



(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)



1-0041891

(51)⁷ C12P 19/24

(13) B

(21) 1-2019-04740

(22) 07/02/2018

(86) PCT/EP2018/053023 07/02/2018

(87) WO2018/149707 23/08/2018

(30) 17156215.0 15/02/2017 EP

(45) 25/12/2024 441

(43) 25/11/2019 380A

(73) Evonik Operations GmbH (DE)

Rellinghauser Straße 1-11, 45128 Essen, Germany

(72) HELLMERS, Frank (DE); SCHLEGEL-KACHEL, Sibylle (DE); ÖHRLEIN, Johannes (DE); WOLTER, Jan (DE).

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

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẤT RẮN CHỨA TINH THỂ ISOMALTULOZA VÀ TREHALULOZA

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình tạo ra chất rắn chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza, bao gồm các bước xử lý:

A) cho phức hợp enzym mà có khả năng xúc tác phản ứng chuyển sucroza thành isomaltuloza và trehaluloza tiếp xúc với dung dịch chứa sucroza;

B) đồng phân hóa ít nhất một phần sucroza thành isomaltuloza và trehaluloza;

C) tách phức hợp enzym để thu được dung dịch chứa isomaltuloza, trehaluloza và nước;

D) loại bỏ một phần nước bằng cách làm bay hơi nước cho tới khi thu được dung dịch đậm đặc có, tính theo tổng khối lượng dung dịch, hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 75% khối lượng đến 95% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 80% khối lượng đến 93% khối lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 86% khối lượng đến 92% khối lượng;

E) nâng nhiệt độ của dung dịch đậm đặc này đến khoảng từ 30°C đến 63°C, tốt hơn là khoảng từ 45°C đến 62°C, tốt hơn nữa là khoảng từ 55°C đến 60°C, và sau đó thực hiện kết tinh isomaltuloza trong khoảng nhiệt độ này, tiếp theo là làm nguội để thu được chất rắn chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới quy trình sản xuất chất rắn chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza, bao gồm các bước xử lý:

- A) cho phức hợp enzym mà có khả năng xúc tác phản ứng chuyển sucroza thành isomaltuloza và trehaluloza tiếp xúc với dung dịch chứa sucroza;
- B) đồng phân hóa ít nhất một phần sucroza thành isomaltuloza và trehaluloza;
- C) tách phức hợp enzym để thu được dung dịch chứa isomaltuloza, trehaluloza và nước;
- D) loại bỏ một phần nước bằng cách làm bay hơi nước cho tới khi thu được dung dịch đậm đặc có, tính theo tổng khối lượng dung dịch, hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 75% khối lượng đến 95% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 80% khối lượng đến 93% khối lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 86% khối lượng đến 92% khối lượng;
- E) nâng nhiệt độ của dung dịch đậm đặc này đến khoảng từ 30°C đến 63°C, tốt hơn là khoảng từ 45°C đến 62°C, tốt hơn nữa là khoảng từ 55°C đến 60°C, và sau đó thực hiện kết tinh isomaltuloza trong khoảng nhiệt độ này, tiếp theo là làm nguội để thu được chất rắn chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Isomaltuloza (α -D-glucopyranosyl-1,6-fructoza, còn được gọi là Palatinose®) là chất thay thế đường, thu được từ đường sucroza. Việc tạo ra nó được thực hiện bằng cách đồng phân hóa sucroza, thường được thực hiện nhờ enzym bằng cách sử dụng isomaltuloza synthases (sucroza glucosylmutaza, EC 5.4.99.11). Các tài liệu DE1049800, DE2217628, EP 28900 và EP 91063 mô tả nhiều phương pháp sử dụng tế bào vi khuẩn cố định để chuyển sucroza thành isomaltuloza thông qua enzym. Nhằm mục đích này, EP 0625578 sử dụng các chủng vi khuẩn từ nhóm *Protaminobacter rubrum* (CBS 574.77), *Serratia plymuthica* (ATCC 15928), *Serratia marcescens* (NCIB 8285), *Leuconostoc mesenteroides* (NRRL-B 512 F (ATCC 1083 a)) và *Erwinia rhapontici* (NCPBP 1578). EP 0392556 và EP1257638 mô tả việc sử dụng các chủng vi khuẩn từ nhóm *Klebsiella*

terrigena JCM 1687, *Klebsiella* sp. No. 88 (FERM BP-2838) và *Klebsiella singaporiensis* LX3 và LX21.

Các phương pháp đồng phân hóa này được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào sống hoặc tế bào chết, cùng với sự có mặt của tế bào tự do hoặc tế bào cố định: ví dụ, DE3133123 và EP0915986, ví dụ, mô tả các phương pháp cố định chất xúc tác enzym sử dụng canxi alginat hoặc chất trao đổi ion, trong khi đó, EP0001099 mô tả phương pháp sử dụng các tế bào sống, tự do mà có thể tạo ra isomaltuloza trong điều kiện lên men. Các sản phẩm phụ như trehaluloza (α -D-glucopyranosyl-1,1-fructoza) và cả fructoza cũng như glucoza thường được tạo ra trong phản ứng đồng phân hóa sucroza này.

Tài liệu EP483755 cũng mô tả phương pháp tạo ra trehaluloza, trong đó, về cơ bản, phương pháp được mô tả ở trên đã được tối ưu về hiệu suất tổng hợp trehaluloza, bằng cách sử dụng enzym sucroza glucosylmutaza từ một số chủng *Pseudomonas* hoặc *Agrobacterium*.

DE102012216955 bộc lộ quy trình kết tinh liên tục isomaltuloza bao gồm các bước A) tạo ra dịch nuôi chứa isomaltuloza và nước, B) loại bớt một phần nước bằng cách làm bay hơi để thu được huyền phù chứa tinh thể isomaltuloza, C) tách huyền phù này thành chất rắn chứa isomaltuloza và nước cái và D) tùy ý rửa isomaltuloza rắn này.

EP2674500 bộc lộ phương pháp tạo ra chất rắn từ sacarit lỏng chứa isomaltuloza, trong đó sacarit lỏng này thu được bằng cách cho enzym mà tạo ra isomaltuloza từ sucroza tác dụng với sucroza lỏng, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: làm nóng sacarit lỏng nêu trên để điều chỉnh hàm lượng chất rắn của sacarit lỏng này tới 77 đến 96% khối lượng, dùng lực trượt tác động lên hỗn hợp thu được từ bước nêu trên để tạo ra nhân tinh thể, trong khi vẫn duy trì nhiệt độ của sản phẩm này ở khoảng từ 65 đến 120 độ C và làm nguội hỗn hợp này để thu được chất rắn.

Các nhược điểm của giải pháp kỹ thuật này hoặc chỉ thu được tinh thể isomaltuloza tinh khiết, và bỏ phí trehaluloza chứa trong đó, hoặc không thu được chất rắn tinh thể mà chỉ thu được chất rắn vô định hình, và hoặc phải thực hiện quy trình này nhiệt độ cao, tiêu tốn nhiều năng lượng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình nhằm khắc phục ít nhất một nhược điểm của các quy trình đã biết trong tình trạng kỹ thuật.

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng quy trình theo điểm 1 yêu cầu bảo hộ có thể đạt được mục đích này.

Vì vậy, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chất rắn chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza, bao gồm các bước xử lý:

- A) cho phức hợp enzym mà có khả năng xúc tác phản ứng chuyển sucroza thành isomaltuloza và trehaluloza tiếp xúc với dung dịch chứa sucroza;
- B) đồng phân hóa ít nhất một phần sucroza thành isomaltuloza và trehaluloza;
- C) tách phức hợp enzym để thu được dung dịch chứa isomaltuloza, trehaluloza và nước;
- D) loại bỏ một phần nước bằng cách làm bay hơi nước cho tới khi thu được dung dịch đậm đặc có, tính theo tổng khối lượng dung dịch, hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 75% khối lượng đến 95% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 80% khối lượng đến 93% khối lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 86% khối lượng đến 92% khối lượng;
- E) nâng nhiệt độ của dung dịch đậm đặc này đến khoảng từ 30°C đến 63°C, tốt hơn là khoảng từ 45°C đến 62°C, tốt hơn nữa là từ 55°C đến 60°C, và sau đó thực hiện kết tinh isomaltuloza trong khoảng nhiệt độ này, tiếp theo là làm nguội để thu được chất rắn chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza.

Một ưu điểm của quy trình theo sáng chế là chất lượng sản phẩm ổn định.

Một ưu điểm tiếp theo của quy trình theo sáng chế là gia tăng hiệu suất không gian-thời gian riêng của thiết bị.

Một ưu điểm nữa của quy trình theo sáng chế là không cần tới tinh thể mầm và sự phát triển phức tạp của chúng.

Còn một ưu điểm nữa của quy trình theo sáng chế là có thể tiết kiệm năng lượng, do quy trình này được thực hiện ở nhiệt độ thấp.

Còn một ưu điểm nữa của quy trình theo sáng chế là hiệu suất cao hơn, do nhiều sản phẩm được hóa rắn hơn so với các quy trình kết tinh chỉ tập trung vào isomaltuloza tinh khiết.

Một ưu điểm khác của sáng chế là sản phẩm thu được có thể được sử dụng ngay và không cần đợi khoảng thời gian kéo dài cho tới lúc kết thúc quá trình hoàn thành tinh thể.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “isomaltuloza” được hiểu là 6-O- α -D-glucopyranosido-D- fructoza.

Thuật ngữ “trehaluloza” được hiểu là 1-O- α -D-glucopyranosido-D-fructoza.

Thuật ngữ “phức hợp enzym” được hiểu là một thành phần hoặc hỗn hợp thành phần chứa ít nhất một enzym hoạt tính mà có thể có bản chất phức tạp, ví dụ, tế bào sống. Các ví dụ tiếp theo về phức hợp enzym là các protein dung hợp trong đó ít nhất một enzym hoạt tính được liên kết với ít nhất một polypeptit nữa, và nhằm mục đích của sáng chế, chính một enzym tinh khiết cũng có thể là phức hợp enzym.

Liên quan tới sáng chế, thuật ngữ “phức hợp enzym cố định” được hiểu là phức hợp enzym được liên kết với chất nền hoặc được bao quanh bởi chất nền để phức hợp enzym này bị khống chế, ví dụ, bị chậm, trong sự khuếch tán tự do của nó hoặc trong sự chuyển động tự do của nó trong dung dịch nước.

Liên quan tới sáng chế, thuật ngữ “chất rắn chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza” được hiểu là chất rắn chứa chất kết tinh với lượng ít nhất là 50% khối lượng, tốt hơn là với lượng ít nhất 70% khối lượng, tốt hơn nữa là với lượng ít nhất 90% khối lượng, tính theo tổng khối lượng chất rắn. Phương pháp thích hợp để xác định hàm lượng tinh thể là phương pháp nhiễu xạ tia X.

Các trị số khối lượng được đưa ra đối với chất được dùng để chỉ chất khan.

Trừ khi có quy định khác, tất cả phần trăm (%) được đưa ra là phần trăm khối lượng.

Trong quy trình theo sáng chế, tốt hơn nếu nồng độ sucroza có mặt trong dung dịch chứa sucroza ở bước xử lý A) nằm trong khoảng từ 20% đến 80% khối lượng, cụ thể là

nằm trong khoảng từ 30% đến 50% khối lượng, tính theo tổng khối lượng dung dịch chứa sucroza.

Quy trình được ưu tiên theo sáng chế đặc biệt thích hợp để tổng hợp chất rắn chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza bao gồm isomaltuloza với lượng nằm trong khoảng từ 70% đến 90% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 72% đến 89% khối lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 74% đến 88% khối lượng, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75% đến 85% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của chất rắn. Chất rắn này chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza bao gồm trehaluloza với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 25% khối lượng, cụ thể là nằm trong khoảng từ 6% đến 20% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của chất rắn.

Chất rắn này chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza có thể chứa glucoza với lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 5% khối lượng, cụ thể là chứa từ 0,2% đến 4% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của chất rắn.

Chất rắn này chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza có thể chứa fructoza với lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 5% khối lượng, cụ thể là chứa từ 0,2% đến 4% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của chất rắn.

Chất rắn này chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza có thể chứa sucroza với lượng nằm trong khoảng từ 0,05% đến 4% khối lượng, cụ thể là chứa từ 0,1% đến 3% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của chất rắn.

Tốt hơn là, chất rắn này chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza chứa cả ba loại đường này.

Tốt hơn là, enzym có mặt trong phức hợp enzym này là ít nhất một sucroza glucosylmutaza của lớp enzym EC 5.4.99.11. Ưu tiên đặc biệt sử dụng các enzym sucroza glucosylmutaza từ *Protaminobacter rubrum*, cụ thể là chủng *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77; *Protaminobacter ruber* Z12; *Serratia plymuthica*, cụ thể là chủng *Serratia plymuthica* ATCC 15928; *Serratia odorifera*, cụ thể là chủng *Serratia odorifera* 4Rx13; *Serratia marcescens*, cụ thể là chủng *Serratia marcescens* NCIB 8285; *Leuconostoc mesenteroides*, cụ thể là chủng *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 1083 a; *Erwinia rhapontici*, cụ thể là các chủng *Erwinia rhapontici* ATCC29283, NCPPB 1578,

DSM 4484, NX-5 và WAC2928, *Erwinia* sp., cụ thể là chủng *Erwinia* sp. D12; *Agrobacterium radiobacter*, cụ thể là chủng *Agrobacterium radiobacter* MX-232; *Klebsiella terrigena*, cụ thể là chủng *Klebsiella terrigena* JCM 1687; *Klebsiella* sp., cụ thể là các chủng *Klebsiella* sp. FERM BP-2838, LX3 và NK33-98-8; *Klebsiella pneumoniae*, cụ thể là chủng *Klebsiella pneumoniae* 342; *Klebsiella singaporensis*, cụ thể là chủng *Klebsiella singaporensis* LX21; *Pseudomonas mesoacidophila*, cụ thể là chủng *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45; *Pantoea dispersa*, cụ thể là chủng *Pantoea dispersa* UQ68J; *Klebsiella planticola*, cụ thể là các chủng *Klebsiella planticola* CCRC 19112, MX10 và UQ14S; *Enterobacter* sp., cụ thể là chủng *Enterobacter* sp. FMB- 1 (trình tự ID số 16), SZ62 và Ejp617; *Azotobacter vinelandii* DJ trong quy trình theo sáng chế, với *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 và *Protaminobacter ruber* Z12 là được đặc biệt ưu tiên.

Các enzym có thể được dùng dưới dạng đã được tinh sạch như polypeptit. Để thuận tiện cho quá trình tinh sạch, các enzym có thể ở dạng protein dung hợp trong đó, ví dụ, chuỗi đánh dấu (tag) cho phép dễ dàng tinh sạch, ví như chuỗi đánh dấu His (His tag), chuỗi đánh dấu Strep (Strep tag), chuỗi đánh dấu GST (GST tag) hoặc chuỗi đánh dấu MBP (MBP tag), được gắn vào enzym này.

Trong quy trình theo sáng chế, tốt hơn nếu phức hợp enzym này là tế bào nguyên vẹn mà tốt hơn là được chọn từ nhóm *Protaminobacter rubrum*, cụ thể là chủng *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77; *Protaminobacter ruber* Z12; *Serratia plymuthica*, cụ thể là chủng *Serratia plymuthica* ATCC 15928; *Serratia odorifera*, cụ thể là chủng *Serratia odorifera* 4Rx13; *Serratia marcescens*, cụ thể là chủng *Serratia marcescens* NCIB 8285; *Leuconostoc mesenteroides*, cụ thể là chủng *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 1083 a; *Erwinia rhapontici*, cụ thể là các chủng *Erwinia rhapontici* ATCC29283, NCPPB 1578, DSM 4484, NX-5 và WAC2928; *Erwinia* sp., cụ thể là chủng *Erwinia* sp. D12; *Agrobacterium radiobacter*, cụ thể là chủng *Agrobacterium radiobacter* MX-232; *Klebsiella terrigena*, cụ thể là chủng *Klebsiella terrigena* JCM 1687; *Klebsiella* sp., cụ thể là các chủng *Klebsiella* sp. FERM BP-2838, LX3 và NK33-98-8; *Klebsiella pneumoniae*, cụ thể là chủng *Klebsiella pneumoniae* 342; *Klebsiella singaporensis*, cụ thể là chủng *Klebsiella singaporensis* LX21; *Pseudomonas mesoacidophila*, cụ thể là chủng

Pseudomonas mesoacidophila MX-45; *Pantoea dispersa*, cụ thể là chủng *Pantoea dispersa* UQ68J; *Klebsiella planticola*, cụ thể là các chủng *Klebsiella planticola* CCRC 19112, MX10 và UQ14S; *Enterobacter* sp., cụ thể là chủng *Enterobacter* sp. FMB- 1, SZ62 và Ejp617; *Azotobacter vinelandii* DJ, với *Protaminobacter rubrum* CBS 574,77 và *Protaminobacter ruber* Z12 được ưu tiên đặc biệt. Tế bào nguyên vẹn tốt nhất được bao gồm trong quy trình được ưu tiên theo sáng chế có thể ở trạng thái bất kỳ, như đang tăng trưởng, đang nghỉ, còn sống hoặc đã chết, trong đó tế bào ở trạng thái nghỉ được ưu tiên đặc biệt.

Việc cố định các phức hợp enzym có thể diễn ra, ví dụ, dưới dạng CLEAs (khối kết tụ enzym liên kết ngang không hòa tan - insoluble crosslinked enzym aggregates) (Cao, L. et al., 2000, *Cross-linked enzym aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase*, Org. Lett., 2: 1361- 1264) hoặc trên các vật liệu hỗ trợ có nguồn gốc tự nhiên hoặc tổng hợp. Vật liệu tự nhiên là, ví dụ, polysacarit như alginat, thạch, sepharose, xenluloza và các dẫn xuất của chúng (ví dụ, DEAE- hoặc CM-xenluloza). Có thể dùng sepharose biến tính, như sepharose đã hoạt hóa bằng epoxy, sepharose đã hoạt hóa bằng brom xyanua, sepharose đã hoạt hóa bằng NHS, sepharose đã hoạt hóa đã hoạt hóa bằng thiol. Các sepharose này có sẵn trên thị trường, ví dụ, từ các công ty GE Healthcare, BioRad, Sigma và Pierce.

Ưu tiên poly(met)acrylat được chọn từ các polyme acrylat ankyl có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, polyme metacrylat ankyl có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon và copolyme metacrylat ankyl có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon – acrylat ankyl có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon. Quy trình bao nang và xử lý tiếp theo ưu tiên sử dụng các polyme poly(met)acrylat đã được mô tả trong đơn EP3114218.

Chất mang vô cơ có thể là vật liệu nền oxit silicon hoặc oxit nhôm, hoặc hỗn hợp của chúng.

Việc cố định các phức hợp enzym này có thể diễn ra bằng cách bao nang chúng trong các gel polyme có nhiều lỗ xốp, ví dụ, các vật liệu sol-gel kỵ nước của $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$ hoặc hỗn hợp của $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$ và $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ (Reetz, M.T.; Zonta, A.; Simpelkamp, J.; Rufinska, A.; Tesche, B. J. Sol-Gel Sci. Technol. 1996, 7, p. 35-43) hoặc của silica gel

polyme có nhiều lỗ xốp (Elgren, T.M.; Zadvorny, O.A.; Brecht, E.; Douglas, T.; Zorin, N.A.; Maroney, M. J. & Peters, J. W.). Nano Lett. 2005, 5, 2085-2087.

Hơn nữa, ngoài việc cố định, enzym này còn được sử dụng cho nhiều mục đích trong các bình phản ứng màng enzym.

Các phức hợp enzym được dùng trong quy trình theo sáng chế, cụ thể là các tế bào, tốt hơn là được cố định trong polysacarit như alginat, pectin, carageenan, chitosan hoặc polyvinyl alcohol, ví như lentikats, hoặc hỗn hợp của chúng, cụ thể trong alginat; xem về vấn đề này ở, ví dụ Shimizu, H. và đồng tác giả (1997) *Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds, in: Advances in biochemical engineering biotechnology*, Vol58: *New Enzymes for Organic Synthesis* (Scheper, T., ed.) pp. 45-88, Springer, New York.

Việc cố định được ưu tiên đặc biệt cho dạng phức hợp enzym bất kỳ được sử dụng trong quy trình theo sáng chế là quy trình đã được mô tả trong đơn EP2011865, trong đó các phức hợp enzym được cố định trên giá đỡ trơ đã được tráng silicon thu được bằng phản ứng hydro-silic hóa.

Bước B) của quy trình theo sáng chế được ưu tiên hơn là, độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 9,5. Độ pH này được thiết lập dễ dàng nhờ axit, cụ thể là axit vô cơ, tốt hơn là từ nhóm axit sunphuric, axit clohydric hoặc axit axetic.

Bước B) của quy trình theo sáng chế được ưu tiên hơn là, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 40°C, tốt hơn là từ 25 đến 35°C, được đo trong dung dịch chứa sucroza.

Ở bước C) theo quy trình, phức hợp enzym này và các tạp chất rắn tích tụ được tách ra khỏi isomaltuloza; việc tách này diễn ra, ví dụ, bằng cách lọc, kết tủa, sắc ký trao đổi ion hoặc ly tâm. Do đặc điểm cố định đó của phức hợp enzym này, việc tách này là thuận tiện so với enzym không được cố định.

Vì lý do kinh tế của quy trình, ưu tiên hơn theo sáng chế nếu phức hợp enzym này đã cố định được dùng dưới dạng nền rắn mà dung dịch chứa sucroza chảy qua (H. Schiweck, Zuckerind. (1990), 115 (7), 555-565). Các quy trình nền rắn tương ứng được mô tả trong A. Liese, et. al. *Processes in A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey (Eds.), Industrial Biotransformations 2nd Edition* (2006), Wiley-VCH, Weinheim.

Có thể có lợi nếu các tạp chất rắn tích tụ được tách ra khỏi isomaltuloza này bằng cách kết tủa. Tốt hơn là, việc này được thực hiện bằng cách để lắng trong một khoảng thời gian từ 2 ngày đến 60 ngày, tốt hơn là từ 10 ngày đến 50 ngày, tốt hơn nữa là từ 20 ngày đến 40 ngày, tốt hơn là ở khoảng nhiệt độ từ 2°C đến 30°C, tốt hơn nữa là từ 3°C đến 25°C, thậm chí tốt hơn nữa là từ 4°C đến 12°C, trong khi các tạp chất rắn tích tụ chìm xuống đáy của dung dịch chứa isomaltuloza, trehaluloza và nước.

Điều này có hiệu quả kỹ thuật đáng ngạc nhiên, rằng việc kết tinh isomaltuloza có thể thực hiện ở nhiệt độ thấp như 30°C. Vì vậy, quy trình khác được ưu tiên theo sáng chế đặc trưng ở chỗ: ở bước C) theo quy trình, phức hợp enzym này và các tạp chất rắn tích tụ được tách khỏi isomaltuloza này bằng cách để lắng trong một khoảng thời gian từ 2 ngày đến 60 ngày, tốt hơn là cùng với các mô tả ở bước D), nước được loại bỏ bằng cách làm bay hơi nước cho tới khi thu được dung dịch đậm đặc chứa chất rắn với hàm lượng nằm trong khoảng từ 86% khối lượng đến 92% khối lượng và các mô tả trong bước E), tính theo tổng khối lượng dung dịch, dung dịch đậm đặc này được nâng nhiệt độ đến khoảng từ 30°C đến 50°C.

Bằng cách thay đổi độ bay hơi, có thể thu được các hàm lượng chất rắn khác nhau; độ bay hơi có thể được kiểm soát thông qua, ví dụ, thời gian lưu trong bước D) của quy trình.

Quy trình được ưu tiên theo sáng chế đặc trưng ở chỗ: bước D) của quy trình được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 80°C, tốt hơn là từ 60°C đến 75°C, tốt hơn nữa là từ 63°C đến 68°C, và áp suất nằm trong khoảng từ 70mbar đến 200mbar, tốt hơn là từ 100mbar đến 180mbar, tốt hơn nữa là từ 130mbar đến 160mbar. Cụ thể, ưu tiên trong phạm vi này là, trong quy trình theo sáng chế, bước D) của quy trình được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 63°C đến 68°C, và ở áp suất nằm trong khoảng từ 130mbar đến 160mbar.

Quy trình khác được ưu tiên theo sáng chế đặc trưng ở chỗ: bước D) của quy trình được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 80°C, tốt hơn là từ 60°C đến 75°C, tốt hơn nữa là từ 63°C đến 68°C, và ở áp suất nằm trong khoảng từ 250mbar đến 500mbar, tốt hơn là từ 275mbar đến 450mbar, tốt hơn nữa là từ 300mbar đến 400mbar.

Cụ thể, ưu tiên trong phạm vi này là, trong quy trình theo sáng chế, bước D) của quy trình được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 63°C đến 68°C, và áp suất nằm trong khoảng từ 300mbar đến 400mbar.

Quy trình nữa được ưu tiên theo sáng chế đặc trưng ở chỗ: bước D) của quy trình được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 95°C đến 130°C, tốt hơn là từ 106°C đến 121°C, tốt hơn nữa là từ 108°C đến 118°C, và ở áp suất nằm trong khoảng từ 250mbar đến 500mbar, tốt hơn là từ 275mbar đến 450mbar, tốt hơn nữa là từ 300mbar đến 400mbar. Cụ thể, ưu tiên trong phạm vi này là, trong quy trình theo sáng chế, bước D) của quy trình được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 108°C đến 118°C, và ở áp suất nằm trong khoảng từ 300mbar đến 400mbar.

Bằng cách thay đổi độ bay hơi, có thể thu được các hàm lượng và/hoặc sản lượng chất rắn khác nhau; độ bay hơi có thể được kiểm soát thông qua thời gian lưu, áp suất và nhiệt độ, ví dụ, trong bước D) của quy trình. Quá trình bay hơi có thể thực hiện trong thiết bị bay hơi liên tục hoặc theo mẻ.

Ở bước D) của quy trình theo sáng chế, tốt hơn nếu độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 9,5.

Ở bước E) của quy trình này, dung dịch đậm đặc này được nâng nhiệt độ tới khoảng từ 30°C đến 63°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 45°C đến 62°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 55°C đến 60°C, tốt hơn là ở áp suất của môi trường. Ưu tiên đặc biệt nếu ở bước D) của quy trình theo sáng chế, thu được dung dịch đậm đặc với, tính theo tổng khối lượng dung dịch, hàm lượng chất rắn chiếm từ 86% khối lượng đến 92% khối lượng và ở bước E) của quy trình, dung dịch đậm đặc này được nâng nhiệt độ tới khoảng từ 55°C đến 60°C.

Quy trình được ưu tiên theo sáng chế đặc trưng ở chỗ, ở bước E) của quy trình, dung dịch đậm đặc này được nâng nhiệt độ tới khoảng từ 30°C đến 63°C, tốt hơn là từ 45°C đến 62°C, tốt hơn nữa là từ 55°C đến 60°C, và sau đó việc kết tinh isomaltuloza được cảm ứng bởi phương pháp được chọn từ ít nhất một trong các cách bao gồm sự bổ sung tinh thể mầm isomaltuloza, lực trượt, sự khuấy trộn, sự ma sát, phóng xạ và siêu âm, với lực trượt được ưu tiên đặc biệt. Trong phạm vi này, ưu tiên đặc biệt là việc kết tinh được

cảm ứng bởi phương pháp được chọn từ lực trượt nhưng không bao gồm sự bổ sung tinh thể mầm isomaltuloza.

Quy trình được ưu tiên theo sáng chế đặc trưng ở chỗ, nếu bổ sung tinh thể mầm isomaltuloza ở bước E) của quy trình, các tinh thể này được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 10% khối lượng và tốt hơn nữa là từ 0,1% đến 1% khối lượng, tính theo tổng khối lượng isomaltuloza có trong dung dịch đậm đặc này.

Quy trình được ưu tiên theo sáng chế đặc trưng ở chỗ, ở bước E) của quy trình, lực trượt cảm ứng tinh thể isomaltuloza bằng thiết bị tạo lực trượt, tốt hơn là không bao gồm việc bổ sung tinh thể mầm isomaltuloza.

Theo sáng chế, "thiết bị tạo lực trượt" là thiết bị tác dụng lực trượt vào vật liệu. Thiết bị này có thể là, ví dụ, thiết bị có khả năng nhào trộn vật liệu có độ nhớt cao, vì thế thiết bị theo đó lực di chuyển vật liệu được tác dụng theo một hướng và hướng ngược lại để nghiền, nhào trộn, hoặc trộn lẫn vật liệu. Thiết bị này đặc biệt có thể là thiết bị có chức năng như máy nhào, đặc biệt hơn là thiết bị có thể làm nóng và cạo vật liệu để vật liệu đã xử lý này không bị bỏ lại, bám vào bình chứa của thiết bị. Thiết bị này có thể là máy nhào, máy ép đùn, máy nhào, máy khuấy, và máy khuấy và trộn phổ thông, trong đó ưu tiên sử dụng máy ép đùn.

Các thiết bị tạo lực trượt này có thể là máy nhào nhỏ dùng trong phòng thử nghiệm có bình chứa với thành bình gồm hai lớp với dung tích từ 100ml đến 300ml. Ưu tiên thiết bị có tốc độ quay từ 10 đến 40 vòng/phút, ưu tiên hơn tốc độ quay từ 20 đến 40 vòng/phút. Thiết bị này có thể có thể có thể có máng nhào ngang với hai lưỡi nhào đồng xoay và mô-men quay cực đại của thiết bị này có thể là 40Nm hoặc 30Nm. Nhiệt độ của sản phẩm có thể được điều chỉnh thông qua chất lỏng gia nhiệt ở lớp bọc thành bình hai lớp. Ví dụ, thiết bị IKA HKD-T 06. Sản phẩm và thiết bị này được chuyển động theo chuyển động tròn và được trượt giữa các cánh nhào. Trong thiết bị này, khoảng thời gian cần thiết để hoàn thành sự kết tinh và tạo ra sản phẩm rắn có màu trắng (sau đây gọi là "thời gian xử lý") có thể từ 1 đến 40 phút, tốt hơn là từ 3 đến 15 phút. Trong suốt thời gian xử lý, sử dụng lực trượt một cách liên tục trên hỗn hợp isomaltuloza này bằng cách

nhào và khuấy trộn. Thiết bị nhào này hoạt động ở chế độ theo mẻ. Sau khi kết thúc thời gian xử lý, sản phẩm này được đưa ra khỏi máng trộn.

Thiết bị tạo lực trượt liên tục như máy ép đùn dùng trong phòng thí nghiệm, đặc biệt là máy ép đùn hai trục vít xoay đồng trục, ví dụ, có thể dùng Haake PolyLab O. Tỷ lệ chiều dài/đường kính (L/D) của vít có thể là 25. Vít có thể được định hình để chứa các yếu tố vận chuyển và yếu tố nhào. Vật liệu được vận chuyển theo chiều ngang từ cửa nạp liệu đến cửa xả của máy ép đùn. Thành phẩm được trượt trong vít và cụ thể là giữa các yếu tố nhào. Mô-men quay cực đại của thiết bị này có thể là 130Nm hoặc 100Nm. Máy ép đùn này có thể có ống đùn làm nóng bằng điện. Tốc độ quay của máy ép đùn này có thể từ 5 đến 100 vòng/ phút, tốt hơn là từ 10 đến 50 vòng/ phút. Thời gian xử lý trong máy ép đùn này có thể từ 20 giây đến 5 phút, tốt hơn là từ 30 giây đến 2 phút.

Thiết bị tạo lực trượt quy mô lớn hơn như máy nhào-đùn, đặc biệt là máy nhào với cấp liệu kiểu quay đơn trục có thể được dùng. Vít này có thể có thể có các yếu tố vận chuyển và nhào. Vật liệu được vận chuyển theo chiều ngang từ cửa nạp liệu đến cửa xả của máy ép đùn này. Sản phẩm này được trượt trong vít này và cụ thể là giữa các yếu tố nhào.

Quy trình được ưu tiên theo sáng chế đặc trưng ở chỗ, ở bước E) của quy trình, việc kết tinh isomaltuloza bằng siêu âm được thực hiện bằng cách dùng sóng âm với mật độ công suất bề mặt cụ thể trong phạm vi từ 20W/cm² đến 400W/cm², cụ thể là từ 80 W/cm² đến 300W/cm², cụ thể hơn là từ 120W/cm² đến 180 W/cm².

Ưu tiên theo sáng chế là ở bước E) của quy trình, độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 9,5.

Các ví dụ được đưa ra dưới đây mô tả sáng chế để làm ví dụ mà không có mục đích giới hạn sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Đồng phân hóa dung dịch chứa sucroza

Đối với tất cả các thử nghiệm, sự đồng phân hóa được thực hiện như sau:

Các tế bào từ dịch cấy truyền của chủng *Protaminobacter rubrum* (CBS574.77) được rửa bằng 1 đến 5 ml môi trường dinh dưỡng vô trùng chứa 50g/kg sucroza, 15g/kg ngô ngâm nước, 7g/kg amoni sulphat, 0,5g/kg dịch chiết nấm men, 1g/kg kali dihydrosulphat, 0,41g/kg magiê clorua heptahydrat, 0,004g/kg mangan clorua tetrahydrat, 0,047g/kg sắt xitrat monohydrat và 926g/kg nước, chỉnh độ pH đến 7,2, nếu cần. Huyền phù này được dùng làm dung dịch nuôi cấy ban đầu, bao gồm 200ml dung dịch dinh dưỡng nêu trên trong bình nuôi cấy dung tích 1l.

Sau khi cấy ở 30°C trong 20 giờ, 2l dịch lên men, với một lít môi trường sản phẩm vô trùng chứa 50g/kg sucroza, 15g/kg ngô ngâm nước, 3g/kg amoni sulphat, 4 g/kg amoni hydrophosphat, 0,5g/kg dịch chiết nấm men, 1g/kg kali dihydrosulphat, 0,41g/kg magiê clorua heptahydrat, 0,004g/kg mangan clorua tetrahydrat, 0,047g/kg sắt xitrat monohydrat và 926g/kg nước, điều chỉnh độ pH đến 7,2, được đưa vào dịch nuôi cấy ban đầu sao cho mật độ quang học ban đầu (OD600) là 1.

Việc lên men được thực hiện ở 30°C, độ pH = 7 (đã được điều chỉnh) và pO₂ là 30% (máy khuấy tạo dòng chảy, Airflow). Sucroza được nạp vào quá trình lên men này. Sau 15h đến 20h, quá trình lên men này được hoàn thành và thu sinh khối để cố định.

Nhằm mục đích này, trộn huyền phù thu được với nước và dung dịch alginat nồng độ 4% theo tỷ lệ 1:1 về thể tích. Sau đó, huyền phù này được cố định bằng cách nhỏ giọt huyền phù vào dung dịch CaCl₂ nồng độ 2%. Các hạt thu được đã được hóa cứng bằng polyetyleneimin và glutarandehyt. Chất xúc tác sinh học thu được có thể được bảo quản trong vài tuần ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4 đến 10°C.

Đưa các tế bào cố định đã thu được vào lò phản ứng cột nhiệt và nâng nhiệt độ tới khoảng từ 20 đến 35°C, và pha loãng nước ép đặc từ củ cải đường với hàm lượng sucroza là 41% khối lượng, tính theo tổng khối lượng nước ép đặc, cho đi qua dưới dạng dòng liên tục.

Chế phẩm sau khi đồng phân hóa được nêu trong Bảng 1.

Fructoza	[% khối lượng]	1,4%
Glucoza	[% khối lượng]	0,5%
Sucroza	[% khối lượng]	1,7%

Isomaltuloza	[% khối lượng]	32,5%
Trehaluloza	[% khối lượng]	3,8%
Isomelezitoza	[% khối lượng]	1,1%
Nước	[% khối lượng]	59,0%

Bảng 1. Chế phẩm nước ép đặc đã được đồng phân hóa

Ví dụ 2: Kết tủa

Đối với một số thử nghiệm, các tạp chất rắn tích tụ được loại bỏ ra khỏi isomaltuloza này nhờ kết tủa bằng cách để lắng ở 20°C trong khoảng 30 ngày.

Ví dụ 3: Cô đặc

Dung dịch chứa isomaltuloza, trehaluloza và nước được cô đặc trong máy cô quay chân không ở 65°C và 130mbar để hàm lượng chất rắn mong muốn nằm trong khoảng từ 85 đến 98%. Áp suất được hạ thấp xuống 110mbar trong quá trình bay hơi để bù cho áp suất bay hơi giảm xuống ở dung dịch cô đặc này. Cuối quá trình bay hơi, nhiệt độ được làm tăng đến 95°C ở 150mbar để thu được xi-rô có thể rót được.

Phần trăm các trị số hàm lượng nước được đưa ra dưới đây tương đương với 100% khối lượng – hàm lượng chất rắn tính theo % khối lượng.

Ví dụ 4: Kết tinh

Sự kết tinh được cảm ứng trong máy ép đùn hai vít liên tục Thermo Fischer (Haake PolyLab OSPTW 16/25) có các yếu tố nhào và vận chuyển. Chuyển xi-rô đã cô đặc tới phễu cấp liệu đã được làm nóng (khoảng 140°C) của máy ép đùn đó.

Thực hiện kết tinh ở nhiệt độ cao hơn cho sản phẩm khó xử lý hơn và cần nhiều năng lượng hơn (C1 và C2). Dung dịch quá đậm đặc không thể được kết tinh hoàn toàn (C3). Các khối tinh thể rất hữu ích này được hình thành ở các nhiệt độ theo sáng chế có thể được xử lý một cách dễ dàng hơn nhiều và sẵn sàng để sử dụng, sản phẩm rất đồng đều về hình thức.

Thử nghiệm	C1	C2	C3	E1
Hàm lượng nước [-]	9%	10%	2%	10%
Nhiệt độ sản phẩm[°C]	76	75	56,2	55

Tốc độ quay[/ phút]	18	10	10	10
Mô-men [Nm]	25	7	5,5	32
Tinh thể mầm	có	không	không	không
Kết tủa	-	30 ngày	30 ngày	-
Kết quả	Khô và cứng, sản phẩm kết tinh giòn, dòng chảy nhỏ do nghẽn vít	Khối chất lỏng quánh, đục, cứng lại và kết tinh nhờ làm nguội	Tan chảy, ít đục mà vẫn dai như cao su khi làm nguội	Sợi rắn, màu trắng, trong suốt

Thử nghiệm	E2	E3	E4	E5
Hàm lượng nước [-]	10%	14%	12%	8%
Nhiệt độ sản phẩm[°C]	62	48,9	33,5	58,5
Tốc độ quay[/ phút]	20	5	5	10
Mô-men [Nm]	6	4,3	43,2	32,4
Tinh thể mầm	không	không	không	không
Kết tủa	-	30 ngày	30 ngày	30 ngày
Kết quả	sợi rắn, màu trắng, trong suốt	sợi kết tinh bóng, mềm, trắng, mà cứng lại và trở nên mờ nhờ làm nguội	sợi kết tinh bóng, mềm, trắng mà cứng lại và trở nên mờ nhờ làm nguội	sợi kết tinh bóng, mềm, trắng, mờ mà cứng lại nhờ làm nguội

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chất rắn chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza, tức là chất rắn chứa chất kết tinh với lượng ít nhất là 50% khối lượng, tốt hơn là với lượng ít nhất 70% khối lượng, tốt hơn nữa là với lượng ít nhất 90% khối lượng, tính theo tổng khối lượng chất rắn, bao gồm các bước xử lý:

- A) cho phức hợp enzym mà có khả năng xúc tác phản ứng chuyển sucroza thành isomaltuloza và trehaluloza tiếp xúc với dung dịch chứa sucroza;
- B) đồng phân hóa ít nhất một phần sucroza thành isomaltuloza và trehaluloza;
- C) tách phức hợp enzym để thu được dung dịch chứa isomaltuloza, trehaluloza và nước;
- D) loại bỏ một phần nước bằng cách làm bay hơi nước cho tới khi thu được dung dịch đậm đặc có, tính theo tổng khối lượng dung dịch, hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 75% khối lượng đến 95% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 80% khối lượng đến 93% khối lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 86% khối lượng đến 92% khối lượng;
- E) nâng nhiệt độ của dung dịch đậm đặc này đến khoảng từ 30°C đến 63°C, tốt hơn là khoảng từ 45°C đến 62°C, tốt hơn nữa là khoảng từ 55°C đến 60°C, và sau đó thực hiện kết tinh isomaltuloza trong khoảng nhiệt độ này, tiếp theo là làm nguội để thu được chất rắn chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza.

2. Quy trình theo điểm 1, đặc trưng ở chỗ, nồng độ sucroza có mặt trong dung dịch chứa sucroza ở bước xử lý A) nằm trong khoảng từ 20% đến 80% khối lượng, cụ thể là nằm trong khoảng từ 30% đến 50% khối lượng, tính theo tổng khối lượng dung dịch chứa sucroza.

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, đặc trưng ở chỗ, enzym có mặt trong phức hợp enzym là ít nhất một sucroza glucosylmutaza của lớp enzym EC 5.4.99.11.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, đặc trưng ở chỗ, độ pH ở bước B) của quy trình này nằm trong khoảng từ 3,5 đến 9,5.

5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, đặc trưng ở chỗ, ở bước C) của quy trình này, phức hợp enzym và tạp chất rắn chứa trong đó được tách ra khỏi isomaltuloza bằng cách lọc, lắng hoặc ly tâm.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, đặc trưng ở chỗ, bước D) của quy trình này được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 63°C đến 68°C, và áp suất nằm trong khoảng từ 13kPa đến 16kPa.
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, đặc trưng ở chỗ, trong bước D) của quy trình này, dung dịch đậm đặc chứa chất rắn với hàm lượng nằm trong khoảng từ 86% khối lượng đến 92% khối lượng, tính theo tổng khối lượng dung dịch, và trong bước E), dung dịch đậm đặc được nâng nhiệt độ tới khoảng từ 55°C đến 60°C.
8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, đặc trưng ở chỗ, bước kết tinh isomaltuloza được thực hiện bằng các phương pháp được chọn từ ít nhất một phương pháp trong nhóm bao gồm phương pháp bổ sung các tinh thể mầm isomaltuloza, áp dụng lực trượt, khuấy trộn, ma sát, phóng xạ và siêu âm.
9. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, đặc trưng ở chỗ, chất rắn chứa tinh thể isomaltuloza và trehaluloza nêu trên bao gồm isomaltuloza với lượng nằm trong khoảng từ 70% đến 90% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 72% đến 89% khối lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 74% đến 88% khối lượng, còn tốt hơn là nằm trong khoảng từ 75% đến 85% khối lượng, trehaluloza với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 25% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6% đến 20% khối lượng, glucoza với lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 5% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,2% đến 4% khối lượng, fructoza với lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 5% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,2% đến 4% khối lượng, và sucroza với lượng nằm trong khoảng từ 0,05% đến 4% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1% đến 3% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của chất rắn.