



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

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

(11)



1-0029436

(51)⁸ A23K 20/147; A23K 10/14; A23K
20/189; A23K 10/12; A23K 10/30

(13) B

(21) 1-2018-01272

(22) 23/09/2016

(86) PCT/KR2016/010705 23/09/2016

(87) WO 2017/052298 30/03/2017

(30) 10-2015-0136600 25/09/2015 KR; 10-2016-0031463 16/03/2016 KR

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/07/2018 364A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

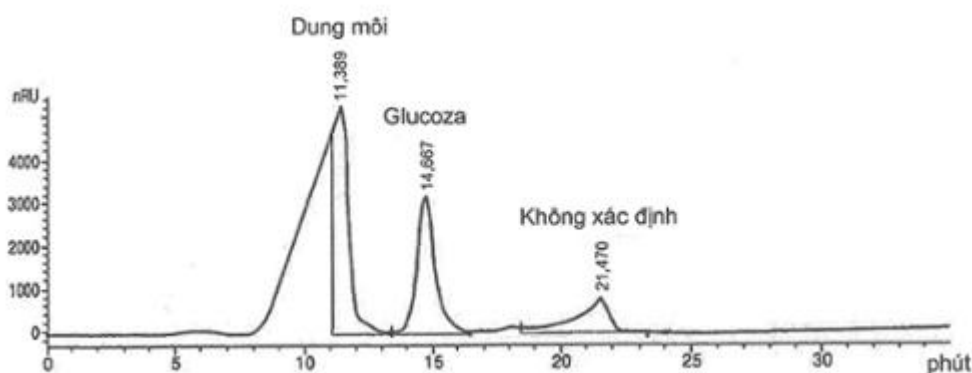
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) SEO, Hyo Jeong (KR); HONG, Young Ho (KR); CHO, Seong Jun (KR); KANG, Kyeong Il (KR); RYU, Je Hoon (KR); PARK, Seung Won (KR); HAN, Sung Wook (KR).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP CÔ PROTEIN TRONG BỘT NGŨ CỐC, BỘT NGŨ CỐC CHỨA PROTEIN ĐƯỢC CÔ BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY VÀ CHẤT PHỤ GIA DÙNG CHO THỨC ĂN CHỨA BỘT NGŨ CỐC NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp cô protein trong bột ngũ cốc, bột ngũ cốc chứa protein được cô bằng cách sử dụng phương pháp này, và chất phụ gia dùng cho thức ăn chứa bột ngũ cốc này. Theo phương pháp cô protein trong bột ngũ cốc của sáng chế, bột ngũ cốc được xử lý bằng enzym để làm tăng hàm lượng sacarit tan trong nước trong nguyên liệu, và bằng cách cấy vi khuẩn hoặc nấm men và lên men, lượng sacarit tan trong nước tăng lên được loại bỏ, nhờ đó làm cho hàm lượng protein cao hơn. Do đó, hiệu quả làm tăng tỷ lệ hàm lượng protein được tăng thêm và tính năng của bột ngũ cốc làm nguồn protein được cải thiện.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp cô protein trong bột ngũ cốc, bột ngũ cốc chứa protein được cô bằng cách sử dụng phương pháp này, và chất phụ gia dùng cho thức ăn có bột ngũ cốc chứa protein cô đặc. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp cô protein trong bột ngũ cốc bao gồm bước xử lý bột ngũ cốc bằng enzym để phân hủy hydrat cacbon cấu trúc.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngũ cốc được sử dụng rộng rãi làm thức ăn gia súc do có hàm lượng năng lượng cao, và do đó, có hiệu quả của thức ăn cao, và hàm lượng chất xơ thô thấp, và nhờ đó, có khả năng tiêu hóa tốt. Tuy nhiên, thức ăn là ngũ cốc có tỷ lệ protein thấp và tỷ lệ axit amin thấp. Vì thế, để thu được dinh dưỡng cân bằng, thức ăn là ngũ cốc cần được bổ sung thêm protein và các axit amin. Để dùng làm nguồn protein, nguồn protein động vật như bột cá, bột sữa đã gạn kem, bột thịt, hoặc bột máu, và nguồn protein thực vật như đậu tương, hạt cải dầu, hoặc cây lanh, được sử dụng. Trong số các nguồn protein thực vật, gluten ngô là sản phẩm phụ được tạo ra trong quá trình sản xuất tinh bột ngô. Gluten ngô có hàm lượng protein tương đương với hàm lượng protein trong bột cá có hàm lượng protein cao (cao hơn khoảng 3 lần so với nguồn protein thực vật thông thường), và không đắt tiền. Do các đặc điểm này của gluten ngô, gluten ngô được sử dụng rộng rãi làm nguồn protein cho thức ăn.

Theo các nghiên cứu trước đây, do proteaza trong vi sinh vật hoặc enzym có bán trên thị trường, protein của gluten ngô được thoái biến thành peptit, và bằng cách cấy vi sinh vật vào gluten ngô, protein được thoái biến thành các peptit có trọng lượng phân tử thấp và đồng thời, tỷ lệ hàm lượng protein được tăng lên một chút.

Tuy nhiên, do hàm lượng sacarit tan trong nước trong nguyên liệu là nhỏ,

hiệu quả làm tăng tỷ lệ hàm lượng protein trong gluten ngô trong khi lên men chỉ thấp ở mức từ 2% đến 3%. Do đó, quá trình lên men ở trạng thái rắn của gluten ngô chỉ làm thoái biến các protein chính thành peptit.

Theo sáng chế, phương pháp tạo ra nguyên liệu có tỷ lệ hàm lượng protein sao cho nguyên liệu này có thể thay thế cho bột cá có bán trên thị trường được đề xuất, do các thành phần không phải protein có trong gluten ngô được xử lý bằng enzym và được loại bỏ bằng vi sinh vật, tỷ lệ hàm lượng protein trong gluten ngô được tăng lên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp cô protein trong bột ngũ cốc bao gồm bước xử lý bột ngũ cốc bằng enzym để phân hủy hydrat cacbon cấu trúc.

Các khía cạnh khác sẽ được nêu trong phần mô tả chi tiết sau đây và các khía cạnh này sẽ trở nên rõ ràng một phần qua phần mô tả này, hoặc có thể được hiểu bằng cách thực hành các phương án này.

Theo một khía cạnh của một phương án của sáng chế, phương pháp cô protein trong bột ngũ cốc bao gồm các bước: xử lý bột ngũ cốc bằng enzym để phân hủy hydrat cacbon cấu trúc; và cấy vi khuẩn vào bột ngũ cốc này để lên men bột ngũ cốc.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các khía cạnh này và/hoặc khía cạnh khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng và được hiểu dễ dàng hơn qua phần mô tả các phương án sau đây cùng với các hình vẽ kèm theo trong đó:

Fig.1 thể hiện phổ sắc ký của phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (high-performance liquid chromatography: HPLC) của sản phẩm thu được bằng cách phân hủy hydrat cacbon cấu trúc của gluten ngô;

Fig.2 thể hiện phổ sắc ký HPLC để phân tích hàm lượng sacarit trong gluten ngô ở nhóm được xử lý bằng enzym và nhóm không được xử lý bằng enzym;

Fig.3 thể hiện khả năng thoái biến protein theo thời gian được khẳng định bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit có natri dodexyl sulfat

(SDS-PAGE) ở nhóm được xử lý bằng enzym và nhóm không được xử lý bằng enzym khi *Bacillus* được cấy để thực hiện việc lên men;

Fig.4 thể hiện khả năng thoái biến protein theo thời gian được khẳng định bằng phương pháp SDS-PAGE ở nhóm được xử lý bằng enzym và nhóm không được xử lý bằng enzym khi nấm men được cấy vào để thực hiện việc lên men; và

Fig.5 thể hiện khả năng thoái biến protein theo thời gian thu được bằng phương pháp SDS-PAGE ở nhóm được xử lý bằng enzym và nhóm không được xử lý bằng enzym khi vi khuẩn axit lactic được cấy vào để thực hiện việc lên men.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ "bột ngũ cốc" được sử dụng ở đây để chỉ sản phẩm thu được bằng cách nghiền ngũ cốc, ví dụ, ngô, lúa miến, lúa gạo, đậu tương, củ cải đường, hạt bông, vừng, hoặc hạt tương tự. Thuật ngữ "bột ngũ cốc" bao gồm sản phẩm thu được bằng cách làm khô và nghiền phần còn lại của ngũ cốc tinh khiết sau khi được sử dụng trong quá trình nghiền thành bột và sản phẩm này có thể là gluten ngô, bột hạt bông, bột hạt Kapok, bột Perilla, bột đậu tương tách vỏ, hoặc bột tương tự, nhưng các phương án của sáng chế không chỉ giới hạn ở các bột này. Bột ngũ cốc, được sử dụng trong sáng chế này, có thể là loại bột ngũ cốc giống nhau được sản xuất trong khu vực giống nhau. Tuy nhiên, sự khác biệt về loại bột ngũ cốc không ảnh hưởng đến các kết quả thu được theo sáng chế.

Theo một phương án của sáng chế, bột ngũ cốc có thể là gluten ngô. Gluten ngô để chỉ bột màu vàng thu được trong quá trình sản xuất tinh bột từ ngô bằng cách chiết tinh bột tinh bột và mầm từ ngô và tách cám ngô từ sản phẩm thu được, sau đó loại nước và làm khô. Nói theo cách khác, gluten ngô để chỉ phần còn lại được tạo ra trong quá trình chế biến tinh bột ngô. Tỷ lệ hàm lượng protein trong gluten ngô nằm trong khoảng từ 35% đến 65%, tỷ lệ này cao hơn ba lần so với tỷ lệ trong thức ăn thông thường. Do đó, gluten ngô được sử dụng làm nguồn protein cho thức ăn.

Thuật ngữ "enzym" được sử dụng ở đây để chỉ enzym phân hủy hydrat cacbon cấu trúc trong bột ngũ cốc. Enzym này có thể được chọn từ nhóm bao gồm enzym

phân hủy tinh bột, enzym phân hủy xenluloza (xenlulaza), enzym phân hủy hemixenluloza (hemixenlulaza), và enzym phân hủy pectin (pectinaza).

Theo một phương án của sáng chế, enzym phân hủy tinh bột có thể là amylaza hoặc glucoamylaza, hoặc có thể được chọn từ nhóm bao gồm α -amylaza, β -amylaza, isoamylaza, và glucoamylaza. Theo một phương án, enzym phân hủy tinh bột có thể là α -amylaza hoặc glucoamylaza. Theo một phương án, enzym phân hủy tinh bột có thể là glucoamylaza.

Theo một phương án của sáng chế, enzym có thể được chọn bằng cách sàng lọc enzym. Các enzym có bán trên thị trường có hoạt tính enzym khác nhau và các điều kiện phản ứng enzym khác nhau. Do đó, enzym được tối ưu hóa đối với bột ngũ cốc là nguyên liệu có thể được chọn bằng cách sàng lọc enzym. Việc sàng lọc enzym có thể được tiến hành bằng cách cho nguyên liệu phản ứng với enzym, lấy mẫu của hỗn hợp phản ứng ở thời điểm định trước và xác định lượng protein thô trong mỗi mẫu, và lặp lại các bước với sự thay đổi về (i) loại enzym, (ii) thời điểm mà enzym được cho thêm vào phản ứng, và (iii) nhiệt độ phản ứng, và cuối cùng, chọn enzym sao cho tạo ra cho hàm lượng cuối của protein trong mẫu cho trước là cao nhất.

Theo một phương án của sáng chế, lượng enzym có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1 phần trọng lượng so với 100 phần trọng lượng của bột ngũ cốc.

Thuật ngữ "hydrat cacbon cấu trúc" được sử dụng ở đây để chỉ hydrat cacbon có độ khả dụng thấp, như tinh bột, xenluloza, hemixenluloza, hoặc pectin. Theo một phương án, hydrat cacbon cấu trúc có thể là tinh bột.

Theo một phương án của sáng chế, hydrat cacbon cấu trúc trong bột ngũ cốc có thể được xác định bằng cách thủy phân hydrat cacbon cấu trúc bằng cách sử dụng, ví dụ, axit để thu được (các) monosacarit tạo thành hydrat cacbon cấu trúc, và giả sử rằng hydrat cacbon cấu trúc có thể được tạo cấu trúc dựa trên (các) monosacarit. Thuật ngữ "lên men" được sử dụng ở đây để chỉ quá trình trong đó vi khuẩn hoặc nấm men phân hủy nguyên liệu hữu cơ, ví dụ, glucoza bằng cách sử dụng enzym của vi khuẩn hoặc nấm men. Phương pháp lên men bao gồm, ví dụ, lên men ở trạng thái rắn và lên men dạng chất lỏng. Theo một phương án, quá trình lên men có thể là lên men

ở trạng thái rắn.

Thuật ngữ "lên men ở trạng thái rắn" để chỉ phương pháp trong đó vi khuẩn được phân bố trên bề mặt bột ngũ cốc hoặc bên trong bột này. Trong trường hợp lên men ở trạng thái rắn, sự phát triển của các chất gây bệnh được hạn chế do khả năng sống trong nước thấp. Do đó, không giống như phương pháp lên men dạng chất lỏng, phương pháp lên men ở trạng thái rắn không gây ra mức độ nhiễm tạp chất nghiêm trọng. Khi chủng giống nhau được sử dụng để tạo ra enzyme bằng phương pháp lên men ở dạng chất lỏng hoặc lên men ở trạng thái rắn, enzyme được tạo ra bằng phương pháp lên men ở trạng thái rắn, có ái lực cao với cơ chất, có hoạt tính cao.

Theo một phương án của sáng chế, quá trình lên men ở trạng thái rắn có thể được thực hiện bằng cách xử lý bột ngũ cốc bằng vi sinh vật, ví dụ, vi khuẩn hoặc nấm men.

Thuật ngữ "vi khuẩn" được sử dụng ở đây để chỉ vi sinh vật lên men và có chiều dài nhỏ hơn hoặc bằng 0,1mm. Các ví dụ về vi sinh vật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, giống *Bacillus*, giống *Aspergillus*, giống *Leuconostoc*, giống *Lactobacillus*, giống *Weisella*, và giống *Streptococcus*. Theo một phương án của sáng chế, vi khuẩn có thể là giống *Bacillus*.

Theo một phương án của sáng chế, giống *Bacillus* được dùng để lên men ở trạng thái rắn có thể là giống vi khuẩn *Bacillus* không gây bệnh. Theo một phương án, giống *Bacillus* không gây bệnh này có thể bao gồm ít nhất một chủng *Bacillus* được chọn từ *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus toyoi*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus polyfermenticus*, và *Bacillus amyloliquefaciens* K2G. Trong trường hợp này, quá trình lên men có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 45°C, theo một phương án, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C, hoặc theo một phương án, ở nhiệt độ 37°C.

Theo một phương án của sáng chế, vi khuẩn được dùng để lên men ở trạng thái rắn có thể là vi khuẩn axit lactic.

Thuật ngữ "vi khuẩn axit lactic" được sử dụng ở đây để chỉ vi khuẩn lên men sacarit để thu được năng lượng và tạo ra axit lactic với lượng lớn. Các ví dụ về vi

khuẩn axit lactic bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, giống *Lactobacillus*, giống *Lactococcus*, giống *Leuconostoc*, giống *Pediococcus*, và giống *Bifidobacterium*. Thuật ngữ "vi khuẩn axit lactic" không được xác định theo cách phân loại của vi khuẩn. Theo đó, ngay cả khi vi sinh vật thuộc về các loài khác, vi sinh vật này có thể là vi khuẩn axit lactic. Theo một phương án của sáng chế, vi khuẩn axit lactic có thể là giống *Lactobacillus*.

Theo một phương án của sáng chế, giống *Lactobacillus* có thể là ít nhất một giống *Lactobacillus* được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, và *Lactobacillus brevis*. Trong trường hợp này, quá trình lên men có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 45°C, theo một phương án, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C, hoặc theo một phương án, ở nhiệt độ 37°C.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm bước cho thêm dung dịch bazơ vào bột ngũ cốc trước khi xử lý bằng enzym để thu được độ pH sao cho vi khuẩn phát triển tối ưu trong bột ngũ cốc. Ví dụ, khi vi khuẩn là giống *Bacillus*, độ pH của vi khuẩn mà khi đó vi khuẩn này phát triển tối ưu, có thể nằm trong khoảng từ 6 đến 7; khi vi khuẩn là giống *Lactobacillus* nghĩa là vi khuẩn axit lactic, độ pH của vi khuẩn mà khi đó vi khuẩn này phát triển tối ưu, có thể nằm trong khoảng từ 5 đến 7.

Dung dịch bazơ có thể là dung dịch nước có độ pH lớn hơn 7. Theo một phương án, dung dịch bazơ có thể là dung dịch NaOH, dung dịch KOH, dung dịch NH₄OH, hoặc dung dịch tương tự. Theo một phương án, dung dịch bazơ có thể là dung dịch NaOH. Nồng độ dung dịch NaOH có thể nằm trong khoảng từ 1% đến 2%. Dung dịch NaOH có thể được sử dụng với lượng sao cho sau khi cho thêm dung dịch NaOH, hàm lượng nước của bột ngũ cốc, ví dụ, gluten ngô, nằm trong khoảng từ 40% đến 50%, theo một phương án, nằm trong khoảng từ 41% đến 45%, hoặc theo một phương án, bằng 43%.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp cô protein trong bột ngũ cốc, phương pháp này bao gồm các bước: xử lý bột ngũ cốc bằng enzym để phân hủy

hydrat cacbon cấu trúc; và cấy nấm men vào bột ngũ cốc để lên men bột ngũ cốc này.

Thuật ngữ "nấm men" được sử dụng ở đây để chỉ vi sinh vật được dùng để lên men, và các ví dụ về nấm men bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, giống *Saccharomyces*, giống *Pichia*, giống *Candida*, và giống *Schizosaccharomyces*. Theo một phương án của sáng chế, nấm men có thể là giống *Saccharomyces*.

Theo một phương án của sáng chế, giống *Saccharomyces* được dùng để lên men ở trạng thái rắn có thể là *Saccharomyces Carlsbergensis*, và trong trường hợp này, quá trình lên men có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C, theo một phương án, nhiệt độ này nằm trong khoảng từ 25°C đến 35°C, hoặc theo một phương án, nhiệt độ này bằng 30°C. Do nấm men phát triển chậm hơn vi khuẩn, thời gian lên men có thể nằm trong khoảng từ 24 đến 72 giờ, theo một phương án, thời gian lên men nằm trong khoảng từ 36 đến 60 giờ, hoặc theo một phương án, thời gian này bằng 48 giờ.

Theo một phương án của sáng chế, nấm men phát triển đủ trong điều kiện axit. Do đó, không cần kiểm soát độ pH của bột ngũ cốc, việc xử lý bằng enzym và quá trình lên men có thể được thực hiện.

Theo một phương án của sáng chế, quá trình xử lý bột ngũ cốc bằng enzym để phân hủy hydrat cacbon cấu trúc và cấy vi khuẩn, nấm men, hoặc vi khuẩn axit lactic vào bột ngũ cốc để tiến hành lên men có thể được thực hiện lần lượt theo thứ tự này hoặc thực hiện đồng thời. Tuy nhiên, thứ tự thực hiện này không ảnh hưởng đến kết quả của các phương án theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bột ngũ cốc chứa protein được cô bằng cách sử dụng phương pháp cô protein trong bột ngũ cốc.

Thuật ngữ "bột ngũ cốc chứa protein đã được cô" có thể được hiểu là bột ngũ cốc có tỷ lệ hàm lượng protein cao hơn hàm lượng trước khi lên men do phản ứng lên men và quá trình lên men bằng cách sử dụng vi khuẩn hoặc nấm men.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chất phụ gia dùng cho thức ăn có bột ngũ cốc chứa protein cô đặc.

Thuật ngữ "chất phụ gia dùng cho thức ăn" để chỉ chất được cho thêm vào

thức ăn để cải thiện năng suất và tình trạng sức khỏe của sinh vật sống đích. Chất phụ gia dùng cho thức ăn có thể được tạo ra ở nhiều dạng khác nhau đã biết trong lĩnh vực này, và có thể được sử dụng một mình hoặc cùng với các chất phụ gia dùng cho thức ăn đã biết thông thường. Chất phụ gia dùng cho thức ăn có thể được cho thêm với tỷ lệ trộn thích hợp vào thức ăn. Tỷ lệ trộn này có thể được xác định dựa trên cách thông thường và kinh nghiệm trong lĩnh vực này. Chất phụ gia dùng cho thức ăn theo phương án này có thể được cho thêm vào thức ăn dùng cho động vật, như gà, lợn, khi, chó, mèo, thỏ, trâu-bò, cừu, hoặc dê, nhưng các phương án của sáng chế không chỉ giới hạn ở đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các phương án của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây, ví dụ về các phương án này được thể hiện trên các hình vẽ kèm theo, trong đó các số chỉ dẫn giống nhau để chỉ các chi tiết giống nhau trong toàn bộ bản mô tả. Theo đó, các phương án này có thể có các dạng khác nhau và không được hiểu theo nghĩa làm giới hạn phần mô tả được nêu trên đây. Do đó, các phương án được mô tả dưới đây bằng cách viện dẫn đến các hình vẽ chỉ để giải thích các khía cạnh.

Ví dụ 1. Phân tích nguồn gluten ngô

Các tác giả sáng chế đã sử dụng gluten ngô làm nguyên liệu để lên men ở trạng thái rắn. Theo đó, mức hàm lượng sacarit tan trong nước trong nguyên liệu, thích hợp cho việc lên men bằng vi sinh vật, được xác định.

Gluten ngô được hòa tan trong nước để điều chế dung dịch 10%, và được chiết ở nhiệt độ 60°C trong 3 giờ. Chất chiết thu được được ly tâm (8000 vòng/phút, 10 phút), và dịch nổi bề mặt được thu hồi từ đó và được lọc qua tấm lọc (Whatman số 2). Phần nước lọc được xử lý bằng than hoạt tính, và sau đó được cho phản ứng ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút, được lọc bằng cách sử dụng tấm lọc, và được xử lý bằng nhựa trao đổi ion (cation, anion) để loại bỏ các chất ion ra khỏi đó. Hàm lượng sacarit tan

trong nước trong mẫu cuối được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Hàm lượng sacarit tan trong nước trong gluten ngô thấp tới mức khoảng 0,4%. Do đó, sự góp phần của quá trình lên men bằng vi sinh vật vào việc làm tăng tỷ lệ hàm lượng protein có thể được cho là không đáng kể (xem Bảng 1).

Bảng 1

Thành phần	Glucoza	Fructoza	Sucroza	Tổng
Hàm lượng (%)	0,12	0,26	0,02	0,4

Ví dụ 2. Đánh giá hydrat cacbon cấu trúc trong gluten ngô

Sau khi khẳng định trong ví dụ 1 rằng hàm lượng sacarit tan trong nước trong nguồn gluten ngô được sử dụng bởi vi sinh vật là rất nhỏ, việc xử lý bằng enzym được thực hiện để làm tăng lượng thành phần có thể được sử dụng bởi vi sinh vật này. Trước khi sàng lọc enzym, hydrat cacbon cấu trúc của gluten ngô được phân hủy để xác định monosacarit chính của hydrat cacbon tạo thành gluten ngô, và cơ chất đích của enzym được đánh giá dựa trên kết quả này.

Hydrat cacbon cấu trúc của gluten ngô được phân tích như sau: theo phương pháp phân tích thành phần của Phòng thí nghiệm năng lượng tái tạo quốc gia (National Renewable Energy Laboratory: NREL), nguyên liệu tham chiếu là glucoza, xyloza, galactoza, arabinoza, mannoza, fructoza, nguồn gluten ngô (đối với mỗi ví dụ, phép phân tích này được thực hiện ba lần) được chuẩn bị. Mỗi nguyên liệu này được nạp với lượng 0,3g vào ống nghiệm bằng thủy tinh, và sau đó, 3ml axit sulfuric 72% được thêm vào. Ống nghiệm thu được được cho vào bể nước ở nhiệt độ 30°C để thực hiện quá trình thủy phân bằng axit trong 2 giờ, sau đó khuấy bằng que thủy tinh trong khoảng thời gian từ 10 phút đến 20 phút. 4ml nước cất được cho thêm vào ống nghiệm hydrat hóa bằng axit, và dung dịch tạo thành được nạp vào đồ chứa khác, và nước cất được cho thêm vào với lượng sao cho tổng trọng lượng của nó đạt 80g. Để

thủy phân lần thứ hai, sản phẩm hydrat hóa thứ nhất được thủy phân trong nồi hấp ở nhiệt độ 121°C trong 1 giờ. Sản phẩm hydrat hóa thứ hai được làm nguội, và sau đó, canxi cacbonat được cho thêm vào đó để tiến hành làm trung hòa. Mẫu gluten ngô được thủy phân bằng axit lặp lại, và các sản phẩm hydrat hóa bằng axit thu được được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp như đã mô tả trên đây.

Hydrat cacbon cấu trúc của gluten ngô được phân hủy hoàn toàn, và sau đó, được phân tích bằng phương pháp HPLC. Các kết quả cho thấy rằng monosacarit chính là glucoza (xem Bảng 2 và Fig.1). Điều này có nghĩa là hydrat cacbon cấu trúc của gluten ngô được cho là phần lớn tinh bột hoặc xenluloza.

Bảng 2

Monosacarit	Số lần lặp lại	Hàm lượng (%)	Giá trị trung bình (%)
Glucoza	1	19,376	19,318
	2	19,222	
	3	19,355	

Ví dụ 3. Sự thay đổi thành phần nguồn do việc xử lý bằng enzym

Hàm lượng sacarit tan trong nước trong nguồn gluten ngô được sử dụng bởi vi sinh vật là rất nhỏ. Tuy nhiên, khi nguồn gluten ngô này được xử lý sơ bộ bằng glucoamylaza là enzym phân hủy các thành phần được cho là hydrat cacbon chính của gluten ngô, thành phần sacarit của gluten ngô được thay đổi. Phương pháp thử nghiệm được sử dụng trong ví dụ 1 được thực hiện.

Trong thử nghiệm này, đã khẳng định được rằng khi glucoamylaza, enzym phân hủy tinh bột trong số các enzym phân hủy hydrat cacbon không tan trong gluten ngô, được sử dụng, hàm lượng glucoza được tăng lên 10 lần hoặc nhiều hơn. Tuy nhiên, khi enzym phân hủy tinh bột không được sử dụng, hàm lượng của mỗi enzym trong số glucoza, fructoza, và sucroza là rất nhỏ (xem Bảng 3 và Fig.2).

Bảng 3

	Glucoza (%)	Fructoza (%)	Sucroza (%)	Tổng (%)
Nguồn gluten ngô	0,61	0,26	0,00	0,88
Xử lý bằng enzym	12,57	0,27	0,00	12,83

Ví dụ 4. Chuẩn bị các điều kiện thích hợp để lên men ở trạng thái rắn

Nguồn cacbon để lên men bằng vi sinh vật thu được bằng cách xử lý bằng enzym. Tuy nhiên, do độ pH của gluten ngô thường nhỏ hơn hoặc bằng 4, chủng *Bacillus* không phát triển trong đó. Vì thế, trong thử nghiệm này, để lên men gluten ngô bằng cách cấy chủng *Bacillus*, độ pH của gluten ngô được điều chỉnh để nằm trong khoảng từ 6 đến 7, là khoảng tối ưu cho sự phát triển của *Bacillus*.

Trước tiên, trong khi hàm lượng nước của gluten ngô được điều chỉnh bằng khoảng 43%, dung dịch NaOH được cho thêm vào với nồng độ khác nhau. Dung dịch thu được được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 30 phút, và sau đó độ pH của nó được xác định. Độ pH của gluten ngô với nồng độ dung dịch NaOH khác nhau được thể hiện trong Bảng 4. Kết quả là đã khẳng định được rằng khi dung dịch NaOH 2% được sử dụng, độ pH là tối ưu cho sự phát triển của *Bacillus*.

Bảng 4

NaOH (%)	độ pH sau khi xử lý bằng nhiệt
0	3,85
0,1	3,85
0,2	3,97
0,4	4,3
0,5	4,23
1	4,87
2	6,17
4	8,12

Ví dụ 5. So sánh hiệu quả làm tăng hàm lượng protein thu được bởi vi sinh vật theo enzym

Như được khẳng định trong ví dụ 3, khi enzym phân hủy tinh bột được sử dụng, hàm lượng sacarit tan trong nước trong gluten ngô được tăng lên. Các enzym phân hủy tinh bột có bán trên thị trường có hoạt tính enzym và điều kiện phản ứng khác nhau. Do đó, chúng có hiệu quả phân hủy tinh bột, mức hàm lượng sacarit tan trong nước, và tỷ lệ hàm lượng protein tăng lên do sự lên men ở trạng thái rắn là khác nhau. Trong thử nghiệm này, bằng cách sàng lọc enzym, enzym phân hủy tinh bột thích hợp để cô protein trong gluten ngô được sàng lọc.

Việc sàng lọc enzym được thực hiện theo cách sao cho thời điểm cho thêm enzym và nhiệt độ phản ứng được thay đổi theo các đặc tính của enzym.

Trong trường hợp nhóm xử lý bằng glucoamylaza và nhóm xử lý bằng α -amylaza ưa nhiệt trung bình, dung dịch NaOH 2% được cho thêm vào gluten ngô để điều chỉnh hàm lượng nước bằng khoảng 43%, và gluten ngô tạo thành được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 30 phút, và sau đó, để nguội trong không khí, và được xử lý bằng các enzym tương ứng, mỗi enzym có nồng độ 0,1%, và được cho phản ứng ở nhiệt độ 60°C trong 1 giờ.

Trong trường hợp nhóm xử lý bằng α -amylaza ưa nhiệt, dung dịch NaOH 2% được cho thêm vào gluten ngô để điều chỉnh hàm lượng nước của nó bằng khoảng 43%, và enzym 0,1% được cho thêm vào đó, và dung dịch tạo thành được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 30 phút. Sau khi xử lý bằng nhiệt, không để thời gian cho phản ứng lên men.

Bacillus amyloliquefaciens K2G (*Bacillus amyloliquefaciens*, mã số lưu giữ là KCCM11471P, xem Bằng độc quyền sáng chế số 10-1517326) 10% (thể tích/trọng lượng của nguyên liệu) được cấy vào gluten ngô đã được cho phản ứng hoàn toàn với enzym, và sau đó, gluten ngô được lên men trong bể có nhiệt độ không đổi và độ ẩm không đổi ở nhiệt độ 37°C và độ ẩm 95% trong 24 giờ. Sản phẩm lên men được làm khô và nghiền, và lượng protein trong đó được xác định bằng cách sử dụng

dụng thiết bị phân hủy Kjeldahl (xem Bảng 5).

Nhờ quá trình lên men, tất cả các enzym cho thấy quần thể vi khuẩn sống được là tương tự nhau. Tuy nhiên, chúng có tỷ lệ tăng hàm lượng protein khác nhau đáng kể. Trong trường hợp enzym không được sử dụng, mặc dù dung dịch 2% được thêm vào và việc xử lý bằng nhiệt được thực hiện, các điều kiện về cơ bản là thích hợp cho sự phát triển của vi sinh vật, nhưng hàm lượng sacarit tan trong nước trong nguyên liệu vẫn nhỏ, dẫn đến tỷ lệ tăng hàm lượng protein khoảng 2%. Ngoài ra, điều này được cho là do hiệu quả phân hủy tinh bột của chúng khác nhau và nhiệt độ và thời gian phản ứng không đủ, các enzym tương ứng cho kết quả lên men khác nhau. Nhờ đó, để làm enzym làm tăng tỷ lệ hàm lượng protein tương đối cao thu được bằng cách phân hủy tinh bột trong gluten ngô trong các điều kiện này, glucoamylaza được chọn.

Bảng 5

Enzym	Thời gian (giờ)	Hàm lượng nước (%)	Quần thể vi khuẩn còn sống (CFU/g)	Protein thô (%)	Tỷ lệ tăng hàm lượng protein (%)
Không có enzym	0	46,01%	4,2.E+07	71,7	-
	16	38,17%	-	73,9	2,2
	20	36,32%	-	74,3	2,5
	24	32,81%	9,2.E+09	73,9	2,2
Glucoamylaza 0,1%	0	46,34%	5,0.E+07	71,7	-
	16	39,47%	-	79,5	7,8
	20	35,54%	-	78,9	7,1
	24	32,84%	7,4.E+09	78,7	7,0
α -amylaza ura	0	45,97%	3,0.E+07	71,7	-

nhiệt 0,1%	16	35,90%	-	75,4	3,7
	20	31,38%	-	75,6	3,8
	24	28,42%	9,7.E+09	75,7	4,0
α -amylaza và nhiệt trung bình 0,1%	0	45,97%	5,0E+07	71,7	-
	16	34,39%	-	75,1	3,4
	20	30,77%	-	75,3	3,6
	24	27,01%	1,4.E+10	75,8	4,0

Ví dụ 6. So sánh phương pháp lên men và chất lượng thu được khi enzym được sử dụng hoặc không được sử dụng

Như được thể hiện trong các kết quả thu được theo ví dụ 5, sau 24 giờ lên men, hàm lượng protein tăng lên do glucoamylaza và quá trình lên men ở trạng thái rắn. Để xác nhận thêm, ngoài hiệu quả làm tăng hàm lượng protein, hiệu quả xử lý bằng glucoamylaza đối với quá trình lên men và chất lượng lên men, kiểu phát triển của vi sinh vật, sự thay đổi hàm lượng nước, sự tăng hàm lượng protein, và khả năng thoái biến protein, và độ tan của protein được xác định. Quá trình lên men được thực hiện theo cách giống như cách trong ví dụ 5, và các nhóm thử nghiệm được phân loại thành nhóm xử lý bằng glucoamylaza 0,5% và nhóm không được xử lý bằng enzym, và các mẫu được thu hoạch từ các nhóm mỗi bốn giờ (xem Bảng 6).

Khi không được xử lý bằng enzym, gluten ngô có sự tăng tỷ lệ hàm lượng protein khoảng 2,5% do quá trình lên men được thực hiện bởi vi sinh vật. Tuy nhiên, trong trường hợp gluten ngô được lên men sau khi xử lý bằng enzym, tỷ lệ hàm lượng protein tăng lên cao tới mức khoảng 8%. Điều này là do việc xử lý bằng enzym, tinh bột trong nguyên liệu gluten ngô được phân hủy thành glucoza, sau đó chất này được sử dụng khi vi khuẩn *Bacillus* phát triển. Kết quả là, protein được cô ở mức tương đối, tạo ra hiệu quả làm tăng tỷ lệ hàm lượng protein. Về điểm này, khi độ pH của gluten ngô được điều chỉnh đến mức mà khi đó vi sinh vật phát triển độc lập với việc xử lý

bằng enzym, quần thể vi khuẩn còn sống ở mức tương đương. Tuy nhiên, phương pháp xử lý bằng enzym có thể được dùng để làm tăng tỷ lệ hàm lượng protein trong gluten ngô.

Protein thô (hàm lượng chất rắn khô (DS)) trong nguồn gluten ngô bằng 71,7%, và như trong ví dụ 1, hàm lượng sacarit tan trong nước, được sử dụng để phát triển vi sinh vật, bằng 0,4%. Do đó, nếu sacarit tan trong nước được sử dụng và protein vẫn còn nguyên, tỷ lệ tăng hàm lượng protein sẽ ở mức nhỏ khoảng 0,3%. Tuy nhiên, trên thực tế, tỷ lệ tăng hàm lượng protein là cao hơn 2%, và theo ví dụ 8, khi việc xử lý bằng enzym không được thực hiện, hàm lượng tinh bột trong sản phẩm lên men bị giảm đi so với hàm lượng này trong nguồn gluten ngô. Tỷ lệ hàm lượng protein với hàm lượng sacarit tan trong nước trong gluten ngô cao ngay cả khi gluten ngô không được xử lý bằng enzym có thể là do hoạt tính của amylaza được tạo ra bởi chủng vi sinh vật trong khi lên men bằng vi sinh vật. Kết quả này cho thấy rằng quá trình lên men bằng cách sử dụng chủng vi sinh vật có hoạt tính amylaza cao có tác động tích cực đến sự tăng tỷ lệ hàm lượng protein.

Bảng 6

Các nhóm thử nghiệm	Thời gian (giờ)	Hàm lượng nước (%)	Quần thể vi khuẩn còn sống (CFU/g)	Protein (% ds)	Tỷ lệ tăng hàm lượng protein (%)
Khi không được xử lý bằng enzym	0	45,33%	2,6.E+07	70,51	0,09
	4	44,06%	5,4.E+07	71,25	0,83
	8	41,54%	4,2.E+09	71,65	1,23
	12	37,84%	5,6.E+09	72,1	1,68
	16	33,41%	3,5.E+09	72,72	2,3
	20	29,83%	6,2.E+09	72,92	2,5

	24	25,75%	7,9.E+09	72,77	2,35
Khi được xử lý bằng enzym	0	46,54%	2,0.E+07	71,43	1,02
	4	45,03%	2,4.E+07	72,77	2,35
	8	43,53%	1,7.E+09	75,86	5,45
	12	40,37%	4,3.E+09	77,88	7,47
	16	36,85%	3,8.E+09	78,08	7,66
	20	33,67%	5,1.E+09	77,89	7,47
	24	30,07%	8,6.E+09	78,43	8,01

Ví dụ 7. So sánh các kết quả thử nghiệm thu được theo phản ứng lên men

Sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng hàm lượng protein trong gluten ngô bằng cách thực hiện việc xử lý sơ bộ bằng enzym và đồng thời lên men bằng vi sinh vật. Nếu quá trình lên men được thực hiện ngay sau khi xử lý bằng enzym mà không có phản ứng lên men riêng biệt, quá trình làm tăng tỷ lệ hàm lượng protein trong gluten ngô và quá trình tạo ra gluten ngô có thể được đơn giản hóa và ngoài ra, chi phí sản xuất có thể được giảm đi. Để khẳng định giả thiết này, cần xác định phản ứng lên men riêng biệt bằng cách so sánh các kết quả của hai thử nghiệm sau đây: quá trình lên men được thực hiện theo cách giống như cách trong ví dụ 5, và sau khi cho thêm enzym, phản ứng lên men được thực hiện ở nhiệt độ 60°C trong 1 giờ; và quá trình lên men được thực hiện theo cách giống như cách trong ví dụ 5, và không có thời gian cho phản ứng lên men, vi sinh vật được cấy.

Kết quả là không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ tăng hàm lượng protein giữa trường hợp có thời gian cho phản ứng lên men (xem phần phản ứng lên men trong Bảng 7) và trường hợp không có thời gian cho phản ứng lên men (xem phần không có phản ứng lên men trong Bảng 7). Kết quả này cho thấy rằng ngay cả khi không có thời gian cho phản ứng lên men, phản ứng lên men vẫn diễn ra đủ trong quá trình lên

men (xem Bảng 7).

Bảng 7

Có hoặc không có phản ứng lên men	Thời gian (giờ)	Hàm lượng nước (%)	Quần thể vi khuẩn còn sống (CFU/g)	Protein (% ds)	Tỷ lệ tăng hàm lượng protein (%)
Không có phản ứng lên men	0	45,86%	1,45.E+07	72,75	-
	16	37,69%	6,85.E+09	78,88	7,93
	20	33,97%	1,39.E+10	79,36	8,41
Có phản ứng lên men	0	46,47%	2,95.E+07	73,71	-
	16	34,14%	7,25.E+09	79,67	8,58
	20	30,84%	6,15.E+09	79,24	8,15

Ví dụ 8. So sánh hàm lượng tinh bột và tỷ lệ hàm lượng protein theo nồng độ enzym

Mối tương quan giữa sự giảm hàm lượng tinh bột và sự tăng tỷ lệ hàm lượng protein trong gluten ngô theo nồng độ enzym được xác định. Tinh bột trong nguyên liệu được giảm đến mức nhất định theo lượng của nó do sự lên men bằng vi sinh vật, ngay cả khi không xử lý bằng enzym. Ngoài ra, nồng độ enzym càng cao, hàm lượng tinh bột trong nguyên liệu càng thấp. Do đó, tỷ lệ hàm lượng protein được tăng lên đáng kể (xem Bảng 8).

Trong khi đó gluten ngô là sản phẩm phụ được tạo ra khi tinh bột ngô được tạo ra, và hàm lượng protein trong gluten ngô có thể thay đổi tùy theo hiệu suất của tinh bột ngô. Điều này có nghĩa là hàm lượng protein trong gluten ngô càng thấp, hàm lượng tinh bột càng cao hơn đáng kể. Do đó, glucoza được phân hủy nhiều hơn bằng enzym phân hủy tinh bột, và vì thế, hiệu quả làm tăng tỷ lệ hàm lượng protein

do sự lên men bằng vi sinh vật có thể tăng lên. Bảng 9 thể hiện kết quả lên men thu được bằng cách sử dụng nguồn gluten ngô khi hàm lượng protein trong gluten ngô bằng 66% và 70%. Khác với hàm lượng protein trong nguyên liệu, các điều kiện giống hệt bao gồm hàm lượng glucoamylaza 0,1%, cấy *Bacillus* 10%, v.v. được sử dụng để thực hiện việc lên men. Kết quả là khi hàm lượng protein trong gluten ngô bằng 66%, hàm lượng protein này được tăng thêm. Trong thử nghiệm này, giá trị tinh bột của các nguồn tương ứng không được xác định, và do đó, khó chứng minh được rằng hàm lượng tinh bột cao hơn hoàn toàn hàm lượng protein. Tuy nhiên, có thể giả thiết rằng nếu giá trị tinh bột cao hơn do hàm lượng protein thấp, glucoza được phân hủy nhiều hơn bởi enzym, điều này dẫn đến tỷ lệ tăng hàm lượng protein cao hơn.

Bảng 8

Các nhóm thử nghiệm	Nồng độ enzym (%)	Thời gian (giờ)	Hàm lượng nước (%)	Quần thể vi khuẩn còn sống (CFU/g)	Protein (% ds)	Tỷ lệ tăng hàm lượng protein (%)	Glucoza (%)	Tinh bột (%)
Nguyên liệu	-	-	-	-	70,28	-	0,14	15,86
Không xử lý bằng enzym	0%	0	45,76%	2,00.E+07	-	-	-	-
		16	37,11%	8,20.E+09	72,61	2,33	-	-
		20	33,64%	1,07.E+10	72,63	2,36	-	-
		24	31,05%	8,75.E+09	72,67	2,39	0,25	10,75
Có xử		0	45,76%	5,10.E+07	-	-	-	-

lý bằng enzym	0,00%	16	35,49%	6,10.E+09	71,86	1,58	-	-
		20	32,35%	7,70.E+09	72,03	1,76	-	-
		24	29,99%	7,60.E+09	72,53	2,26	0,25	11,64
	0,01%	0	46,00%	2,25.E+07	-	-	-	-
		16	36,91%	1,06.E+10	75,1	4,83	-	-
		20	31,90%	1,16.E+10	75,3	5,03	-	-
		24	29,74%	1,10.E+10	75,14	4,86	0,28	7,61
	0,05%	0	46,43%	2,90.E+07	-	-	-	-
		16	38,45%	9,70.E+09	76,89	6,61	-	-
		20	34,50%	1,18.E+10	77,73	7,46	-	-
		24	30,49%	1,02.E+10	77,18	6,91	0,37	4,43
	0,10%	0	46,24%	2,80.E+07	-	-	-	-
		16	37,41%	8,95.E+09	77,88	7,61	-	-
		20	33,92%	1,15.E+10	78,41	8,14	-	-
		24	30,62%	1,10.E+10	78,38	8,11	0,58	2,94

Bảng 9

Các nhóm thử nghiệm	Thời gian (giờ)	Quần thể vi khuẩn còn sống (CFU/g)	Protein (% ds)	Tỷ lệ tăng hàm lượng protein (%)
	0	5,05.E+07	-	-

Protein nguồn 70%	16	1,28.E+10	77,893	7,949
	20	1,04.E+10	78,601	8,657
	24	1,21.E+10	78,345	8,401
Protein nguồn 66%	0	3,65.E+07	-	-
	16	1,08.E+10	74,713	8,855
	20	1,17.E+10	75,089	9,231
	24	1,43.E+10	74,989	9,131

Ví dụ 9. Khử định gluten ngô được lên men bằng nấm men

Như được mô tả trong các ví dụ trên đây, đã khử định được rằng gluten ngô được lên men bằng *Bacillus* và có hiệu quả làm tăng tỷ lệ hàm lượng protein do việc cho thêm enzym. Các tác giả sáng chế đã tiến hành thêm nhiều thử nghiệm để khử định gluten ngô được lên men bằng nấm men chứ không phải *Bacillus* để so sánh các đặc tính lên men của gluten ngô theo vi sinh vật.

Trong thử nghiệm này, *Saccharomyces Carlsbergensis* được sử dụng làm nấm men để thực hiện quá trình lên men. Giống như quá trình lên men bằng *Bacillus*, nước được cho thêm vào gluten ngô để điều chỉnh hàm lượng nước bằng khoảng 43%, và dung dịch tạo thành được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 30 phút. Gluten ngô đã xử lý nhiệt được để nguội trong không khí, và trong trường hợp nhóm được xử lý bằng enzym, glucoamylaza được sử dụng với lượng 0,5% so với nguyên liệu, và trong trường hợp nhóm không được xử lý bằng enzym, enzym không được sử dụng, và với cả hai nhóm, giống nuôi cấy *S.carlsbergensis* được cho thêm với lượng 10% so với nguyên liệu. Sản phẩm thu được được để lên men trong bể ở nhiệt độ không đổi và độ ẩm không đổi (nhiệt độ 30°C và độ ẩm 95%) trong 48 giờ. Do nhiệt

độ phát triển tối ưu của nấm men bằng 30°C, quá trình lên men được thực hiện ở nhiệt độ khác với nhiệt độ phát triển của *Bacillus*. Thời gian lên men là 48 giờ, do nấm men phát triển chậm hơn *Bacillus*.

Giả thiết rằng nấm men phát triển đủ trong điều kiện axit, độ pH không được điều chỉnh. Chỉ sản phẩm lên men thu được khi có xử lý hoặc không xử lý bằng enzym được so sánh. Các kết quả so sánh cho thấy rằng nấm men phát triển mà không có sự điều chỉnh bất kỳ về độ pH của gluten ngô, và tỷ lệ tăng hàm lượng protein thay đổi theo quá trình xử lý bằng enzym. Khi không có xử lý bằng enzym, sacarit tan trong nước, được sử dụng để phát triển vi sinh vật, với lượng nhỏ trong gluten ngô, và do đó, hiệu quả cô protein từ việc lên men là tương đối nhỏ và tỷ lệ tăng hàm lượng protein là nhỏ hơn 1%. Tuy nhiên, khi được xử lý bằng enzym, gluten ngô có tỷ lệ tăng hàm lượng protein bằng 9% hoặc cao hơn (xem Bảng 10).

Bảng 10

Nhóm thử nghiệm	Thời gian (giờ)	Hàm lượng nước (%)	Độ pH	Quần thể vi khuẩn còn sống CFU/g)	Protein (% ds)	Tỷ lệ tăng hàm lượng protein (%)
Không xử lý bằng enzym	0	46,0%	3,92	6,0.E+06	71,76	-
	24	41,4%	4,52	1,6.E+08	72,56	0,80
	48	38,5%	4,63	3,0.E+08	71,92	0,16
Có xử lý bằng enzym	0	45,4%	3,97	8,0.E+06	71,76	-
	24	39,7%	3,91	8,1.E+08	81,12	9,36
	48	31,2%	3,86	8,6.E+08	81,13	9,37

Ví dụ 10. Kháng định gluten ngô được lên men bằng vi khuẩn axit lactic

Như được mô tả trong các ví dụ trên đây, đã khẳng định được rằng gluten ngô được lên men bằng *Bacillus* hoặc nấm men và có hiệu quả làm tăng tỷ lệ hàm lượng protein do việc cho thêm enzym glucoamylaza. Các tác giả sáng chế tiến hành thêm nhiều thử nghiệm để khẳng định gluten ngô được lên men bằng vi khuẩn axit lactic chứ không phải *Bacillus* và nấm men để so sánh các đặc tính lên men của gluten ngô theo vi sinh vật.

Đối với quá trình lên men bằng vi khuẩn axit lactic, *Lactobacillus plantarum* được sử dụng. Giống như lên men bằng *Bacillus*, nước hoặc NaOH 2% được cho thêm vào gluten ngô để điều chỉnh hàm lượng nước bằng khoảng 43%. Nói chung, vi khuẩn axit lactic phát triển trong điều kiện axit hoặc trung tính. Tuy nhiên, *L. plantarum* không phát triển trong gluten ngô, là nguyên liệu có tính axit. Do đó, cả gluten ngô mà nước đã được thêm vào trong khi không điều chỉnh độ pH và gluten ngô có độ pH đã điều chỉnh được dùng để lên men. Giống như chính phương pháp được sử dụng liên quan đến việc lên men bằng *Bacillus* và lên men bằng nấm men, gluten ngô được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 30 phút, và sau khi để nguội trong không khí, trong trường hợp nhóm được xử lý bằng enzym, glucoamylaza được cho thêm với lượng 0,5% so với nguyên liệu, và trong trường hợp nhóm không được xử lý bằng enzym, enzym không được thêm vào. Giống nuôi cấy *L. plantarum* được cấy với lượng 10% so với nguyên liệu, và ở nhiệt độ 37°C, quá trình lên men kỵ khí được thực hiện. Quá trình lên men được thực hiện trong 48 giờ do vi khuẩn axit lactic cũng phát triển chậm hơn *Bacillus*.

Từ kết quả của quá trình lên men bằng vi khuẩn axit lactic, đã khẳng định được rằng, khi cho thêm hoặc không cho thêm enzym, vi khuẩn axit lactic không phát triển trong gluten ngô có độ pH không được điều chỉnh. Tuy nhiên, trong trường hợp gluten ngô có độ pH được điều chỉnh, quần thể vi khuẩn còn sống được tăng lên. Kết quả này cho thấy rằng sự phát triển của *L. plantarum* trong gluten ngô nhất thiết cần có sự điều chỉnh độ pH. Ngoài ra, sự giảm độ pH cho thấy rằng axit hữu cơ được

tạo ra bởi quá trình lên men bằng vi khuẩn axit lactic. Tuy nhiên, bất kể việc xử lý bằng enzym và điều chỉnh độ pH, tất cả các nhóm thử nghiệm đều cho thấy không có hiệu quả làm tăng tỷ lệ hàm lượng protein, và điều này được cho là do sự lên men kỵ khí không tạo ra hiệu quả cô protein. Sự khác biệt giữa nhóm được xử lý bằng enzym và nhóm không được xử lý bằng enzym là ở chỗ sự giảm độ pH là lớn hơn khi độ pH được kiểm soát so với khi độ pH không được kiểm soát. Cũng giả thiết rằng ở nhóm được xử lý bằng enzym, do có nhiều thành phần monosacarit cho sự phát triển vi khuẩn axit lactic, sự chuyển hóa xuất hiện nhanh chóng và axit hữu cơ được tạo ra nhiều hơn. Trong khi đó, do độ pH của gluten ngô bị giảm đi do axit hữu cơ, axit này được tạo ra trong 24 giờ lên men, đến mức trong đó vi khuẩn axit lactic không thể phát triển, quần thể vi khuẩn còn sống trong nhóm được xử lý bằng enzym và nhóm được kiểm soát độ pH sau 48 giờ lên men bị giảm đi (xem Bảng 11).

Bảng 11

Nhóm thử nghiệm	Điều chỉnh độ pH	Thời gian (giờ)	Hàm lượng nước (%)	Độ pH	Quần thể vi khuẩn còn sống (CFU/g)	Protein (% ds)	Tỷ lệ tăng hàm lượng protein (%)
Không xử lý bằng enzym	Không điều chỉnh độ pH	0	44,9 %	3,9	1,1.E+08	71,76	-
		24	45,4 %	3,93	10 ⁵ hoặc nhỏ hơn	71,32	-0,44
		48	45,1 %	3,92	10 ³ hoặc nhỏ hơn	71,48	-0,28
	Có điều chỉnh độ pH	0	44,6 %	6,96	1,3.E+08	71,76	-
		24	44,8 %	5,61	1,6.E+09	70,87	-0,89

		48	46,2 %	5,7	2,0.E+09	71,30	-0,46
Xử lý bằng enzym	Không điều chỉnh độ pH	0	45,0 %	3,9	9,8.E+07	71,76	-
		24	45,5 %	3,92	10 ⁵ hoặc nhỏ hơn	72,03	0,27
		48	45,6 %	3,9	8,4.E+04	72,55	0,79
	Có điều chỉnh độ pH	0	44,9 %	6,69	1,3.E+08	71,76	-
		24	46,8 %	4,37	2,8.E+09	72,53	0,77
		48	45,1 %	4,28	3,6.E+08	72,61	0,85

Giá trị kỹ thuật chính của sáng chế nằm ở chỗ sự chuyển hóa tinh bột trong gluten ngô thành sacarit tan trong nước do phản ứng lên men, và để cho vi sinh vật sử dụng sacarit tan trong nước phát triển. Trong trường hợp *Bacillus* và nấm men, do các đặc tính phát triển ưa khí của vi sinh vật, sacarit được sử dụng và chuyển hóa thành CO₂, làm cho protein được cô đặc. Tuy nhiên, trong trường hợp vi khuẩn axit lactic, ngay cả khi sacarit được sử dụng và vi sinh vật phát triển, do các đặc tính phát triển kỵ khí của vi sinh vật, không thể thu được hiệu quả cô protein do axit hữu cơ được tạo ra. Tuy nhiên, do các đặc tính của axit hữu cơ được tạo ra, vi khuẩn axit lactic được đánh giá cao như men vi sinh. Cho đến nay, khi gluten ngô được sử dụng làm nguyên liệu, do không có sacarit tan trong nước có thể được dùng để lên men, sự tạo ra axit hữu cơ do sự chuyển hóa của vi khuẩn axit lactic bị hạn chế. Tuy nhiên, sự phân hủy tinh bột, là dấu hiệu kỹ thuật quan trọng của sáng chế, góp phần vào sự chuyển hóa của vi khuẩn axit lactic.

Ví dụ 11. So sánh khả năng thoái biến protein do sự lên men theo vi sinh vật

Để xác định sự khác biệt bất kỳ về các chỉ số khác với hiệu quả làm tăng hàm lượng protein, khả năng thoái biến protein của gluten ngô được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE. Các mẫu được dùng để phân tích SDS-PAGE được chuẩn bị bằng cách sử dụng phương pháp sau.

Đối với mỗi sản phẩm lên men được thu thập ở các thời điểm khác nhau, khoảng 100mg sản phẩm lên men được tạo huyền phù trong dung môi ure 8M, và được siêu âm, và ly tâm (8000 vòng/phút, 10 phút). Chất chiết tạo thành được định lượng BCA để xác định tỷ lệ hàm lượng protein, và đối với phương pháp SDS-PAGE, lượng tương đương của protein được tải để xác định mức độ thoái biến protein ở các thời điểm khác nhau. Kích thước của gen đánh dấu dùng cho phương pháp SDS-PAGE là 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, hoặc 10kDa.

Các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng mức độ thoái biến protein thay đổi theo các đặc tính của vi sinh vật. Ví dụ, trong trường hợp nhóm *Bacillus* tạo ra proteaza, do sự lên men, peptit của nguyên liệu gluten ngô được thoái biến đến mức khoảng 20kDa (xem Fig.3). Tuy nhiên, trong trường hợp nấm men và vi khuẩn axit lactic, không thể tạo ra proteaza, bất kể xử lý bằng enzym hoặc điều chỉnh độ pH hay không, trong quá trình lên men, peptit trong nguyên liệu không được thoái biến (xem Fig.4 và Fig.5).

Sự thoái biến protein của gluten ngô thành peptit bằng cách lên men bằng *Bacillus* có thể tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiêu hóa thức ăn. Trong khi đó, mặc dù trong trường hợp nấm men và vi khuẩn axit lactic, khả năng thoái biến protein không xảy ra, do các thành phần chức năng, như betaglucan tồn tại trong thành tế bào của nấm men có chức năng miễn dịch, và vi khuẩn axit lactic có thể được sử dụng làm men vi sinh, do đó tác dụng của nguyên liệu thức ăn được cho là có thể tăng lên.

Khi phương pháp cô protein trong bột ngũ cốc theo một phương án của sáng chế được sử dụng, lượng sacarit tan trong nước trong nguyên liệu được tăng lên bằng cách xử lý bột ngũ cốc bằng enzym, và lượng sacarit tan trong nước tăng lên được loại bỏ bằng cách cấy vi khuẩn hoặc nấm men vào bột ngũ cốc và lên men. Nhờ đó,

hiệu quả làm tăng tỷ lệ hàm lượng protein được tăng lên, và tính năng của bột ngũ cốc làm nguồn protein có thể được cải thiện.

Cần hiểu rằng các phương án được mô tả ở đây chỉ được hiểu theo nghĩa minh họa và không được hiểu theo mục đích giới hạn. Phần mô tả các dấu hiệu hoặc khía cạnh trong mỗi phương án thường cần được cho là có thể áp dụng cho các dấu hiệu hoặc khía cạnh tương tự khác trong các phương án khác.

Trong khi một hoặc nhiều phương án đã được mô tả cùng với các hình vẽ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng có thể tiến hành các thay đổi khác nhau về hình dạng và chi tiết mà vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế như được xác định trong phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp cô protein trong bột ngũ cốc, phương pháp này bao gồm các bước:
cho thêm dung dịch bazơ vào bột ngũ cốc để điều chỉnh độ pH;
xử lý bột ngũ cốc bằng enzym α -amylaza hoặc glucoamylaza để phân hủy hydrat cacbon cấu trúc; và
cấy vi khuẩn vào bột ngũ cốc để thực hiện việc lên men ở trạng thái rắn.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn là giống *Bacillus*.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó giống *Bacillus* bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus toyoi*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus polyfermenticus*, và *Bacillus amyloliquefaciens* K2G.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn axit lactic.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một chủng được chọn từ nhóm bao gồm giống *Lactobacillus*, giống *Lactococcus*, giống *Leuconostoc*, giống *Pediococcus*, và giống *Bifidobacterium*.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bột ngũ cốc là gluten ngô.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hydrat cacbon cấu trúc bao gồm ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm tinh bột, xenluloza, hemixenluloza, hoặc pectin.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó enzym được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1 phần trọng lượng so với 100 phần trọng lượng của bột ngũ cốc.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch bazơ được cho thêm vào bột ngũ cốc sao cho hàm lượng nước của bột ngũ cốc nằm trong khoảng từ 40% (thể tích/trọng lượng) đến 50% (thể tích/trọng lượng).
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước xử lý bột ngũ cốc bằng nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 130°C trong khoảng thời gian từ 5 phút đến 30 phút, sau khi cho thêm dung dịch bazơ vào bột ngũ cốc.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó dung dịch bazơ được cho thêm vào bột ngũ cốc sao cho độ pH của bột ngũ cốc này nằm trong khoảng từ 5 đến 7.
12. Bột ngũ cốc chứa protein được cô bằng cách sử dụng phương pháp theo điểm 1.
13. Chất phụ gia dùng cho thức ăn có bột ngũ cốc chứa protein được cô theo điểm 12.

Fig.1

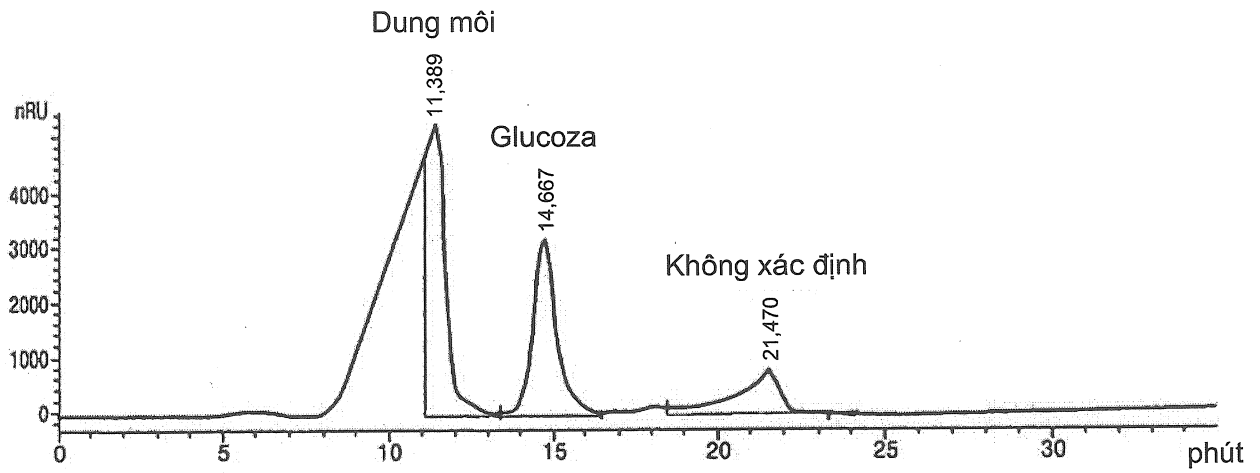


Fig.2

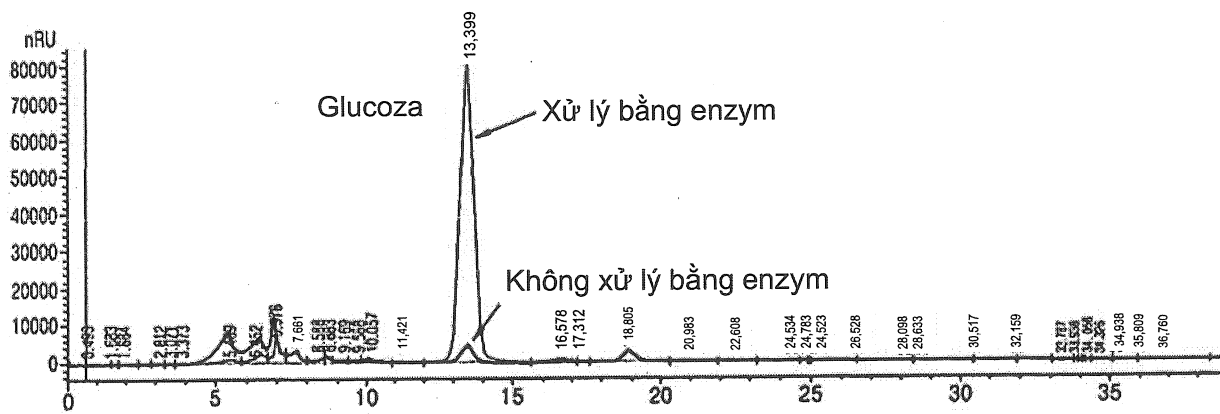


Fig.3

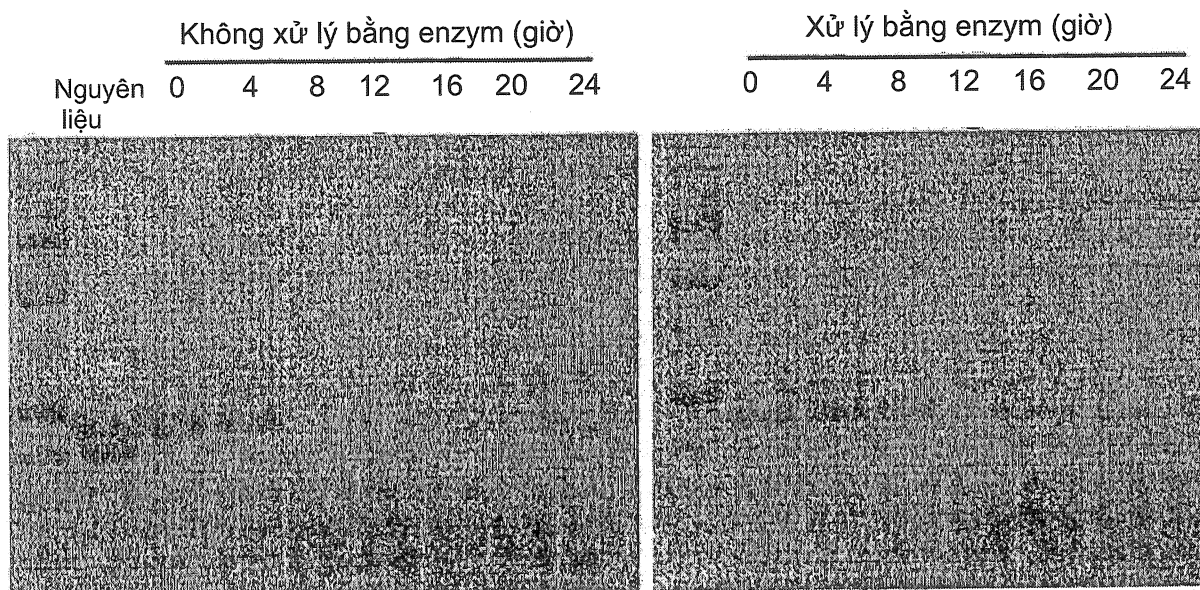


Fig.4

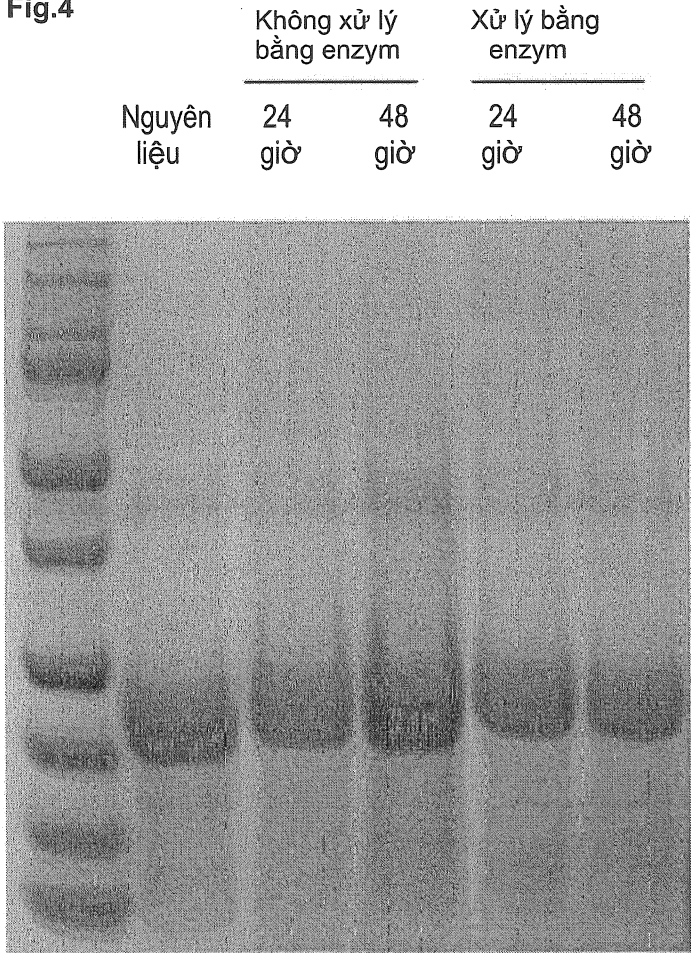


Fig.5

