



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

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

(11)



1-0036256

(51)⁷ C12P 19/02; C12N 9/90; C12N 11/00; (13) B
C12N 15/77

(21) 1-2018-02577

(22) 16/11/2016

(86) PCT/KR2016/013197 16/11/2016

(87) WO 2017/086690 26/05/2017

(30) 10-2015-0160710 16/11/2015 KR

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/10/2018 367A

(73) SAMYANG CORPORATION (KR)

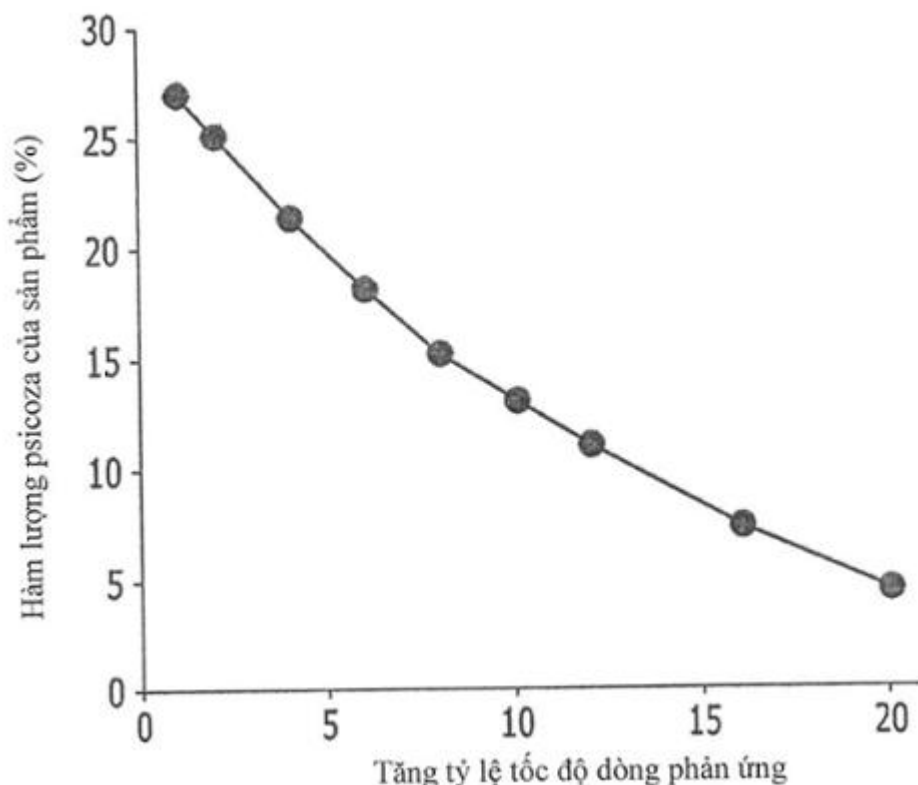
31 Jong-ro 33-gil, Jongno-gu, Seoul 03129, Republic of Korea

(72) KWON, Soun Gyu (KR); KIM, Hye Jung (KR); PARK, Bu-Soo (KR); PARK, Chong Jin (KR); LEE, Kang Pyo (KR); CHEON, Hee Soon (KR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PSICOZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM CHỨA PSICOZA TỪ CƠ CHẤT CHỨA FRUCTOZA

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp thu sản phẩm chứa psicoza từ cơ chất chứa fructoza với năng suất cao trong thời gian ngắn ở quy mô công nghiệp bằng phản ứng cố định bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza, và phương pháp sản xuất psicoza dạng lỏng hoặc dạng bột bằng cách tách sản phẩm chứa psicoza thu được bằng phương pháp này và sản xuất psicoza một cách liên tục bằng cách đưa sản phẩm phụ của quy trình tách vào quy trình sản xuất sản phẩm chứa psicoza.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp thu sản phẩm chứa psicoza từ cơ chất chứa fructoza với năng suất cao trong thời gian ngắn ở quy mô công nghiệp bằng phản ứng cố định bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza, và phương pháp sản xuất psicoza dạng lỏng hoặc dạng bột một cách liên tục bằng cách tách sản phẩm chứa psicoza thu được bằng phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc phát triển các phương pháp sinh học để sản xuất sirô sacarit đã được tập trung chủ yếu vào việc sản xuất sacarit cụ thể ở nồng độ cao với tỷ lệ chuyển hóa cao bằng cách sử dụng enzym hoặc tế bào vi khuẩn.

Lý do cho việc phát triển sản xuất sirô sacarit này là, do quy trình kế tiếp như cô, v.v. sau khi sản xuất sirô sacarit là cần thiết, để làm giảm thiểu yêu cầu của quy trình kế tiếp và làm giảm chi phí và thời gian cần để tách và tinh chế sacarit cụ thể bằng cách sản xuất sacarit cụ thể này với độ tinh khiết cao.

Mới đây, do sirô sacarit có thành phần cụ thể có tính ngọt và độ ngọt cao, nên cần làm giảm thiểu việc thực hiện các quy trình cô, tách và tinh chế bổ sung, để sản xuất chính sirô đã sản xuất được hoặc sau khi đi qua quy trình kế tiếp tối thiểu.

Ngoài ra, có nhu cầu sản xuất sirô chứa sacarit cụ thể với năng suất cao trong thời gian ngắn ở quy mô công nghiệp, và cũng có nhu cầu sản xuất sirô này một cách ổn định.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm chứa psicoza từ cơ chất chứa fructoza với năng suất cao ở quy mô công nghiệp bằng phản ứng cố định bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất psicoza dạng lỏng hoặc dạng bột bằng cách tách sản phẩm chứa psicoza thu được bằng phương pháp này.

Giải pháp kỹ thuật

Một phương án của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm chứa psicoza từ cơ chất chứa fructoza bằng phản ứng cố định bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm chứa psicoza chứa tổng hàm lượng rắn của psicoza và glucoza nhỏ hơn 20% trọng lượng, trên cơ sở 100% trọng lượng hàm lượng rắn của psicoza, glucoza và fructoza trong sản phẩm, bằng cách thực hiện phản ứng cố định ở vận tốc phản ứng từ 8,5 đến 20, trên cơ sở 1 là tốc độ dòng phản ứng tại đó psicoza chứa trong sản phẩm chứa psicoza được sản xuất với lượng lớn hơn hoặc bằng 25% trọng lượng tính theo 100% trọng lượng tổng hàm lượng sacarit rắn trong sản phẩm chứa psicoza.

Phương án khác của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất psicoza dưới dạng sản phẩm lỏng hoặc bột bằng cách sản xuất sản phẩm chứa psicoza từ cơ chất chứa fructoza bằng phản ứng cố định bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza, tách phân đoạn psicoza chứa hàm lượng psicoza lớn hơn hoặc bằng 80% trọng lượng hoặc lớn hơn hoặc bằng 90% trọng lượng (ví dụ, 90% trọng lượng) và phân đoạn sản phẩm tinh chế (raffinate) với thành phần sacarit chứa hàm lượng psicoza nhỏ hơn hoặc bằng 5% bằng cách sử dụng thiết bị tách có độ tinh khiết cao, và thực hiện quy trình bổ sung trong trường hợp của phân đoạn psicoza.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện đồ thị phản ánh sự thay đổi của hàm lượng psicoza trong sản phẩm phụ thuộc vào tốc độ dòng của cột trong khoảng hàm lượng fructoza lỏng từ 75% đến 95% và khoảng từ 5% đến nhỏ hơn 20% tổng hàm lượng glucoza và psicoza, trong quy trình sản xuất psicoza bằng cách sử dụng phản ứng cố định được nạp hạt chứa tế bào để sản xuất psicoza, theo một ví dụ của sáng chế.

Fig.2 thể hiện công thức phản ánh sự thay đổi của hàm lượng psicoza trong sản phẩm phụ thuộc vào tốc độ dòng của cột trong khoảng hàm lượng fructoza lỏng từ 75% đến 95% và khoảng từ 5% đến nhỏ hơn 20% tổng hàm lượng glucoza và psicoza, trong quy trình sản xuất psicoza bằng cách sử dụng phản ứng cố định được nạp hạt chứa tế bào để sản xuất psicoza theo một ví dụ của sáng chế.

Fig.3 thể hiện ví dụ về vectơ biểu hiện tái tổ hợp để sản xuất sirô psicoza theo sáng chế (pCES_sodCDPE).

Fig.4 thể hiện sơ đồ tiến trình của quy trình sản xuất psicoza theo một ví dụ của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Một phương án của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm chứa psicoza từ cơ chất chứa fructoza bằng phản ứng cố định bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza.

Cơ chất dùng cho phản ứng cố định là cơ chất chứa fructoza, và hàm lượng fructoza dùng làm cơ chất để sản xuất hữu hiệu psicoza có thể nằm trong khoảng từ 75 đến 95% (trọng lượng/thể tích), ví dụ, từ 80 đến 91% (trọng lượng/thể tích), trên cơ sở 100% (trọng lượng/thể tích) tổng hàm lượng rắn của toàn bộ cơ chất chứa fructoza. Fructoza có thể được dùng cho phương pháp sản xuất sản phẩm chứa psicoza dưới dạng lỏng được hòa tan trong dung dịch đệm hoặc nước (ví dụ, nước cất). Cơ chất chứa fructoza không bị giới hạn cụ thể, miễn là chứa fructoza dùng cho phản ứng chuyển hóa psicoza, và ví dụ, có thể là sirô sacarit được đồng phân hóa. Khi sirô sacarit được đồng phân hóa được dùng làm cơ chất để sản xuất psicoza, quy trình sản xuất sirô sacarit được đồng phân hóa và quy trình sản xuất psicoza có thể được tiến hành một cách liên tục dưới dạng dây quy trình.

Sản phẩm chứa psicoza thu được theo sáng chế có thể chứa không chỉ psicoza mà còn chứa fructoza, glucoza và các oligosacarit. Tổng hàm lượng psicoza và glucoza chứa trong sản phẩm có thể nhỏ hơn 20% trọng lượng, khi tổng hàm lượng fructoza, glucoza và psicoza chứa trong sản phẩm chứa psicoza là 100% trọng lượng, và ví dụ, có thể là lớn hơn hoặc bằng 9% trọng lượng đến nhỏ hơn 20% trọng lượng. Khi tổng hàm lượng fructoza, glucoza và psicoza chứa trong sản phẩm là 100% trọng lượng, tổng hàm lượng rắn của psicoza và glucoza là lớn hơn hoặc bằng 9% trọng lượng đến nhỏ hơn 20% trọng lượng, và hàm lượng fructoza là lớn hơn 80% trọng lượng đến 91% trọng lượng. Hàm lượng psicoza chứa trong sản phẩm có thể là từ 4% trọng lượng đến 29% trọng lượng, khi tổng hàm lượng fructoza, glucoza và psicoza là 100% trọng lượng.

Chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza dùng được cho sáng chế, ví dụ, enzyme hoặc tế bào vi khuẩn có thể bị ảnh hưởng bởi yếu tố như nhiệt độ phản ứng

chuyển hóa, thời gian phản ứng, hàm lượng fructoza của cơ chất, v.v.. Ví dụ, nó có thể được sử dụng, trong đó tỷ lệ chuyển hóa psicoza từ cơ chất trong vòng 1 giờ ở nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 50 đến 60 là từ 4 đến 29%.

Chất xúc tác sinh học có thể là enzym chuyển hóa psicoza hoặc tế bào vi khuẩn để sản xuất enzym chuyển hóa psicoza, và enzym hoặc tế bào vi khuẩn này có thể được chứa trong hạt, theo đó được nạp vào cột cho phản ứng cố định.

Trong trường hợp chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza là tế bào vi khuẩn, nó có thể là chủng tái tổ hợp trong đó gen mã hóa chủng để sản xuất psicoza epimeraza hoặc psicoza epimeraza được đưa vào.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, chủng sản xuất psicoza epimeraza có thể là chủng có độ ổn định cao và có thể sản xuất psicoza epimeraza với hiệu suất cao, và chủng tái tổ hợp này có thể sử dụng các tế bào chủ khác nhau, ví dụ, chủng *E. coli*, *Bacillus sp.*, chủng *Salmonella sp.* và chủng *Corynebacterium sp.*, v.v., song tốt hơn nếu nó có thể là chủng *Corynebacterium sp.*, đây là chủng GRAS, và có thể là *Corynebacterium glutamicum*.

Trong trường hợp sử dụng chủng tái tổ hợp, psicoza epimeraza có thể sử dụng gen mã hóa của các enzym có nguồn gốc từ các chủng khác nhau, và ví dụ, nó có thể là enzym được tạo ra từ *Treponema primitia* được bộc lộ trong Công bố đơn patent Hàn Quốc số 2014-0021974, enzym được tạo ra từ *Ruminococcus torques* được bộc lộ trong Công bố đơn patent Hàn Quốc số 2014-0080282 và enzym được tạo ra từ *Clostridium scindens* được bộc lộ trong patent Hàn Quốc số 10-1318422, và cũng có thể là enzym được tạo ra từ *Ensifer adhaerens*. Theo một phương án cụ thể, psicoza epimeraza theo sáng chế có thể là enzym được tạo ra từ *Clostridium scindens*, và ví dụ, có thể chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7, và có thể được mã hóa bởi trình tự bazơ chứa trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 9. Trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 8 là trình tự axit nucleic được tối ưu hóa của *E. coli*, và SEQ ID NO: 9 là trình tự axit nucleic được cải biến thích hợp với *Corynebacterium*.

Để sản xuất chủng tái tổ hợp theo một phương án của sáng chế, sự biểu hiện của enzym có thể được điều hòa bằng cách sử dụng trình tự điều hòa nằm ở đầu của trình tự axit nucleic mã hóa psicoza epimeraza, và trình tự điều hòa này về cơ bản

chứa gen khởi đầu phiên mã, và nó có thể còn chứa vùng liên kết với ribosom và/hoặc đoạn trống. Các yếu tố cấu thành trình tự điều hòa có thể được liên kết trực tiếp hoặc được liên kết bằng cách chứa một hoặc nhiều đoạn trình tự axit nucleic liên kết có 1 đến 100 bazơ, ví dụ, 5 đến 80 bazơ.

Theo một phương án cụ thể, gen khởi đầu phiên mã có thể là phân tử axit nucleic biểu hiện trình tự axit nucleic mã hóa psicoza epimeraza ở chủng *Corynebacterium* sp., song có thể là gen khởi đầu tac1, tac2, trc, sod. Gen khởi đầu sod có nguồn gốc từ *Corynebacterium glutamicum*, và tốt hơn nếu chứa trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1 làm vùng lõi. Gen khởi đầu trc là gen khởi đầu có nguồn gốc từ E. coli và được tạo ra bằng cách tổ hợp gen khởi đầu trp và gen khởi đầu lac của UV5. Gen khởi đầu tac1 là gen khởi đầu có nguồn gốc từ E. coli và được tạo ra bằng cách tổ hợp gen khởi đầu trp và gen khởi đầu lac của UV5. Gen khởi đầu tac2 là gen khởi đầu có nguồn gốc từ E. coli và được tạo ra bằng cách tổ hợp gen khởi đầu trp và gen khởi đầu lac của UV5, và là dạng được tối ưu hóa bằng cách cải biến trình tự của gen khởi đầu Tac 1.

Vùng liên kết với ribosom và trình tự trống có thể được liên kết trực tiếp bằng con đường hóa học hoặc được liên kết gián tiếp bằng cách đặt đoạn trình tự axit nucleic liên kết vào giữa. Theo một phương án của sáng chế, vùng liên kết với ribosom và trình tự trống có thể chứa một oligonucleotit được liên kết trình tự theo thứ tự 5' đến 3'. Trình tự axit nucleic của trình tự gen khởi đầu, vùng liên kết với ribosom và trình tự trống theo một phương án của sáng chế được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây. Các phần in đậm và gạch chân trong Bảng 1 chỉ ra vùng liên kết với ribosom, trình tự trống, trình tự liên kết, v.v. trong trình tự điều hòa.

Bảng 1

SEQ ID NO	Trình tự (5'-->3')	Tên
1	aagcgcctcatcagcggtaaccatcacgggttcgggtgcgaaaaaccatgccataacagg aatgttcctttcgaaaattgaggaagccttatgcccttcaaccctacttagctgccaattattccg ggcttgtgacccgctaccgataaataggtcgggtgaaaaatttcgttgcaatatcaacaaaa aggcctatcattgggaggtgtcgcaccaagtacttttgcgaagcgccatctgacggattttca aaagatgtatatgctcgggtgcggaaacctac <u>gaaaggattttttacccatggctgtatacgaactcccagaactcgactacgcatacgcac</u> <u>gaaaggattacaaa</u>	Gen khởi đầu Sod

2	<u>tgacaattaatcatcggctcgtatatattgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacag</u> <u>gaaacagaattccccgggaaaggattacaaa</u>	Gen khởi đầu tac1
3	<u>tgacaattaatcatcggctcgtataatgttaacaatttgtggaattgtgagcggacacaca</u> <u>ggaaacagaccatggaattcgagctcggtacccgggaaaggattacaaa</u>	Gen khởi đầu Tac2
4	tgacaattaatcatcggcctcgtataatgt	Gen khởi đầu trc
5	gaaagga	Vùng liên kết với ribosom
6	ttacaaa	Trình tự trống

Tốt hơn là, psicoza epimeraza theo sáng chế có hoạt tính enzym và độ ổn định nhiệt cao, và theo phương án cụ thể của sáng chế, tổ hợp của gen khởi đầu phiên mã hoặc trình tự điều hòa với gen mã hóa psicoza epimeraza, và tất cả các gen khởi đầu tac1, tac2, trc, trip, sod có thể tạo ra mức biểu hiện protein nhiều hơn mức đầy đủ với psicoza epimeraza dùng trong sáng chế, và khi gen khởi đầu sod được sử dụng, tốt hơn nữa là, do sự gấp nếp protein mạnh mẽ và độ ổn định nhiệt cao có thể thu được.

Phương pháp sản xuất psicoza bằng cách sử dụng chủng tái tổ hợp có thể được thực hiện bằng các phương pháp được bộc lộ trong Công bố đơn patent Hàn Quốc số 2014-0021974, Công bố đơn patent Hàn Quốc số 2014-0080282 và patent Hàn Quốc số 10-1318422, song không giới hạn ở các phương pháp này.

Phương pháp sản xuất psicoza bao gồm bước cho chủng *Corynebacterium* sp. phản ứng với nguyên liệu thô chứa fructoza. Theo một phương án cụ thể, bước cho chủng *Corynebacterium* sp. phản ứng với fructoza có thể được thực hiện bằng bước cho fructoza tiếp xúc với chất mang trong đó chủng hoặc enzym được cố định. Psicoza có thể được sản xuất từ fructoza bằng cách cho enzym hoặc tế bào vi khuẩn cố định phản ứng với cơ chất chứa fructoza, theo đó chuyển hóa fructoza thành psicoza.

Trong phương pháp sản xuất psicoza, phản ứng có thể được thực hiện trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 9,5, ví dụ, độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 9, độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 8, hoặc độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 9.

Ngoài ra, phản ứng có thể được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ 30°C hoặc cao hơn, ví dụ, 40°C. Khi nhiệt độ là 80°C hoặc cao hơn, hiện tượng hóa nâu của cơ chất fructoza có thể xảy ra, và do đó phản ứng có thể được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ từ 40 đến 80°C, ví dụ, từ 50 đến 75°C, từ 60 đến 75°C, hoặc từ 68 đến 75°C.

Khi thời gian phản ứng dài hơn, tỷ lệ chuyển hóa psicoza tăng, và khi thời gian phản ứng ngắn hơn, năng suất tăng. Ví dụ, tốt hơn nếu thời gian phản ứng là 0,5 giờ (30 phút) hoặc lâu hơn, 1 giờ hoặc lâu hơn, 2 giờ hoặc lâu hơn, 3 giờ hoặc lâu hơn, 4 giờ hoặc lâu hơn, 5 giờ hoặc lâu hơn hoặc 6 giờ hoặc lâu hơn. Do tỷ lệ tăng của tỷ lệ chuyển hóa psicoza là không đáng kể hoặc thậm chí giảm, khi thời gian phản ứng là trên 48 giờ, tốt hơn nếu thời gian phản ứng là 48 giờ hoặc ít hơn. Do đó, thời gian phản ứng có thể là từ 0,5 đến 48 giờ, từ 1 đến 48 giờ, từ 2 đến 48 giờ, từ 3 đến 48 giờ, từ 4 đến 48 giờ, từ 5 đến 48 giờ, hoặc từ 6 đến 48 giờ, và về các khía cạnh công nghiệp và kinh tế, có thể là từ 0,5 đến 48 giờ, từ 0,5 đến 36 giờ, từ 0,5 đến 24 giờ, từ 0,5 đến 12 giờ, hoặc từ 0,5 đến 6 giờ, song không giới hạn ở đó. Điều kiện này được chọn làm điều kiện trong đó hiệu quả chuyển hóa từ fructoza thành psicoza là cực đại.

Việc hoạt hóa enzym chuyển hóa fructoza thành psicoza (ví dụ, epimeraza) có thể được kiểm soát bằng ion kim loại, và do đó, để sản xuất psicoza, khi ion kim loại được bổ sung, hiệu quả chuyển hóa từ fructoza thành psicoza, tức là sản xuất psicoza, có thể tăng.

Do đó, thành phần để sản xuất psicoza chứa chủng *Corynebacterium* sp. có thể còn chứa ion kim loại. Ngoài ra, phương pháp sản xuất psicoza bằng cách sử dụng chủng *Corynebacterium* sp. có thể còn bao gồm bước bổ sung ion kim loại. Theo một phương án cụ thể, ion kim loại có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở bước nuôi cấy, hoặc bước nuôi cấy có thể được thực hiện trong môi trường nuôi cấy trong đó ion kim loại được bổ sung vào. Theo phương án khác, ion kim loại có thể được bổ sung vào fructoza, hoặc có thể được bổ sung vào chất mang

trong đó chủng *Corynebacterium* sp. được cố định (trước khi bổ sung fructoza), hoặc có thể được bổ sung vào hỗn hợp chứa chất mang trong đó chủng *Corynebacterium* sp. được cố định và fructoza (sau khi bổ sung fructoza), hoặc có thể được bổ sung vào ở thời điểm bổ sung fructoza ở dạng hỗn hợp hoặc lần lượt.

Ion kim loại có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm ion đồng, ion mangan, ion canxi, ion magie, ion kẽm, ion niken, ion coban, ion sắt, ion nhôm, v.v.. Ví dụ, ion kim loại có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm ion mangan, ion magie, ion niken và ion coban, v.v., và theo một phương án, ion kim loại có thể là ion mangan, ion coban, hoặc hỗn hợp của chúng. Khi lượng ion kim loại được bổ sung nhỏ hơn 0,5mM, tác dụng tăng cường hiệu suất sản xuất psicoza là không đáng kể, và do đó, lượng ion kim loại được bổ sung có thể là 0,5mM hoặc hơn. Mặt khác, do tác dụng này là không đáng kể so với mức dư thừa của nó, nên khi lượng ion kim loại được bổ sung là lớn hơn 5mM, lượng ion kim loại được bổ sung là 5mM hoặc nhỏ hơn. Ví dụ, lượng ion kim loại được bổ sung có thể nằm trong khoảng từ 0,5mM đến 5mM, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,5 mM đến 2mM.

Khi enzyme hoặc tế bào vi khuẩn để sản xuất psicoza theo sáng chế được sử dụng khi được cố định vào chất mang, chất mang này có thể tạo ra môi trường duy trì hoạt động của chủng được cố định hoặc enzyme được sản xuất từ chủng này trong thời gian dài, và có thể là tất cả các chất mang đã biết một cách công khai khả dụng để cố định enzyme. Ví dụ, natri alginat dưới dạng chất mang có thể được sử dụng. Natri alginat là polysacarit dạng keo tự nhiên có nhiều trong thành tế bào của tảo biển, và được cấu trúc bởi axit manuronic (axit β -D-manuronic) và axit gluronic (axit α -L-gluronic), và về mặt thành phần, được tạo ra ngẫu nhiên bằng cách tạo liên kết β -1,4, theo đó cố định vững chắc chủng hoặc enzyme, và do đó nó có thể có lợi trong việc tạo hiệu suất psicoza cao.

Theo một phương án cụ thể, để tăng cường hơn nữa hiệu suất psicoza, nồng độ dung dịch natri alginat nằm trong khoảng từ 1,5 đến 4,0% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, dung dịch nước natri alginat), ví dụ, natri alginat 2,0% (trọng lượng/thể tích) có thể được sử dụng để cố định chủng. Ví dụ, tế bào vi khuẩn của chủng, giống nuôi cấy chứa enzyme được sản xuất bởi chủng này, hoặc dịch tan tế bào của chủng này có thể được cố định vào chất mang natri alginat, bằng cách nhỏ từng giọt dung dịch

hỗn hợp thu được vào khoảng 0,2M dung dịch ion canxi bằng cách sử dụng bơm tiêm và bơm chân không, theo đó tạo ra hạt, sau khi bổ sung tế bào vi khuẩn của chủng, giống nuôi cấy chứa enzym được sản xuất bởi chủng này, hoặc dịch tan tế bào của chủng này vào từ 1 đến 2 lần thể tích dung dịch nước natri alginat của tế bào vi khuẩn của chủng, giống nuôi cấy chứa enzym được sản xuất bởi chủng này, hoặc dịch tan tế bào của chủng này. Enzym có thể được tinh chế bằng phương pháp như phương pháp chung, ví dụ, thẩm tách, kết tủa, hấp phụ, điện di, sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, v.v., từ chủng, giống nuôi cấy hoặc dịch tan tế bào của chủng.

Chất mang trong đó tế bào vi khuẩn hoặc enzym được mang, ví dụ, hạt có thể là hạt để sản xuất psicoza, nó làm giảm cỡ hạt và làm giảm sự trương nở bằng cách xử lý nén hạt, theo đó tăng sản xuất psicoza và có khả năng được sử dụng một cách ổn định trong khoảng thời gian dài.

Một phương án có thể là hạt nén chứa enzym hoặc tế bào vi khuẩn để sản xuất psicoza và axit alginat hoặc muối của nó làm chất mang, và có thể là hạt để sản xuất psicoza có đường kính hạt nén trung bình nằm trong khoảng từ 62 đến 100 trên cơ sở 100 là đường kính hạt trung bình trước khi xử lý nén. Hạt nén có thể làm giảm hiện tượng trương nở khi phản ứng với cơ chất lỏng, và cụ thể, tỷ lệ trương nở của đường kính hạt trung bình có thể nằm trong khoảng từ 100 đến 155, ví dụ, nằm trong khoảng từ 100 đến 130, hoặc nằm trong khoảng từ 100 đến 125, v.v., trên cơ sở 100 là tỷ lệ trương nở của đường kính hạt trước khi tiếp xúc với cơ chất lỏng.

Phương pháp sản xuất hạt nén theo sáng chế có thể bao gồm phương pháp xử lý ion kim loại và phương pháp xử lý ion kim loại và phủ chất ức chế trương nở, và phương pháp làm khô ở nhiệt độ thấp. Ion kim loại cho phương pháp xử lý nén hạt có thể là một hoặc nhiều loại ion kim loại hóa trị hai được chọn từ nhóm bao gồm Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , và Cu^{2+} , và chất ức chế trương nở có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm chitosan, chitin, polyetylen glycol (PEG), polyetylen imin (PEI), chito-oligosacarit và polylysin. Phương pháp làm khô ở nhiệt độ thấp có thể được thực hiện bằng cách làm lạnh ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ $-90^{\circ}C$ đến $-10^{\circ}C$, và làm khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ $-40^{\circ}C$ đến $20^{\circ}C$ ở áp suất nhỏ hơn 10 mtorr.

Trong trường hợp hạt được xử lý nén bằng phương pháp xử lý ion kim loại và phương pháp xử lý ion kim loại và phủ chất ức chế trương nở, tỷ lệ phần trăm mong muốn của hàm lượng ẩm có thể nằm trong khoảng từ 50 đến 88%. Ngoài ra, trong trường hợp hạt nén được sản xuất bằng cách làm khô ở nhiệt độ thấp, tỷ lệ phần trăm mong muốn của hàm lượng ẩm có thể nằm trong khoảng từ 10 đến 50%.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất psicoza dạng lỏng hoặc bột bằng cách thực hiện quy trình tách từ sản phẩm chứa psicoza từ cơ chất chứa fructoza bằng phản ứng cố định bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza.

Một phương án cụ thể đề cập đến phương pháp sản xuất psicoza bằng cách thu sản phẩm lỏng chứa psicoza bao gồm các bước:

sản xuất sản phẩm chứa psicoza từ cơ chất chứa fructoza bằng phản ứng cố định bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza theo sáng chế;

khử màu hoặc khử muối sản phẩm chứa psicoza đã sản xuất được, và

cô sản phẩm đã khử màu hoặc khử muối đến hàm lượng psicoza rắn lớn hơn hoặc bằng 75 Brix (%).

Phương án khác đề cập đến phương pháp sản xuất bột chứa psicoza, bao gồm các bước:

sản xuất sản phẩm chứa psicoza từ cơ chất chứa fructoza bằng phản ứng cố định bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza;

khử màu hoặc khử muối sản phẩm chứa psicoza đã sản xuất được,

tách sản phẩm đã khử màu hoặc khử muối để tách phân đoạn psicoza chứa hàm lượng psicoza lớn hơn hoặc bằng 90% trọng lượng và phân đoạn sản phẩm tinh chế có thành phần sacarit chứa hàm lượng psicoza nhỏ hơn hoặc bằng 5%;

cô phân đoạn psicoza đã tách;

kết tinh dịch cô ở trạng thái quá bão hòa psicoza; và

tách psicoza đã kết tinh từ nước cái kết tinh và làm khô.

Sản phẩm chứa psicoza thu được từ fructoza bằng phương pháp theo sáng chế có thể thu được bằng phương pháp chung, một hoặc nhiều phương pháp như khử muối, khử màu, cô, tách tinh chế với độ tinh khiết cao bằng cách sử dụng sắc

ký SMB, kết tinh, ly tâm, lọc, v.v.. Bước kết tinh có thể kết tinh psicoza bằng cách tạo ra psicoza ở trạng thái quá bão hòa, và một ví dụ về phương pháp để đạt tới trạng thái quá bão hòa có thể là phương pháp làm lạnh dung dịch chứa psicoza, song không giới hạn ở phương pháp này.

Nguyên lý cơ bản của SMB dùng trong bước tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký SMB là mô phỏng dòng ngược của pha cố định và pha động và tạo ra quá trình tách liên tục khả thi bằng cách di chuyển vị trí giữa các cột trong khoảng thời gian xác định. Các chất di chuyển nhanh do ái lực yếu với chất hấp thụ được tập trung tới phân đoạn chứa psicoza có độ tinh khiết cao được tách ra bằng cách di chuyển theo hướng của dòng chất lỏng, và các chất di chuyển chậm do ái lực mạnh với chất hấp thụ được tập trung tới phân đoạn sản phẩm tinh chế có thành phần sacarit chứa hàm lượng psicoza nhỏ hơn hoặc bằng 5% được tách ra bằng cách di chuyển theo hướng của dòng pha cố định. Các cột được nối liên tục, và đầu vào bao gồm hỗn hợp và pha động, và đầu ra bao gồm phân đoạn psicoza có độ tinh khiết cao và phân đoạn chứa hàm lượng psicoza thấp. SMB thường gồm bốn vùng, và được chia theo vị trí đầu vào và đầu ra. Công nghệ SMB có thể tạo ra quá trình tách liên tục khả thi và thu được sản phẩm có nồng độ cao và hiệu suất cao, so với quy trình tách theo mẻ. Thử nghiệm SMB có thể được thực hiện bằng cách xác định điều kiện cụ thể liên quan đến các yếu tố cơ bản như tỷ lệ hấp phụ, sự khuếch tán và sự phân tán của mỗi chất.

Psicoza có thể được sản xuất một cách liên tục, bằng cách tách psicoza có độ tinh khiết cao được phân đoạn và phân đoạn sản phẩm tinh chế được tách có thành phần sacarit chứa hàm lượng psicoza nhỏ hơn hoặc bằng 5%.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế là phương pháp sản xuất sản phẩm chứa psicoza từ cơ chất chứa fructoza bằng phản ứng cố định bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza và phương pháp sản xuất liên tục psicoza dạng lỏng hoặc dạng bột bằng cách tách sản phẩm chứa psicoza thu được bằng phương pháp này, và có ưu điểm là thu được psicoza với năng suất cao trong thời gian ngắn ở quy mô công nghiệp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Thiết lập hệ thống sản xuất psicoza

1-1: Chuẩn bị chủng sản xuất psicoza

Gen mã hóa psicoza epimeraza có nguồn gốc từ *Clostridium scindens* (*Clostridium scindens* ATCC 35704) (gen DPE; ngân hàng gen: EDS06411.1) được tổng hợp dưới dạng polynucleotit cải biến được tối ưu hóa cho *E. coli* và gọi là CDPE. Polynucleotit được tối ưu hóa cho *E. coli* và gen khởi đầu *sod* và gen kết thúc T7 thu được từ vector pET21a được thu dưới dạng mỗi khuôn thông qua PCR, và các trình tự này được liên kết dưới dạng một khuôn bằng phương pháp PCR chồng lắp và nhân dòng trong vector pGEM T-easy thông qua việc nhân dòng vector T, để xác nhận trình tự bao gồm gen khởi đầu *sod* (SEQ ID NO: 1), trình tự CDPE được tối ưu hóa nêu trong SEQ ID NO: 8 và gen kết thúc T7.

Toàn bộ polynucleotit này được cài vào cùng vị trí enzyme giới hạn của vector biểu hiện pCES208 (J. Microbiol. Biotechnol., 18:639-647, 2008) với các enzyme giới hạn NotI và XbaI (NEB), để tạo ra vector tái tổ hợp pCES208/psicoza epimeraza (pCES_sodCDPE). Bản đồ phân cắt của vector tái tổ hợp được tạo ra (pCES_sodCDPE) được thể hiện trên FIG.1.

Corynebacterium glutamicum được biến nạp vector tái tổ hợp đã sản xuất được (pCES_sodCDPE) bằng biến nạp điện. Khuẩn lạc được thu và ủ trong 4 ml môi trường LB (trypton 10 g/L, NaCl 10g/L, dịch chiết nấm men 5g/L) có bổ sung Kanamycin ở nồng độ cuối 15ug/ml, và tiếp theo được nuôi cấy trong khoảng 16 giờ trong các điều kiện nuôi cấy 30°C và 250 vòng/phút. Tiếp theo, 1ml dung dịch nuôi cấy được thu và ủ trong 100ml môi trường LB chứa 15ug/ml Kanamycin, và việc nuôi cấy được tiếp tục trong hơn 16 giờ. Sau khi làm tan tế bào nuôi cấy bằng máy nghiền hạt, chỉ thu dịch nổi và trộn với dung dịch đệm mẫu theo tỷ lệ trộn 1:1, và tiếp theo được gia nhiệt ở 100°C trong 5 phút. Các mẫu sản xuất được chạy điện di trên gel SDS-PAGE 12% (thành phần: gel chạy – 3,3 ml H₂O, 4,0 ml acrylamit 30%, 2,5 ml dung dịch đệm Tris 1,5M (độ pH 8,8), 100μl SDS 10%, 100μl APS 10%, 4μl TEMED/gel hội tụ – 1,4 ml H₂O, 0,33 ml acrylamit 30%, 0,25 ml dung dịch đệm Tris 1,0M (độ pH 6,8), 20μl SDS 10%, 20μl APS 10%, 2μl TEMED) ở 180V trong khoảng 50 phút, để xác nhận sự biểu hiện protein. Sau khi sự biểu hiện của CDPE được xác nhận trên gel SDS-PAGE, việc tinh chế đuôi His được thực hiện bằng cách sử dụng nhựa Ni-NTA và tỷ lệ biểu hiện được tính bằng

cách sử dụng công thức tính (tỷ lệ biểu hiện (%)) = (protein tinh sạch (mg)/tổng lượng protein hòa tan (mg)) X 100), để đo chính xác mức biểu hiện. Thử nghiệm nạp *Corynebacterium glutamicum* đã chuẩn bị sản xuất được 16,62 mg tổng lượng protein hòa tan trong nước và 1,74 mg protein enzym tinh sạch.

1-2: Sản xuất hạt cố định

Để sản xuất psicoza từ fructoza bằng cách sử dụng chủng tái tổ hợp sản xuất psicoza epimeraza trong Ví dụ 1-1, các tế bào được thu bằng cách ly tâm trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Tiếp theo, huyền phù tế bào được xử lý bằng 0,05% (thể tích) chất nhũ hóa (Ryoto(tkSugar Ester, M-1695) trong thể tích cuối và xử lý ở 35°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) trong 60 phút. Khi phản ứng kết thúc, tế bào vi khuẩn được thu sau khi loại bỏ dịch nổi chứa chất nhũ hóa cũng bằng cách ly tâm.

Để sản xuất hạt cố định, tế bào vi khuẩn đã thu được được trộn với nước cất đến nồng độ tế bào vi khuẩn cuối 5% (thể tích), và 5% (thể tích) tế bào vi khuẩn đã thu được được trộn với 4% (thể tích) axit alginic được hòa tan trong nước theo tỷ lệ trộn 1:1, và được làm lạnh ở 4°C để loại bỏ bong bóng sinh ra trong quá trình trộn. Dung dịch trộn đã được làm lạnh này được ép đùn qua Needle (đường kính trong 0,20~0,30mm) và được tạo thành dạng giọt do trọng lượng, và dung dịch trộn dạng giọt này được xử lý bằng cách nhỏ giọt vào dung dịch canxi clorua (CaCl_2) 100mM, để tạo ra các hạt hình cầu hoặc hình elip (đường kính 2,0~2,2mm). Các hạt tạo ra được ngâm trong dung dịch canxi clorua 100mM và trộn đều bằng máy khuấy để xử lý tiếp.

Sau khi toàn bộ dung dịch trộn được ép đùn, các hạt được xử lý tiếp bằng cách giữ lạnh trong 4~6 giờ, và tiếp theo được xử lý trong khoảng 6 giờ ở trạng thái lạnh với việc thay bằng dung dịch canxi clorua 100mM mới. Sau khi các hạt được xử lý hoàn toàn, các hạt được hút bọt và chất ẩm được loại bỏ hoàn toàn. Các hạt này được khuấy trong 10 phút sau khi bổ sung nước gấp 3 lần thể tích hạt. Quy trình này được lặp lại ba lần để loại bỏ dung dịch canxi clorua. Sau khi loại bỏ hoàn toàn chất ẩm khỏi hạt ướt, cơ chất chứa fructoza (50 brix fructoza và 1mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) được đưa vào gấp 3 lần thể tích hạt, và tiếp theo khuấy trong 10 phút. Bước xử lý này được thực hiện 2 lần hoặc hơn để thay bằng cơ chất chứa fructoza dùng làm cơ

chất phản ứng. Cơ chất phản ứng này được điều chỉnh đến độ pH 6,8~7,2 bằng NaOH 3N. Fructoza lỏng hoặc fructoza kết tinh có thể được dùng làm cơ chất phụ thuộc vào loại sản phẩm.

Các hạt được thay bằng cơ chất phản ứng được nạp vào cột phản ứng cố định, và tiếp theo được sử dụng để sản xuất sirô psicoza.

1-3: Sản xuất sirô psicoza

Sau khi nạp các hạt sản xuất được trong Ví dụ 1-2 vào cột phản ứng cố định, sirô psicoza được sản xuất trong các điều kiện phản ứng sau. Nguyên liệu thô là 50% hàm lượng rắn, và bao gồm 88,8% trọng lượng fructoza và 4,8% trọng lượng glucoza, trong 100% trọng lượng tổng hàm lượng rắn của sacarit của cơ chất chứa fructoza (độ pH 6,8~7,1) với hàm lượng rắn lớn hơn hoặc bằng 50% (trọng lượng), được cấp cho cột phản ứng cố định dưới đây, theo đó tạo ra sacarit hỗn hợp của sirô psicoza.

<Các điều kiện phản ứng của cột cố định>

(1) Nhiệt độ phản ứng: 50°C là nhiệt độ bên trong của vỏ cột

(2) Cơ chất phản ứng: cơ chất chứa 88,8% trọng lượng fructoza và 4,8% trọng lượng glucoza trong tổng hàm lượng rắn của cơ chất chứa fructoza với hàm lượng rắn lớn hơn hoặc bằng 50% (trọng lượng), và chứa ít hơn 6,4% trọng lượng các sacarit khác có độ trùng hợp (DP: Degree of Polymerization) bằng 1 hoặc cao hơn ngoại trừ fructoza và glucoza.

(3) Tiêu chuẩn sản xuất: sản xuất sirô chứa 24% trọng lượng hàm lượng psicoza tính theo 100% trọng lượng tổng hàm lượng sacarit rắn trong sản phẩm.

Kết quả của phản ứng là 24% trọng lượng sirô psicoza có tỷ lệ trọng lượng glucoza:fructoza:psicoza:oligosacarit là 5:65:24:6 đã được thu từ dung dịch phản ứng.

Ví dụ 2: Sản xuất psicoza phụ thuộc vào tốc độ dòng phản ứng tăng

Sau khi nạp các hạt sản xuất được trong Ví dụ 1-2 vào cột phản ứng cố định, lượng sirô psicoza sản xuất được phụ thuộc vào tốc độ dòng của cột trong các điều kiện phản ứng sau được so sánh bằng cách cấp cơ chất phản ứng ở 5 lần thể tích cột trong 1 giờ theo tỷ lệ tăng tốc độ dòng, tại thời điểm khi hàm lượng psicoza (%)

trong cột là ổn định. Cột này được cấp nguyên liệu thô dung dịch cơ chất phản ứng với 50% (trọng lượng) hàm lượng rắn chứa hàm lượng fructoza lớn hơn hoặc bằng 88,8% trọng lượng và hàm lượng glucoza là 4,8% trọng lượng, trên cơ sở 100% trọng lượng tổng hàm lượng sacarit rắn.

Việc phân tích hàm lượng sacarit được phát hiện bằng RI bằng cách tiêm 10 μ L mẫu được pha loãng thích hợp bằng dung môi nước ở tốc độ dòng 0,6ml/phút bằng cách sử dụng cột Aminex HPX-87C (80°C) của hãng Biorad, và trong vòng 30 phút phân tích, fructoza, psicoza và các sacarit khác có DP bằng 1 hoặc hơn được hợp nhất, theo đó phân tích mỗi vùng. Ngoài ra, để phân tích hàm lượng bằng mỗi thành phần sacarit, các giá trị tương ứng với vùng bởi mỗi thành phần sacarit được phân tích dưới dạng hàm lượng của mỗi sacarit, khi giá trị tổng vùng của fructoza, psicoza và các sacarit khác có DP bằng 1 hoặc hơn được thể hiện trong vòng 30 phút phân tích.

<Các điều kiện phản ứng của cột cố định>

(1) Nhiệt độ phản ứng: 50°C là nhiệt độ bên trong của vỏ cột,

(2) Cơ chất phản ứng: cơ chất chứa 88,8% trọng lượng fructoza và 4,8% trọng lượng glucoza tính theo 100% trọng lượng tổng chất rắn sacarit của cơ chất chứa fructoza với hàm lượng rắn 50% (trọng lượng) (độ pH 6,8~7,2) và chứa ít hơn 6,4% các sacarit khác có DP bằng 1 hoặc hơn ngoại trừ fructoza và glucoza, là nguyên liệu thô chứa 94,9% trọng lượng hàm lượng fructoza và 5,1% trọng lượng glucoza trong cơ chất nguyên liệu thô, khi chúng đã được chuyển hóa trên cơ sở 100% trọng lượng tổng hàm lượng của fructoza, glucoza và psicoza,

(3) Tốc độ dòng của cột: hàm lượng psicoza trong sản phẩm được đánh giá phụ thuộc vào tỷ lệ tăng tốc độ dòng, khi phản ứng được thực hiện bằng cách tăng tốc độ dòng phản ứng từ 1 đến 20 lần, trên cơ sở 1 là tốc độ dòng phản ứng tại đó psicoza chứa trong sản phẩm chứa psicoza được sản xuất với lượng lớn hơn hoặc bằng 25% trọng lượng tính theo 100% trọng lượng tổng hàm lượng sacarit rắn trong sản phẩm chứa psicoza,

(4) Tiêu chuẩn sản xuất: tổng hàm lượng glucoza và psicoza nằm trong khoảng lớn hơn hoặc bằng 9% trọng lượng đến nhỏ hơn 20% trọng lượng, tính theo 100% trọng lượng tổng hàm lượng của fructoza, glucoza và psicoza trong sản phẩm.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây và trên FIG.1. Trong Bảng 2, hàm lượng của mỗi sacarit được thể hiện, trên cơ sở 100% trọng lượng tổng hàm lượng fructoza, glucoza và psicoza trong tổng hàm lượng sacarit rắn trong sản phẩm.

Bảng 2

Tỷ lệ tăng tốc độ dòng	Hàm lượng fructoza (% trọng lượng)	Hàm lượng psicoza (% trọng lượng)	Hàm lượng glucoza (% trọng lượng)	Tổng hàm lượng psicoza và glucoza (% trọng lượng)
Cơ chất trước khi phản ứng	94,9	0	5,1	5,1
1	67,8	27,1	5,1	32,2
2	69,7	25,2	5,1	30,3
4	73,5	21,4	5,1	26,5
6	76,7	18,2	5,1	23,3
8	79,6	15,3	5,1	20,4
10	81,8	13,1	5,1	18,2
12	83,8	11,1	5,1	16,2
16	87,5	7,4	5,1	12,5
20	90,3	4,6	5,1	9,7

Như được thể hiện trong Bảng 2, khi tổng hàm lượng rắn của fructoza, glucoza và psicoza chứa trong cơ chất phản ứng là 100% trọng lượng, nguyên liệu thô chứa 94,9% hàm lượng fructoza và 5,1% glucoza được sử dụng. Do fructoza được chuyển hóa thành psicoza, khi phản ứng chuyển hóa tiếp diễn, 94,9% hàm lượng fructoza dưới dạng cơ chất bị giảm dần, và hàm lượng psicoza tăng, có sự duy trì 5,1% glucoza.

Khi tăng tốc độ dòng của cột, tỷ lệ chuyển hóa psicoza giảm dần. Hàm lượng psicoza là 4,6%, khi được phản ứng ở tốc độ dòng cao hơn 20 lần tốc độ dòng sản xuất 27,1% hàm lượng psicoza trong Bảng 2. Khi được phản ứng ở tốc độ dòng cao hơn 10 lần tốc độ dòng sản xuất 25% hàm lượng psicoza của Ví dụ 1, thành phần sirô có ít hơn 20% trọng lượng tổng hàm lượng glucoza và psicoza được sản xuất.

Sự thay đổi về hàm lượng psicoza bởi sự thay đổi về tốc độ dòng của cột trong Bảng 2 được thể hiện trên FIG.1, theo đó thể hiện sự thay đổi về hàm lượng psicoza trong sản phẩm theo tỷ lệ tăng tốc độ dòng của cột.

Như được thể hiện trên FIG.2, khi các trị số tốc độ dòng của cột được đưa vào công thức, có thể thấy rằng điều kiện sản xuất đối với thành phần sirô chứa lớn hơn hoặc bằng 9,7% trọng lượng đến nhỏ hơn 20% trọng lượng tổng hàm lượng rắn của glucoza và psicoza, trên cơ sở 100% trọng lượng tổng hàm lượng fructoza, glucoza và psicoza trong sản phẩm, có thể được kiểm soát bằng từ 8,5 đến 20 lần tốc độ dòng để sản xuất thành phần sirô chứa 25% trọng lượng hàm lượng psicoza trong Ví dụ 1. Kết quả này thể hiện tốc độ dòng tăng khoảng 10 lần để sản xuất thành phần sirô chứa 25% trọng lượng hàm lượng psicoza trong Ví dụ 1, tốc độ dòng của cột khả dụng để sản xuất thành phần sirô có ít hơn 20% trọng lượng tổng hàm lượng rắn của glucoza và psicoza, khi tốc độ dòng tăng khoảng 8,5 lần so với tốc độ dòng để sản xuất thành phần sirô chứa 25% trọng lượng hàm lượng psicoza trong Ví dụ 1.

Ngoài ra, theo kết quả phân tích hàm lượng của các vật liệu sản xuất được trong đó việc sản xuất diễn ra hoàn toàn trong phản ứng có tốc độ dòng của cột cao hơn 10 lần trong các điều kiện phản ứng cố định bằng cách sử dụng công thức nêu trên FIG.2, thành phần chứa 76,5% trọng lượng fructoza, 12,3% trọng lượng psicoza, 4,8% trọng lượng glucoza, và 6,4% các sacarit khác có DP bằng 1 hoặc hơn, trên cơ sở 100% trọng lượng tổng hàm lượng sacarit rắn được thu, khi nó được chuyển hóa là 100% trọng lượng tổng hàm lượng của fructoza, glucoza và psicoza, tổng hàm lượng psicoza và glucoza có thể được sản xuất là 18,2% trọng lượng.

Ví dụ 3: Đánh giá độ ổn định phản ứng

Sau khi nạp các hạt sản xuất được trong Ví dụ 1-2 vào cột phản ứng cố định, cơ chất chứa fructoza và điều kiện phản ứng là giống như trong Ví dụ 2.

Bằng cách sử dụng công thức nêu trên FIG.2, tốc độ dòng trong tốc độ dòng của cột trong đó tổng hàm lượng psicoza và glucoza là nhỏ hơn 20% trọng lượng được chọn và cố định, trên cơ sở 100% trọng lượng tổng hàm lượng fructoza, glucoza và psicoza trong các sacarit của sản phẩm, và sự thay đổi về hàm lượng psicoza của sản phẩm được đo ở số ngày khác nhau đối với phản ứng. Cụ thể, kết

quả đo sự thay đổi về hàm lượng psicoza chứa trong sản phẩm được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây, bằng cách cố định tốc độ dòng ở mức cao hơn 8,5 lần tốc độ dòng sản xuất 25% trọng lượng hàm lượng psicoza tính theo 100% trọng lượng tổng hàm lượng sacarit rắn trong Ví dụ 1 và cho phản ứng trong 15 ngày.

<Các điều kiện của phản ứng cố định >

(1) Nhiệt độ phản ứng: 50°C,

(2) Cơ chất phản ứng: cơ chất phản ứng giống như trong Ví dụ 2,

(3) Điều kiện cột: tốc độ dòng tăng 8,5 lần so với tốc độ dòng sản xuất 25% trọng lượng hàm lượng psicoza tính theo 10% trọng lượng tổng hàm lượng sacarit rắn trong Ví dụ 1, và

(4) Tiêu chuẩn sản xuất: tổng hàm lượng glucoza và psicoza nằm trong khoảng từ lớn hơn hoặc bằng 15% trọng lượng đến nhỏ hơn 20% trọng lượng, khi tổng hàm lượng fructoza, glucoza và psicoza trong sản phẩm là 100% trọng lượng.

Bảng 3

Thời gian phản ứng (ngày)	Hàm lượng fructoza (% trọng lượng)	Hàm lượng psicoza (% trọng lượng)	Tổng hàm lượng psicoza và glucoza (% trọng lượng)
0	80,5	14,4	19,5
1	80,1	14,8	19,9
2	80,1	14,8	19,9
4	80,1	14,8	19,9
6	80,1	14,8	19,9
8	80,1	14,8	19,9
9	80,2	14,7	19,8
12	80,3	14,6	19,7
13	80,5	14,4	19,5
14	80,6	14,3	19,4
15	80,7	14,2	19,3

Như được thể hiện trong Bảng 3, hàm lượng psicoza trong sản phẩm được đo trong quá trình phản ứng trong 15 ngày ở tốc độ dòng phản ứng cao, thành phần

chứa hàm lượng psicoza lớn hơn hoặc bằng 10% trọng lượng đến nhỏ hơn 15% trọng lượng và tổng hàm lượng psicoza và glucoza lớn hơn hoặc bằng 15% trọng lượng đến nhỏ hơn 20% trọng lượng, trên cơ sở 100% trọng lượng tổng hàm lượng fructoza, glucoza và psicoza, có thể được sản xuất một cách ổn định trong 15 ngày.

Ví dụ 5: Tái sản xuất psicoza liên tục

Hệ thống sản xuất psicoza được thiết lập dưới dạng quy trình sản xuất liên tục bằng cách sản xuất liên tục sirô psicoza có ít hơn 20% trọng lượng tổng hàm lượng glucoza và psicoza, khi tổng hàm lượng fructoza, glucoza và psicoza chứa trong sản phẩm là 100% trọng lượng, và tách phân đoạn psicoza khỏi sản phẩm và phân đoạn sản phẩm tinh chế fructoza.

Cụ thể, phản ứng chuyển hóa psicoza được thực hiện bằng cách kiểm soát tốc độ dòng của cột phản ứng chuyển hóa psicoza trong điều kiện sản xuất nhỏ hơn 20% trọng lượng glucoza và psicoza trên cơ sở 100% trọng lượng tổng hàm lượng của fructoza, glucoza và psicoza chứa trong sản phẩm, và phân đoạn psicoza có độ tinh khiết lớn hơn hoặc bằng 90% và phân đoạn sản phẩm tinh chế fructoza chứa lượng dư fructoza được tách khỏi sản phẩm chứa psicoza bằng cách sử dụng quy trình tách có độ tinh khiết cao.

Sơ đồ của toàn bộ quy trình phản ứng sản xuất psicoza được thể hiện trên FIG.4, và quy trình này có thể được lồng vào hoặc loại trừ theo chất lượng sản xuất hoặc quy trình sản xuất. Quy trình sản xuất chi tiết là như sau.

Sau khi fructoza lỏng có hàm lượng rắn 75 Brix (%) (khi tổng hàm lượng rắn là 100% trọng lượng, hàm lượng fructoza được chứa là 88,8% trọng lượng) được bổ sung bằng nước đến hàm lượng rắn 50 Brix (%), và được điều chỉnh đến độ pH 7,0 bằng cách bổ sung NaOH 5N, để sản xuất nguyên liệu thô của phản ứng. Nguyên liệu thô này được cấp vào cột phản ứng đã được nạp các hạt cố định tế bào vi khuẩn của Ví dụ 1-2 (nhiệt độ không đổi 50°C) và sirô chứa ít hơn 20% trọng lượng glucoza và psicoza được sản xuất về cơ bản là theo phương pháp nêu trong Ví dụ 3, khi fructoza trong nguyên liệu thô được chuyển hóa thành psicoza, trên cơ sở 100% trọng lượng tổng hàm lượng fructoza, glucoza và psicoza của nguyên liệu thô phản ứng.

Về quy trình tách sirô psicoza sản xuất được, sirô chứa psicoza đã sản xuất được khử màu ở 50°C trong 30 phút bằng cách bổ sung 0,05% (trọng lượng) cacbon hoạt tính vào hàm lượng rắn trong sirô, và sirô chứa psicoza đã khử màu hoàn toàn được cho qua bộ lọc micro, theo đó loại bỏ than hoạt tính.

Sirô chứa psicoza trong đó than hoạt tính đã được loại bỏ được khử muối bằng cách cho chảy qua cột được nạp nhựa trao đổi cation, nhựa trao đổi anion và nhựa hỗn hợp của nó ở nhiệt độ trong phòng để loại bỏ các tạp chất như thành phần ion, v.v., ở tỷ lệ thể tích 2 lần (1~2 lần) nhựa trao đổi cation/giờ. Psicoza được tách ở tỷ lệ 0,15:1 của tổng trọng lượng chất rắn trong nguyên liệu thô dùng cho phản ứng chuyển hóa psicoza, trong tầng chuyển động mô phỏng (simulated moving bed: SMB) đã nạp nhựa trao đổi ion loại canxi (Ca^{2+}) ở tốc độ dòng 0,06SV, trong điều kiện mà tỷ lệ tách psicoza:fructoza là 0,7:1, để thu được phân đoạn psicoza có độ tinh khiết cao (độ tinh khiết psicoza 96%) với 4 Brix (%) hàm lượng rắn. Nước cất ba lần được dùng cho pha động của cột do dùng làm thực phẩm.

Đồng thời, phân đoạn sản phẩm tinh chế chứa 5,5% glucoza, 83,9% fructoza, 3,4% psicoza, và 4,2% các sacarit khác là hàm lượng thành phần ngoại trừ phân đoạn psicoza có độ tinh khiết cao được thu ở tỷ lệ 0,85, khi tổng trọng lượng chất rắn của nguyên liệu thô dùng cho phản ứng chuyển hóa psicoza là 1. Sau khi được phân đoạn, sản phẩm tinh chế được chuyển và đặt vào hàm lượng rắn 50 Brix (%) dưới dạng cơ chất chứa fructoza của quá trình chuyển hóa psicoza, và được điều chỉnh đến độ pH 7,0 bằng cách sử dụng NaOH 5N, sẽ được cấp vào cột phản ứng và được tái sinh để thực hiện phản ứng chuyển hóa psicoza.

Psicoza có độ tinh khiết cao tách được bằng SMB được chuyển sang thùng trữ và cô đến hàm lượng rắn 80 Brix (%) hoặc hơn ở 60°C, và được làm lạnh đến trạng thái quá bão hòa theo phương pháp kết tinh lạnh, tạo ra tinh thể psicoza. Tiếp theo, bột psicoza có độ tinh khiết psicoza 99% cuối cùng được thu ở hiệu suất 81% bằng cách ly tâm loại nước và làm khô.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất sản phẩm chứa psicoza từ cơ chất chứa fructoza bằng phản ứng cố định bằng cách sử dụng chất xúc tác sinh học để sản xuất psicoza,

trong đó chất xúc tác sinh học này có tỷ lệ chuyển hóa psicoza từ cơ chất chứa fructoza nằm trong khoảng từ 20% đến 29% ở nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 50°C đến 60°C trong vòng 1 giờ,

trong đó phản ứng cố định được thực hiện ở tốc độ dòng phản ứng là từ 8,5 đến 20, trên cơ sở 1 là tốc độ dòng phản ứng tại đó psicoza chứa trong sản phẩm chứa psicoza được sản xuất với lượng lớn hơn hoặc bằng 25% trọng lượng tính theo 100% trọng lượng tổng hàm lượng sacarit rắn trong sản phẩm chứa psicoza, và

trong đó hàm lượng rắn của psicoza và glucoza là lớn hơn hoặc bằng 9% trọng lượng đến nhỏ hơn 20% trọng lượng, tính theo 100% trọng lượng hàm lượng rắn của psicoza, glucoza và fructoza chứa trong sản phẩm chứa psicoza.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phản ứng cố định được thực hiện ở tốc độ dòng phản ứng là từ 10 đến 18, trên cơ sở 1 là tốc độ dòng phản ứng tại đó psicoza chứa trong sản phẩm chứa psicoza được sản xuất với lượng lớn hơn hoặc bằng 25% trọng lượng tính theo 100% trọng lượng tổng hàm lượng sacarit rắn trong sản phẩm chứa psicoza.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phản ứng cố định được thực hiện để đạt được hàm lượng rắn của psicoza và glucoza là 9% trọng lượng đến nhỏ hơn 20% trọng lượng, và hàm lượng fructoza rắn từ 80% đến 91% trọng lượng, trên cơ sở 100% trọng lượng tổng hàm lượng của fructoza, glucoza và psicoza trong sản phẩm chứa psicoza.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cơ chất chứa fructoza chứa từ 75% trọng lượng đến 95% trọng lượng fructoza tính theo 100% trọng lượng tổng hàm lượng sacarit rắn trong cơ chất.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cơ chất chứa từ 80% trọng lượng đến 95% trọng lượng fructoza tính theo 100% trọng lượng tổng hàm lượng sacarit rắn trong cơ chất chứa fructoza.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cơ chất chứa fructoza là sirô sacarit được đồng phân hóa.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất xúc tác sinh học là enzym để sản xuất psicoza hoặc tế bào vi khuẩn sản xuất psicoza.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phản ứng cố định được thực hiện bằng cách sử dụng cột cố định được nạp hạt chứa enzym để sản xuất psicoza hoặc tế bào vi khuẩn sản xuất psicoza.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phản ứng cố định được thực hiện bằng cách sử dụng hạt chứa tế bào vi khuẩn hoặc enzym được xử lý bằng ion kim loại hóa trị hai và được bao bằng một hoặc nhiều chất ức chế trương nở được chọn từ nhóm bao gồm chitosan, chitin, polyetylen glycol (polyethylene glycol - PEG), polyetylen amin (polyethylene amine - PEI), chito-oligosacarit và polylysin.
10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phản ứng cố định được thực hiện bằng cách sử dụng hạt chứa tế bào vi khuẩn hoặc enzym được xử lý bằng cách làm khô ở nhiệt độ thấp và được nén.
11. Phương pháp theo điểm 7, trong đó tế bào vi khuẩn sản xuất psicoza là chủng *Corynebacterium* được biến nạp gen psicoza epimeraza.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó chủng *Corynebacterium* là một hoặc nhiều chủng *Corynebacterium* sp. được chọn từ nhóm bao gồm *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* và *Corynebacterium efficiens*.
13. Phương pháp theo điểm 7, trong đó tế bào vi khuẩn sản xuất psicoza là chủng sản xuất psicoza epimeraza.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phản ứng cố định được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 80°C trong 0,5 đến 48 giờ.
15. Phương pháp sản xuất psicoza bằng cách thu sản phẩm lỏng chứa psicoza, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

thu sản phẩm chứa psicoza theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14,

khử màu hoặc khử muối sản phẩm chứa psicoza đã sản xuất được, và
cô sản phẩm đã khử màu hoặc khử muối đến hàm lượng rắn của psicoza lớn hơn hoặc bằng 75 Brix (%).

16. Phương pháp sản xuất psicoza bao gồm sản xuất bột chứa psicoza, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

thu sản phẩm chứa psicoza theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14,

khử màu hoặc khử muối sản phẩm chứa psicoza đã sản xuất được,

tách sản phẩm đã khử màu hoặc khử muối để tách phân đoạn psicoza chứa lớn hơn hoặc bằng 90% trọng lượng hàm lượng psicoza và phân đoạn sản phẩm tinh chế,

cô phân đoạn psicoza đã tách,

sản xuất dịch cô ở trạng thái quá bão hòa psicoza để kết tinh psicoza, và

tách psicoza đã kết tinh từ nước cái kết tinh và làm khô.

Fig.1

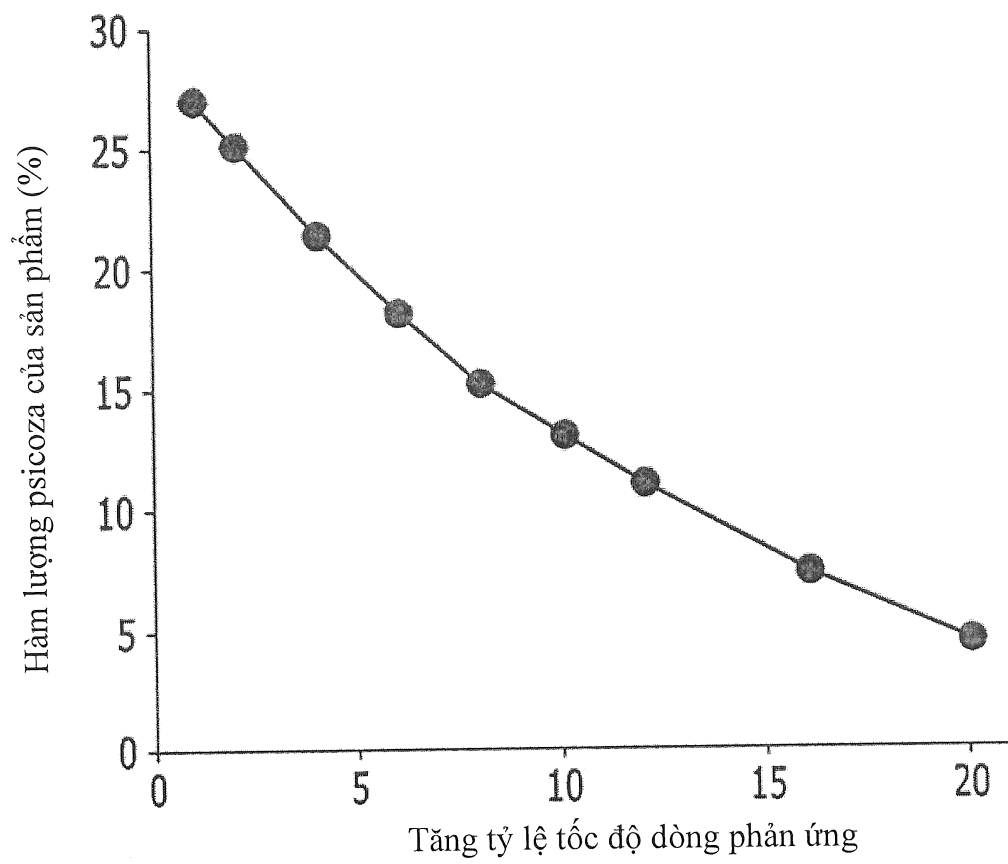


Fig.2

Phương trình: Đa thức, Bậc hai

$$f=y_0+a*x+b*x^2$$

Các kết quả cho giải pháp tổng thể phù hợp nhất

R	Rsqr	Adj Rsqr	Sai số chuẩn ước tính		
0,9995	0,9991	0,9988	0,2537		
	Hệ số	Sai số chuẩn	t	P	VIF
y0	26,7829	0,2192	122,1627	<0,0001	6,7233<
a	-3,6566	0,1042	-35,1008	<0,0001	43,0514<
b	0,1418	0,0099	14,3734	<0,0001	24,7607<

Fig.3

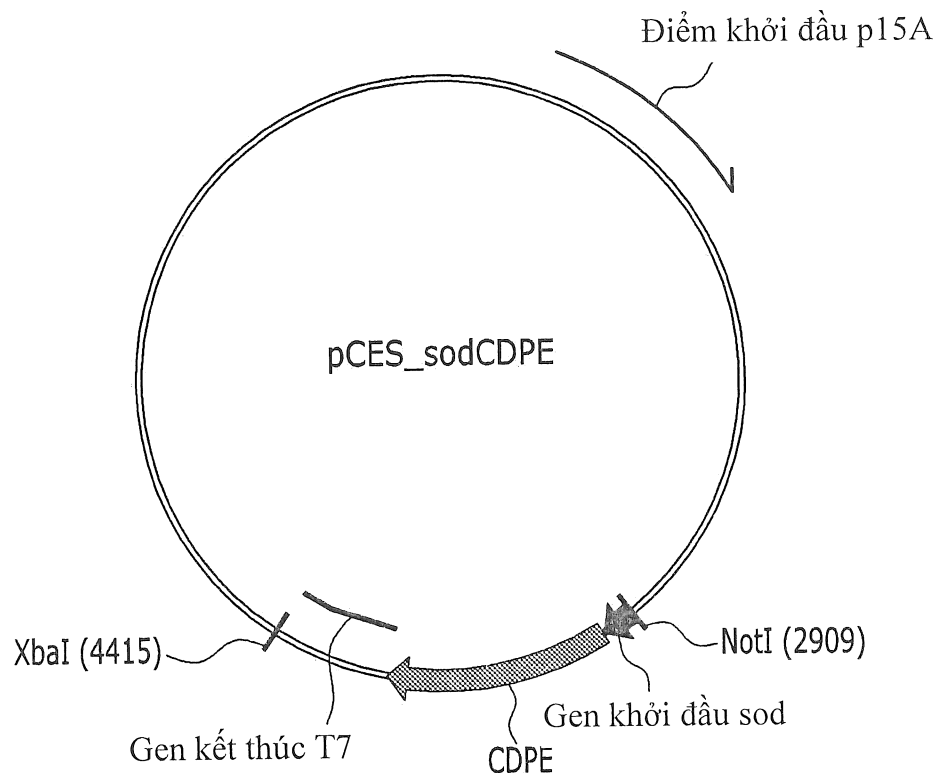
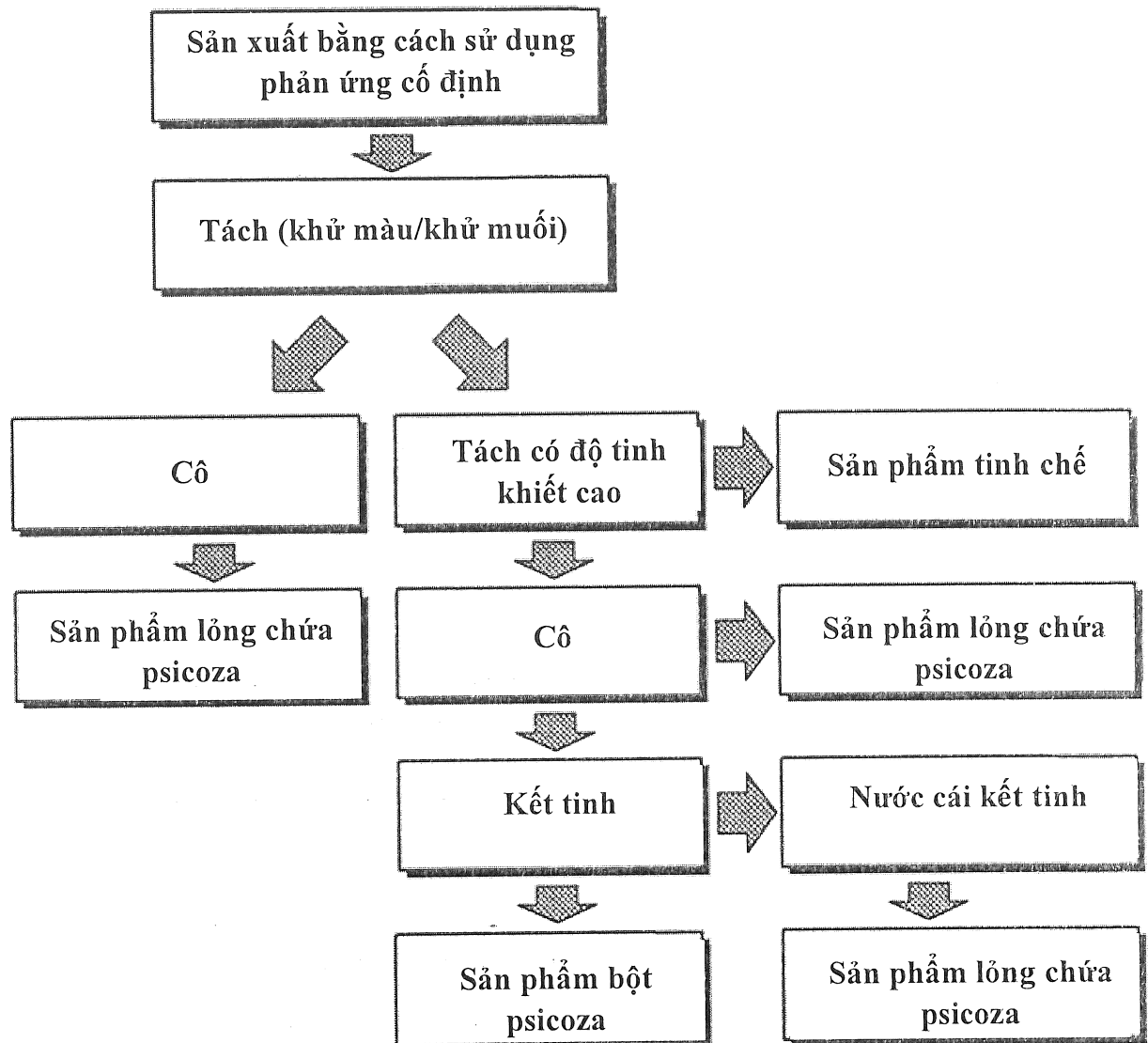


Fig.4



<110> SAMYANG GENEX CORPORATION

<120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PSICOZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM CHỨA PSICOZA TỪ CƠ CHẤT CHỨA FRUCTOZA

<130> OPP20163639KR

<160> 9

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 356

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> gen khởi đầu sod (6)

<400> 1	
aagcgcctca tcagcggtaa ccatcacggg ttcgggtgcg aaaaaccatg ccataacagg	60
aatgttcctt tcgaaaattg aggaagcctt atgcccttca accctactta gctgccaatt	120
attccgggct tgtgaccgc tacccgataa ataggctcggc tgaaaaattt cggttgcaata	180
tcaacaaaaa ggccatatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga agcgccatct	240
gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tacgaaagga tttttaccc	300
atggctgtat acgaactccc agaactcgac tacgcatacg acgaaaggat tacaaa	356

<210> 2

<211> 93

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> gen khởi đầu Tac1 (4)

<400> 2	
tgacaattaa tcacggctc gtatatgttg tggaattgtg agcggataac aatttcacac	60
aggaaacaga attcccgggg aaaggattac aaa	93

<210> 3
 <211> 112
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> gen khởi đầu Tac2 (4)

 <400> 3
 tgacaattaa tcattccggct cgtataatgt taacaatttg tggaattgtg agcggacaca 60
 caggaaacag accatggaat tcgagctcgg taccgggga aaggattaca aa 112

 <210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> gen khởi đầu Trc (1)

 <400> 4
 tgacaattaa tcattcgcct cgtataatgt 30

 <210> 5
 <211> 7
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Vùng liên kết với ribosome

 <400> 5
 gaaagga 7

 <210> 6
 <211> 7
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự trống

<400> 6
ttacaaa

7

<210> 7
<211> 289
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự axit amin của protein enzym có nguồn gốc từ
Clostridium scindens

<400> 7
Met Lys His Gly Ile Tyr Tyr Ala Tyr Trp Glu Gln Glu Trp Ala Ala
1 5 10 15
Asp Tyr Lys Arg Tyr Val Glu Lys Ala Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile
20 25 30
Leu Glu Val Gly Ala Ala Pro Leu Pro Asp Tyr Ser Ala Gln Glu Val
35 40 45
Lys Glu Leu Lys Lys Cys Ala Asp Asp Asn Gly Ile Gln Leu Thr Ala
50 55 60
Gly Tyr Gly Pro Ala Phe Asn His Asn Met Gly Ser Ser Asp Pro Lys
65 70 75 80
Ile Arg Glu Glu Ala Leu Gln Trp Tyr Lys Arg Leu Phe Glu Val Met
85 90 95
Ala Gly Leu Asp Ile His Leu Ile Gly Gly Ala Leu Tyr Ser Tyr Trp
100 105 110
Pro Val Asp Phe Ala Thr Ala Asn Lys Glu Glu Asp Trp Lys His Ser
115 120 125
Val Glu Gly Met Gln Ile Leu Ala Pro Ile Ala Ser Gln Tyr Gly Ile
130 135 140
Asn Leu Gly Met Glu Val Leu Asn Arg Phe Glu Ser His Ile Leu Asn
145 150 155 160
Thr Ser Glu Glu Gly Val Lys Phe Val Thr Glu Val Gly Met Asp Asn
165 170 175

Val Lys Val Met Leu Asp Thr Phe His Met Asn Ile Glu Glu Ser Ser
 180 185 190

Ile Gly Asp Ala Ile Arg His Ala Gly Lys Leu Leu Gly His Phe His
 195 200 205

Thr Gly Glu Cys Asn Arg Met Val Pro Gly Lys Gly Arg Thr Pro Trp
 210 215 220

Arg Glu Ile Gly Asp Ala Leu Arg Glu Ile Glu Tyr Asp Gly Thr Val
 225 230 235 240

Val Met Glu Pro Phe Val Arg Met Gly Gly Gln Val Gly Ser Asp Ile
 245 250 255

Lys Val Trp Arg Asp Ile Ser Lys Gly Ala Gly Glu Asp Arg Leu Asp
 260 265 270

Glu Asp Ala Arg Arg Ala Val Glu Phe Gln Arg Tyr Met Leu Glu Trp
 275 280 285

Lys

<210> 8
 <211> 870
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit nucleic biến đổi (1) của protein enzym nêu trong SEQ ID
 NO:7

<400> 8
 atgaaacacg gtatctacta cgcgtactgg gaacaggaat gggcggcgga ctacaaacgt 60
 tacgttgaaa aagcggcgaa actgggtttc gacatcctgg aagttggtgc ggcgccgctg 120
 ccggactact ctgcgcagga agttaaagaa ctgaaaaaat gcgcggacga caacggtatc 180
 cagctgaccg cgggttacgg tccggcggtc aaccacaaca tgggttcttc tgacccgaaa 240
 atccgtgaag aagcgtgca gtggtacaaa cgtctgttcg aagttatggc gggctctggac 300
 atccacctga tcggtggtgc gctgtactct tactggccgg ttgacttcgc gaccgcgaac 360
 aaagaagaag actggaaaca ctctgttgaa ggtatgcaga tcctggcgcc gatcgcgtct 420

```

cagtacggta tcaacctggg tatggaagtt ctgaaccggt tcgaatctca catcctgaac      480
acctctgaag aaggtgttaa attcgttacc gaagttggta tggacaacgt taaagttatg      540
ctggacacct tccacatgaa catcgaagaa tcttctatcg gtgacgcgat ccgtcacgcg      600
ggtaaactgc tgggtcactt ccacaccggt gaatgcaacc gtatggttcc gggtaaaggt      660
cgtaccccgt ggcgtgaaat cgggtgacgcg ctgcgtgaaa tcgaatacga cggtaccggt      720
gttatggaac cgttcgttcg tatgggtggg caggttgggt ctgacatcaa agtttggcgt      780
gacatctcta aaggtgcggg tgaagaccgt ctggacgaag acgcgcgtcg tgcggttgaa      840
ttccagcggt acatgctgga atggaaataa      870

```

<210> 9

<211> 870

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit nucleic biến đổi(2) của protein enzym nêu trong SEQ ID NO:7

<400> 9

```

atgaagcacg gcatctacta cgcatactgg gagcaggagt gggcagcaga ctacaagcgc      60
tacgttgaga aggcagcaaa gctgggcttc gacatcctgg aggttggcgc agcaccactg      120
ccagactact ccgcacagga ggtaaggag ctgaagaagt gcgcagacga caacggcatc      180
cagctgaccg caggctacgg cccagcattc aaccacaaca tgggctcctc cgacccaaag      240
atccgcgagg aggcactgca gtggtacaag cgcctgttcg aggttatggc aggcctggac      300
atccacctga tcggcggcgc actgtactcc tactggccag ttgacttcgc aaccgcaaac      360
aaggaggagg actggaagca ctccgttgag ggcatgcaga tcctggcacc aatcgcatcc      420
cagtacggca tcaacctggg catggaggtt ctgaaccgct tcgagtccca catcctgaac      480
acctccgagg agggcgtaa gttcgttacc gaggttggca tggacaacgt taaggttatg      540
ctggacacct tccacatgaa catcgaggag tcctccatcg gcgacgcaat ccgccacgca      600

```

ggcaagctgc tgggccactt ccacaccggc gaggcaacc gcatgggttc aggcaagggc	660
cgcaccccat ggcgcgagat cggcgacgca ctgcgagaga tcgagtacga cggcaccgtt	720
gttatggagc cattcgttcg catgggcggc caggttggct ccgacatcaa ggtttggcgc	780
gacatctcca agggcgagg cgaggaccgc ctggacgagg acgcacgccg cgcagttgag	840
ttccagcgct acatgctgga gtggaagtaa	870