



(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) 
1-0022823

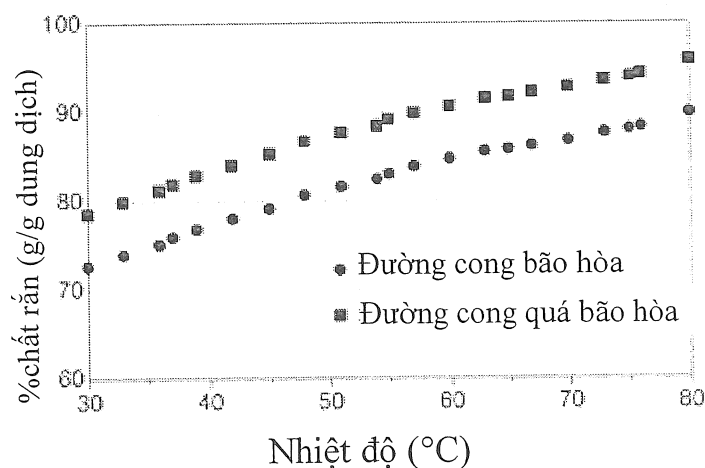
(51)⁷ C07H 1/06, 3/02

(13) B

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2012-02180 | (22) | 25.03.2011 | | |
| (86) | PCT/KR2011/002072 | 25.03.2011 | (87) | WO2011/119004 | 29.09.2011 |
| (30) | 10-2010-0027546 | 26.03.2010 | KR | | |
| (45) | 27.01.2020 | 382 | (43) | 25.02.2013 | 299 |
| (73) | CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
500 Namdaemunro 5-ga, Jung-gu, Seoul 100-749, Republic of Korea | | | | |
| (72) | LEE, Kang Pyo (KR), SONG, Sang Hoon (KR), PARK, Seung Won (KR), KIM, Sung Bo (KR), HONG, Young Ho (KR), LEE, Joo Hang (KR), KIM, Taek Beom (KR), AN, Jun Gap (KR), KIM, Jung Hoon (KR) | | | | |
| (74) | Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.) | | | | |
-

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT TINH THỂ D-PSICOZA

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất tinh thể D-psicoza từ dung dịch D-psicoza bằng cách sử dụng kỹ thuật quá bão hòa.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất tinh thể D-psicoza từ dung dịch D-psicoza bằng cách sử dụng kỹ thuật quá bão hòa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

D-psicoza là đường tự nhiên có mặt với lượng rất nhỏ trong quá trình đồng phân hóa mật đường hoặc glucoza và monosacarit, có độ ngọt bằng khoảng 70% so với đường. D-psicoza được thông báo là chất làm ngọt có ảnh hưởng rất ít đến sự tăng khối lượng cơ thể vì nó không được chuyển hóa bởi người, chất này gần như không chứa calo, và có tác dụng ức chế sự tạo thành chất béo trong cơ thể (Matuo, T. *et. Al.*, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 10, 233-237, 2001 ; Matsuo, T. and K. Izumori, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 13, S127, 2004).

Gần đây, sự ảnh hưởng của D-psicoza đến các tác dụng không gây sâu răng và chống sâu răng đã được thông báo, và do đó việc phát triển D-psicoza để làm chất hỗ trợ cho sức khỏe răng miệng và để làm chất làm ngọt có thể thay thế đường, đã được thực hiện một cách tích cực.

Mặc dù D-psicoza thu hút sự chú ý của ngành công nghiệp thực phẩm như một chất làm ngọt để ngăn ngừa sự tăng khối lượng cơ thể do các tính chất và chức năng của nó, chỉ một lượng nhỏ D-psicoza được tạo ra từ fructoza ở nhiệt độ cao, và do đó rất khó sản xuất D-psicoza bằng cách tổng hợp hóa học. Mặc dù các phương pháp sản xuất hàng loạt bằng cách cho fructoza phản ứng với D-tagatoza epimeraza hoặc cho fructoza phản ứng với

D-psicoza epimeraza đã được thông báo, nhưng hiệu suất của D-psicoza là quá thấp nên giá thành sản xuất của chúng rất cao.

Gần đây, các tác giả sáng chế đã thông báo phương pháp sản xuất D-psicoza kinh tế bằng cách đồng phân hóa glucoza thành fructoza, sau đó cho fructoza phản ứng với các tế bào tổng hợp D-psicoza epimeraza đã được cố định (Đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2009-0118465).

Dung dịch phản ứng chứa D-psicoza được tạo ra bằng các phản ứng enzym là các sản phẩm có độ tinh khiết thấp chứa D-psicoza ở dạng rắn với lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 30% khối lượng, và do đó cần tách D-psicoza ở độ tinh khiết cao. Các phương pháp khác nhau được áp dụng cho các chất được sản xuất công nghiệp để tách chúng ở độ tinh khiết cao. Trong trường hợp đường, phương pháp sắc ký thường được sử dụng để điều chế chất lỏng có độ tinh khiết cao, sau đó kết tinh để thu được sản phẩm đường có độ tinh khiết cao. Đối với D-psicoza, phương pháp sản xuất có thể áp dụng trong công nghiệp vẫn chưa được phát triển.

JP 03228687 cũng bộc lộ phương pháp điều chế D-psicoza.

Phương pháp sản xuất D-psicoza ở dạng bột bằng cách loại bỏ fructoza không phản ứng trong dung dịch phản ứng chứa D-psicoza bằng cách lên men nấm men và sử dụng lượng lớn etanol đã được thông báo (Kei T. *et. al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 90(4), 453-455, 2000). Tuy nhiên, việc sử dụng etanol với lượng lớn đòi hỏi thiết bị đắt tiền để chống cháy nổ và thu hồi sản phẩm, và các vấn đề như hỏng thiết bị khuấy do sử dụng dung môi hữu cơ và sự có mặt các chất lạ trong các sản phẩm thu hồi có thể xảy ra. Thêm vào đó, vì các sản phẩm cuối ở dạng bột, chúng có thể bị tổn hao với lượng lớn trong quá trình khử nước, rửa và sấy khô. Mặc dù D-psicoza được nghiền thành bột để thu

được sản phẩm cuối, nhưng các bột này bị hút bám vào nhau, đưa các tạp chất lẫn vào các hạt bột, do đó làm giảm độ tinh khiết của sản phẩm cuối cùng. Với các sản phẩm ở dạng bột mịn, sự tăng thể tích lớn hơn sự tăng khối lượng, dẫn đến làm tăng chi phí sản xuất do phải đóng gói thể tích lớn và dẫn đến chi phí bổ sung trong quá trình phân phối. Hơn nữa, các sản phẩm ở dạng chất hóa học nguyên chất là bất lợi trong quy trình sản xuất thực phẩm do khả năng chảy thấp. Do đó, vẫn cần có phương pháp sản xuất D-psicoza tinh khiết ở dạng tinh thể hơn là dạng bột mịn, để sản xuất D-psicoza một cách kinh tế mà không sử dụng các dung môi hữu cơ, như etanol và cải thiện khả năng chảy trong quy trình sản xuất và làm tăng giá trị sản phẩm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu về phương pháp sản xuất tinh thể D-psicoza từ dung dịch D-psicoza thu được bằng cách chuyển hóa sinh học hoặc bằng các phản ứng enzym mà không sử dụng dung môi hữu cơ, trong đó các tinh thể D-psicoza được sản xuất ở kích thước thích hợp bằng cách duy trì dung dịch D-psicoza ở trạng thái quá bão hòa trong vùng giả ổn định, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tinh thể D-psicoza bằng cách duy trì dung dịch D-psicoza trong vùng giả ổn định nằm giữa đường cong bão hòa và đường cong quá bão hòa.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tinh thể D-psicoza tinh khiết, bao gồm các bước:

loại bỏ tạp chất ra khỏi dung dịch D-psicoza để thu được dung dịch D-psicoza tinh khiết;

cô dung dịch D-psicoza tinh khiết này; và

kết tinh D-psicoza từ dung dịch D-psicoza đã cô ở trạng thái quá bão hòa trong vùng giả ổn định.

Theo một phương án của sáng chế, quá trình cô dung dịch D-psicoza tinh khiết có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 70°C. Khi nhiệt độ của dung dịch cô tăng lên đến nhiệt độ cao hơn khoảng 70°C, D-psicoza có thể bị biến chất bởi nhiệt. Khi nhiệt độ giảm xuống thấp hơn khoảng 60°C, khó cô dung dịch đến nồng độ mong muốn. Do nhiệt độ của chất phản ứng tăng nhanh bởi nhiệt bay hơi khi quá trình cô xảy ra, quá trình cô này cần được thực hiện nhanh trong khi vẫn duy trì nhiệt độ khoảng 70°C hoặc thấp hơn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các dấu hiệu và các ưu điểm trên đây và các dấu hiệu khác và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn nhờ việc mô tả chi tiết các phương án làm ví dụ của chúng dựa vào các hình vẽ kèm theo trong đó:

Fig. 1 là đồ thị thể hiện đường cong bão hòa và đường cong quá bão hòa của D-psicoza tinh khiết theo nhiệt độ;

Fig. 2 là đồ thị thể hiện lượng dư của D-psicoza ở nồng độ 80% (g/g dung dịch) theo nhiệt độ;

Fig. 3 là ảnh chụp thể hiện các mầm tinh thể D-psicoza tạo ra được quan sát bằng cách sử dụng kính hiển vi;

Fig. 4 là ảnh chụp thể hiện các tinh thể D-psicoza được tạo ra bằng cách kiểm soát nhiệt độ theo phương án làm ví dụ của sáng chế, ảnh này được chụp bằng cách sử dụng kính hiển vi; và

Fig. 5 là ảnh chụp thể hiện các tinh thể D-psicoza được sản xuất bằng cách cô trong chân không theo một phương án làm ví dụ của sáng chế, ảnh này được chụp bằng cách sử dụng kính hiển vi.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ trạng thái quá bão hòa dùng để chỉ trạng thái không ổn định, trong đó chất tan được hòa tan vượt quá khả năng hòa tan của dung môi và là trạng thái trong đó chất tan có thể được kết tinh thành chất rắn. Vì vậy, trạng thái quá bão hòa cần đạt được trong dung dịch để tách chất tan ra khỏi dung dịch bằng cách kết tinh. Nói chung, trạng thái quá bão hòa của dung dịch có thể chịu tác động bởi các điều kiện bên ngoài, tạp chất, nhiệt độ, nồng độ, độ pH, và các yếu tố khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ trạng thái quá bão hòa bên dưới vùng giả ổn định dùng để chỉ khoảng nồng độ từ nồng độ cân bằng, nghĩa là, nồng độ bão hòa đến nồng độ quá bão hòa tối thiểu mà trên nồng độ này các tinh thể được tạo ra một cách tự nhiên. Sự kết tinh, chẳng hạn như tạo mầm tinh thể không xảy ra ở các nồng độ trong khoảng này. Tuy nhiên, khi các tinh thể được bổ sung từ bên ngoài vào dung dịch có nồng độ nằm trong khoảng này, sự lớn lên của tinh thể xảy ra tự phát và kích thước tinh thể tăng lên do lượng chất tan trong dung dịch ở nồng độ quá bão hòa. Nghĩa là, khi mầm tinh thể được đưa vào dung dịch ở nồng độ bão hòa hoặc nồng độ cao hơn để tạo ra tinh thể, các mầm này phát triển trong vùng giả ổn định để tạo ra tinh thể. Khi dung dịch kết tinh được cô quá mức hoặc được làm lạnh nhanh, nó đạt tới trạng thái quá bão hòa vượt quá vùng giả ổn định, và do đó sự tạo mầm tinh thể chứ không phải là sự lớn lên của tinh thể sẽ xảy ra để tạo ra nhiều tinh

thể nhỏ. Do đó, để thu được các tinh thể có kích thước thích hợp, quá trình kết tinh cần được thực hiện ở tốc độ thích hợp trong khi dung dịch kết tinh được duy trì ở trạng thái quá bão hòa trong vùng giả ổn định.

Theo một phương án của sáng chế, dung dịch D-psicoza dùng làm chất ban đầu có thể được tạo ra nhờ vi khuẩn thuộc loài *Corynebacterium* biểu hiện D-psicoza epimeraza hoặc D-psicoza epimeraza được phân lập từ nó.

Theo một phương án của sáng chế, như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp Patent Hàn Quốc số 2009-0118465, dung dịch D-psicoza có thể thu được bằng cách cố định tế bào thu được bằng cách nuôi cấy *Corynebacterium glutamicum* KCTC 13032 hoặc enzym được phân lập từ nó trong chất mang đã được cố định tế bào và cung cấp fructoza làm cơ chất cho tế bào đã được cố định hoặc enzym này.

Để thu được tinh thể D-psicoza từ dung dịch D-psicoza, các chất khác có thể ảnh hưởng đến quá trình tinh chế và kết tinh D-psicoza cần được loại bỏ để tạo ra điều kiện cần để kết tinh hiệu quả.

Do đó, phương pháp sản xuất tinh thể D-psicoza theo sáng chế bao gồm bước loại bỏ các tạp chất ra khỏi dung dịch D-psicoza để thu được dung dịch D-psicoza tinh khiết.

Theo một phương án của sáng chế, bước tạo ra dung dịch D-psicoza có thể bao gồm:

cho dung dịch D-psicoza đi qua cột nạp chất tẩy màu để tẩy màu dung dịch D-psicoza;

khử muối của dung dịch D-psicoza đã tẩy màu bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion; và

cho dung dịch D-psicoza đã khử muối qua cột nạp nhựa trao đổi ion có gắn nhóm canxi hoạt tính để thu được dung dịch D-psicoza tinh khiết.

Theo một phương án của sáng chế, quá trình khử muối của dung dịch D-psicoza có thể được thực hiện bằng cách sắc ký, trong đó dung dịch này được cho đi qua cột nạp nhựa trao đổi cation, cột nạp nhựa trao đổi anion, và cột nạp hỗn hợp của nhựa trao đổi cation và nhựa trao đổi anion.

Nói chung, phương pháp tách bằng cách sắc ký được sử dụng để thu được D-psicoza có độ tinh khiết cao. Để thu được tinh thể D-psicoza, lượng D-psicoza trong dung dịch D-psicoza cần nằm trong khoảng từ 70% đến 85% hoặc cao hơn. Do đó, D-psicoza cần được tinh chế và cô đến nồng độ mong muốn trước khi kết tinh vì độ tinh khiết của D-psicoza trong dung dịch D-psicoza thu được bằng phản ứng của D-psicoza epimeraza là khoảng 22%, độ tinh khiết này là quá thấp để kết tinh trực tiếp. Để thu được các tinh thể D-psicoza có độ tinh khiết cao, các tạp chất có thể được loại bỏ bằng cách tẩy màu và khử muối dung dịch này và D-psicoza có thể được tinh chế bằng cách sắc ký, như sắc ký trong cột nạp nhựa trao đổi anion có gắn nhóm canxi hoạt tính trước khi kết tinh.

Phương pháp sản xuất tinh thể D-psicoza theo sáng chế có thể bao gồm bước cô dung dịch D-psicoza tinh khiết.

Theo một phương án của sáng chế, quá trình cô dung dịch D-psicoza có thể được thực hiện ở nhiệt độ khoảng 65°C hoặc thấp hơn.

Phương pháp sản xuất tinh thể D-psicoza theo sáng chế có thể bao gồm bước kết tinh D-psicoza ra khỏi dung dịch D-psicoza đã cô ở trạng thái quá bão hòa bên dưới vùng giả ổn định bằng cách kiểm soát nhiệt độ và cô dung dịch này.

Theo một phương án của sáng chế, dung dịch D-psicoza đã cô được sử dụng trong bước kết tinh có thể là dung dịch D-psicoza có nồng độ nằm trong khoảng từ 70% đến 85% (g/g) hoặc nồng độ cao hơn.

Theo một phương án của sáng chế, các mầm tinh thể D-psicoza có thể được bổ sung vào dung dịch D-psicoza cô được sử dụng trong bước kết tinh với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 1% (g/g) tính theo tổng lượng D-psicoza trong dung dịch D-psicoza.

Theo sáng chế, các tinh thể D-psicoza được tạo ra bằng cách duy trì dung dịch D-psicoza ở trạng thái quá bão hòa bên dưới vùng giả ổn định, là vùng mà D-psicoza có mặt ở nồng độ cao hơn nồng độ cân bằng hoặc ở nồng độ cân bằng, trong đó D-psicoza tạo ra trạng thái cân bằng với dung môi trong dung dịch và sự lớn lên của tinh thể xảy ra đồng thời. Trạng thái quá bão hòa cần thiết cho bước kết tinh có thể được duy trì bằng cách làm giảm nhiệt độ của dung dịch D-psicoza hoặc thay đổi nồng độ của D-psicoza trong dung dịch D-psicoza.

Theo một phương án của sáng chế, diễn biến của quá trình kết tinh trong bước kết tinh có thể được theo dõi bằng cách lấy mẫu ở các khoảng thời gian định trước để quan sát mẫu bằng mắt thường hoặc sử dụng kính hiển vi hoặc phân tích nồng độ đường trong dịch nổi bề mặt thu được bằng cách ly tâm mẫu. Theo kết quả này, nhiệt độ hoặc nồng độ của D-psicoza có thể được kiểm soát.

Theo một phương án của sáng chế, trạng thái quá bão hòa bên dưới vùng giả ổn định của dung dịch D-psicoza trong bước kết tinh có thể được duy trì bằng cách làm giảm nhiệt độ khi sự lớn lên của tinh thể D-psicoza

trong dung dịch dừng lại hoặc nồng độ của dung dịch D-psicoza không thay đổi nữa sau khi bổ sung mầm tinh thể D-psicoza vào dung dịch D-psicoza.

Theo một phương án của sáng chế, trạng thái quá bão hòa bên dưới vùng giả ổn định của dung dịch D-psicoza trong bước kết tinh có thể được duy trì bằng cách bổ sung dung dịch D-psicoza ở nồng độ thấp hơn nồng độ của dung dịch D-psicoza này khi D-psicoza được cô đến nồng độ quá bão hòa hoặc nồng độ cao hơn sau khi bổ sung mầm tinh thể D-psicoza vào dung dịch D-psicoza và tinh thể lớn lên khi khuấy nhẹ dung dịch, ví dụ khuấy ở tốc độ khoảng 10 vòng/phút.

Theo một phương án của sáng chế, dung dịch D-psicoza cần được bổ sung vào để duy trì dung dịch D-psicoza ở trạng thái quá bão hòa bên dưới vùng giả ổn định trong bước kết tinh bao gồm D-psicoza ở nồng độ thấp hơn nồng độ của dung dịch D-psicoza đã cô đến nồng độ quá bão hòa hoặc nồng độ cao hơn. Ví dụ, dung dịch D-psicoza cần bổ sung có thể là dung dịch D-psicoza có nồng độ nằm trong khoảng từ 60% đến 70%.

Theo một phương án của sáng chế, trạng thái quá bão hòa trong bước kết tinh có thể xuất hiện ở nồng độ nằm trong khoảng từ nồng độ bão hòa đến nồng độ cao hơn nồng độ bão hòa khoảng 6% (g/g dung dịch).

Nồng độ quá bão hòa là đặc tính nội tại của một chất và có thể đạt được bằng cách làm lạnh hoặc cô dung dịch bão hòa. Nồng độ quá bão hòa và nhiệt độ quá bão hòa có thể được xác định tương ứng là nồng độ và nhiệt độ mà tại đó dung dịch có độ đậm đặc cao đạt tới trạng thái không ổn định để bắt đầu tạo ra các tinh thể nhỏ, khi nhiệt độ của dung dịch được giảm chậm từ nhiệt độ mà tại đó nó đạt tới trạng thái bão hòa. Nồng độ quá bão hòa mà tại đó các tinh thể được tạo ra có thể được xác định bằng cách bổ sung nước đã

khử ion vào dung dịch có nồng độ quá bão hòa, gia nhiệt lại dung dịch này để hòa tan nhanh các tinh thể nhỏ, điều chỉnh nhiệt độ của dung dịch đến nhiệt độ bão hòa ở nồng độ pha loãng, và làm lạnh lại dung dịch. Vùng giả ổn định của một chất có thể được xác định bằng cách lặp lại quá trình pha loãng, gia nhiệt, và làm lạnh lại dung dịch chứa chất này ở các nồng độ bão hòa khác nhau. D-psicoza cũng có khoảng nồng độ của vùng giả ổn định vốn có của nó và khoảng này được xác định là từ nồng độ bão hòa hoặc cao hơn đến nồng độ cao hơn 6% so với nồng độ bão hòa. Bước kết tinh có thể được thực hiện để thu được các tinh thể có hình dạng ổn định và kích thước lớn, trong khi duy trì dung dịch D-psicoza trong vùng giả ổn định của D-psicoza.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp sản xuất tinh thể D-psicoza theo sáng chế có thể còn bao gồm các bước:

thu hồi tinh thể D-psicoza thu được trong bước kết tinh,
rửa tinh thể này bằng nước khử ion, và
sấy tinh thể.

Quá trình sấy tinh thể có thể được thực hiện trong thiết bị sấy tầng sôi hoặc thiết bị sấy chân không.

Theo một phương án của sáng chế, tinh thể D-psicoza tinh khiết có kích thước nằm trong khoảng từ 0,1mm đến khoảng 0,2mm.

Theo một phương án của sáng chế, tinh thể D-psicoza tinh khiết có thể được tạo ra bằng phương pháp bao gồm:

bước cô dung dịch D-psicoza được tạo ra bằng các phản ứng enzym và dung dịch tương tự đến nồng độ khoảng 40% (g/g dung dịch) và cho dung dịch này đi qua cột nạp các chất tẩy màu là hạt cacbon hoạt tính (granulated active carbon: GAC) ở tốc độ tuyến tính khoảng 4m mỗi 1 giờ để tẩy màu;

bơm dung dịch D-psicoza đã tẩy màu vào các cột, mỗi cột này được nạp nhựa trao đổi cation, nhựa trao đổi anion, và hỗn hợp của nhựa trao đổi cation và nhựa trao đổi anion ở nhiệt độ khoảng 40°C ở tốc độ gấp hai lần thể tích của nhựa trao đổi ion mỗi giờ để khử muối của dung dịch D-psicoza đã tẩy màu;

cô dung dịch D-psicoza đã tinh chế bằng cách tẩy màu và khử muối đến nồng độ khoảng 60% (g/g dung dịch) và cho dung dịch này đi qua cột tách được nạp nhựa trao đổi ion có gắn nhóm canxi hoạt động để tách D-psicoza khỏi ra khỏi fructoza;

cô dung dịch D-psicoza tách được này đến nồng độ khoảng 85% (g/g) ở nhiệt độ 70°C hoặc thấp hơn trong thiết bị cô;

bơm các mầm tinh thể D-psicoza vào dung dịch D-psicoza đã cô với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến khoảng 1% (g/g) tinh theo tổng lượng D-psicoza hòa tan trong dung dịch D-psicoza đã cô và điều chỉnh nhiệt độ và nồng độ để kết tinh D-psicoza ra khỏi dung dịch ở trạng thái quá bão hòa bên dưới vùng giả ổn định; và

tách tinh thể D-psicoza bằng cách ly tâm ra khỏi dung dịch kết tinh, rửa dung dịch và tinh thể D-psicoza, và sấy tinh thể trên thiết bị sấy tầng sôi hoặc thiết bị sấy chân không.

Ưu điểm của sáng chế

Phương pháp sản xuất theo một phương án của sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất tinh thể D-psicoza tinh khiết và thích hợp cho các ứng dụng công nghiệp từ dung dịch D-psicoza bằng các quá trình kết tinh kinh tế mà không sử dụng dung môi hữu cơ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết kèm theo các ví dụ cụ thể. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và phạm vi của sáng chế không bị hạn chế ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Sản xuất dung dịch D-psicoza có độ tinh khiết thấp bằng cách sử dụng vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*

Như được mô tả trong Đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2009-0118465, D-psicoza được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp sản xuất D-psicoza liên tục bao gồm nuôi cấy *Corynebacterium glutamicum* KCTC 13032 và chuyển hóa fructoza thành D-psicoza bằng chất mang mà trên đó vi sinh vật hoặc D-psicoza epimeraza phân lập từ nó được cố định. Nồng độ D-psicoza trong dung dịch D-psicoza thu được bằng cách sử dụng phương pháp này là khoảng 22%, nồng độ này là quá thấp để kết tinh trực tiếp từ đó.

Ví dụ 2: tinh chế dung dịch D-psicoza có độ tinh khiết thấp

Dung dịch D-psicoza thu được trong ví dụ 1 được cô đến nồng độ khoảng 40% (g/g dung dịch), sau đó cho đi qua cột tẩy màu nạp hạt cacbon hoạt tính để loại bỏ các chất có màu trong dung dịch đã cô.

Độ tinh khiết của D-psicoza trong dung dịch D-psicoza thu được trong ví dụ 1 là khoảng 22%, do lượng chất rắn này là quá thấp nên không thích hợp để kết tinh. Độ tinh khiết của chất cần kết tinh phải tăng đến mức nằm trong khoảng từ 70% đến 90% hoặc cao hơn để kết tinh được. Để tách hiệu quả D-psicoza bằng cách sắc ký, các ion cần được loại bỏ ra khỏi dung dịch D-

psicoza. Khi thành phần ion có mặt trong dung dịch cần tách, nhóm hoạt tính trong nhựa tách sẽ được thế bằng thành phần ion này, làm giảm khả năng tách của nhựa và do đó không thể sử dụng nhựa tách này nhiều lần. Do đó, dung dịch D-psicoza đã tẩy màu điều chế được ở trên được cho đi qua cột nạp nhựa trao đổi cation được thế bằng nhóm hydro và nhựa trao đổi anion được thế bằng nhóm hydroxyl, sau đó cho đi qua cột trao đổi ion được nạp hỗn hợp của nhựa trao đổi cation và nhựa trao đổi anion trong bước cuối cùng để loại bỏ thành phần ion trong dung dịch. Việc loại bỏ thành phần ion trong dung dịch được xác nhận bằng cách đo độ dẫn điện bằng máy đo độ dẫn. Khả năng dẫn điện của dung dịch tinh khiết chế được kiểm soát ở mức nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10 microsiemen/cm.

Ví dụ 3: Điều chế dung dịch D-psicoza có độ tinh khiết cao bằng cách sắc ký

Dung dịch D-psicoza có độ tinh khiết thấp mà từ đó các tạp chất chẳng hạn như chất màu và thành phần ion được loại ra bằng cách tẩy màu và khử muối trong ví dụ 2 được cô đến nồng độ khoảng 60% (g/g dung dịch), sau đó cho đi qua nhựa trao đổi ion (Purolite PCR 642 K) được thế bằng nhóm canxi để thu được dung dịch D-psicoza tinh khiết.

Thể tích của nhựa trao đổi ion nạp vào cột nhựa trao đổi ion là khoảng 200l, thể tích của mẫu đi qua cột này, tức là dung dịch D-psicoza tinh khiết thu được trong ví dụ 2, là khoảng 20l, và nhiệt độ thực hiện là khoảng 60°C. Mẫu này được bơm và rửa giải bằng nước đã khử ion ở tốc độ khoảng 260l/giờ, và sau đó nồng độ của fructoza và D-psicoza trong mỗi phân đoạn thu được lần lượt được xác định bằng cách sử dụng hệ thống HPLC (HP, Agilent 1200). Phân đoạn D-psicoza tinh khiết được thu hồi và phân đoạn

chứa D-psicoza và fructoza được cô và được sử dụng lại làm mẫu để tách. Cột (Bio-Rad, Inc.) được thể bằng nhóm canxi được sử dụng cho cột phân tích HPLC, và nước đã khử ion được sử dụng ở tốc độ dòng khoảng 0,5ml/phút.

Ví dụ 4: cô dung dịch D-psicoza

Để thu được dung dịch D-psicoza đã cô cần thiết để kết tinh, dung dịch D-psicoza tinh khiết trong ví dụ 3 được cho vào thiết bị cô chân không (EYELA Inc., N-11) và cô đến nồng độ khoảng 80% (g/g dung dịch). Dung dịch cô này được chia vào mỗi ống, ống này được để yên trong bể cách thủy ở nhiệt độ 70°C, 65°C, và 60°C tương ứng. Các mẫu được lấy ở các khoảng thời gian cách đều nhau để xác định lượng dư trong các mẫu phân ước của dung dịch cô. Các kết quả được thể hiện trên Fig.2. Khi nhiệt độ của dung dịch cô là cao hơn khoảng 70°C, đã nhận thấy là D-psicoza bị biến tính bởi nhiệt sau 3 giờ và chỉ còn lại khoảng 78% so với lượng ban đầu sau 22 giờ. Mặc dù nhiệt độ bên trong dung dịch được duy trì ở khoảng 40°C hoặc thấp hơn nhờ nhiệt bay hơi trong quy trình cô, nhiệt độ tăng nhanh khi lượng D-psicoza đạt tới khoảng 80% (g/g dung dịch) hoặc cao hơn. Từ các kết quả này, đã nhận thấy là khi D-psicoza được cô đến nồng độ khoảng 80% (g/g dung dịch) hoặc nồng độ cao hơn, cần làm giảm nhanh nhiệt độ bên trong của dung dịch cô đến khoảng 70°C hoặc thấp hơn, hoặc cần cô ở nhiệt độ thấp hơn hoặc bằng 65°C chẳng hạn.

Ví dụ 5: điều chế mầm tinh thể D-psicoza

Dung dịch D-psicoza (chứa khoảng 1000g D-psicoza) đã tinh chế và tách trong ví dụ 3 được cô đến nồng độ khoảng 85% (g/g dung dịch) như

được mô tả trong ví dụ 4. 1g sản phẩm có độ tinh khiết 95% (Sigma) được mua, cho vào cối, nghiền và sau đó trộn với dung dịch etanol. Hệ thiết bị phản ứng (IKA, LR-2. ST) có bồn phản ứng dung tích 2l có lớp vỏ kép được sử dụng làm thiết bị kết tinh, nhiệt độ ban đầu của dung dịch cô trong thiết bị kết tinh được kiểm soát đến khoảng 50°C, dung dịch D-psicoza có độ tinh khiết 95% trong etanol điều chế được ở trên được bổ sung vào làm mầm tinh thể, và dung dịch tạo thành được khuấy ở tốc độ khoảng 100 vòng/phút. Sau khi khẳng định đã trộn dung dịch cô và mầm tinh thể, tốc độ khuấy được điều chỉnh đến 10 vòng/phút và hỗn hợp được làm nguội ở tốc độ 1°C/giờ. Kính hiển vi được sử dụng để xác định nồng độ mà tại đó số lượng tinh thể D-psicoza tăng nhanh. Trạng thái này được cho là quá bão hòa. Sau đó, nhiệt độ được duy trì để tinh thể lớn lên cho đến khi quan sát bằng kính hiển vi và phân tích đo độ đường cho thấy là tinh thể không lớn lên thêm nữa hoặc nồng độ đường của dịch nổi bề mặt không thay đổi nữa và sau đó nhiệt độ của dung dịch được làm nguội khoảng 1°C. Sau khi nhiệt độ được làm giảm xuống khoảng 33°C, trạng thái tinh thể cuối cùng đạt được được thể hiện trên Fig.3. Việc làm nguội được dừng lại ở nhiệt độ khoảng 33°C, và loại nước bằng cách ly tâm, rửa và sấy để thu được các mầm tinh thể D-psicoza. Các mầm tinh thể cuối cùng thu được có đường kính nằm trong khoảng từ 0,04mm đến khoảng 0,10mm, và trọng lượng khô là khoảng 40% so với trọng lượng của D-psicoza có mặt trong dung dịch nước ban đầu.

Ví dụ 6: xác định nồng độ bão hòa và nồng độ quá bão hòa của D-psicoza

Các quy trình nêu trong ví dụ 3 đến 5 được lặp lại để thu được D-psicoza tinh khiết. D-psicoza điều chế được này được hòa tan để thu được

đường cong bão hòa theo nhiệt độ. Bắt đầu ở nhiệt độ 30°C, nồng độ mà tại đó D-psicoza không hòa tan thêm nữa khi bổ sung một lượng nhỏ D-psicoza được xác định là nồng độ bão hòa ở nhiệt độ tương ứng, và nồng độ bão hòa được xác định bằng cách tăng nhiệt độ đến 80°C để tạo ra đường cong bão hòa D-psicoza được thể hiện trên Fig.1.

Thêm vào đó, D-psicoza được hòa tan và được cô đến nồng độ khoảng 85% (g/g dung dịch). Sau đó, dung dịch D-psicoza được cho vào thiết bị kết tinh và làm nguội chậm đến nhiệt độ mà tại đó các tinh thể nhỏ được tạo ra nhanh. Nước đã khử ion được bổ sung vào để làm thay đổi nồng độ bão hòa, và sau đó thử nghiệm làm nguội được lặp lại để xác định nồng độ quá bão hòa của các nhiệt độ bão hòa tương ứng. Dựa vào các kết quả này, đường cong quá bão hòa của D-psicoza thể hiện trên Fig.1 được tạo ra.

Ví dụ 7: kết tinh D-psicoza bằng cách thay đổi nhiệt độ

Dung dịch D-psicoza (chứa khoảng 2780g D-psicoza) đã tinh chế như được mô tả trong ví dụ 3 được thu hồi, cô đến nồng độ khoảng 85% (g/g dung dịch), và cho vào thiết bị kết tinh. Thiết bị kết tinh này được kiểm soát để duy trì nhiệt độ ở khoảng 50°C. Các mầm tinh thể thu được trong ví dụ 5 được cho vào cối và được trộn với etanol để thu được dung dịch D-psicoza. Dung dịch D-psicoza trong etanol này được đưa dưới dạng mầm tinh thể vào dung dịch D-psicoza cô trong thiết bị kết tinh sao cho các mầm này có mặt với lượng 0,3% (khối lượng/khối lượng) so với D-psicoza trong dung dịch kết tinh. Sau đó, dung dịch tạo ra được khuấy ở tốc độ khoảng 100 vòng/phút để các mầm tinh thể được phân bố đồng nhất trong dung dịch cô. Sau đó, tốc độ của máy khuấy được giảm tới khoảng 10 vòng/phút, các mẫu được lấy ở các

thời điểm định trước để quan sát sự tăng số lượng tinh thể và sự thay đổi kích thước tinh thể bằng kính hiển vi. Các mẫu này được ly tâm bằng cách sử dụng các vi ống có dung tích 1,5ml và nồng độ và độ tinh khiết của dịch nổi bề mặt được xác định lần lượt bằng máy đo độ đường, và phương pháp HPLC.

Khi nhiệt độ đạt tới điểm (nhiệt độ bão hòa) mà tại đó sự thay đổi kích thước tinh thể hoặc sự thay đổi nồng độ của dịch nổi bề mặt không xảy ra nữa, nhiệt độ của thiết bị kết tinh được làm nguội khoảng 1°C, nhờ đó dung dịch D-psicoza sẽ tồn tại trong vùng nằm giữa nồng độ bão hòa và nồng độ quá bão hòa của nó, nghĩa là trạng thái quá bão hòa bên dưới vùng giả ổn định được duy trì.

Khi dung dịch D-psicoza để kết tinh được dịch chuyển về vùng quá bão hòa bằng cách làm nguội nhanh, các tinh thể nhỏ bắt đầu được tạo ra và số lượng mầm tinh thể tăng lên, cuối cùng dẫn đến sự giảm kích thước tinh thể. Khi kích thước tinh thể nhỏ, không dễ loại nước bằng cách ly tâm, do đó khó sử dụng các tinh thể này trong các quy trình thực tế.

Dịch nổi bề mặt cuối cùng được làm nguội cho đến khi nồng độ đạt tới khoảng 74% (g/g dung dịch), và trạng thái tinh thể ở thời điểm này được thể hiện trên Fig.4. Dung dịch mà trong đó quá trình kết tinh đã kết thúc được đưa vào thiết bị loại nước ly tâm tốc độ cao và được ly tâm ở tốc độ khoảng 4000 vòng/phút trong khoảng 10 phút để gạn dịch nổi bề mặt và chỉ thu hồi các tinh thể. Sau đó, nước đã khử ion được bổ sung ở dạng khí dung trong quá trình khử nước để rửa dịch nổi bề mặt ra khỏi mặt ngoài của tinh thể. D-psicoza thu được sau khi loại nước được chuyển vào thiết bị sấy tầng sôi hoặc thiết bị sấy chân không để sấy. Kết quả cho thấy rằng lượng tinh thể D-psicoza sau khi sấy khô là khoảng 1408g, hiệu suất thu hồi khoảng 50% lượng

so với khoảng 2789g D-psicoza đã được hòa tan ban đầu. Kích thước tinh thể nằm trong khoảng từ 0,1mm đến khoảng 0,2mm, tương ứng với khoảng 1/2 kích thước của fructoza hoặc sucroza có bán trên thị trường.

Ví dụ 8: kết tinh D-psicoza bằng cách sử dụng sự thay đổi nồng độ

Khoảng 5000g dung dịch tính theo lượng rắn thu được từ dung dịch D-psicoza đã tinh chế như được mô tả trong ví dụ 3. Trong số này, khoảng 2/3 lượng dung dịch này được cô đến nồng độ khoảng 60% (g/g dung dịch) và 1/3 lượng còn lại được cô đến khoảng 80% (g/g dung dịch). Dung dịch cô có nồng độ 80% (g/g dung dịch) được cho vào thiết bị cô (EYELA Inc., N-11) có lắp bình có dung tích 10l và cô trong khi khuấy ở tốc độ khoảng 10 vòng/phút. Dung dịch D-psicoza trong etanol điều chế được trong ví dụ 5 để làm mầm tinh thể được bổ sung vào bình này trong chân không, và nhiệt kế được lắp trong bình để đo sự thay đổi nhiệt độ bên trong. Trong quá trình cô này, các tinh thể lớn lên. Các mẫu được lấy ở các thời điểm định trước để quan sát số lượng tinh thể và sự thay đổi kích thước tinh thể bằng kính hiển vi, và các vi ống có dung tích 1,5ml được sử dụng để ly tâm, sau đó xác định nồng độ dịch nổi bề mặt bằng máy đo độ đường và xác định độ tinh khiết của dịch nổi bề mặt bằng phương pháp HPLC. Đôi khi, dung dịch này được cô đến nồng độ quá bão hòa hoặc cao hơn, do đó dẫn đến sự tạo thành tinh thể nhỏ. Kết quả là kích thước tinh thể giảm đi. Trong trường hợp này, dung dịch D-psicoza đã điều chế trước ở nồng độ thấp bằng khoảng 60% (g/g dung dịch) được bơm vào để hòa tan các tinh thể nhỏ tạo ra và đồng thời làm tăng độ tinh khiết của dung dịch cô để kết tinh mà độ tinh khiết của nó bị giảm do sự lớn lên của tinh thể.

Các mẫu được lấy và ly tâm. Sau đó, khi không quan sát thấy sự thay đổi kích thước tinh thể nữa, thì chân không được loại bỏ và các mẫu này được để yên ở nhiệt độ khoảng 40°C trong khoảng 12 giờ. Trạng thái tinh thể ở thời điểm này được thể hiện trên Fig.4. Dung dịch mà trong đó quá trình kết tinh đã kết thúc được cho vào thiết bị khử nước ly tâm ở tốc độ cao và ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong khoảng 10 phút để gạn dịch nổi bề mặt và chỉ thu hồi tinh thể. Sau đó, nước đã khử ion được bổ sung vào ở dạng khí dung để rửa dịch nổi bề mặt trên mặt ngoài của tinh thể. Các tinh thể D-psicoza thu được sau khi khử nước được chuyển vào thiết bị sấy tầng sôi hoặc thiết bị sấy chân không để làm sấy. Quan sát thấy là lượng tinh thể sau khi sấy khô là khoảng 2650g, hiệu suất thu hồi khoảng 53% so với khoảng 5000g D-psicoza đã hòa tan. Đã xác định được rằng kích thước tinh thể nằm trong khoảng từ 0,1mm đến khoảng 0,2mm. Khi các tinh thể này được so sánh với các tinh thể thu được bằng cách thay đổi nhiệt độ, chiều dài của các tinh thể thu được này là dài hơn so với các tinh thể thu được bằng cách thay đổi nhiệt độ.

Mặc dù các phương án làm ví dụ theo sáng chế đã được mô tả, cần hiểu rằng các phương án được mô tả trên đây được đưa ra chỉ để làm ví dụ theo tất cả các khía cạnh và không làm giới hạn việc cải biến và thay đổi sáng chế. Phạm vi của sáng chế được xác định bởi yêu cầu bảo hộ kèm chứ không phải bản mô tả chi tiết nêu trên. Cần hiểu rằng phạm vi của yêu cầu bảo hộ và tất cả các cải biến hoặc thay đổi bắt nguồn từ các phương án tương đương của chúng đều thuộc phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất tinh thể D-psicoza bao gồm các bước: loại bỏ tạp chất ra khỏi dung dịch D-psicoza để thu được dung dịch D-psicoza tinh khiết; cô dung dịch D-psicoza tinh khiết này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 70°C; và kết tinh D-psicoza ra khỏi dung dịch D-psicoza đã cô ở trạng thái quá bão hòa bên dưới vùng giả ổn định.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước điều chế dung dịch D-psicoza tinh khiết bao gồm: cho dung dịch D-psicoza đi qua cột nạp các chất tẩy màu để tẩy màu dung dịch D-psicoza; khử muối của dung dịch D-psicoza đã tẩy màu bằng cách sắc ký trao đổi ion; và cho dung dịch D-psicoza đã khử muối này đi qua cột nạp nhựa trao đổi ion có nhóm canxi hoạt tính gắn vào để thu được dung dịch D-psicoza tinh khiết.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các mầm tinh thể D-psicoza được bổ sung vào dung dịch D-psicoza đã cô được sử dụng trong bước kết tinh với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 1% (g/g) tính theo tổng lượng D-psicoza trong dung dịch D-psicoza đã cô.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch D-psicoza đã cô được sử dụng trong bước kết tinh là dung dịch D-psicoza có nồng độ lớn hơn hoặc bằng 70% (g/g).

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó diễn biến của quá trình kết tinh trong bước kết tinh được theo dõi để duy trì dung dịch D-psicoza đã cô ở trạng thái quá bão hòa bên dưới vùng giả ổn định bằng cách làm giảm nhiệt độ của dung dịch này khi sự lớn lên của tinh thể D-psicoza dừng lại hoặc nồng độ của dung dịch D-psicoza không thay đổi thêm nữa.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó diễn biến của quá trình kết tinh trong bước kết tinh được theo dõi để duy trì dung dịch D-psicoza đã cô ở trạng thái quá bão hòa bên dưới vùng giả ổn định bằng cách bổ sung dung dịch D-psicoza có nồng độ thấp hơn nồng độ của dung dịch này khi D-psicoza trong dung dịch này được cô đến nồng độ quá bão hòa hoặc nồng độ cao hơn.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trạng thái quá bão hòa bên dưới vùng giả ổn định trong bước kết tinh nằm trong khoảng từ nồng độ bão hòa đến nồng độ cao hơn 6% (g/g dung dịch) so với nồng độ bão hòa.

Fig.1

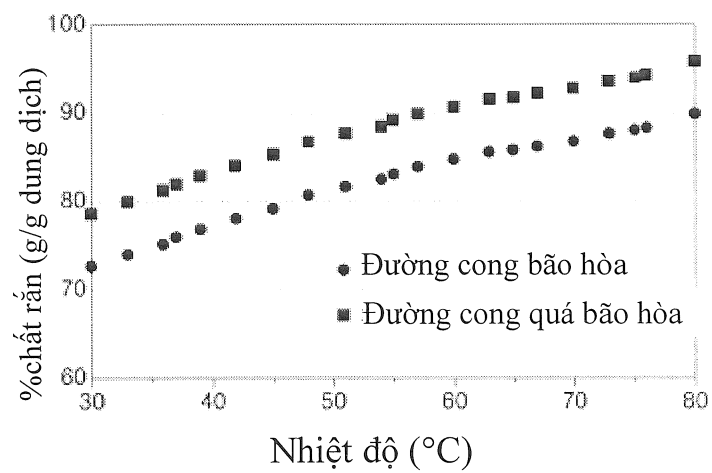


Fig.2

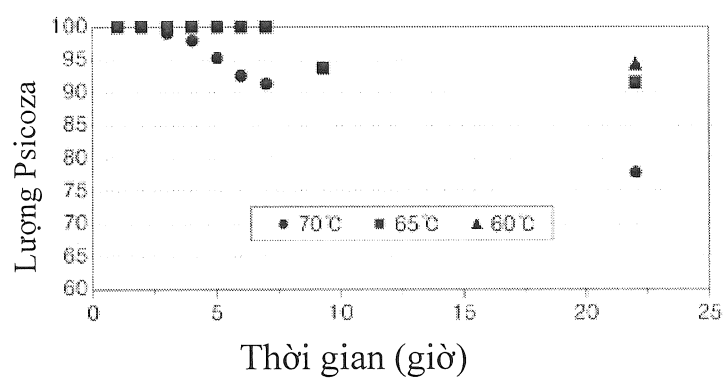


Fig.3

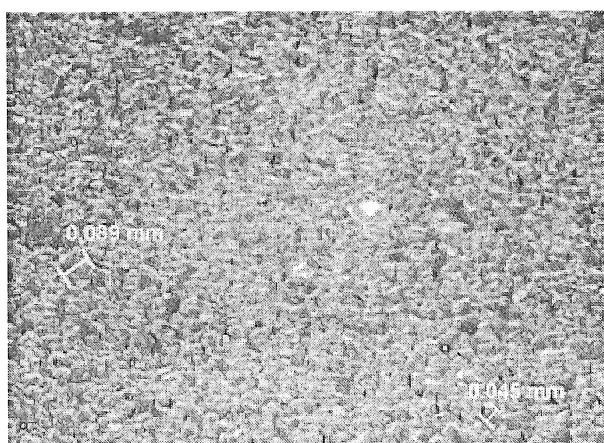
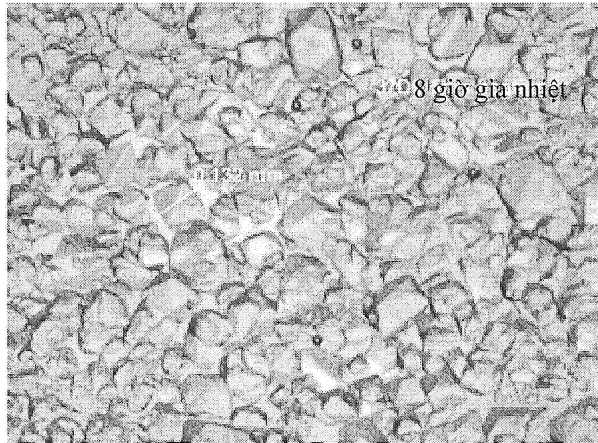


Fig.4**Fig.5**