN2016/076526 16/03/2016

(87) WO 2016/165520 20/10/2016

(30) 201510184621.4 17/04/2015 CN

(45) 25/02/2022 407

(43) 25/01/2018 358A

(73) CHENGDU BOHAODA BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD. (CN)

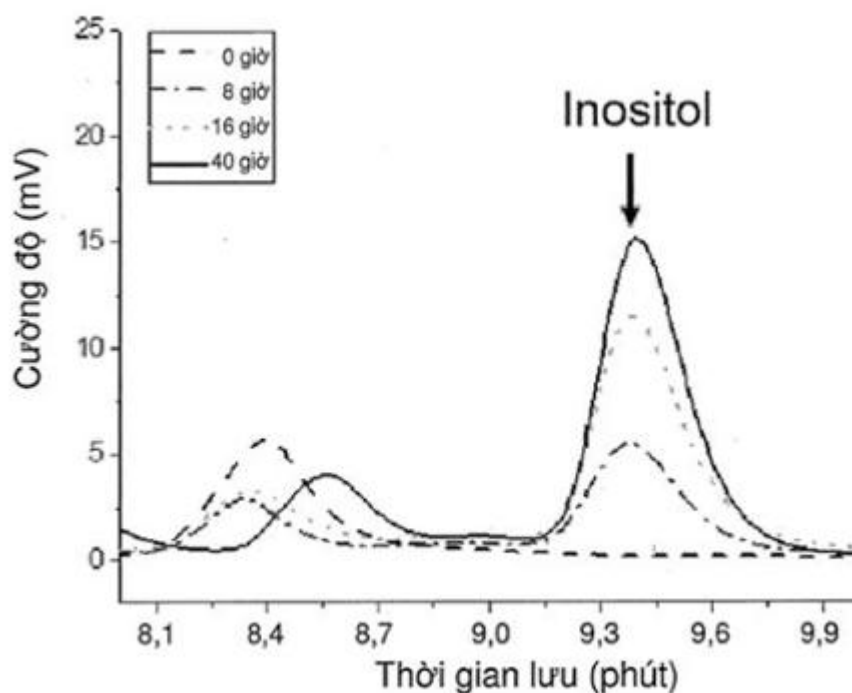
Industrial area of Southwest Airport Economic Development Zone, Shuangliu
District, Chengdu, Sichuan 610200, P.R.China

(72) ZHANG, Yi-Heng Percival (US); YOU, Chun (CN).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ INOSITOL

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế inositol. Bằng cách sử dụng tinh bột và xenluloza hoặc dẫn xuất của chúng làm cơ chất, cho thêm enzym có khả năng thúc đẩy sự thủy phân của tinh bột hoặc xenluloza và bằng cách sử dụng enzym của sản phẩm phụ glucoza, hệ phản ứng đa enzym được tạo ra, và các cơ chất được chuyển hóa thành inositol. Tỷ lệ chuyển hóa nguyên liệu và hiệu suất của inositol được cải thiện.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế inositol, cụ thể là đề cập đến phương pháp chuyển hóa tinh bột hoặc xenluloza và dẫn xuất của chúng thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*, sáng chế này thuộc về lĩnh vực sản xuất inositol được xúc tác bằng enzym.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Inositol, còn được gọi là xyclohexanhexol, là một thành viên của họ vitamin B tan trong nước. Inositol là chất thiết yếu cho sự phát triển của người, động vật và vi sinh vật và được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực y học, thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và các ngành khác. Nhu cầu về chất này trên toàn cầu hiện nay là khoảng 5000 tấn/năm. Do giá inositol hiện nay cao, triển vọng thị trường inositol vẫn chưa được phát triển đầy đủ. Ví dụ, sản lượng thức ăn chăn nuôi toàn cầu năm 2013 là 960 triệu tấn, chỉ có từ 0,2 đến 0,5% inositol được thêm vào, lượng inositol cần thiết cho ngành thức ăn chăn nuôi cần đạt mức từ 190 đến 480 triệu tấn/năm. Trong trường hợp này, sản lượng trong nước hiện nay và thậm chí sản lượng trên thế giới vẫn không đáp ứng đủ yêu cầu.

Hiện nay, phương pháp sản xuất inositol truyền thống chủ yếu là bằng cách thủy phân bằng axit phytic (inositol hexaphosphat) trong điều kiện nhiệt độ và áp suất cao. Phương pháp này có yêu cầu nghiêm ngặt về thiết bị, đầu tư lớn một lần, và áp suất vận hành chỉ có thể được kiểm soát trong một khoảng nhất định, làm hạn chế tỷ lệ sử dụng nguyên liệu; quy trình tinh chế sản phẩm thô phức tạp, và có mức tổn hao sản phẩm cao, chi phí sản xuất tương đối cao. Ngoài ra, phương pháp này sẽ tạo ra một lượng lớn phosphat là chất gây ô nhiễm, gây ô nhiễm nghiêm trọng nguồn nước và môi trường. Trong những năm gần đây, để giảm mức tiêu thụ năng lượng và ô nhiễm môi trường, phương pháp thủy phân trong điều kiện áp suất khí quyển được phát triển. Hiện nay, các phương pháp sản xuất inositol là tổng hợp hóa học và lên men bằng enzym của vi khuẩn. Tuy nhiên, các phương pháp này có nhược điểm là chi phí cao và năng suất sản phẩm thấp.

Do đó, rất cần phát triển phương pháp mới để sản xuất inositol với chi phí thấp, gây ô nhiễm môi trường ở mức thấp và có năng suất cao.

Công bố đơn quốc tế số WO 2015/001312 A1 bộc lộ phương pháp điều chế inositol bằng phản ứng lên men.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết bởi sáng chế là đề xuất phương pháp chuyển hóa được xúc tác bằng enzym đối với inositol, nghĩa là phương pháp sản xuất inositol từ tinh bột hoặc xenluloza và dẫn xuất của chúng và glucoza bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*. Phương pháp này có các ưu điểm là năng suất inositol cao và tỷ lệ chuyển hóa cao, chi phí sản xuất thấp, không gây ô nhiễm môi trường, và nhiều ưu điểm khác.

Để giải quyết các vấn đề kỹ thuật nêu trên, sáng chế đề xuất giải pháp kỹ thuật được mô tả như sau.

Sáng chế đề xuất phương pháp thứ nhất để điều chế inositol bao gồm các bước sau:

(1) sử dụng tinh bột hoặc dẫn xuất tinh bột làm cơ chất, cho thêm α -glucan phosphorylaza (EC 2.4.1.1), phosphoglucomutaza (EC 5.4.2.2), inositol-3-phosphat synthaza (EC 5.5.1.4) và inositol monophosphataza (EC 3.1.3.25) để tạo ra hệ phản ứng đa enzym, và tiến hành phản ứng được xúc tác bằng enzym, trong đó phản ứng được xúc tác bằng enzym được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 100°C trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ; và (2) tách và tinh chế sản phẩm của phản ứng để thu được inositol.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp khác để điều chế inositol bao gồm các bước sau:

(1) sử dụng xenluloza hoặc dẫn xuất xenluloza làm cơ chất, cho thêm xenlulaza, xenlodextrin phosphorylaza (EC 2.4.1.49), xenlobioza phosphorylaza (EC 2.4.1.20), phosphoglucomutaza (EC 5.4.2.2), inositol 3-phosphat synthaza (EC 5.5.1.4) và inositol monophosphataza (EC 3.1.3.25) để tạo ra hệ phản ứng đa enzym để tiến hành phản ứng được xúc tác bằng enzym; và (2) tách và tinh chế sản phẩm thô của phản ứng để thu được inositol.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ sơ đồ thể hiện con đường chuyển hóa tinh bột thành inositol được

xúc tác bằng đa enzym *in vitro*. Trong đó: IA là isoamylaza; PA là pululanaza; α GP là α -glucan phosphorylaza; PGM là phosphoglucomutaza; IPS là inositol 3-phosphat synthaza; IMP là inositol monophosphataza; MP là maltoza phosphorylaza (có thể được thay thế bằng glucanotransferaza); PPGK là polyphosphat glucokinaza.

Fig.2 thể hiện kết quả phát hiện được bốn enzym quan trọng bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit có natri dodecyl sulfat (SDS-PAGE). Trong đó: làn 1 là α -glucan phosphorylaza; làn 2 là phosphoglucomutaza; làn 3 là inositol 3-phosphat synthaza; làn 4 là inositol monophosphataza.

Fig.3 thể hiện kết quả phân tích inositol bằng phương pháp sắc ký lỏng có áp suất cao (HPLC). Fig.3a thể hiện kết quả xác định inositol, glucoza, glucoza-1-phosphat và glucoza-6-phosphat bằng phương pháp HPLC; Fig.3b thể hiện nồng độ inositol thu được bằng phương pháp phân tích HPLC định lượng, được tính từ cường độ của đỉnh inositol.

Fig.4 thể hiện sản phẩm phát hiện được bằng phương pháp HPLC sau khi phản ứng được xúc tác bằng enzym, trong đó tinh bột hòa tan được dùng làm cơ chất. Hình mũi tên thể hiện đỉnh đặc trưng của inositol.

Fig.5 thể hiện sản phẩm phát hiện được bằng phương pháp HPLC sau khi phản ứng được xúc tác bằng enzym, trong đó maltodextrin được dùng làm cơ chất. Hình mũi tên thể hiện đỉnh đặc trưng của inositol.

Fig.6 là sơ đồ thể hiện con đường chuyển hóa xenluloza thành inositol được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*, trong đó: xenlulaza là xenlulaza; CDP là xenlodextrin phosphorylaza; CBP là xenlobioza phosphorylaza; PGM là phosphoglucomutaza; IPS là inositol 3-phosphat synthaza; IMP là inositol monophosphataza; PPGK là polyphosphat glucokinaza.

Fig.7 thể hiện kết quả phát hiện được hai enzym quan trọng trong quá trình chuyển hóa xenluloza thành inositol bằng phương pháp SDS-PAGE. Trong đó: làn 1 là xenlobioza phosphorylaza; làn 2 là xenlodextrin phosphorylaza.

Fig.8 thể hiện sản phẩm phát hiện được bằng phương pháp HPLC sau khi phản ứng được xúc tác bằng enzym, trong đó xenluloza vi tinh thể (Avicel) được dùng làm cơ chất. Hình mũi tên thể hiện đỉnh đặc trưng của inositol.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các thuật ngữ và định nghĩa được sử dụng trong bản mô tả

Trừ khi được định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về.

Thuật ngữ “phản ứng được xúc tác bằng enzym” để chỉ phản ứng hóa học được tiến hành nhờ tác dụng của chất xúc tác sinh học là enzym.

Thuật ngữ “polyme glucoza” để chỉ tinh bột hoặc xenluloza thu được bằng cách polyme hóa phân tử glucoza.

Thuật ngữ “oligome glucoza” để chỉ tinh bột được thủy phân một phần, tinh bột dextrin, malto oligosacarit, maltoza, xenlodextrin hoặc xenlobioza, v.v..

Sáng chế đề xuất phương pháp thứ nhất để điều chế inositol bao gồm các bước sau:

(1) sử dụng tinh bột hoặc dẫn xuất tinh bột làm cơ chất, cho thêm α -glucan phosphorylaza (EC 2.4.1.1), phosphoglucomutaza (EC 5.4.2.2), inositol-3-phosphat synthaza (EC 5.5.1.4) và inositol monophosphataza (EC 3.1.3.25) để tạo ra hệ phản ứng đa enzym, và tiến hành phản ứng được xúc tác bằng enzym, trong đó phản ứng được xúc tác bằng enzym được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 100°C trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ; và (2) tách và tinh chế sản phẩm của phản ứng để thu được inositol.

Trong bước (1), nồng độ cơ chất là 10 g/l; lượng α -glucan phosphorylaza là 0,05 U/ml; lượng phosphoglucomutaza là 1 U/ml; lượng inositol-3-phosphat synthaza là 0,05 U/ml; lượng sử dụng inositol monophosphataza là 2 U/ml. Điều kiện của phản ứng được xúc tác bằng enzym là: để cho phản ứng xảy ra ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 80°C trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ; tốt hơn là để cho phản ứng xảy ra ở nhiệt độ 60°C trong 40 giờ.

Việc cho thêm enzym khử phân nhánh của tinh bột và maltoza phosphorylaza (EC 2.4.1.8), hoặc enzym khử phân nhánh của tinh bột và glucanotransferaza (EC 2.4.1.25) vào hệ phản ứng đa enzym có thể làm tăng hiệu suất và tỷ lệ chuyển hóa của inositol. Tốt hơn nếu lượng enzym khử phân nhánh của tinh bột là 1 U/ml; lượng maltoza phosphorylaza (EC 2.4.1.8) hoặc glucanotransferaza là 1 U/ml; trong đó, enzym khử phân nhánh là một trong hai enzym isoamylaza (EC 3.2.1.68) hoặc

pululanaza (EC 3.2.1.41) hoặc cả hai enzym này.

Tốt hơn nữa nếu nồng độ cơ chất là 10 g/l; lượng α -glucan phosphorylaza là 5 U/ml; lượng phosphoglucomutaza là 1U/ml; lượng inositol-3-phosphat synthaza là 5 U/ml; lượng sử dụng inositol monophosphataza là 2 U/ml; lượng enzym khử phân nhánh của tinh bột là 1 U/ml; lượng maltoza phosphorylaza hoặc glucanotransferaza là 1 U/ml.

Điều kiện của phản ứng được xúc tác bằng enzym là: để cho phản ứng xảy ra ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 100°C trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ; tốt hơn là để cho phản ứng xảy ra ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 80°C trong 40 giờ; tốt nhất là để cho phản ứng xảy ra ở nhiệt độ 80°C trong 40 giờ.

Để đánh giá thêm sản lượng inositol, chuyển hóa lượng glucoza còn lại thành inositol, cho thêm polyphosphat glucokinaza (EC 2.7.1.63) và polyphosphat vào hệ phản ứng đa enzym. Tốt hơn nếu lượng polyphosphat glucokinaza là 1 U/ml; lượng polyphosphat là 10mM; trong đó tốt hơn nếu polyphosphat là natri polyphosphat.

Hệ phản ứng đa enzym còn chứa các thành phần sau: chất đệm, phosphat vô cơ, ion magie hóa trị hai và ion kẽm hoặc ion mangan. Tốt hơn nếu lượng của mỗi thành phần là: chất đệm 100mM, phosphat vô cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm hoặc ion mangan 0,5mM; trong đó tốt hơn nếu chất đệm là HEPES; tốt hơn nữa nếu độ pH của chất đệm HEPES bằng 7,2.

Sau khi phản ứng kết thúc, gốc tinh bột dư sẽ là amyloza tinh khiết. Ở thời điểm này, có thể cho thêm một lượng nhỏ α -amylaza (EC 3.2.1.1) để thúc đẩy sự thủy phân của gốc tinh bột và làm tăng thêm sản lượng inositol. Tốt hơn nếu lượng α -amylaza bằng 0,1 U/ml.

Theo sáng chế, tinh bột hoặc dẫn xuất tinh bột được sử dụng làm cơ chất, α -glucan phosphorylaza, phosphoglucomutaza, inositol-3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza được thêm vào để tạo ra hệ phản ứng đa enzym. Con đường được xúc tác bằng đa enzym bao gồm: một đơn vị glucoza trong tinh bột hoặc dẫn xuất tinh bột được chuyển hóa thành glucoza 1-phosphat bằng α -glucan phosphorylaza; glucoza 1-phosphat được chuyển hóa thành glucoza 6-phosphat bằng phosphoglucomutaza; glucoza 6-phosphat được chuyển hóa thành inositol 3-phosphat bằng inositol 3-phosphat synthaza; và inositol 3-phosphat được chuyển hóa thành inositol bằng inositol monophosphataza. Do hai phản ứng, sự chuyển hóa glucoza-6-phosphat thành

inositol-3-phosphat bằng inositol-3-phosphat synthaza và sự chuyển hóa inositol-3-phosphat thành inositol bằng inositol monophosphataza, là các phản ứng không thuận nghịch, hiệu suất tạo ra inositol từ tinh bột sẽ cao. Hiệu suất cao và tỷ lệ chuyển hóa cao có thể làm giảm đáng kể chi phí tách inositol cuối.

Tinh bột là hỗn hợp của amyloza (20-30%) và amylopectin (70-80%). Mạch nhánh của amylopectin được liên kết với mạch chính bằng liên kết α -1,6 glycosit, và α -glucan phosphorylaza không thể phân giải liên kết α -1,6 glycosit. Để cải thiện hiệu suất tạo ra inositol, enzym khử mạch nhánh - isoamylaza hoặc pululanaza, có khả năng phân giải liên kết α -1,6 glycosit trong tinh bột, được cho thêm vào hệ phản ứng đa enzym trong sáng chế này. Do sản phẩm cuối của tinh bột được thủy phân bằng α -glucan phosphorylaza là maltoza, maltoza phosphorylaza được cho thêm vào hệ phản ứng để sử dụng maltoza, do đó maltoza bị phân hủy thành glucoza 1-phosphat và glucoza. Theo sáng chế, tốt hơn nữa nếu polyphosphat và polyphosphat glucokinaza được cho thêm tiếp vào hệ phản ứng đa enzym để chuyển hóa glucoza thành glucoza 6-phosphat, sản phẩm này được chuyển hóa thành inositol bằng inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza. Cuối cùng, tất cả các đơn vị glucoza trong tinh bột và dẫn xuất của chúng được chuyển hóa thành inositol, do đó, hiệu suất inositol và tỷ lệ chuyển hóa tăng lên. Ở đây, maltoza phosphorylaza có thể được thay thế bằng 4- α -glucanotransferaza (EC. 2.4.1.25), chất này có thể polyme hóa oligosacarit mạch ngắn thành oligosacarit mạch dài, và các oligosacarit mạch dài có thể được tái sử dụng bởi glucan phosphorylaza, do đó cải thiện hiệu quả sử dụng tinh bột.

Tốt hơn nếu tinh bột theo sáng chế là tinh bột hòa tan; dẫn xuất tinh bột chứa một hoặc nhiều thành phần bất kỳ trong số tinh bột được thủy phân một phần, tinh bột dextrin, maltodextrin, malto oligosacarit hoặc maltoza.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp khác để điều chế inositol bao gồm các bước sau:

(1) sử dụng xenluloza hoặc dẫn xuất xenluloza làm cơ chất, cho thêm xenlulaza, xenlodextrin phosphorylaza (EC 2.4.1.49), xenlobioza phosphorylaza (EC 2.4.1.20), phosphoglucomutaza (EC 5.4.2.2), inositol 3-phosphat synthaza (EC 5.5.1.4) và inositol monophosphataza (EC 3.1.3.25) để tạo ra hệ phản ứng đa enzym để tiến hành phản ứng được xúc tác bằng enzym; và (2) tách và tinh chế sản phẩm thô của phản ứng để thu được inositol.

Theo sáng chế, xenluloza được dùng làm cơ chất. Xenlulaza, xenlodextrin phosphorylaza, xenlobioza phosphorylaza, phosphoglucomutaza, inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza được cho thêm vào để tạo ra hệ phản ứng đa enzym. Con đường được xúc tác bằng đa enzym bao gồm: xenluloza được thủy phân bằng xenlulaza để tạo ra xenlodextrin và xenlobioza; một đơn vị glucoza trong xenlodextrin hoặc xenlobioza được chuyển hóa thành glucoza 1-phosphat bằng xenlodextrin phosphorylaza và xenlobioza phosphorylaza; glucoza 1-phosphat được chuyển hóa thành glucoza 6-phosphat bằng phosphoglucomutaza; glucoza 6-phosphat được chuyển hóa thành inositol 3-phosphat bằng inositol 3-phosphat synthaza; và inositol 3-phosphat được chuyển hóa thành inositol bằng inositol monophosphataza.

Tốt hơn nếu điều kiện phản ứng của bước (1) là: xenluloza hoặc dẫn xuất xenluloza nồng độ 10 g/l và xenlulaza nồng độ 5 U/ml được trộn lẫn trong bể nước đá và để yên trong bể nước đá này trong 5 phút; ly tâm hỗn hợp ở nhiệt độ 4°C và dịch nổi bề mặt được loại bỏ để thu được hỗn hợp của xenlulaza và xenluloza. Bước xử lý này có thể loại bỏ gần như toàn bộ glucosidaza ra khỏi xenlulaza loại thương mại, để tránh tạo ra lượng lớn glucoza từ quá trình thủy phân xenlobioza bằng glucosidaza, sao cho các sản phẩm thủy phân chính là xenlobioza và xenlodextrin.

Trong hệ phản ứng đa enzym, nồng độ của hỗn hợp chứa xenlulaza và xenluloza là 10 g/l; lượng xenlodextrin phosphorylaza là 5 U/ml; lượng xenlobioza phosphorylaza là 5 U/ml; lượng phosphoglucomutaza là 1 U/ml; lượng inositol 3-phosphat synthaza là 5 U/ml; và lượng inositol monophosphataza là 2 U/ml. Điều kiện của phản ứng được xúc tác bằng enzym là: để cho phản ứng xảy ra ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 100°C trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ; tốt hơn là để cho phản ứng xảy ra ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 80°C trong 72 giờ; tốt nhất là để cho phản ứng xảy ra ở nhiệt độ 50°C trong 72 giờ.

Để làm tăng thêm hiệu suất của sản phẩm inositol, polyphosphat glucokinaza (EC 2.7.1.63) và polyphosphat được cho thêm vào hệ phản ứng đa enzym của bước (1). Tốt hơn nếu lượng polyphosphat glucokinaza là 5 U/ml; lượng polyphosphat là 10 mM; trong đó tốt hơn nếu polyphosphat là natri polyphosphat.

Để cải thiện hiệu suất của phản ứng được xúc tác bằng enzym và năng suất sản phẩm, hệ phản ứng đa enzym còn chứa các thành phần sau: chất đệm, phosphat vô cơ, ion magie hóa trị hai và ion kẽm hoặc ion mangan. Tốt hơn nếu lượng của mỗi thành

phần là: chất đệm 100mM, phosphat vô cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm hoặc ion mangan 0,5mM; trong đó tốt hơn nếu chất đệm là HEPES, tốt hơn nữa nếu độ pH của chất đệm HEPES bằng 7,2.

Polyphosphat glucokinaza và polyphosphat được cho thêm tiếp vào hệ phản ứng đa enzym của sáng chế để chuyển hóa glucoza, là sản phẩm cuối của quá trình thủy phân xenluloza thành glucoza-6-phosphat; sau đó, glucoza-6-phosphat được chuyển hóa thành inositol bằng inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza. Cuối cùng, toàn bộ các đơn vị glucoza trong xenluloza và dẫn xuất của nó được chuyển hóa thành inositol.

Dẫn xuất xenluloza theo sáng chế bao gồm sản phẩm bất kỳ trong số sản phẩm sau khi xử lý sơ bộ xenluloza, xenlodextrin hoặc xenlobioza;

trong đó, có nhiều phương pháp xử lý sơ bộ xenluloza, như thủy phân bằng axit, thủy phân bằng enzym, phương pháp vật lý, v.v.; tốt hơn nếu sản phẩm sau khi xử lý sơ bộ xenluloza theo sáng chế là sản phẩm xử lý xenluloza bằng axit phosphoric đậm đặc.

Enzym bất kỳ trong số các enzyme trong hệ phản ứng đa enzym của sáng chế cũng có thể được thay thế bằng enzym bất kỳ có cùng chức năng, tốt hơn nếu là enzym đột biến được tạo ra bằng protein kỹ thuật có cùng chức năng.

Trong thử nghiệm, giải pháp theo sáng chế chuyển hóa tinh bột thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro* trong hệ phản ứng, khi tinh bột hòa tan được sử dụng làm nguyên liệu, và glucan phosphorylaza, phosphoglucomutaza, inositol-3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza được thêm vào để xúc tác phản ứng, hiệu suất cuối của inositol bằng 16%. Sau khi cho thêm isoamylaza, maltoza phosphorylaza, polyphosphat glucokinaza và natri polyphosphat vào hệ phản ứng trên đây trong khi tăng lượng glucan phosphorylaza và inositol 3-phosphat synthaza, làm cho hiệu suất cuối của inositol đạt 72%, hiệu suất được cải thiện đáng kể.

Trong thử nghiệm của sáng chế để chuyển hóa xenluloza thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro* trong hệ phản ứng, khi xenluloza vi tinh thể (Avicel) được dùng làm cơ chất, và xenluloza, xenlodextrin phosphorylaza, xenlobioza phosphorylaza, phosphoglucomutaza, inositol-3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza được cho thêm vào để xúc tác cho phản ứng, tỷ lệ chuyển hóa cuối của inositol bằng 14%; khi xenluloza vô định hình tái tạo ra được dùng làm cơ chất, và xenluloza, xenlodextrin phosphorylaza, xenlobioza phosphorylaza,

phosphoglucomutaza, inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza được cho thêm vào để xúc tác cho phản ứng, tỷ lệ chuyển hóa cuối của inositol bằng 48%. Việc cho thêm tiếp polyphosphat glucokinaza và natri polyphosphat làm cho tỷ lệ chuyển hóa cuối của inositol đạt 65%, cải thiện tỷ lệ chuyển hóa đáng kể.

Giải pháp kỹ thuật của sáng chế có các hiệu quả có lợi sau đây so với các giải pháp đã biết trong lĩnh vực này:

Trong hệ phản ứng đa enzym của sáng chế, tinh bột hoặc xenluloza và các dẫn xuất của chúng được dùng làm nguyên liệu và được chuyển hóa thành inositol bằng phản ứng được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*; nhờ việc tối ưu hóa quy trình bằng cách cho thêm enzym để thúc đẩy sự thủy phân tinh bột hoặc xenluloza và enzym để sử dụng sản phẩm phụ (glucoza), hiệu suất chuyển hóa được cải thiện đáng kể. Hiệu suất cao làm giảm chi phí tách inositol đáng kể, dẫn đến chi phí sản xuất inositol thấp. Phương pháp theo sáng chế có các ưu điểm như quy trình đơn giản, hiệu suất sử dụng nguyên liệu cao, năng suất sản phẩm cao; giá thành sản phẩm thấp và mức độ gây ô nhiễm môi trường thấp, và dễ dàng mở rộng quy mô sản xuất inositol.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nguyên liệu thử nghiệm

Tinh bột hòa tan: ACROS, Cat số 424490020

Maltodextrin: ALDRICH, Cat số 419672

Vector pET20b: Novagen (Madison, WI)

Vi khuẩn BL21 biểu hiện *Escherichia coli* (DE3), Invitrogen (Carlsbad, CA)

Phần lớn các enzym trong sáng chế này (ngoại trừ inositol monophosphataza, polyphosphat glucokinaza và glucanotransferaza) có bán trên thị trường từ công ty Sigma. Có thể thu được tất cả các enzym này nhờ sự biểu hiện của sinh vật có nhân nguyên thủy bằng phương pháp kỹ thuật di truyền.

Xenulaza được mua từ công ty Sigma, Cat số C2730

Maltoza phosphorylaza được mua từ công ty Sigma, Cat số M8284

α -amylaza được mua từ công ty Sigma, Cat số 10065

Avicel, xenluloza vi tinh thể, được mua từ công ty Sigma, Cat số 11365

Ví dụ 1. Chuyển hóa tinh bột thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*

Tinh bột được chuyển hóa thành inositol bằng hệ phản ứng được xúc tác bằng đa enzym *in vitro* (Fig.1). Các enzym chính bao gồm: (1) α -glucan phosphorylaza (α GP, EC 2.4.1.1), giải phóng glucoza 1-phosphat từ tinh bột; (2) phosphoglucomutaza (PGM, EC 5.4.2.2), xúc tác glucoza 1-phosphat thành glucoza-6-phosphat; (3) inositol 3-phosphat synthaza (IPS, EC 5.5.1.4), xúc tác glucoza 6-phosphat thành inositol 3-phosphat; (4) inositol monophosphataza (IMP, EC 3.1.3.25), xúc tác quá trình tách phospho của inositol 3-phosphat thành inositol. Do hai phản ứng lên men cuối là phản ứng không thuận nghịch, hệ chất được xúc tác bằng enzym này có hiệu suất rất cao.

Theo sáng chế, α -glucan phosphorylaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Thermotoga maritime* và mã số gen theo cơ sở dữ liệu KEGG là TM1168; phosphoglucomutaza cũng có nguồn gốc từ vi khuẩn *T. maritime* và mã số gen theo KEGG là TM0769; inositol 3-phosphat synthaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Archaeoglobus fulgidus* và mã số gen theo KEGG là AF1794; inositol monophosphataza cũng có nguồn gốc từ vi khuẩn *T. maritime* và mã số gen theo KEGG là TM1415. Tất cả các ADN hệ gen này có sẵn trên trang web chính thức của Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (American Type Culture Collection: ATCC) (www.atcc.org). Bốn gen này thu được từ ADN hệ gen tương ứng dựa trên phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction: PCR) bằng cách sử dụng các đoạn mồi khác nhau và được tách dòng vào vectơ pET20b (Novagen, Madison, WI) bằng phương pháp tách dòng đơn (You, C., et al. (2012), "Simple Cloning via Direct Transformation of PCR Product (DNA Multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." Appl. Environ. Microbiol. 78(5): 1593-1595.), để thu được các vectơ biểu hiện tương ứng: pET20b-Tm α GP, pET20b-AfIPS, pET20b-TmPGM và pET20b-TmIMP. Bốn plasmid này được biến nạp vào vi khuẩn BL21 biểu hiện *E. coli* (DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA), và sự biểu hiện và tinh chế protein được tiến hành. Kết quả của quá trình tinh chế protein được thể hiện trên Fig.2.

0,75ml hệ phản ứng chứa chất đệm HEPES 100mM (độ pH = 7,2), phosphat vô cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm 0,5mM, α -glucan phosphorylaza 0,05 U/ml, phosphoglucomutaza 1 U/ml, inositol-3-phosphat synthaza 0,05 U/ml, inositol monophosphat 2 U/ml và tinh bột hòa tan 10 g/l, được cho phản ứng có xúc tác ở nhiệt độ 60°C trong 40 giờ.

Tùy thuộc vào thời gian lưu, phương pháp HPLC có thể được sử dụng để phân biệt inositol, glucoza, glucoza 1-phosphat hoặc glucoza 6-phosphat trong dung dịch

phản ứng (Fig.3a); inositol có thể được định lượng bằng phương pháp HPLC, như được thể hiện trên Fig.3b, nồng độ inositol tỷ lệ với cường độ của đỉnh đặc trưng của inositol trong HPLC. Pha động của HPLC là axit sulfuric loãng 5mM.

Sau khi phản ứng kết thúc, nồng độ cuối của inositol (Fig.4) bằng 1,6 g/l và tỷ lệ chuyển hóa bằng 16%.

Ví dụ 2. Chuyển hóa tinh bột thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*

Quá trình điều chế α -glucan phosphorylaza, phosphoglucomutaza, inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza là giống như trong Ví dụ 1.

0,75ml hệ phản ứng chứa chất đệm HEPES 100mM (độ pH = 7,2), phosphat vô cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm 0,5mM, α -glucan phosphorylaza 0,05 U/ml, phosphoglucomutaza 1 U/ml, inositol-3-phosphat synthaza 0,05 U/ml, inositol monophosphat 2 U/ml và tinh bột hòa tan 10 g/l, được cho phản ứng có xúc tác ở nhiệt độ 40°C trong 40 giờ.

Sau khi phản ứng kết thúc, nồng độ cuối của inositol bằng 0,9g/l và tỷ lệ chuyển hóa bằng 9%.

Ví dụ 3. Chuyển hóa tinh bột thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*

Quá trình điều chế α -glucan phosphorylaza, phosphoglucomutaza, inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza là giống như trong Ví dụ 1.

0,75ml hệ phản ứng chứa chất đệm HEPES 100mM (độ pH = 7,2), phosphat vô cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm 0,5mM, α -glucan phosphorylaza 0,05 U/ml, phosphoglucomutaza 1 U/ml, inositol-3-phosphat synthaza 0,05 U/ml, inositol monophosphat 2 U/ml và tinh bột hòa tan 10 g/l, được cho phản ứng có xúc tác ở nhiệt độ 80°C trong 40 giờ.

Sau khi phản ứng kết thúc, nồng độ cuối của inositol bằng 3,6g/l và tỷ lệ chuyển hóa bằng 36%.

Ví dụ 4. Chuyển hóa tinh bột thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro* bằng cách tối ưu hóa quy trình và cho thêm enzym để thúc đẩy sự thủy phân tinh bột

Việc chỉ sử dụng glucan phosphorylaza không thể thủy phân hoàn toàn tinh bột, do tinh bột có mạch nhánh được liên kết với mạch chính bằng liên kết α -1,6 glycosit, và glucan phosphorylaza chỉ có tác dụng đối với liên kết α -1,4 glycosit. Do đó, cần cho thêm isoamylaza (EC 3.2.1.68) để thủy phân liên kết α -1,6 glycosit. Cuối cùng, sản phẩm cuối của quá trình thủy phân tinh bột bằng hai enzym này là maltoza và glucoza. Để chuyển hóa các sản phẩm cuối thành inositol, cần cho thêm tiếp maltoza phosphorylaza (EC 2.4.1.8) và polyphosphat glucokinaza (EC 2.7.1.63).

Theo sáng chế, isoamylaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Sulfolobus tokodaii* và mã số gen trên KEGG là ST0928; ADN hệ gen của chủng này được giáo sư Georg Fuchs ở trường đại học Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (Đức) sẵn lòng cung cấp. Polyphosphat glucokinaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Thermobifida fusca* và mã số gen trên KEGG là Tfu1811; ADN hệ gen của chủng này được giáo sư David Wilson ở trường đại học Cornell University (Mỹ) sẵn lòng cung cấp. Glucanotransferaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Thermococcus litoralis* và mã số gen trên KEGG là OCC_10078; ADN hệ gen của chủng này có sẵn trên trang web chính thức của ATCC (www.atcc.org). Ba gen này thu được từ các ADN hệ gen tương ứng theo phản ứng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi khác nhau và được tách dòng vào vectơ pET20b bằng phương pháp tách dòng đơn (You, C., et al. (2012), "Simple Cloning via Direct Transformation of PCR Product (DNA Multimer) to Escherichia coli and Bacillus subtilis." Appl. Environ. Microbiol. 78(5): 1593-1595.), để thu được vectơ biểu hiện tương ứng: pET20b-StIA, pET20b-TfuPPGK và pET20b-Ti4GT. Ba plasmid này được biến nạp vào vi khuẩn BL21 biểu hiện *E. coli* (DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA), và quá trình biểu hiện và tinh chế protein được tiến hành.

Quá trình điều chế α -glucan phosphorylaza, phosphoglucomutaza, inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza được tiến hành giống như trong Ví dụ 1. Maltoza phosphorylaza được mua từ công ty Sigma, Cat số M8284.

0,75ml hệ phản ứng chứa chất đệm HEPES 100mM (độ pH = 7,2), phosphat vô cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm 0,5mM, α -glucan phosphorylaza 5 U/ml, phosphoglucomutaza 1 U/ml, inositol-3-phosphat synthaza 5 U/ml, inositol monophosphat 2 U/ml, isoamylaza 1 U/ml, maltoza phosphorylaza 1 U/ml, polyphosphat glucokinaza 1 U/ml, natri polyphosphat 10mM và tinh bột hòa tan 10 g/l, được cho phản ứng có xúc tác ở nhiệt độ 80°C trong 40 giờ. Nồng độ cuối của inositol

(Fig.4) bằng 7,2 g/l và tỷ lệ chuyển hóa đạt 72%.

Ví dụ 5. Chuyển hóa tinh bột thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro* bằng cách tối ưu hóa quy trình và cho thêm enzym để thúc đẩy sự thủy phân tinh bột

Quá trình điều chế α -glucan phosphorylaza, phosphoglucomutaza, inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza là giống như trong Ví dụ 1. Quá trình điều chế polyphosphat glucokinaza là giống như trong Ví dụ 4. Pululanaza (EC 3.2.1.41) được mua từ công ty Sigma, Cat số P1067; maltoza phosphorylaza được mua từ công ty Sigma, Cat số M8284.

Do pululanaza được mua từ công ty Sigma không phản ứng ở nhiệt độ cao (80°C), trước tiên, tinh bột hòa tan được xử lý bằng pululanaza ở nhiệt độ 37°C, sau đó cho thêm các enzym khác. Phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 80°C.

0,75ml hệ phản ứng chứa chất đệm HEPES 100mM (độ pH = 7,2), phosphat vô cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm 0,5 M, pululanaza 1 U/ml, natri polyphosphat 10mM và tinh bột hòa tan 10 g/l, được cho phản ứng có xúc tác ở nhiệt độ 37°C. Sau 10 giờ, cho thêm α -glucan phosphorylaza 5 U/ml, phosphoglucomutaza 1 U/ml, inositol 3-phosphat synthaza 5 U/ml, inositol monophosphat 2 U/ml, maltoza phosphorylaza 1 U/ml và polyphosphat glucokinaza 1 U/ml vào và tiến hành phản ứng có xúc tác ở nhiệt độ 80°C trong 40 giờ. Nồng độ cuối của inositol (Fig.4) bằng 7,3g/l và tỷ lệ chuyển hóa đạt 73%.

Sau đó, cho thêm một lượng nhỏ α -amylaza vào hệ phản ứng để thúc đẩy sự thủy phân tinh bột còn dư và làm tăng sản lượng inositol. Lượng α -amylaza là 0,1 U/ml và phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 37°C trong 6 giờ, sau đó ở nhiệt độ 80°C trong 24 giờ. Nồng độ cuối của inositol (Fig.4) bằng 8,8g/l và tỷ lệ chuyển hóa đạt 88%.

Ví dụ 6. Chuyển hóa maltodextrin thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*

Quá trình điều chế α -glucan phosphorylaza, phosphoglucomutaza, inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza là giống như trong Ví dụ 1. Quá trình điều chế isoamylaza và polyphosphat glucokinaza là giống như trong Ví dụ 4. Maltoza phosphorylaza được mua từ công ty Sigma, Cat số M8284.

0,75ml hệ phản ứng chứa chất đệm HEPES 100mM (độ pH = 7,2), phosphat vô

cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm 0,5mM, α -glucan phosphorylaza 5 U/ml, phosphoglucomutaza 1 U/ml, inositol 3-phosphat synthaza 5 U/ml, inositol monophosphat 2 U/ml, isoamylaza 1 U/ml, maltoza phosphorylaza 1 U/ml, polyphosphat glucokinaza 1 U/ml, natri polyphosphat 10mM và maltodextrin 10 g/l (ALDRICH, Cat số 419672), được cho phản ứng có xúc tác ở nhiệt độ 80°C trong 40 giờ. Nồng độ cuối của inositol (Fig.5) bằng 7,8 g/l và tỷ lệ chuyển hóa đạt 78%.

Ví dụ 7. Chuyển hóa xenluloza thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*

Sơ đồ của quá trình chuyển hóa xenluloza thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro* được thể hiện trên Fig.6.

Xenulaza được mua từ công ty Sigma, Cat số C2730; quá trình điều chế phosphoglucomutaza, inositol-3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza là giống như trong Ví dụ 1.

Cả xenlodextrin phosphorylaza (Cthe_2989) và xenlobioza phosphorylaza (Cthe_0275) đều có nguồn gốc từ vi khuẩn *Clostridium thermocellum*. Hai gen này thu được từ ADN hệ gen tương ứng (ADN hệ gen có sẵn từ trang web chính thức của ATCC (www.atcc.org)) theo phản ứng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi khác nhau và được tách dòng vào các vector pET20b bằng phương pháp tách dòng đơn (You, C., et al. (2012)) để thu được các vector biểu hiện tương ứng: pET20b-CthCDP và pET20b-CthCBP. Cả hai plasmid này được biến nạp vào vi khuẩn BL21 biểu hiện *E. coli* (DE3) và quá trình biểu hiện và tinh chế protein được tiến hành. Kết quả của quá trình tinh chế protein được thể hiện trên Fig.7.

Trong thử nghiệm này, xenluloza vi tinh thể (Avicel) được sử dụng làm cơ chất. Trước tiên, xenlulaza (5 U/ml) và xenluloza (10 g/l) loại thương mại được trộn lẫn trong bể nước đá và được để yên trong 5 phút; hỗn hợp này được ly tâm ở nhiệt độ 4°C và dịch nổi bề mặt được loại bỏ. Viên vón là hỗn hợp của xenluloza và xenlulaza có thể gắn kết với xenluloza. Bước xử lý này có thể loại bỏ gần như toàn bộ glucosidaza ra khỏi xenlulaza loại thương mại để tránh tạo ra một lượng lớn glucoza từ quá trình thủy phân xenlobioza bằng glucosidaza, vì thế các sản phẩm thủy phân chính là xenlobioza và xenlodextrin.

0,75ml hệ phản ứng chứa chất đệm HEPES 100mM (độ pH = 7,2), phosphat vô cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm 0,5mM, xenlodextrin phosphorylaza 5

U/ml, xenlobioza phosphorylaza 5 U/ml, phosphoglucomutaza 1 U/ml, inositol 3-phosphat synthaza 5 U/ml, inositol monophosphat 2 U/ml và hỗn hợp của xenluloza và xenlulaza nồng độ 10 g/l, được cho phản ứng có xúc tác ở nhiệt độ 50°C trong 72 giờ. Nồng độ cuối của inositol bằng 1,4 g/l và tỷ lệ chuyển hóa đạt 14%, như được thể hiện trên Fig.8.

Ví dụ 8. Chuyển hóa xenluloza thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*

Xenlulaza được mua từ công ty Sigma, Cat số C2730; quá trình điều chế phosphoglucomutaza, inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza là giống như trong Ví dụ 1; quá trình điều chế xenlodextrin phosphorylaza và xenlobioza phosphorylaza là giống như trong Ví dụ 7.

Trong thử nghiệm này, xenluloza vô định hình tái tạo (regenerated amorphous cellulose: RAC) được sử dụng làm cơ chất, là sản phẩm của Avicel sau khi xử lý bằng axit phosphoric đậm đặc (Zhang, Y. H. P., et al. (2006), " A Transition from Cellulose Swelling to Cellulose Dissolution by o-Phosphoric Acid: Evidence from Enzymatic Hydrolysis and Supramolecular Structure." *Biomacromolecules* 7(2): 644-648). Trước tiên, xenlulaza (5 U/ml) và xenluloza (10 g/l) loại thương mại được trộn lẫn trong bể nước đá và để yên trong bể nước đá này trong 5 phút; hỗn hợp được ly tâm ở nhiệt độ 4°C và dịch nổi bề mặt được loại bỏ. Viên vón là hỗn hợp của xenluloza và xenlulaza có thể gắn kết với xenluloza.

0,75ml hệ phản ứng chứa chất đệm HEPES 100mM (độ pH = 7,2), phosphat vô cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm 0,5mM, xenlodextrin phosphorylaza 5 U/ml, xenlobioza phosphorylaza 5 U/ml, phosphoglucomutaza 1 U/ml, inositol-3-phosphat synthaza 5 U/ml, inositol monophosphat 2 U/ml và hỗn hợp của xenluloza và xenlulaza nồng độ 10 g/l, được cho phản ứng có xúc tác ở nhiệt độ 50°C trong 72 giờ. Nồng độ cuối của inositol bằng 4,8g/l và tỷ lệ chuyển hóa đạt 48%.

Ví dụ 9. Chuyển hóa xenluloza thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*

Xenlulaza được mua từ công ty Sigma, Cat số C2730. Việc điều chế phosphoglucomutaza, inositol-3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza là giống như trong Ví dụ 1; quá trình điều chế xenlodextrin phosphorylaza và xenlobioza

phosphorylaza là giống như trong Ví dụ 7.

0,75ml hệ phản ứng chứa chất đệm HEPES 100mM (độ pH = 7,2), phosphat vô cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm 0,5mM, xenlodextrin phosphorylaza 5 U/ml, xenlobioza phosphorylaza 5 U/ml, phosphoglucomutaza 1 U/ml, inositol 3-phosphat synthaza 5 U/ml, inositol monophosphat 2 U/ml và hỗn hợp của xenluloza và xenluloza nồng độ 10 g/l trong Ví dụ 8, được cho phản ứng có xúc tác ở nhiệt độ 40°C trong 72 giờ. Nồng độ cuối của inositol bằng 2,3 g/l và tỷ lệ chuyển hóa đạt 23%.

Ví dụ 10. Chuyển hóa xenluloza thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*

Xenlulaza được mua từ công ty Sigma, Cat số C2730; quá trình điều chế phosphoglucomutaza, inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza là giống như trong Ví dụ 1; quá trình điều chế xenlodextrin phosphorylaza và xenlobioza phosphorylaza là giống như trong Ví dụ 7.

0,75ml hệ phản ứng chứa 100mM HEPES chất đệm (độ pH = 7,2), phosphat vô cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm 0,5mM, xenlodextrin phosphorylaza 5 U/ml, xenlobioza phosphorylaza 5 U/ml, phosphoglucomutaza 1 U/ml, inositol 3-phosphat synthaza 5 U/ml, inositol monophosphat 2 U/ml và hỗn hợp của xenluloza và xenluloza nồng độ 10 g/l trong Ví dụ 8, được cho phản ứng có xúc tác ở nhiệt độ 80°C trong 72 giờ. Nồng độ cuối của inositol bằng 1,9g/l và tỷ lệ chuyển hóa đạt 19%.

Ví dụ 11. Chuyển hóa xenluloza thành inositol bằng quá trình được xúc tác bằng đa enzym *in vitro*

Do sản phẩm cuối sau khi thủy phân xenluloza là glucoza, cần cho thêm polyphosphat glucokinaza và axit polyphosphoric để chuyển hóa sản phẩm này thành inositol.

Xenlulaza được mua từ công ty Sigma, Cat số C2730; quá trình điều chế phosphoglucomutaza, inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza là giống như trong Ví dụ 1; quá trình điều chế polyphosphat glucokinaza là giống như trong Ví dụ 4; và quá trình điều chế xenlodextrin phosphorylaza và xenlobioza phosphorylaza là giống như trong Ví dụ 7.

0,75ml hệ phản ứng chứa chất đệm HEPES 100mM (độ pH = 7,2), phosphat vô cơ 10mM, ion magie hóa trị hai 5mM, ion kẽm 0,5mM, xenlodextrin phosphorylaza 5 U/ml, xenlobioza phosphorylaza 5 U/ml, phosphoglucomutaza 1 U/ml, inositol 3-phosphat synthaza 5 U/ml, inositol monophosphat 2 U/ml, hỗn hợp của xenluloza và xenluloza nồng độ 10 g/l trong Ví dụ 8, polyphosphat glucokinaza 5 U/ml và natri polyphosphat 10mM, được cho phản ứng có xúc tác ở nhiệt độ 50°C trong 72 giờ. Nồng độ cuối của inositol (Fig.8) bằng 6,5g/l và tỷ lệ chuyển hóa đạt 65%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế inositol bao gồm các bước:

(1) sử dụng tinh bột hoặc dẫn xuất tinh bột làm cơ chất, cho thêm α -glucan phosphorylaza, phosphoglucomutaza, inositol-3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza để tạo ra hệ phản ứng đa enzym và tiến hành phản ứng được xúc tác bằng enzym; và

(2) tách và tinh chế sản phẩm của phản ứng để thu được inositol, trong đó phản ứng được xúc tác bằng enzym được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 100°C trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hệ phản ứng đa enzym còn chứa enzym khử phân nhánh của tinh bột, maltoza phosphorylaza và α -amylaza, hoặc enzym khử phân nhánh của tinh bột, glucanotransferaza và α -amylaza; enzym khử phân nhánh của tinh bột này là một trong hai enzym isoamylaza và pululanaza hoặc cả hai enzym này.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó hệ phản ứng đa enzym còn chứa polyphosphat glucokinaza và polyphosphat; và trong đó tốt hơn nếu polyphosphat là natri polyphosphat.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dẫn xuất tinh bột trong bước (1) bao gồm một hoặc nhiều thành phần bất kỳ trong số tinh bột được thủy phân một phần, tinh bột dextrin, maltodextrin, malto-oligosacarit hoặc maltoza.

5. Phương pháp điều chế inositol bao gồm các bước:

(1) sử dụng xenluloza hoặc dẫn xuất xenluloza làm cơ chất, cho thêm xenlulaza, xenlodextrin phosphorylaza, xenlobioza phosphorylaza, phosphoglucomutaza, inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza để tạo ra hệ phản ứng đa enzym và tiến hành phản ứng được xúc tác bằng enzym; và

(2) tách và tinh chế sản phẩm của phản ứng để thu được inositol,

trong đó phản ứng được xúc tác bằng enzym được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 100°C trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó tốt hơn nếu bước (1) bao gồm các công đoạn: trộn lẫn xenluloza hoặc dẫn xuất xenluloza với xenlulaza, ly tâm và loại bỏ dịch nổi bề mặt để thu được hỗn hợp của xenlulaza và xenluloza;

trong đó xenlulaza trong hỗn hợp của xenlulaza và xenluloza không chứa glucosidaza;

cho thêm xenlodextrin phosphorylaza, xenlobioza phosphorylaza, phosphoglucomutaza, inositol 3-phosphat synthaza và inositol monophosphataza vào hỗn hợp của xenlulaza và xenluloza, để tạo ra hệ phản ứng đa enzym.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó hệ phản ứng đa enzym còn chứa polyphosphat glucokinaza và polyphospha; trong đó tốt hơn nếu polyphosphat là natri polyphosphat.

8. Phương pháp theo điểm 5, trong đó dẫn xuất xenluloza trong bước (1) bao gồm sản phẩm bất kỳ trong số sản phẩm thu được sau khi xử lý sơ bộ xenluloza, colodextrin hoặc xenlobioza.

9. Phương pháp theo điểm 1 hoặc điểm 5, trong đó hệ phản ứng đa enzym còn chứa các thành phần sau: chất đệm, anion phosphat vô cơ, ion magie hóa trị hai, ion kẽm hoặc ion mangan.

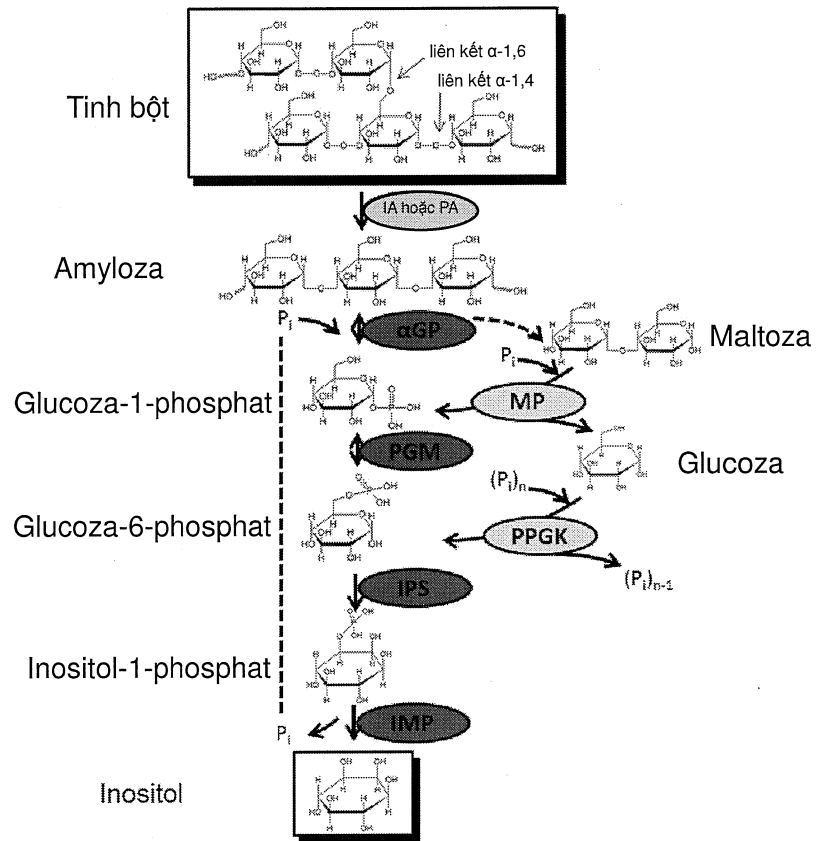
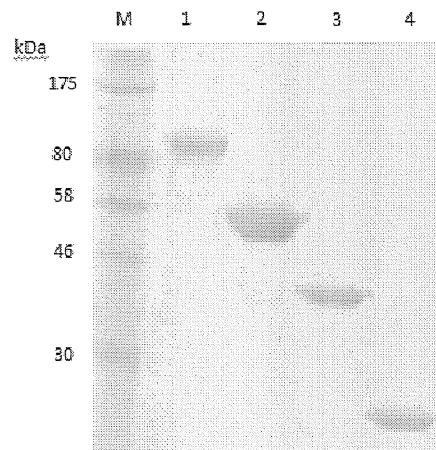
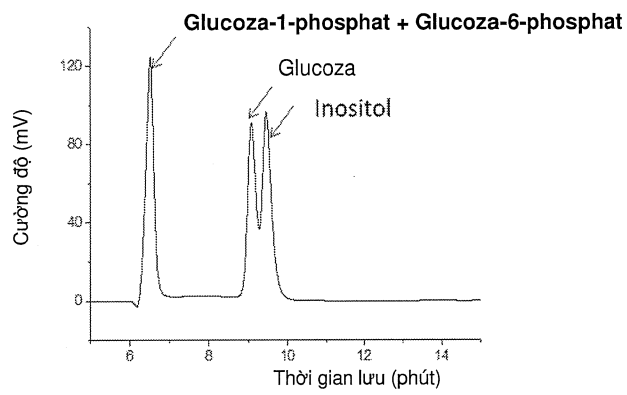
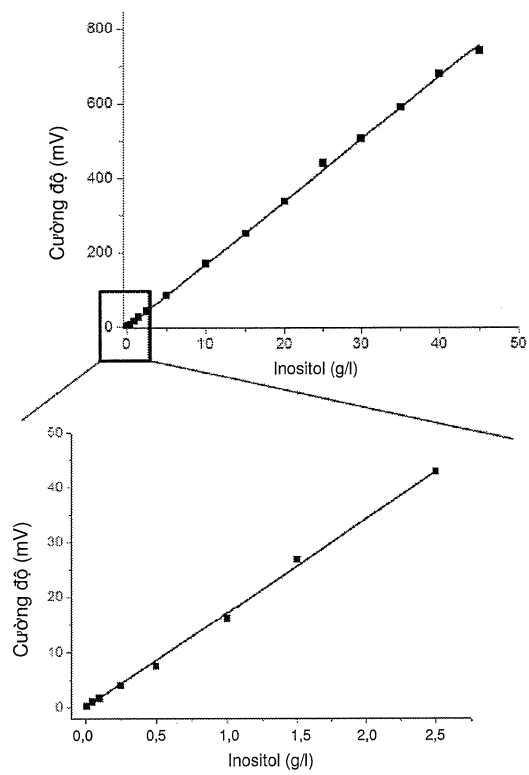
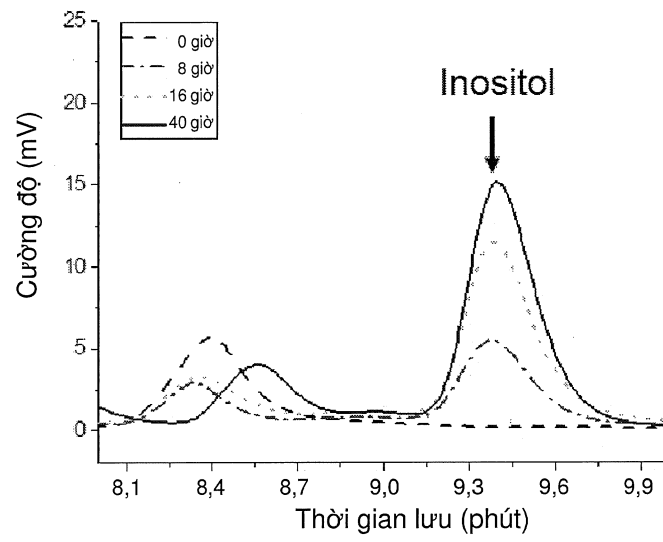
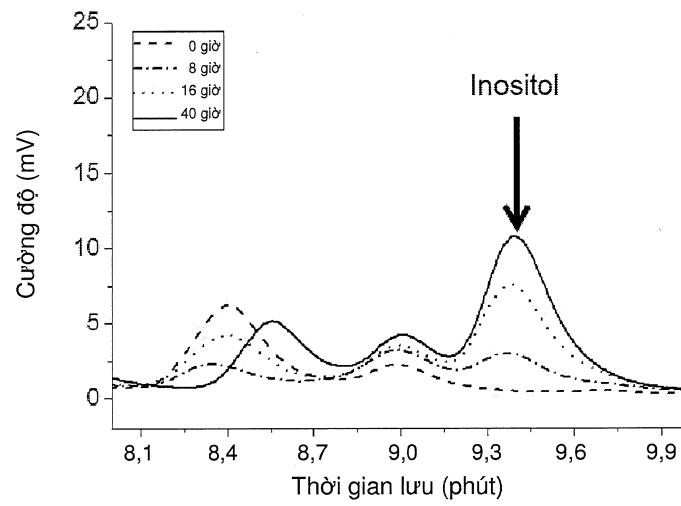


Fig.1

**Fig.2**

**a****b****Fig.3**

**Fig.4**

**Fig.5**

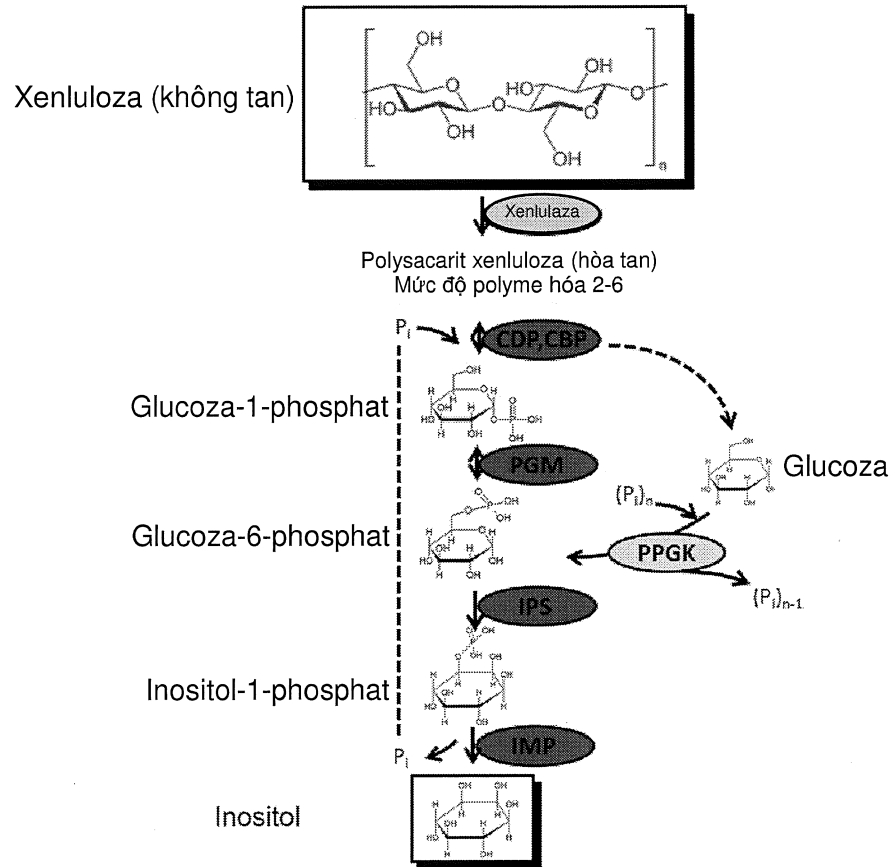
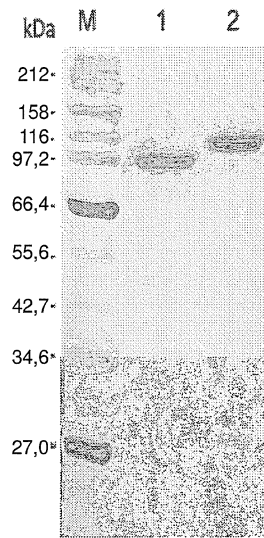
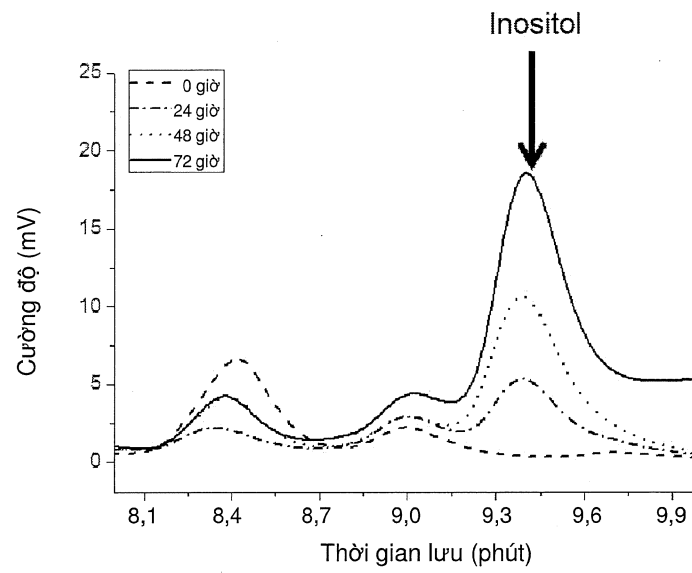


Fig.6

**Fig.7**

**Fig.8**