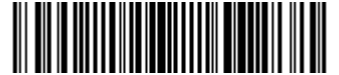




(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002935

(51)⁷ **A01H 1/02; A01H 5/00; A01H 1/04**

(13) **Y**

(21) 2-2017-00208

(22) 19/01/2016

(86) PCT/TH2016/000004 19/01/2016

(87) WO 2016/118091 28/07/2016

(30) 1501000280 21/01/2015 TH

(45) 25/06/2022 411

(43) 27/11/2017 356A

(73) THE THAI TAPIOCA DEVELOPMENT INSTITUTE UNDER THE PATRONAGE
OF HRH PRINCESS MAHA CHAKRI SIRINDHORN (TH)

15th Floor Lumpini Tower 1168/26 Rama IV Road, Bangkok 10120, Thailand

(72) ROJANARIDPICHED, Chareinsuk (TH); VICHUKIT, Vichan (TH); PHUMICHAIR,
Chalermopol (TH).

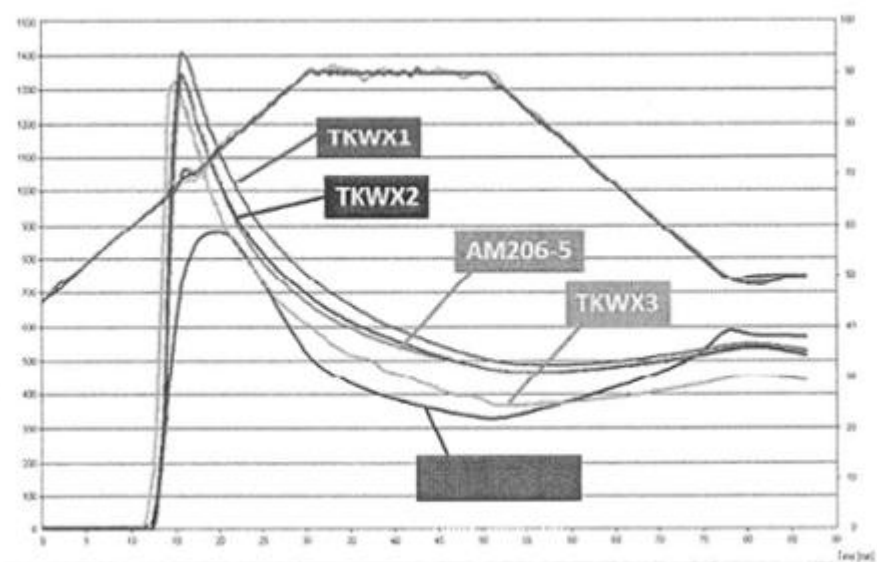
(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÁT TRIỂN GIỐNG SẢN CHỨA TINH BỘT SÁP, TINH BỘT THU
ĐƯỢC TỪ GIỐNG SẢN NÀY VÀ SẢN PHẨM CHỨA NÓ

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp phát triển giống sản chứa tinh bột sáp để tạo ra tinh bột có đặc tính được cải thiện và hàm lượng xyanua thấp, trong đó phương pháp này bao gồm bước phát triển giống sản có gen lặn đồng hợp tử (*wxwx*), có các đặc tính của tinh bột được cải thiện và hàm lượng xyanua thấp mà không sử dụng kỹ thuật di truyền hoặc cải biến di truyền. Giải pháp hữu ích còn đề cập đến tinh bột có các đặc tính được cải thiện, được chiết từ giống sản chứa tinh bột sáp và các giống sản khác thu được bằng phương pháp theo giải pháp hữu ích, cũng như khả năng áp dụng công nghiệp của các tinh bột thu được từ giống sản được phát triển theo phương pháp của giải pháp hữu ích.

Độ nhớt (BU)

Nhiệt độ (°C)



Thời gian (phút)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực kỹ thuật nông nghiệp, đề cập đến phương pháp phát triển giống sắn chứa tinh bột sắn có các đặc tính được cải thiện và hàm lượng xyantua thấp.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Ngoài việc sử dụng tinh bột thông thường, gồm amyloza và amylopectin, ngày nay tinh bột amylopectin (tinh bột không có amyloza) được sử dụng rộng rãi làm chất làm đặc, chất ổn định, chất tạo cấu trúc, chất làm thay đổi độ nhớt, keo dính, chất kết dính và chất bao trong một số lĩnh vực trong công nghiệp cần độ ổn định của hồ tinh bột cao. Chẳng hạn, trong quá trình sản xuất một số sản phẩm thực phẩm, giấy, sản phẩm dệt và sản phẩm chăm sóc cơ thể, việc sử dụng tinh bột amylopectin là được ưu tiên do đặc tính không thoái hóa hoặc thoái hóa ở mức thấp của nó. Tuy nhiên, tinh bột chỉ chứa amylopectin, còn được gọi là tinh bột sắn, chỉ có thể được tìm thấy ở một số cây ngũ cốc như cây lúa gạo, cây ngô, cây lúa miến, cây lúa đại mạch và cây lúa mì, hoặc các cây củ như khoai tây và sắn, các loại này có gen lặn đồng hợp tử, nghĩa là $wwxx$. Gen lặn đồng hợp tử này làm cho quá trình tổng hợp tinh bột sắn diễn ra nhờ sự đột biến của gen để điều hòa gen tổng hợp amyloza, nghĩa là enzym synthaza của tinh bột liên kết hạt (granular bound starch synthase: GBSS).

Mức độ sản xuất tinh bột ngô dạng sắn tăng lên đáng kể trong những năm gần đây, và giá của nó cao hơn đáng kể so với giá của tinh bột ngô thông thường. Tuy nhiên, quá trình sản xuất tinh bột ngô dạng sắn có thể bị lẫn tạp chất là hạt của giống tinh bột ngô thông thường. Do đó, điều quan trọng là cần trồng cây ngô chứa tinh bột sắn riêng biệt với cây ngô thông thường để ngăn ngừa sự thụ phấn chéo và lẫn tạp chất, điều này có nghĩa là cần có nhiều diện tích trồng hơn. Trái lại, tình trạng này hầu như không xảy ra khi cây sắn chứa tinh bột sắn được sinh trưởng dưới dạng cây sắn được nhân giống bằng phương pháp vô tính và không phụ thuộc vào giống (hoặc hạt) hữu tính để sinh sản. Hiện tượng lẫn tạp chất có thể được khắc phục bằng cách ngăn ngừa sự trộn lẫn củ của cây sắn chứa tinh bột sắn với củ của cây sắn bình thường khi

thu hoạch.

Sắn là một trong số các cây trồng kinh tế quan trọng nhất trên thế giới. Ở Thái Lan, cây sắn được trồng rộng rãi, và các sản phẩm thu được từ cây sắn đã và đang được xuất khẩu cho các lĩnh vực khác nhau, cụ thể là trong lĩnh vực sản phẩm thực phẩm. Ví dụ về các sản phẩm từ cây sắn quan trọng là lát sắn, khoai sắn, tinh bột nguyên chất, tinh bột biến tính, ngọc trai nhân tạo và chất làm ngọt. Các thuộc tính quan trọng của tinh bột sắn bình thường và tinh bột ngô dạng sáp được so sánh; trong khi một số thuộc tính của chúng là tương đương, mức độ thoái hóa của tinh bột là hoàn toàn khác nhau, được tóm tắt trong Bảng 1.

Bảng 1- So sánh các đặc tính quan trọng của tinh bột ngô dạng sáp và tinh bột sắn bình thường

Loại	Tinh bột ngô dạng sáp	Tinh bột sắn bình thường
Đặc tính		
Hàm lượng amyloza (%)	0	17
Độ nhớt của hồ tinh bột	Trung bình-cao	Cao
Cấu trúc của hồ tinh bột	Dài	Dài
Độ trong của hồ tinh bột	Trong suốt	Trong suốt
Tính chịu cắt của hồ tinh bột	Thấp	Thấp
Độ ổn định của hồ tinh bột với sự thoái hóa	Rất thấp	Thấp

Do đó, cần phát triển các giống sắn chứa tinh bột sáp để có thể phát triển các sản phẩm tinh bột đặc biệt và mở ra thị trường mới cho các ứng dụng cụ thể. Điều này có thể giúp tăng thêm giá trị kinh tế cho tinh bột sắn và còn gia tăng thêm thị trường xuất khẩu của nó.

Một nhược điểm của hầu hết các giống sắn trồng ở Thái Lan là sự tích tụ xyanua ở dạng xyanogen glucosid trong củ sắn. Trong quá trình sản xuất tinh bột sắn, củ sắn phải được xử lý thích hợp để loại bỏ hợp chất độc này sao cho tinh bột đã xử lý chứa hàm lượng xyanua rất thấp, tuân theo các quy định về độ an toàn, cụ thể là quy định về an toàn thực phẩm. Khi được sử dụng, lượng hợp chất xyanogen còn dư trong tinh bột có thể được chuyển hóa thành axit xianhydric bằng các enzyme trong ruột non và trở thành chất độc (liều gây chết 50% (LD50) = 1-3mg/kg thể trọng). Mục đích của

việc phát triển giống sắn không chỉ là để cải thiện đặc tính về năng suất mà còn làm giảm hàm lượng hợp chất xyanogen trong củ sắn để sử dụng an toàn và làm giảm chi phí xử lý loại bỏ xyanua.

Có nhiều giải pháp đã biết trong lĩnh vực này chứng minh tác dụng ức chế GBSS đối với thành phần tinh bột. Chẳng hạn, patent Mỹ số US 6.784.338 bộc lộ quy trình ngăn ngừa quá trình tổng hợp amyloza bằng cách loại bỏ hoạt tính của GBSS ở khoai tây, với sự biến đổi cấu trúc đối nghĩa thành gen mã hóa enzym GBSS nêu trên. Nhờ đó, thu được tinh bột amylopectin ở khoai tây. Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2007/0261136 bộc lộ phương pháp tạo ra tinh bột ngô amylopectin bằng cách biến đổi trình tự axit nucleic thể khảm để mã hóa tinh bột sắn. Các phương pháp được bộc lộ trong các giải pháp đã biết này sử dụng kỹ thuật cải biến di truyền (genetic modification: GM) hoặc biến nạp di truyền, các kỹ thuật này chỉ được người tiêu dùng chấp nhận ở mức độ hạn chế do mối quan ngại về độ an toàn cũng như các vấn đề về sinh thái và môi trường.

Một phương pháp tiềm năng để phát triển giống sắn không sử dụng kỹ thuật cải biến di truyền (GM) có sự đột biến lặn về tính trạng sắn là phương pháp nhân giống gần bằng cách sử dụng sự tự thụ phấn. Phương pháp này đã được thông báo khi thể đột biến của cây sắn chứa tinh bột không có amyloza, AM 206-5, được phát hiện bởi Ceballos và các đồng tác giả (2007) (Ceballose et al., 2007, Discovery of an amylose-free starch mutant in cassava (*Manihot esculenta* Crantz), J. Agri. Food Chem. 56: 7215-7222). Tuy nhiên, khi dòng vô tính này được trồng sẽ cho năng suất củ rất thấp, và do dáng cây nhỏ của nó không thích hợp cho mục đích thương mại.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm phát triển giống sắn có các tính trạng mong muốn, trong trường hợp này là giống sắn chứa tinh bột sắn có các đặc tính được cải thiện và hàm lượng xyanua thấp mà không sử dụng kỹ thuật cải biến di truyền (GM).

Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp phát triển giống sắn chứa tinh bột sắn có các đặc tính được cải thiện và hàm lượng xyanua thấp. Phương pháp này bao gồm bước lai kiểu gen của cây sắn chứa tinh bột sắn năng suất thấp (*wxwx*) với giống sắn bình thường (giống có kiểu gen đồng hợp tử trội, *WXWX*). Các giống sắn bình thường được chọn cần có các tính trạng kiểu hình tốt bao gồm các tính trạng nông

học, dạng sinh trưởng của cây, năng suất củ và khả năng thích nghi với môi trường tương tự môi trường của Thái Lan, với một hoặc nhiều tính trạng bổ sung như khả năng chịu đựng cao với stress do môi trường, năng suất củ cao, chỉ số thu hoạch cao và hàm lượng chất khô trong củ sắn tươi cao. Các thể lai tạo ra giống lai F1 có sự kết hợp gen, $WXwx$. Sau đó, thể hệ con F2 thu được bằng cách thụ phấn chéo giữa các giống lai F1 ($F1 \times F1$); các thể hệ con này sẽ mang gen lặn đồng hợp tử, $wxwx$, cũng như biểu hiện các tính trạng mong muốn, cụ thể là giống sắn chứa tinh bột sắn có các đặc tính được cải thiện và hàm lượng xyanua thấp. Ngoài ra, giải pháp hữu ích đề xuất giống sắn thu được từ kỹ thuật lai nêu trên.

Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề xuất tinh bột thu được từ các giống sắn chứa tinh bột sắn có các đặc tính được cải thiện và hàm lượng xyanua thấp, được phát triển bằng phương pháp đã mô tả trên đây.

Giải pháp hữu ích còn mô tả việc sử dụng tinh bột thu được từ các giống sắn chứa tinh bột sắn này, được phát triển bằng phương pháp đã mô tả trên đây, trong các ngành và sản phẩm khác nhau như thực phẩm và đồ uống, thức ăn chăn nuôi, giấy và vật liệu bao gói, keo dính và chất kết dính, chất bao, sản phẩm dệt và quần áo, dược phẩm, mỹ phẩm, sản phẩm chăm sóc cơ thể, sản phẩm chăm sóc tóc, sản phẩm chăm sóc thú cưng và sản phẩm dùng cho gia đình.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện profin độ nhớt của hồ tinh bột của các tinh bột sắn được chiết từ các giống sắn khác nhau bao gồm TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3, AM 206-5 và Huay Bong 60.

Fig.2 là đồ thị thể hiện mức độ tách nước (%) của các hồ tinh bột nấu chín của tinh bột thu được từ giống ngô chứa tinh bột sắn, lúa gạo chứa tinh bột sắn, khoai tây chứa tinh bột sắn, sắn chứa tinh bột sắn theo giải pháp hữu ích và giống sắn bình thường chứa tinh bột sắn với các chu trình đông lạnh-rã đông khác nhau.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Trong giải pháp hữu ích này, thuật ngữ “tinh bột sắn” để chỉ các tinh bột chứa hàm lượng amyloza rất thấp và hàm lượng amylopectin rất cao, bao gồm các tinh bột có hàm lượng amylopectin cao hơn 90%, tốt hơn là các tinh bột có hàm lượng

amylopectin cao hơn 99%, và tốt hơn nữa là các tinh bột có hàm lượng amylopectin bằng 100% hoặc hàm lượng amyloza bằng 0%.

Trong giải pháp hữu ích này, thuật ngữ “giống sản có các đặc tính được cải thiện” để chỉ các giống sản có một hoặc nhiều đặc tính mong muốn như năng suất củ cao, số lượng củ/cây cao, chứa các tinh bột sấp có thuộc tính đặc trưng, ví dụ, độ nhớt của hồ tinh bột cao, độ trong của hồ tinh bột, độ ổn định khi đông lạnh-rã đông cũng như chứa hàm lượng amyloza thấp, khi so với giống bố-mẹ của chúng.

Trong giải pháp hữu ích này, thuật ngữ “hàm lượng xyanua thấp” để chỉ củ sản hoặc tinh bột thu được từ các giống được phát triển theo giải pháp hữu ích chứa hàm lượng xyanua thấp hơn giống sản bình thường.

Trong giải pháp hữu ích này, thuật ngữ “chỉ số thu hoạch” là giá trị thu được theo tỷ lệ giữa trọng lượng của củ sản và tổng trọng lượng của cây, nghĩa là trọng lượng của phần cây cao hơn mặt đất cộng với trọng lượng của củ sản.

Sự nhân giống giống sản theo giải pháp hữu ích bắt đầu bằng sự thụ phấn chéo giữa thể đột biến của giống sản chứa tinh bột sấp năng suất thấp và giống sản bình thường để chuyển tính trạng sấp vào giống lai F1. Sau đó, giống lai F1 này được lai chéo với giống lai F1 khác để tạo ra thế hệ con F2.

Sự thụ phấn chéo giữa thể đột biến của giống sản chứa tinh bột sấp và giống sản bình thường để tạo ra giống lai F1 có thể phân tách tính trạng lặn của sấp; do đó, giống sản bình thường có các tính trạng đáng chú ý bất kỳ có thể được chọn từ nhóm bao gồm khả năng chịu đựng cao với stress do môi trường, năng suất củ cao, chỉ số thu hoạch cao và hàm lượng chất khô cao trong củ sản tươi có thể được dùng để tạo ra giống lai F1.

Do tính trạng/các tính trạng cần thiết ở thế hệ con F2 có thể được cố định bằng cách tách dòng sau đó, sự nhân giống của các kiểu gen mong muốn có thể được thực hiện, và không giới hạn ở chính các giống lai F1 được tạo ra. Theo cách khác, quá trình này có thể được thực hiện bằng cách lai giống lai F1 với giống lai F1 khác được tạo ra từ việc lai giống sản chứa tinh bột sấp và giống sản bình thường, có các tính trạng giống nhau hoặc khác nhau; hoặc bằng cách lai giống lai F1 dị hợp tử với các giống lai thu được từ việc nhân giống mở của thể đột biến có tính trạng sấp; hoặc bằng cách lai dị hợp tử F1 với các giống được thụ phấn chéo của giống cái có tính trạng sấp.

Thế hệ con F2 chứa tinh bột sấp có thể được biệt hóa với tinh bột bình thường

bằng phương pháp (nhưng không chỉ giới hạn ở) nhuộm iot hoặc phương pháp in dấu ADN. Các phương pháp đã biết khác để chứng minh rằng kiểu gen tạo thành chứa tinh bột sếp cũng có thể được áp dụng để kiểm tra xem thể hệ con F2 chứa tinh bột sếp hay không.

Ngoài ra, điều này có thể được chứng minh bằng cách trồng thể hệ con F2 trên cánh đồng và sau đó thu hoạch củ để tách tinh bột. Các đặc tính của tinh bột tách được được phân tích, và sau đó các giống lai F2 tạo ra các đặc tính của tinh bột tốt và hàm lượng xyanua thấp được chọn để trồng tiếp và đánh giá ở các khu vực trồng sản thích hợp.

Tinh bột tách được từ các giống sản chứa tinh bột sếp thu được bằng phương pháp đã mô tả trong giải pháp hữu ích có một hoặc nhiều đặc tính được cải thiện này được chọn từ nhóm bao gồm không có sự thoái hóa hoặc sự thoái hóa ở mức thấp, độ ổn định và độ trong của hồ tinh bột cao, độ nhớt của hồ tinh bột cao và tính chịu cắt thấp của hồ tinh bột nấu chín.

Theo đó, tinh bột tách được có thể được sử dụng trong nhiều ngành bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thực phẩm và đồ uống, thức ăn chăn nuôi, giấy và vật liệu bao gói, keo dính và chất kết dính, chất bao, sản phẩm chăm sóc cơ thể, sản phẩm chăm sóc tóc, sản phẩm chăm sóc thú cưng và sản phẩm dùng cho gia đình.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ được mô tả sau đây được đưa ra chỉ để minh họa phần mô tả chi tiết giải pháp hữu ích và không dự định giới hạn phạm vi của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1- Phát triển giống sản chứa tinh bột sếp TKWX 1

Hai nhóm giống lai F1 được tạo ra và dùng làm dòng bố-mẹ. Nhóm thứ nhất gồm giống lai F1, được dùng làm giống cái, thu được bằng cách lai dòng vô tính của giống sản chứa tinh bột sếp AM 206-5 với dòng vô tính của giống sản bình thường MTAI 8 (có khả năng chịu đựng cao với các điều kiện môi trường và năng suất củ cao), nhờ sự thụ phấn chéo. Nhóm giống lai F1 còn lại, được dùng làm giống đực, được phát triển bằng cách thụ phấn chéo (nghĩa là bằng nguồn phấn hoa không xác định) của hoa cái của giống AM 206-5. Sau đó, hai giống lai F1 này được lai chéo để tạo ra thể hệ con F2.

Hạt giống của thế hệ con F2 được tạo ra và sau đó được dùng để trồng trên cánh đồng của Viện phát triển tinh bột sắn Thái Lan (Thai Tapioca Development Institute), nằm ở quận Huay Bong, Nakhon Ratchasima, để chọn kiểu gen của giống sắn chứa tinh bột sắn với các đặc tính nông học tốt nhất. Quá trình này tạo ra giống TKWX 1 (HB_{wx}09-989-9), như được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Tính trạng nông học của giống sắn chứa tinh bột sắn TKWX 1 (HB_{wx}09-989-9).

Tính trạng	TKWX 1 (HB _{wx} 09-989-9)
1. Dạng sinh trưởng	Thẳng đứng
2. Số lượng thân/cây	4
3. Độ lồi sọ lá	Trung bình
4. Tập tính sinh trưởng	Thẳng đứng
5. Màu sắc lá non	Xanh lá cây hơi đỏ tím, có lông tơ
6. Hình dạng của lá chét giữa	Dạng mác
7. Màu của gân lá	Xanh lá cây
8. Chiều dài cuống lá	Vừa phải (21,3cm)
9. Hướng của cuống lá	< 60° (41,4°)
10. Màu sắc của cuống lá	Xanh lá cây hơi đỏ
11. Số lượng thùy lá	9
12. Chiều dài thùy lá	16-20cm
13. Chiều rộng thùy lá	3,6-4,5cm
14. Màu sắc của thân	da cam
15. Chiều cao cây	201-250cm
16. Hướng tạo rễ	thẳng đứng
17. Hình dạng củ và trạng thái lớp bề mặt	Hình nón với bề mặt xù xì
18. Màu sắc lớp bề mặt của củ sắn	Nâu sẫm
19. Màu sắc lớp vỏ lụa của củ sắn	Kem
20. Màu sắc lớp thịt của củ sắn	Trắng
21. Tách vỏ bên ngoài	Dễ dàng
22. Dễ tách vỏ ngoài	Dễ dàng
23. Số lượng củ/cây	6-10

Ví dụ 2- Phát triển giống sản sản chứa tinh bột sếp TKWX 2

Hai nhóm giống lai F1 được tạo ra và dùng làm dòng bố-mẹ. Nhóm thứ nhất gồm các giống lai F1, được dùng làm giống cái, thu được bằng cách lai dòng vô tính của giống sản chứa tinh bột sếp AM 206-5 với dòng vô tính của giống sản bình thường SM 1219-9 (có khả năng chịu đựng cao với các điều kiện môi trường, năng suất củ cao và chỉ số thu hoạch cao), nhờ sự thụ phấn chéo. Nhóm giống lai F1 còn lại, được dùng làm giống đực, được phát triển bằng cách thụ phấn chéo dòng vô tính của giống sản chứa tinh bột sếp AM 206-5, với dòng vô tính của giống sản bình thường khác CM 3306-4 (có hàm lượng chất khô trong củ cao và hàm lượng xyanua thấp). Sau đó, hai giống lai F1 này được lai để tạo ra thế hệ con F2.

Hạt giống của thế hệ con F2 được tạo ra và sau đó được dùng để trồng trên cánh đồng của Viện phát triển tinh bột sản Thái Lan, nằm ở quận Huay Bong, Nakhon Ratchasima, để chọn kiểu gen của giống sản chứa tinh bột sếp với các đặc tính nông học tốt nhất, thu được giống TKWX 2 (HB_{wx}09-19-2), như được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3-Tính trạng nông học của giống sản chứa tinh bột sếp TKWX 2 (HB_{wx}09-19-2).

Tính trạng	TKWX 2 (HB _{wx} 09-19-2)
1. Dạng sinh trưởng	Phát tán
2. Số lượng thân/cây	4
3. Độ lồi sẹo lá	Trung bình
4. Tập tính sinh trưởng	Thẳng
5. Màu sắc lá non	Xanh lá cây nhạt có lông tơ
6. Hình dạng của lá chét giữa	Dạng lá bướm
7. Màu của gân lá	Xanh lá cây
8. Chiều dài cuống lá	Vừa phải (22,8cm)
9. Hướng của cuống lá	Hướng lên trên < 60° (45,8°)
10. Màu sắc của cuống lá	Xanh lá cây hơi đỏ
11. Số lượng thùy lá	9
12. Chiều dài thùy lá	20-25cm
13. Chiều rộng thùy lá	2,0-2,4cm
14. Màu sắc của thân	Xanh lá cây hơi nâu

15. Chiều cao cây	201-250cm
16. Hướng tạo rễ	Thẳng đứng
17. Hình dạng củ và trạng thái lớp bề mặt	Hình nón với bề mặt xù xì
18. Màu sắc lớp bề mặt của củ sắn	Nâu sẫm
19. Màu sắc lớp vỏ lụa của củ sắn	Kem
20. Màu sắc lớp thịt của củ sắn	Trắng
21. Tách vỏ bên ngoài	Dễ dàng
22. Dễ tách vỏ ngoài	Dễ dàng
23. Số lượng củ/cây	10-15

Ví dụ 3- Phát triển giống sắn chứa tinh bột sáp TKWX 3

Hai nhóm giống lai F1 được tạo ra và dùng làm dòng giống bố-mẹ. Nhóm thứ nhất cần được dùng làm giống cái, thu được bằng cách lai dòng vô tính của giống sắn chứa tinh bột sáp AM 206-5 với dòng vô tính của giống sắn bình thường MCOL 1505 (có hàm lượng chất khô trong củ cao), nhờ sự thụ phấn chéo. Nhóm còn lại cần được dùng làm giống đực, được phát triển bằng cách thụ phấn chéo giống sắn chứa tinh bột sáp AM 206-5 với giống sắn bình thường khác CM 3306-4 (có hàm lượng chất khô trong củ cao và hàm lượng xyanua thấp). Sau đó, hai giống lai F1 này được lai chéo để tạo ra thế hệ con F2.

Hạt giống của thế hệ con F2 được tạo ra và sau đó được dùng để trồng trên cánh đồng của Viện phát triển tinh bột sắn Thái Lan, nằm ở quận Huay Bong, Nakhon Ratchasima, để chọn kiểu gen của giống sắn chứa tinh bột sáp với các đặc tính nông học tốt nhất, thu được giống TKWX 3 (HB_{wx}09-635-4), như được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4-Tính trạng nông học của giống sắn chứa tinh bột sáp, TKWX 3 (HB_{wx}09-635-4).

Tính trạng	TKWX 3 (HB _{wx} 09-635-4)
1. Dạng sinh trưởng	Thẳng đứng
2. Số lượng thân/cây	3
3. Độ lồi sẹo lá	Trung bình
4. Tập tính sinh trưởng	Thẳng đứng
5. Màu sắc lá non	Xanh lá cây tía, có lông tơ

6. Hình dạng của lá chét giữa	Dạng mác
7. Màu của gân lá	Xanh lá cây
8. Chiều dài cuống lá	Vừa phải (23.1 cm)
9. Hướng của cuống lá	Hướng lên trên $< 60^\circ$ (27,7°)
10. Màu sắc của cuống lá	Xanh lá cây hơi đỏ
11. Số lượng thùy lá	9
12. Chiều dài thùy lá	15-20cm
13. Chiều rộng thùy lá	4,5-5,0cm
14. Màu sắc của thân	Da cam-xanh lá cây
15. Chiều cao cây	201-250cm
16. Hướng tạo rễ	Thẳng đứng
17. Hình dạng củ và trạng thái lớp bề mặt	Hình nón với lớp vỏ nhẵn
18. Màu sắc lớp bề mặt của củ sắn	Nâu sẫm
19. Màu sắc lớp vỏ lụa của củ sắn	Kem
20. Màu sắc lớp thịt của củ sắn	Trắng
21. Tách vỏ bên ngoài	Dễ dàng
22. Dễ tách vỏ ngoài	Dễ dàng
23. Số lượng củ/cây	6-10

Phân tích

Ví dụ 1- So sánh tính trạng nông học của các giống sắn khác nhau

Các giống sắn khác nhau bao gồm các giống chứa tinh bột sắn, TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3 và AM 206-5 và giống sắn bình thường, cụ thể là Huay Bong 80 (có năng suất củ cao), được trồng trên cùng một cánh đồng. Ở thời điểm 9 tháng sau khi trồng, chiều cao cây, chỉ số thu hoạch, chiều dài và đường kính củ sắn và số lượng củ/5kg được khi lại như được thể hiện trong Bảng 5. Dữ liệu này gợi ý rằng tất cả các giống sắn chứa tinh bột sắn được phát triển theo giải pháp hữu ích, nghĩa là TKWX 1, TKWX 2 và TKWX 3, có các đặc tính nông học được cải thiện so với giống cái, nghĩa là AM 206-5, và tương đương với giống Huay Bong 80, một trong số các giống sắn được trồng rộng rãi ở Thái Lan.

Bảng 5- một số tính trạng nông học của các giống sắn chứa tinh bột sắn khác nhau (TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3 và AM 206-5) và giống sắn bình thường Huay

Bong 80

Giống	TKWX 1	TKWX 2	TKWX 3	AM-206-5	Huay Bong 80
Chiều cao cây (cm)	219	205	210	80	220
Chỉ số thu hoạch	0,45	0,49	0,52	0,21	0,60
Chiều dài củ (cm)	24	20	22	18	25
Đường kính củ (cm)	13	12	13	10	14
Số lượng củ/5kg	18	14	14	24	17

Ví dụ 2- Hàm lượng tinh bột, protein và chất xơ trong củ sắn tươi và tinh bột chiết được

Xác định hàm lượng tinh bột trong củ sắn tươi

Các củ sắn tươi của các giống khác nhau được bóc vỏ, cắt và nghiền thành các miếng nhỏ. Mỗi mẫu nghiền có trọng lượng khoảng 5g được thủy phân bằng 20ml dung dịch axit clohydric 25%, và sau đó hỗn hợp này được lọc qua giấy lọc. Sau đó, phần nước lọc được pha với nước cất thành 500ml. Khoảng 150ml mẫu này được điều chỉnh đến độ pH = 7,0 và tạo thành 250ml. Tiếp đó, dung dịch này được chuẩn độ bằng chất phản ứng Fehling bằng cách sử dụng phẩm xanh metylen làm chất chỉ thị. Hàm lượng tinh bột trong củ sắn được tính như thể hiện dưới đây:

$$\text{Hàm lượng tinh bột (\%)} = \frac{0,2 \times 0,9 \times \text{thể tích dung dịch glucoza chuẩn (ml)} \times 250 \times 500 \times 100}{\text{Trọng lượng mẫu (g)} \times 150 \times \text{thể tích dung dịch (ml)}}$$

Xác định hàm lượng protein trong tinh bột chiết được

Hàm lượng protein trong tinh bột được chiết từ các giống sắn khác nhau, cụ thể là TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3, AM 206-5 và Huay Bong 80 được xác định bằng phương pháp Kjeldahl. Các mẫu đã nghiền được nấu với axit sulfuric đậm đặc và đun nóng với sự có mặt của chất xúc tác (CuSO_4 và K_2SO_4 với tỷ lệ 3:97). Sau khi nấu xong, các mẫu được chưng cất bằng thiết bị chưng cất nitơ, và sau đó được chuẩn độ bằng dung dịch axit clohydric. Lượng protein được tính bằng công thức sau:

$$\text{Hàm lượng protein (\%)} = \left[\frac{\text{Nồng độ HCl (N)} \times \text{thể tích HCl (ml)} \times 1,401}{\text{Trọng lượng mẫu (g)}} \right] \times 6,25 \times 100$$

Xác định hàm lượng chất xơ trong tinh bột chiết

Hàm lượng chất xơ trong tinh bột chiết được từ các giống sắn khác nhau (TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3, AM 206-5 và Huay Bong 80) được xác định bằng cách thủy phân 100g mẫu đã nghiền bằng enzym α -amylaza và đun nóng. Các mẫu đã thủy phân được lọc qua vải lọc, rửa bằng nước nóng và làm khô. Lượng chất xơ được tính như sau:

$$\text{Hàm lượng chất xơ (\%)} = \left(\frac{\text{Trong lượng mẫu sau khi khô (g)} - \text{Trong lượng giấy lọc (g)}}{\text{Trọng lượng mẫu ban đầu (g)}} \right) \times 100$$

Bảng 6- Hàm lượng tinh bột trong củ và hàm lượng protein và chất xơ trong tinh bột chiết được từ các giống sắn chứa tinh bột sắn khác nhau (TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3 và AM 206-5) và giống sắn bình thường Huay Bong 80

Giống	TKWX 1	TKWX 2	TKWX 3	AM-206-5	Huay Bong 80
Hàm lượng tinh bột trong củ sắn (% ww) [*]	23	25	24	13	27
Hàm lượng chất xơ trong tinh bột (% dw) ^{**}	2,9	2,8	3,0	3,5	2,7
Hàm lượng protein trong tinh bột (% dw)	0,84	0,91	1,01	0,93	0,95

*% ww (wet weight basis) = tỷ lệ % tính theo trọng lượng ướt; **% dw (dry weight basis) = tỷ lệ % tính theo trọng lượng khô.

Ví dụ 3. Thử nghiệm iot và xác định hàm lượng amyloza trong tinh bột chiết được

Các tinh bột được chiết từ các giống sắn khác nhau, TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3, AM 206-5 và Huay Bong 80, được thử nghiệm bằng cách nhuộm bằng dung dịch iot 1%, và màu sắc của mẫu được ghi lại. Ngoài ra, hàm lượng amyloza của tinh bột chiết được ước tính bằng phương pháp phổ quang kế, theo McGrance và các đồng tác giả (A Simple and Rapid Colorimetric Method for the Determination of Amylose in Starch Products, McGrance, et al., *Starch*, 1998, 50, 158-163).

Kết quả của thử nghiệm iot và xác định hàm lượng amyloza chứng minh rõ ràng là tất cả các giống sắn chứa tinh bột sắn TKWX 1, TKWX 2 và TKWX 3 là giống như

các giống cái AM 206-5 của chúng.

Bảng 7- thử nghiệm iot và hàm lượng amyloza của tinh bột chiết được từ các giống sắn chứa tinh bột sắn khác nhau (TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3 và AM 206-5) và giống sắn bình thường Huay Bong 80

Giống	Màu sắc khi được thử nghiệm với dung dịch iot 1%	Hàm lượng amyloza (%)
TKWX 1	Màu nâu hơi đỏ	0
TKWX 2	Màu nâu hơi đỏ	0
TKWX 3	Màu nâu hơi đỏ	0
AM-206-5	Màu nâu hơi đỏ	0
Huay Bong 80	Màu xanh sẫm	25

Ví dụ 4. Xác định độ nhớt của hồ tinh bột

Độ nhớt của hồ tinh bột của tinh bột chiết được từ các giống sắn khác nhau, TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3, AM 206-5 và Huay Bong 80, được xác định theo phương pháp được mô tả trong tài liệu Newport Scientific (1995). Huyền phù đặc tinh bột (6% tính theo trọng lượng khô) được phân tích trong các điều kiện sau:

- Tốc độ khuấy 960 vòng/phút trong 10 giây đầu tiên, và sau đó khuấy ở tốc độ 160 vòng/phút trong suốt quá trình thử nghiệm.

- Nhiệt độ ban đầu ở 50°C trong 2 phút; đun nóng ở nhiệt độ 95°C với tốc độ gia nhiệt 4,62°C/phút và duy trì trong 15 phút; làm nguội đến nhiệt độ 50°C với tốc độ làm nguội 4,62°C/phút và duy trì trong 10 phút.

Các thông số độ nhớt của hồ tinh bột đã nêu được ghi lại, và các thông số này bao gồm nhiệt độ hồ hóa (°C), độ nhớt đỉnh (BU), độ nhớt đáy (BU) và độ nhớt cuối (BU). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 8 và trên Fig.1. Tất cả các tinh bột sắn đều có độ nhớt đỉnh và độ nhớt đáy cao hơn tinh bột sắn bình thường.

Bảng 8- Độ nhớt của hồ tinh bột của các tinh bột khác nhau được chiết từ các giống sắn chứa tinh bột sắn khác nhau (TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3 và AM 206-5) và giống sắn bình thường Huay Bong 80

Thông số	Giống
----------	-------

	AM206-5	TKWX1	TKWX2	TKWX3	Huay Bong 80
Nhiệt độ hồ hóa (°C)	66,4	66,1	65,7	64,8	66,1
Độ nhớt đỉnh (BU)	1328	1401	1330	1325	880
Độ nhớt đáy (BU)	480	501	480	375	329
Độ nhớt cuối (BU)	520	518	515	435	580

Ví dụ 5- xác định mức độ thoái hóa của tinh bột

Sự thoái hóa của các loại tinh bột khác nhau, bao gồm các tinh bột sản dạng sấp được chiết từ giống TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3 và AM 206-5, tinh bột ngô dạng sấp, tinh bột lúa gạo dạng sấp, tinh bột khoai tây dạng sấp và tinh bột sản bình thường từ giống Huay Bong 80, được đánh giá bằng cách xác định độ trong của các mẫu hồ tinh bột đã nấu được duy trì trong các khoảng thời gian khác nhau. Trước tiên, huyền phù đặc tinh bột (2% theo trọng lượng, chứa natri nitrua 0,02%) được gelatin hóa trong bể nước sôi ở nhiệt độ 100°C, kèm theo khuấy không liên tục ở tốc độ 300 vòng/phút trong 5 phút đầu tiên và sau đó khuấy trong 1 phút mỗi 10 phút, cho đến 30 phút. Sau đó, hồ tinh bột đã nấu được chuyển vào ống cuvet và được đậy bằng màng parafin. Độ trong của hồ tinh bột mới nấu được xác định theo tỷ lệ % ánh sáng truyền qua (% T) ở bước sóng 650nm, bằng cách sử dụng natri nitrua 0,02% làm mẫu tham chiếu. Tiếp đó, mẫu được duy trì ở nhiệt độ 4°C trong 7 ngày và tỷ lệ % ánh sáng truyền qua được ghi lại sau thời gian đó. Sự khác biệt về tỷ lệ %T của các mẫu mới nấu và mẫu đông lạnh được tính toán và tóm tắt trong Bảng 9. Hồ tinh bột của tinh bột sản dạng sấp mới nấu thu được theo giải pháp hữu ích có độ trong tương đương với tinh bột khoai tây dạng sấp, nhưng có độ trong cao hơn tinh bột ngô dạng sấp, tinh bột lúa gạo dạng sấp và tinh bột sản bình thường. Khi được duy trì trong tủ lạnh, độ trong của hồ tinh bột dạng sấp thu được theo giải pháp hữu ích (từ các giống TKWX 1, TKWX 2 và TKWX 3) vẫn tương đương với độ trong của các mẫu mới nấu, trong khi độ trong của hồ tinh bột của các tinh bột khác bị giảm đáng kể. Các kết quả này gợi ý rằng hồ tinh bột đã nấu của các tinh bột được chiết từ giống sản chứa tinh bột sấp có độ ổn định tốt hơn so với các tinh bột khác, và độ ổn định của chúng là tương đương với độ ổn định của các giống cái của chúng, nghĩa là AM 206-5.

Bảng 9- mức độ thoái hóa của tinh bột, được xác định theo sự thay đổi về tỷ lệ % ánh sáng truyền qua (% T) của mẫu tinh bột mới (vào ngày 0, T1) và mẫu hồ tinh bột đã nấu được đông lạnh (vào ngày 7, T2), thu được từ các giống chứa tinh bột khác nhau, bao gồm giống sắn chứa tinh bột sáp (TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3 và AM 206-5), ngô chứa tinh bột sáp, lúa gạo chứa tinh bột sáp, khoai tây chứa tinh bột sáp và giống sắn bình thường (Huay Bong 80)

Giống	Mức độ ánh sáng truyền qua (% T)		Mức độ thoái hóa của tinh bột
	Vào ngày 0 (%T1)	Vào ngày 7 (%T2)	
Ngô chứa tinh bột sáp	82,7	65,6	Vừa phải
Khoai tây chứa tinh bột sáp	86,5	77,4	Thấp
Lúa gạo chứa tinh bột sáp	66,4	43,5	Vừa phải
TKWX1	84,9	84,9	Thấp
TKWX2	85,7	84,5	Thấp
TKWX3	83,2	82,6	Thấp
AM-206-5	85,7	85,3	Thấp
Huay Bong 80	35,4	0	Cao

Ví dụ 6. Xác định chu trình đông lạnh-rã đông

Huyền phù đặc tinh bột (5% theo trọng lượng, chứa natri nitrua 0,1%) của các giống chứa tinh bột khác nhau, bao gồm giống sắn chứa tinh bột sáp (TKWX 1, TKWX 2, TKWX 3 và AM 206-5), ngô chứa tinh bột sáp, lúa gạo chứa tinh bột, khoai tây chứa tinh bột sáp và giống sắn bình thường (Huay Bong 80), được nấu trong bể nước sôi trong 10 phút kèm theo khuấy liên tục. 1,5ml mẫu hồ tinh bột đã nấu được chuyển vào ống ly tâm có trọng lượng đã biết (A), được làm lạnh và trọng lượng ban đầu (B) được ghi lại. Ống này được duy trì ở nhiệt độ -18°C trong 7 ngày, và sau đó được rã đông ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 30°C trong 4 ngày đối với một chu trình đông lạnh-rã đông. Ống dùng cho chu trình số 1 được ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút, và nước thoát ra được loại bỏ. Sau đó, trọng lượng của mẫu (C) được ghi lại, và tỷ lệ % tách nước của gel tinh bột được tính như dưới

đây. Các mẫu khác được làm đông lạnh-rã đông cho đến khi số chu trình xác định kết thúc, trước khi chúng được ly tâm.

$$\text{Tỷ lệ \% tách nước} = \frac{\text{trọng lượng mẫu ban đầu (B-A)} - \text{trọng lượng mẫu cuối (C-A)}}{\text{trọng lượng mẫu ban đầu (B-A)}} \times 100$$

Fig.2 thể hiện tỷ lệ % tách nước ở mỗi chu trình đông lạnh-rã đông của các tinh bột khác nhau. Kết quả này gợi ý rằng giống như giống cái của chúng là AM 206-5, tinh bột sản dạng sấp thu được theo giải pháp hữu ích có tỷ lệ % tách nước là thấp nhất, cho thấy rằng lượng nước bị tách ra khỏi hồ tinh bột đã nấu là nhỏ nhất. Điều này khẳng định rằng tinh bột sản dạng sấp thu được theo giải pháp hữu ích có độ ổn định với việc đông lạnh-rã đông tốt hơn các tinh bột dạng sấp có bán trên thị trường và tinh bột sản bình thường.

Ví dụ 7- Xác định hàm lượng xyanua trong tinh bột sản

Hàm lượng xyanua trong các tinh bột sản được xác định theo phương pháp OR-082-TMn, đã được Bộ y tế, lao động và phúc lợi Nhật Bản khuyến cáo, Shoku-Ki-Hattsu/Shoku-Kan-Hatsu số. 1121002; ngày 21 tháng 11 năm 2002. Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 10- hàm lượng xyanua trong tinh bột chiết được từ các giống sản khác nhau

Giống	Hàm lượng xyanua
TKWX 1	Thấp
TKWX 2	Vừa phải
TKWX 3	Thấp
AM-206-5	Vừa phải
Huay Bong 80	Cao

Ghi chú: Hàm lượng xyanua thấp, vừa phải và cao tương ứng với hàm lượng < 50 phần triệu (ppm), nằm trong khoảng từ 50 đến 100 ppm và > 100 ppm.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp phát triển giống sản chứa tinh bột sấp với tính năng sinh trưởng tốt hơn trong điều kiện môi trường ở Thái Lan. Các giống này có thể tạo ra củ chứa tinh bột sản dạng sấp có các đặc tính được cải thiện,

tinh bột này có thể được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như thực phẩm và đồ uống, thức ăn chăn nuôi, giấy và vật liệu bao gói, keo dính và chất kết dính, chất bao, sản phẩm dệt và quần áo, dược phẩm, mỹ phẩm, sản phẩm chăm sóc cơ thể, sản phẩm chăm sóc tóc, sản phẩm chăm sóc thú cưng và sản phẩm dùng cho gia đình.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phát triển giống sản chứa tinh bột sáp để tạo ra tinh bột có đặc tính được cải thiện và hàm lượng xyanua thấp bao gồm các bước:
 - (a) lai giống sản chứa tinh bột sáp sản lượng thấp với giống sản bình thường ($WXWX$) có kiểu gen đồng hợp tử trội, có các tính trạng nông học tốt, dạng sinh trưởng tốt, tạo ra củ hình dạng đều, khả năng thích nghi tốt với môi trường tương tự môi trường của Thái Lan, với một hoặc nhiều tính trạng bổ sung của giống sản bình thường được chọn từ nhóm bao gồm khả năng chịu đựng cao với stress do môi trường, năng suất củ cao, chỉ số thu hoạch cao và hàm lượng chất khô trong củ sản tươi cao, để tạo ra giống lai F1; và
 - (b) lai hai giống lai F1 này để tạo ra thế hệ con F2 có gen lặn đồng hợp tử ($wxwx$), để tạo ra tinh bột với năng suất cao và hàm lượng xyanua thấp.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hai giống lai F1 cần được lai trong bước (b) nêu trên là các giống lai được tạo ra từ giống sản chứa tinh bột sáp và giống sản bình thường có các tính trạng giống nhau.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hai giống lai F1 cần được lai trong bước (b) nêu trên là các giống lai được tạo ra từ giống sản chứa tinh bột sáp và giống sản bình thường có các tính trạng khác nhau.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quá trình lai trong bước (b) là lai giữa giống lai F1 và giống lai tạo thành từ sự thụ phấn chéo của giống sản chứa tinh bột sáp.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các tính trạng của giống sản bình thường nêu trên bao gồm khả năng chịu đựng cao với stress do môi trường.
6. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó các tính trạng của giống sản bình thường nêu trên bao gồm năng suất củ cao.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó các tính trạng

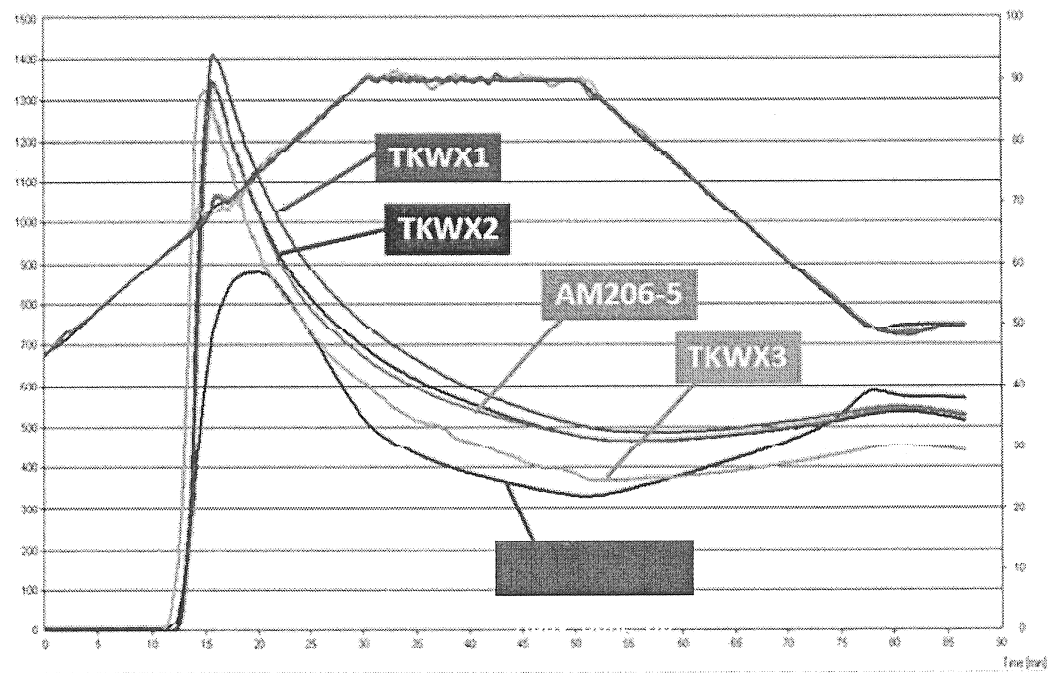
của giống sắn bình thường nêu trên bao gồm chỉ số thu hoạch cao.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó các tính trạng của giống sắn bình thường nêu trên bao gồm hàm lượng chất khô trong củ cao.
9. Tinh bột có các đặc tính được cải thiện và hàm lượng xyanua thấp, thu được từ giống sắn chứa tinh bột sếp được phát triển bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.
10. Thực phẩm có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
11. Đồ uống có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
12. Thức ăn chăn nuôi có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
13. Giấy có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
14. Vật liệu bao gói có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
15. Keo dính có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
16. Chất kết dính có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
17. Chất bao có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
18. Sản phẩm dệt có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
19. Quần áo có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
20. Dược phẩm có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
21. Mỹ phẩm có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.

- 22. Sản phẩm chăm sóc cơ thể có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
- 23. Sản phẩm chăm sóc tóc có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
- 24. Sản phẩm chăm sóc thú cưng có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
- 25. Sản phẩm dùng cho gia đình có tinh bột theo điểm 9 làm thành phần.
- 26. Tinh bột sắn có các đặc tính được cải thiện, trong đó các đặc tính được cải thiện này được chọn từ nhóm bao gồm độ nhớt, độ trong và hoặc độ ổn định khi đông lạnh-rã đông.

Độ nhớt (BU)

Nhiệt độ (°C)



Thời gian (phút)

Fig.1

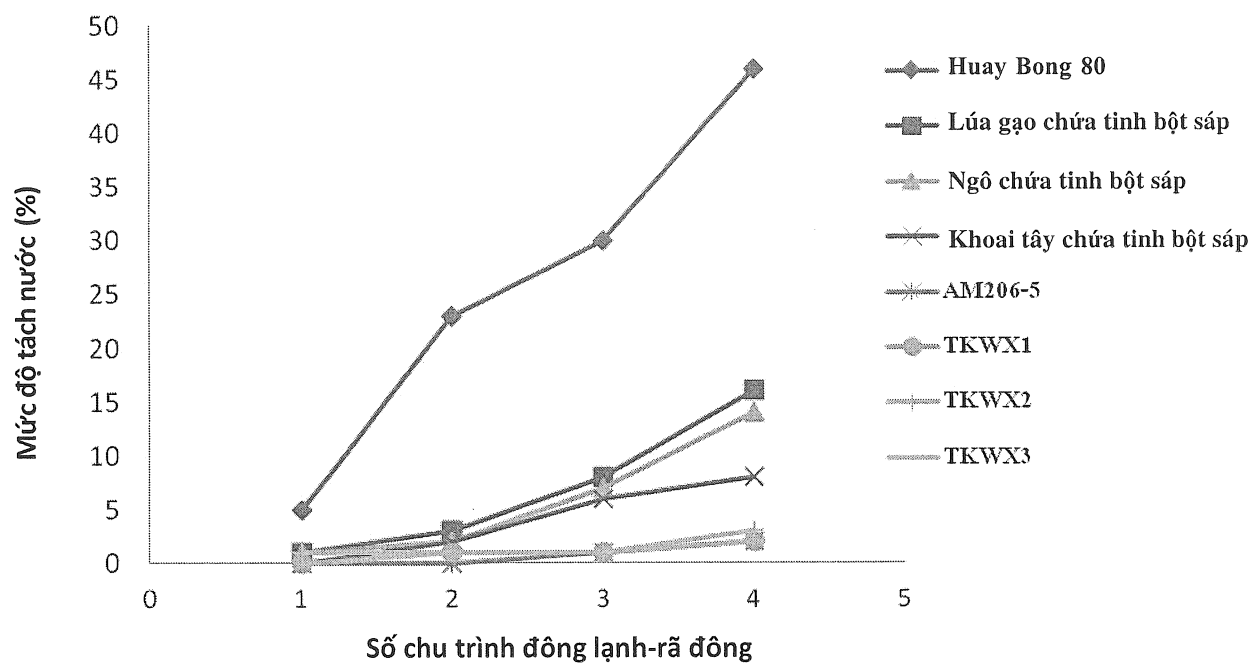


Fig.2