



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002696

(51)⁷ **C12P 19/12; C12P 19/14**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00059

(22) 27/02/2018

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/09/2019 378A

(73) Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Mai Phương (VN); Nguyễn Hòa Anh (VN); Quách Thị Liên (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẤT XƠ HÒA TAN XYLOOLIGOSACARIT (XOS) TỪ
CÁM GẠO**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất xylooligosacarit (XOS) bao gồm các bước: a) thủy phân để loại bỏ tinh bột bằng cách sử dụng enzym amylaza; b) thủy phân để loại bỏ protein có trong cám gạo bằng cách sử dụng enzym proteaza; c) thủy phân giới hạn một lần bã cám gạo đã được loại tinh bột và protein bằng enzym endoxylanaza, d) làm sạch và cô đặc XOS bằng cách sử dụng cột lọc; và e) sấy phun thành bột và đóng gói sản phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất chất xơ hòa tan xylooligosacarit bằng cách sử dụng công nghệ enzym để làm thực phẩm chức năng

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Xylooligosacarit (XOS) là các olygome của đường xyloza (2-7 gốc đường). XOS là nguồn cơ chất thích hợp cho cả các vi khuẩn *Bifidobacteria* và *Lactobacillus*, là những chủng vi khuẩn phổ biến trong đường ruột của người. Số liệu nghiên cứu thu được đã khẳng định XOS có vai trò sinh học thông qua khả năng: i) ức chế hoạt động của các vi khuẩn gây bệnh đường ruột do sinh ra các axit béo mạch ngắn như axit butyric; ii) làm tăng khả năng hấp thu khoáng của cơ thể. Ứng dụng của XOS khá phong phú. XOS có thể sử dụng làm chất phụ gia trong chế biến thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, nông nghiệp hay dược phẩm. XOS có tính chất hóa lý khá đặc biệt so với các oligosacarit (OS) khác như độ ngọt thấp, bền vững trong điều kiện pH và nhiệt độ rộng, sở hữu các đặc tính cảm quan thích hợp để kết hợp vào thực phẩm. Vì thế, XOS có nhiều ưu việt hơn các OS khác ở cả khía cạnh lợi ích sức khỏe và các đặc tính liên quan đến công nghệ.

XOS có thể được tách chiết ở quy mô công nghiệp bằng hóa chất hoặc bằng cách thủy phân bằng enzym. Phương pháp tách chiết XOS bằng kiềm nhẹ được sử dụng khá phổ biến. Tuy nhiên, việc sản xuất XOS bằng công nghệ hóa học có nhược điểm là sản phẩm thu được còn lẫn nhiều tạp chất hóa học, ảnh hưởng đến hoạt tính của sản phẩm, không đảm bảo chất lượng để có thể sử dụng trong lĩnh vực thực phẩm và dược phẩm. Ngoài ra, việc tiền xử lý nguyên liệu bằng kiềm làm ăn mòn thiết bị sản xuất, tạo ra nhiều đường đơn như xyloza và gây ô nhiễm môi trường.

Việc sử dụng enzym để sản xuất XOS đang được quan tâm nhiều hiện nay. Phương pháp tách chiết XOS bằng cách sử dụng xylanaza (1-4 endo-xylanaza) là phổ biến nhất vì khả năng cắt ngẫu nhiên liên kết β -1,4-xylan trong các cấu trúc XOS mạch dài, giải phóng ra những phân tử XOS tan được trong nước. Phương pháp tách chiết

bằng enzym có ưu điểm cho hiệu quả tách chiết cao, thu hồi được dạng không chiết được trong nước, sản phẩm thu hồi an toàn, không tạo ra dụng phụ vì thế có thể được sử dụng làm thực phẩm chức năng cho người.

Nghiên cứu của Zhao, Z., Egashira, Y. and Sanada, H. J. (Agric. Food Chem. 2003, 51, 5534 – 5539); Saulnier, L. Vigouroux, J. and Thibault, J.F. (Carbohydr. Res. 1995, 272, 241 – 253) và Ohta, T., Semboku, N. Kuchii, A. Egashira, Y. and Sanada, H. J. (Agric. Food Chem. 1997, 45, 1644 – 1648) đã sử dụng axit như oxalic hay trifloaxetic để thủy phân cám ngũ cốc nhằm sản xuất xylooligosacarit. Hạn chế của các phương pháp này là sản phẩm sản xuất được không đặc hiệu khó kiểm soát, dẫn đến chất lượng sản phẩm không như mong muốn.

Mueller-Harvey, I. và Hartley, R. D. (Carbohydr. Res. 1986, 148, 71 – 85) và Lequart, C, Nuzillard, J.-M, Kurek, B. and Debeire, P. (Carbohydr. Res. 1999, 319, 102 – 111) đã sử dụng các enzym tinh sạch một phần như xenluloza hay endoxylanaza để sản xuất XOS từ cám ngũ cốc và rơm. Tuy nhiên, việc sử dụng enzym tinh sạch một phần sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả kinh tế.

Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20110020498 của Willem Broekaert (Dilbeek, BE) Christophe Courtin (Wilsle, BE) và Jan Delcour (Heverlee, BE) công bố ngày 27/1/2011 mô tả quy trình sản xuất arabinoxylan (dẫn xuất của XOS) từ cám lúa mì cũng đề cập đến việc sử dụng công nghệ đa enzym công nghiệp. Trong đó, α -amylaza (Termamyl 120LS, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) được dùng để loại bỏ tinh bột. Sau đó, proteaza (Neutralse 0.8L, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) được sử dụng để loại bỏ protein. Cuối cùng, bã cám được thu lại và được thủy phân với endoxylanaza GHF11 của *Bacillus subtilis* (Grindamyl H640, Danisco, Denmark) theo 2 giai đoạn thủy phân. Giai đoạn 1 sử dụng enzym ở nồng độ 1,4 đơn vị/g cám trong 10 giờ ở 50°C. Giai đoạn 2 sử dụng enzym GHF11 endoxylanaza ở nồng độ 1,1 đơn vị/g trong thời gian 10 giờ ở 50°C. Dịch sau thủy phân ở nồng độ 20% chất khô được thu lại bằng màng lọc chân không và sấy phun để thu được sản phẩm. Có thể thấy đây là quy trình khá hiệu quả, an toàn và kinh tế. Tuy nhiên, quy trình thu XOS này vẫn còn phức tạp, ảnh hưởng đến giá thành sản phẩm.

Công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO2015107413 A1 công bố 2015 của Arvind Mallinath Lali, Annamma Anil Odaneth, Mukesh Prabhakar Pednekar về

sản xuất oligosacarit (OS) bao gồm cả hỗn hợp arabinoxylooligosacarit, xylooligosacarit và cello-oligosacarit, từ phụ thải nông nghiệp. Trong sáng chế này, kiểm được sử dụng để xử lý các phân đoạn rắn không tan. Sau đó, cello-oligosacarit hòa tan được loại bỏ nhờ axit loãng. Có thể nhận thấy sản phẩm thu được là chưa đặc hiệu và việc sử dụng kiểm sẽ ảnh hưởng nhiều đến chất lượng của sản phẩm cuối cùng cũng như các thiết bị sử dụng trong quy trình sản xuất.

Tại Việt Nam, Trịnh Thị Kim Vân và các cộng sự (2010) đã nghiên cứu ứng dụng công nghệ enzym kết hợp với hóa học để sản xuất và sử dụng đường chức năng XOS từ lõi ngô. Mặc dù nhóm nghiên cứu đã thu được XOS từ nguồn phế liệu nông nghiệp này nhưng độ tinh khiết chỉ đạt $< 60\%$. Giá thành sản phẩm cao và phải xử lý môi trường bã thải lớn. Một điều quan trọng là việc dùng hóa chất xử lý dẫn đến tồn dư chất có hại trong sản phẩm nên khả năng ứng dụng cho người sẽ bị hạn chế. Trong một nghiên cứu khác với OS từ sản phẩm phụ nông nghiệp, Hồ Kim Vĩnh Nghi và các cộng sự (2009) ở Viện Công nghiệp Thực phẩm đã tiến hành tách chiết các OS từ cám gạo và thu được sản phẩm OS ở dạng hỗn hợp với hàm lượng chất xơ hòa tan (gồm cả chất xơ không phải OS) chiếm khoảng gần 20% lượng chất khô tổng số. Có thể thấy rằng, mặc dù cám gạo là nguồn nguyên liệu rất giàu xylan, các tác giả vẫn chưa định hướng được công nghệ để thu được sản phẩm OS dạng tinh khiết có chất lượng cao.

Như vậy, các nghiên cứu và quy trình công nghệ đã công bố vẫn còn những hạn chế, cần phải tiếp tục được tối ưu hóa để có quy trình thu XOS đặc hiệu, đơn giản, an toàn, thân thiện với môi trường và phù hợp với điều kiện sản xuất tại Việt Nam.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là chủ động công nghệ sản xuất XOS ở trong nước, khắc phục được các thiếu sót của các quy trình công nghệ đã biết và phù hợp với điều kiện sản xuất của Việt Nam. Để đạt được mục đích đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chất xơ hòa tan XOS từ cám gạo sử dụng công nghệ đa enzym công nghiệp để làm thực phẩm chức năng cho người. Quy trình sản xuất XOS này có tính ưu việt ở chỗ: i) không sử dụng hóa chất để xử lý nguyên liệu nên đảm bảo an toàn thực phẩm; ii) không có sản phẩm phụ thải ra môi trường nên không phải xử lý môi trường; iii) sử dụng endo-xylanaza thương mại (hãng Novozymes) thay vì sử dụng môi trường nuôi nấm *Asperigus oryzae* hoặc *Lentinus edodes* sau 10-14 ngày chứa

endoxylanaza để thủy phân cám gạo một giai đoạn, giúp tiết kiệm thời gian và tránh nhiễm trong nuôi cấy; iv) các enzym dùng để sản xuất XOS đều là phổ biến trong chế biến thực phẩm và có giá thành thấp; và v) bước thu và làm sạch dịch thủy phân đơn giản, hiệu quả.

Quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

- a) thủy phân để loại bỏ tinh bột ở cám gạo bằng cách sử dụng enzym amylaza;
- b) thủy phân để loại bỏ protein có trong cám gạo bằng cách sử dụng enzym proteaza;
- c) thủy phân giới hạn một lần bã cám gạo đã được loại bỏ tinh bột và protein bằng cách sử dụng enzym endoxylanaza;
- d) làm sạch và cô đặc dịch thủy phân chứa XOS bằng cách sử dụng cột lọc; và
- e) sấy phun sản phẩm thu được ở bước (d) thành bột và đóng gói sản phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sắc ký đồ TLC sản phẩm XOS thu được.

Hình 2 thể hiện độ sạch XOS bằng HPLC, A: XOS chuẩn 0,1%; B: chế phẩm XOS từ cám gạo.

Hình 3 thể hiện khả năng sinh trưởng của *Bacillus* trong môi trường chứa XOS.

Hình 4 là sắc ký đồ TLC môi trường nuôi cấy *B. subtilis* có chứa XOS. 1. XOS; 2. Môi trường LB tại thời điểm 0 giờ; 3. Môi trường LB tại thời điểm 24 giờ.

Hình 5 thể hiện hàm lượng butyrat trong môi trường nuôi cấy *B. subtilis* có chứa XOS.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm XOS bằng cách sử dụng các enzym thân thiện với môi trường, an toàn thực phẩm, phù hợp với điều kiện Việt Nam là những điểm hoàn toàn mới so với các công nghệ đã sử dụng để tinh sạch XOS ở Việt Nam. Quy trình này bao gồm các bước sau:

Bước 1: Thủy phân để loại bỏ tinh bột bằng amylaza

Cám không lẫn tạp chất và hạt cám có kích thước nhỏ hơn 0,2 mm (lọt qua sàng có kích thước lỗ 0,2 mm). Cám được kiểm nghiệm đầu vào về các chỉ tiêu an toàn vệ sinh thực phẩm, trong đó có thành phần độ ẩm, protein, lipid, tro tổng số, chất xơ tổng số, aflatoxin, mảnh vật sắc nhọn, và đặc biệt có hàm lượng xylan $\geq 12,8\%$ thông qua

việc đo hàm lượng D-xyloza bằng D-xyloza kit (Megazyme). Cám sau khi sấy được trộn với dung dịch đệm phosphat có độ pH=6,5, nồng độ 20 mM. Hỗn hợp cám và dung dịch đệm được khuấy với tốc độ 100 vòng/phút ở 50°C trong 30 phút để tạo thành hệ huyền phù. Sử dụng nồi inox gia nhiệt hai vỏ 300 lít có cánh khuấy. Tinh bột trong cám được thủy phân bằng enzym amylaza (Termamyl® SC, Novozymes) nồng độ 0,2% trong 20 phút ở 90°C. Cám được khuấy trộn liên tục ở tốc độ 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân.

Bước 2: Thủy phân để loại bỏ protein bằng proteaza

Protein trong dung dịch cám sau khi đã được thủy phân để loại tinh bột thu được ở bước 1 sẽ tiếp tục được thủy phân để loại bỏ protein bằng proteaza (Alcalase®, Novozymes) với nồng độ 0,4% trong 60 phút ở 50°C, độ pH=6,5. Dịch được khuấy trộn liên tục ở tốc độ 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân. Dịch sau thủy phân được gia nhiệt lên 100°C trong 20 phút. Dịch này được khuấy trộn liên tục ở 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân.

Bước 3: Thủy phân giới hạn một lần bã cám gạo đã loại bỏ tinh bột và protein bằng endoxylanaza

Dịch thủy phân sau bước 2 được thu lại được sử dụng máy ly tâm rô ở tốc độ quay 5000 vòng/phút. Bã cám sau đó được rửa bằng nước RO hai lần rồi đưa trở lại nồi inox gia nhiệt hai vỏ 300 lít có cánh khuấy. Bã cám được trộn với dung dịch đệm axetat natri 20mM, độ pH=5,5 theo tỷ lệ 1:5 trọng lượng/thể tích tính theo lượng cám ban đầu. Hỗn hợp bã và dung dịch đệm được khuấy ở tốc độ 100 vòng/phút ở 50°C trong 30 phút để tạo thành hệ huyền phù. XOS trong cám được thủy phân bằng enzym endoxylanaza (Ultraflo® Max, Novozymes) nồng độ 0,25% trong 18 giờ. Dịch cám được khuấy trộn liên tục ở tốc độ 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân.

Bước 4: Làm sạch và cô đặc dịch thủy phân chứa XOS bằng cách sử dụng cột lọc

Dịch XOS thủy phân sau bước 3 được thu lại bằng cách sử dụng máy ly tâm rô với tốc độ quay 5000 vòng/phút. Cột siêu lọc có đường kính 90mm, chiều dài 1200 mm, kích thước lỗ lọc là 10 kDa, diện tích lọc 2,04 m², công suất lọc 1224 L/h được sử dụng để thu các phân tử XOS dạng hòa tan có kích thước < 10 kDa. Dịch chiết XOS

sau khi tinh sạch ở cột lọc phân tử 10 kDa được kiểm nghiệm hàm lượng XOS bằng HPLC. Mẫu XOS chuẩn của hãng Wako được sử dụng làm chất chuẩn.

Bước 5: Sấy phun thu thành phẩm

Dịch XOS sau tinh sạch một phần sẽ được bổ sung maltoza dextrin nhằm mục đích nâng cao hàm lượng chất khô lên 10°Bx cho quá trình sấy khô thành phẩm và để sản phẩm sau sấy khô không bị hút ẩm nhanh bằng cách sử dụng máy sấy phun LPG-5, công suất máy 5L/h. Nhiệt độ hơi nóng đầu vào khoảng 145°C. Nhiệt độ hơi nóng đầu ra khoảng 80-100°C. Dung dịch XOS được sấy bằng máy sấy phun, có cỡ hạt khoảng 1 micromet đạt độ ẩm cuối 8-10% để cất giữ. XOS sau khi được sấy khô được kiểm tra độ sạch bằng chạy sắc ký lớp mỏng TLC như được thể hiện trên Hình 1 và HPLC như được thể hiện trên Hình 2. Sau đó, XOS được bao gói bằng giấy thiếc kích thước tùy loại: 50g, 100g, 500 g, 1 kg và hút chân không bằng máy hút chân không ZF-300.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Thu XOS từ cám gạo ở quy mô 1kg cám/mẻ bằng cách sử dụng quy trình thủy phân đa enzym đã được tối ưu hóa

Bước 1: Thủy phân để loại bỏ tinh bột bằng amylaza

1 kg cám được trộn với dung dịch đệm phosphat, độ pH=6,5, nồng độ 20mM. Hỗn hợp cám và dung dịch đệm được khuấy ở tốc độ 100 vòng/phút ở 50°C trong 30 phút để tạo thành hệ huyền phù. Sử dụng nồi inox gia nhiệt hai vỏ 300 lít có cánh khuấy. Tinh bột trong cám được thủy phân bằng enzym amylaza (Termamyl® SC, Novozymes) ở nồng độ 0,2% trong 20 phút ở 90°C. Cám được khuấy trộn liên tục ở tốc độ 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân.

Bước 2: Thủy phân để loại bỏ protein bằng proteaza

Protein trong dung dịch cám sau khi đã được thủy phân để loại bỏ tinh bột ở bước 1 sẽ tiếp tục được thủy phân để loại bỏ protein bằng proteaza (Alcalase®, Novozymes) ở nồng độ 0,4% trong 60 phút ở 50°C, độ pH=6,5. Dịch này được khuấy trộn liên tục ở 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân. Dịch sau thủy phân được gia nhiệt lên 100°C trong 20 phút. Dịch này được khuấy trộn liên tục ở tốc độ 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất gia nhiệt.

Bước 3: Thủy phân giới hạn một lần bã cám gạo đã loại tinh bột và protein bằng endoxylanaza

Dịch thủy phân sau bước 2 được thu lại bằng cách sử dụng máy ly tâm rô ở tốc độ quay 5000 vòng/phút. Bã cám sau đó được rửa bằng nước RO hai lần rồi đưa trở lại nồi inox gia nhiệt hai vỏ 300 lít có cánh khuấy. Bã cám được trộn với dung dịch đệm axetat natri 20mM, độ pH=5,5 theo tỷ lệ 1:5 trọng lượng/thể tích tính theo lượng cám ban đầu. Hỗn hợp bã và dung dịch đệm được khuấy ở tốc độ 100 vòng/phút ở 50°C trong 30 phút để tạo thành hệ huyền phù. XOS trong cám được thủy phân bằng enzym endoxylanaza (Ultraflo® Max, Novozymes) nồng độ 0,25% trong 18 giờ. Dịch cám này được khuấy trộn liên tục ở tốc độ 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân.

Bước 4: Làm sạch và cô đặc dịch thủy phân chứa XOS bằng cách sử dụng cột lọc phân tử

Dịch XOS thủy phân sau bước 3 được thu lại bằng cách sử dụng máy ly tâm rô ở tốc độ quay 5000 vòng/phút. Cột siêu lọc có đường kính 90mm, chiều dài 1200 mm, kích thước lỗ lọc là 10 kDa, diện tích lọc 2,04 m², công suất lọc 1224 L/h được sử dụng để thu các phân tử XOS dạng hòa tan có kích thước < 10 kDa. Dịch chiết XOS sau khi được làm sạch ở cột lọc phân tử 10 kDa được kiểm nghiệm hàm lượng XOS bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Mẫu XOS chuẩn của hãng Wako được sử dụng làm chất chuẩn..

Bước 5: Sấy phun thành bột và đóng gói sản phẩm

Dịch XOS sau khi được làm sạch một phần sẽ được bổ sung maltoza dextrin với mục đích nâng cao hàm lượng chất khô lên 10°Bx cho quá trình sấy khô thành phẩm và để sản phẩm sau sấy khô không bị hút ẩm nhanh bằng cách sử dụng máy sấy phun LPG-5, công suất máy 5L/h. Nhiệt độ hơi nóng đầu vào khoảng 145°C. Nhiệt độ hơi nóng đầu ra khoảng 80-100°C. Quy trình này cho hiệu suất thu hồi sản phẩm XOS đạt >15,0% và có độ sạch đạt >60%.

Ví dụ 2: Thu XOS từ cám gạo ở quy mô 20 kg cám/mẻ bằng cách sử dụng quy trình thủy phân đa enzym đã được tối ưu hóa

Bước 1: Thủy phân để loại bỏ tinh bột bằng amylaza

20 kg cám được trộn với dung dịch đệm phosphat, độ pH=6,5, nồng độ 20mM. Hỗn hợp cám và dung dịch đệm được khuấy ở tốc độ 100 vòng/phút ở 50°C trong 30 phút để tạo thành hệ huyền phù. Sử dụng nồi inox gia nhiệt hai vỏ 300 lít có cánh khuấy. Tinh bột trong cám được thủy phân bằng enzym amylaza (Termamyl® SC, Novozymes) ở nồng độ 0,2% trong 20 phút ở 90°C. Cám được khuấy trộn liên tục ở tốc độ 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân.

Bước 2: Thủy phân để loại bỏ protein bằng proteaza

Protein trong dung dịch cám sau khi đã được thủy phân để loại bỏ tinh bột ở bước 1 sẽ tiếp tục được thủy phân để loại bỏ protein bằng proteaza (Alcalase®, Novozymes) ở nồng độ 0,4% trong 60 phút ở 50°C, độ pH=6,5. Dịch này được khuấy trộn liên tục ở 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân. Dịch sau thủy phân được gia nhiệt lên 100°C trong 20 phút. Dịch này được khuấy trộn liên tục ở tốc độ 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất gia nhiệt.

Bước 3: Thủy phân giới hạn một lần bã cám gạo đã loại tinh bột và protein bằng endoxylanaza

Dịch thủy phân sau bước 2 được thu lại bằng cách sử dụng máy ly tâm rô ở tốc độ quay 5000 vòng/phút. Bã cám sau đó được rửa bằng nước RO hai lần rồi đưa trở lại nồi inox gia nhiệt hai vỏ 300 lít có cánh khuấy. Bã cám được trộn với dung dịch đệm axetat natri 20mM, độ pH=5,5 theo tỷ lệ 1:5 trọng lượng/thể tích tính theo lượng cám ban đầu. Hỗn hợp bã và dung dịch đệm được khuấy ở tốc độ 100 vòng/phút ở 50°C trong 30 phút để tạo thành hệ huyền phù. XOS trong cám được thủy phân bằng enzym endoxylanaza (Ultraflo® Max, Novozymes) nồng độ 0,25% trong 18 giờ. Dịch cám này được khuấy trộn liên tục ở tốc độ 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân.

Bước 4: Làm sạch và cô đặc dịch thủy phân chứa XOS bằng cách sử dụng cột lọc phân tử

Dịch XOS thủy phân sau bước 3 được thu lại bằng cách sử dụng máy ly tâm rô ở tốc độ quay 5000 vòng/phút. Cột siêu lọc có đường kính 90mm, chiều dài 1200 mm, kích thước lỗ lọc là 10 kDa, diện tích lọc 2,04 m², công suất lọc 1224 L/h được sử dụng để thu các phân tử XOS dạng hòa tan có kích thước < 10 kDa. Dịch chiết XOS

sau khi được làm sạch ở cột lọc phân tử 10 kDa được kiểm nghiệm hàm lượng XOS bằng HPLC. Mẫu XOS chuẩn của hãng Wako được sử dụng làm chất chuẩn..

Bước 5: Sấy phun thành bột và đóng gói sản phẩm

Dịch XOS sau khi được làm sạch một phần sẽ được bổ sung maltoza dextrin với mục đích nâng cao hàm lượng chất khô lên 10°Bx cho quá trình sấy khô thành phẩm và để sản phẩm sau sấy khô không bị hút ẩm nhanh bằng cách sử dụng máy sấy phun LPG-5, công suất máy 5L/h. Nhiệt độ hơi nóng đầu vào khoảng 145°C. Nhiệt độ hơi nóng đầu ra khoảng 80-100°C. Quy trình này cho hiệu suất thu hồi sản phẩm XOS đạt >16,0% và có độ sạch đạt >60%.

Ví dụ 3: Thu XOS từ cám gạo ở quy mô 30 kg cám/mẻ bằng cách sử dụng quy trình thủy phân đa enzym đã được tối ưu hóa

Bước 1: Thủy phân để loại bỏ tinh bột bằng amylaza

30 kg cám được trộn với dung dịch đệm phosphat, độ pH=6,5, nồng độ 20mM. Hỗn hợp cám và dung dịch đệm được khuấy ở tốc độ 100 vòng/phút ở 50°C trong 30 phút để tạo thành hệ huyền phù. Sử dụng nồi inox gia nhiệt hai vỏ 300 lít có cánh khuấy. Tinh bột trong cám được thủy phân bằng enzym amylaza (Termamyl SC®, Novozyme) ở nồng độ 0,2% trong 20 phút ở 90°C. Cám được khuấy trộn liên tục ở tốc độ 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân.

Bước 2: Thủy phân để loại bỏ protein bằng proteaza

Protein trong dung dịch cám sau khi đã được thủy phân để loại bỏ tinh bột ở bước 1 sẽ tiếp tục được thủy phân để loại bỏ protein bằng proteaza (Alcalase®, Novozyme) ở nồng độ 0,4% trong 60 phút ở 50°C, độ pH=6,5. Dịch này được khuấy trộn liên tục ở 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân. Dịch sau thủy phân được gia nhiệt lên 100°C trong 20 phút. Dịch này được khuấy trộn liên tục ở tốc độ 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất gia nhiệt.

Bước 3: Thủy phân giới hạn một lần bã cám gạo đã loại tinh bột và protein bằng endoxylanaza

Dịch thủy phân sau bước 2 được thu lại bằng cách sử dụng máy ly tâm rô ở tốc độ quay 5000 vòng/phút. Bã cám sau đó được rửa bằng nước RO hai lần rồi đưa trở lại nồi inox gia nhiệt hai vỏ 300 lít có cánh khuấy. Bã cám được trộn với dung dịch đệm

axetat natri 20mM, độ pH=5,5 theo tỷ lệ 1:5 trọng lượng/thể tích tính theo lượng cám ban đầu. Hỗn hợp bã và dung dịch đậm được khuấy ở tốc độ 100 vòng/phút ở 50⁰C trong 30 phút để tạo thành hệ huyền phù. XOS trong cám được thủy phân bằng enzym endoxylanaza (Ultraflo[®] Max, Novozymes) nồng độ 0,25% trong 18 giờ. Dịch cám này được khuấy trộn liên tục ở tốc độ 100 vòng/phút để nâng cao hiệu suất thủy phân.

Bước 4: Làm sạch và cô đặc dịch thủy phân chứa XOS bằng cách sử dụng cột lọc phân tử

Dịch XOS thủy phân sau bước 3 được thu lại bằng cách sử dụng máy ly tâm rô ở tốc độ quay 5000 vòng/phút. Cột siêu lọc có đường kính 90mm, chiều dài 1200 mm, kích thước lỗ lọc là 10 kDa, diện tích lọc 2,04 m², công suất lọc 1224 L/h được sử dụng để thu các phân tử XOS dạng hòa tan có kích thước < 10 kDa. Dịch chiết XOS sau khi được làm sạch ở cột lọc phân tử 10 kDa được kiểm nghiệm hàm lượng XOS bằng HPLC. Mẫu XOS chuẩn của hãng Wako được sử dụng làm chất chuẩn..

Bước 5: Sấy phun thành bột và đóng gói sản phẩm

Dịch XOS sau khi được làm sạch một phần sẽ được bổ sung maltoza dextrin với mục đích nâng cao hàm lượng chất khô lên 10⁰Bx cho quá trình sấy khô thành phẩm và để sản phẩm sau sấy khô không bị hút ẩm nhanh bằng cách sử dụng máy sấy phun LPG-5, công suất máy 5L/h. Nhiệt độ hơi nóng đầu vào khoảng 145⁰C. Nhiệt độ hơi nóng đầu ra khoảng 80-100⁰C. Quy trình này cho hiệu suất thu hồi sản phẩm XOS đạt >18,0% và có độ sạch đạt >60%.

Ví dụ 4: Khả năng đồng hóa XOS của vi khuẩn có lợi (probiotic) *Bacillus subtilis*

Các số liệu được thể hiện trên Hình 3 cho thấy trong số 5 chủng vi khuẩn probiotic đã được nghiên cứu thì chỉ có chủng *B. subtilis* có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường LB có bổ sung 0,25% XOS. Cụ thể là, mật độ tế bào sau 6 giờ nuôi cấy ở A₆₀₀ của vi khuẩn này trong môi trường LB chỉ đạt 0,43 trong khi mật độ ở môi trường LB có chứa XOS đạt tới 0,68. Sau 8 giờ nuôi cấy, các số liệu lần lượt là 0,65 và 0,93. Sự khác biệt này thể hiện rõ ràng hơn với mẫu nuôi cấy vi khuẩn sau 24 giờ (lần lượt là 1,13 và 1,57). Như vậy, có thể sơ bộ kết luận rằng sự có mặt của XOS trong môi trường nuôi cấy giúp *B. subtilis* sinh trưởng tốt hơn, có lẽ vì vi khuẩn này đã đồng hóa được XOS.

Để khẳng định khả năng tiêu thụ XOS của *B. subtilis*, hàm lượng đường XOS trong môi trường nuôi cấy đã được kiểm tra sử dụng phương pháp TLC và định lượng XOS còn lại trong môi trường sử dụng kit D-xyloza (Megazyme). Kết quả thu được cho thấy sau 24 giờ nuôi cấy, hàm lượng XOS trong môi trường này đã giảm đi 70% so với ban đầu, chứng tỏ *B. subtilis* đã sử dụng XOS trong quá trình phát triển. Kết quả kiểm tra hàm lượng XOS còn lại trong môi trường này bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) được trình bày trong Hình 4 cũng cho thấy XOS đã giảm đi đáng kể sau 24 giờ nuôi cấy. Các vạch sắc ký gần như biến mất sau 24 giờ nuôi cấy so với mẫu đối chứng.

Các nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng butyrat là sản phẩm lên men chủ yếu của XOS bởi vi khuẩn đường ruột. Để chứng minh *B. subtilis* đã đồng hóa XOS và sinh butyrat, hàm lượng butyrat có trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn tại hai thời điểm 0 giờ và 24 giờ đã được kiểm tra. Kết quả nghiên cứu này được thể hiện ở Hình 5 cho thấy rằng hàm lượng axit béo mạch ngắn này đã tăng lên từ 0,54% (tại thời điểm 0 giờ) đến 8,68% (tại thời điểm 24 giờ nuôi cấy), chứng tỏ *B. subtilis* đã sử dụng XOS và sinh ra butyrat.

Chế phẩm sinh học tạo ra dựa trên quy trình sản xuất chế phẩm theo giải pháp hữu ích này là một chế phẩm an toàn sinh học, có hiệu quả để làm thực phẩm bổ sung tăng cường miễn dịch và hỗ trợ điều trị tiêu chảy cấp.

Quy trình theo giải pháp hữu ích này có các ưu điểm chính sau:

1. Đơn giản, dễ thực hiện và phù hợp với các điều kiện thực tế, an toàn thực phẩm, có thể ứng dụng trong các cơ sở sản xuất tại Việt Nam.
2. Nguồn nguyên liệu cho sản xuất là cám gạo rất dồi dào, có giá trị dinh dưỡng và kinh tế thấp
3. Sản phẩm đảm bảo an toàn thực phẩm
4. Không có sản phẩm phụ trong quá trình sản xuất nên quy trình này là thân thiện với môi trường.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chất xơ hòa tan xylooligosacarit (XOS) bao gồm các bước:

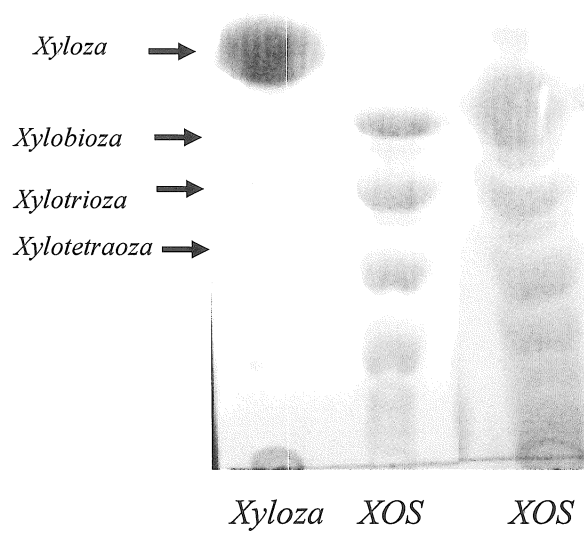
a) thủy phân để loại bỏ tinh bột có trong cám gạo bằng cách sử dụng enzym amylaza (Termamyl[®] SC, Novozymes) 0,2% trong dung dịch đệm phosphat, độ pH=6,5, nồng độ 20 mM trong 20 phút ở 90°C, dịch thủy phân được khuấy trộn liên tục để nâng cao hiệu suất thủy phân;

b) thủy phân để loại bỏ protein có trong cám gạo bằng cách sử dụng enzym proteaza (Alcalase[®], Novozymes) 0,4% trong dung dịch đệm phosphat, độ pH=6,5, nồng độ 20 mM trong 60 phút ở 50°C, dịch thủy phân được khuấy trộn liên tục để nâng cao hiệu suất thủy phân;

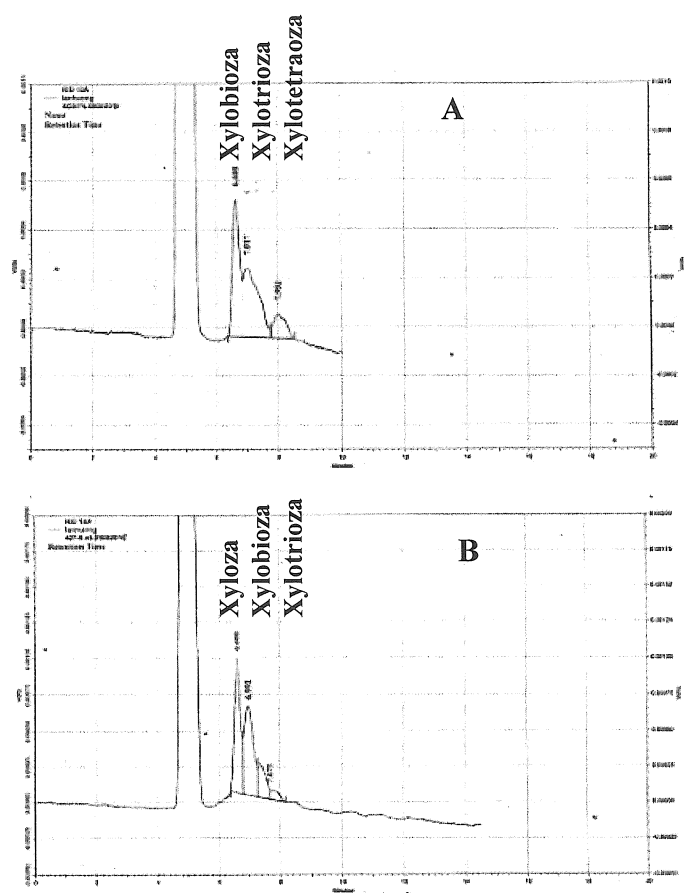
c) thủy phân giới hạn một lần bã cám gạo đã được loại bỏ tinh bột và protein bằng enzym endoxylanaza (Ultraflo[®] Max, Novozymes) 0,25% trong dung dịch đệm axetat natri 20 mM, độ pH=5,5 trong 18 giờ ở 50°C, bã cám được trộn với dung dịch đệm theo tỷ lệ 1:5 trọng lượng/thể tích, dịch cám được khuấy trộn liên tục để nâng cao hiệu suất thủy phân;

d) làm sạch và cô đặc dịch thủy phân chứa XOS bằng cách sử dụng cột lọc có đường kính 90 mm, chiều dài 1200 mm, kích thước lỗ lọc là 10 kDa, diện tích lọc 2,04m², công suất lọc 1224 l/h, thu được các phân tử XOS dạng hòa tan có kích thước <10kDa; và

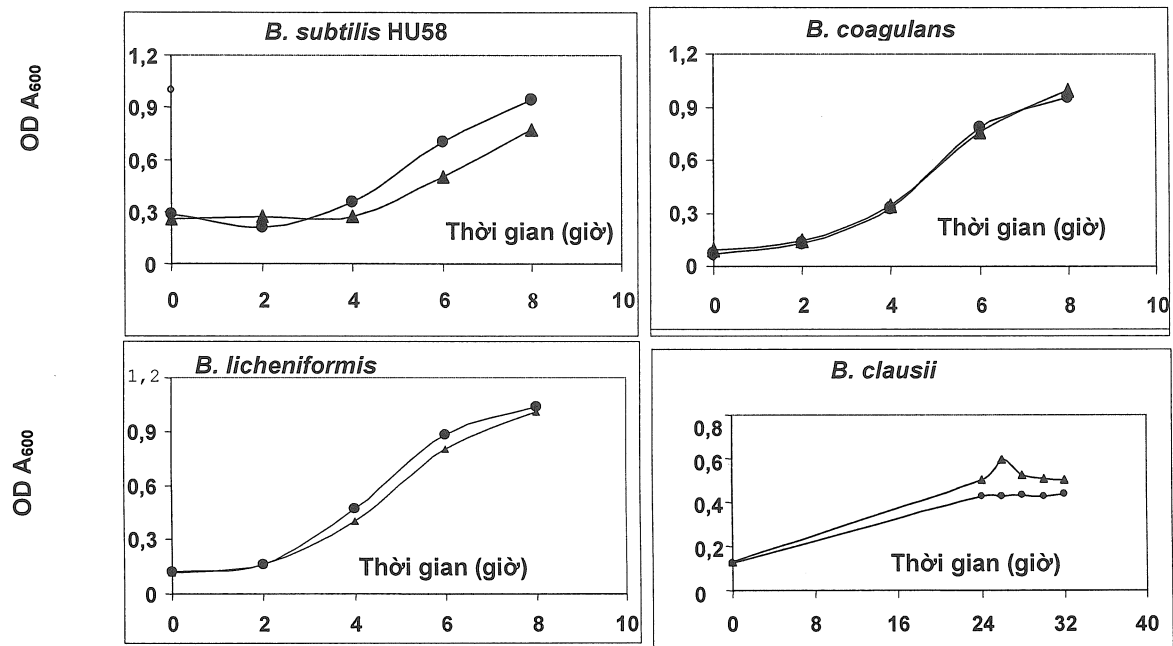
e) sấy phun sản phẩm thu được từ bước d) để tạo thành bột và đóng gói sản phẩm: dịch XOS sau khi làm sạch một phần sẽ được bổ sung bổ sung maltoza dextrin để nâng cao hàm lượng chất khô lên 10°Bx cho quá trình sấy khô thành phẩm và để sản phẩm sau sấy khô không bị hút ẩm nhanh bằng cách sử dụng máy sấy phun LPG-5, công suất máy 5L/h, nhiệt độ hơi nóng đầu vào khoảng 145°C, nhiệt độ hơi nóng đầu ra khoảng 80-100°C, bột thu được có cỡ hạt khoảng 1 micromet, độ ẩm 8-10%.



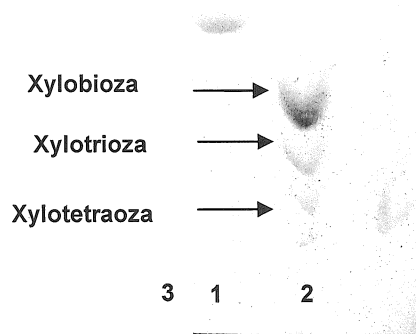
Hình 1



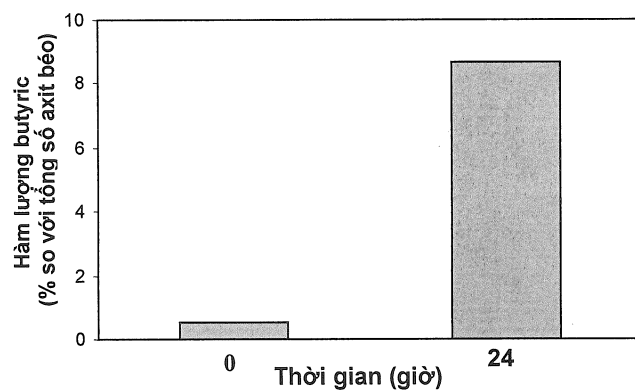
Hình 2



Hình 3



Hình 4



Hình 5