



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

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

(11)



1-0035251

(51)<sup>7</sup> C12P 19/04; C08B 37/00; C08L 5/06

(13) B

(21) 1-2015-01761

(22) 27/11/2013

(86) PCT/EP2013/074811 27/11/2013

(87) WO 2014/083032 05/06/2014

(30) 12194550.5 28/11/2012 EP

(45) 25/04/2023 421

(43) 26/10/2015 331A

(73) PECTCOF B.V. (NL)

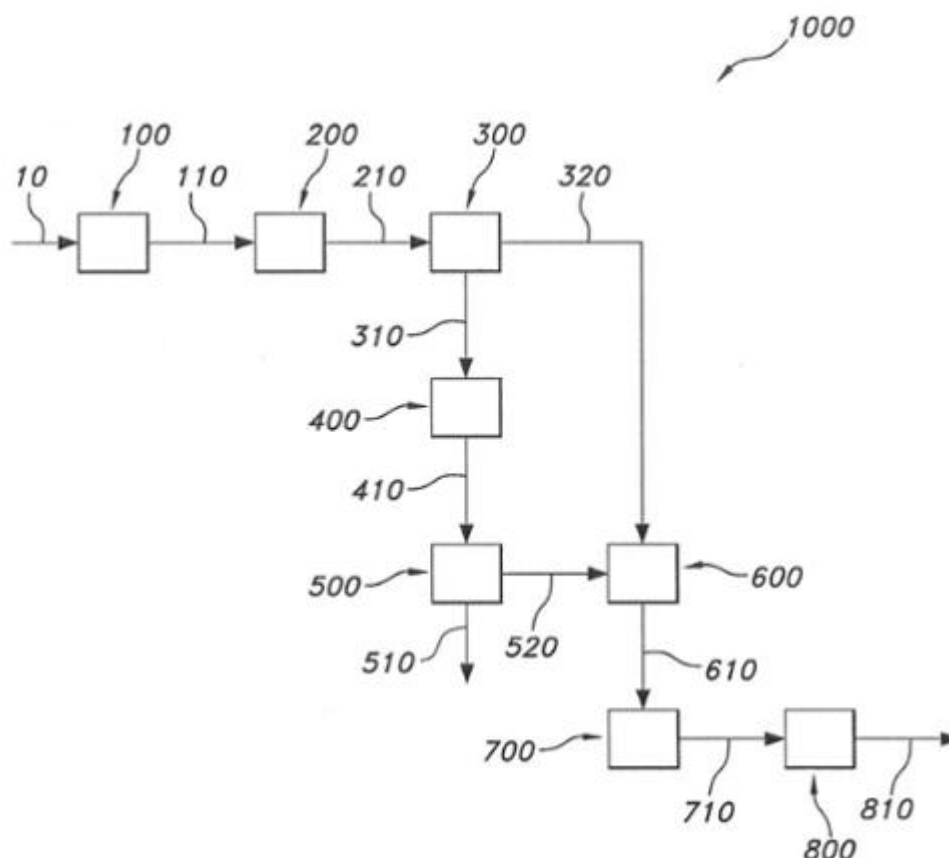
Bevrijdingsstraat 23, NL-6701 AA Wageningen, Netherlands

(72) BELALCAZAR OTALORA, Andres Felipe (CO).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

#### (54) QUY TRÌNH XỬ LÝ PHẦN THỊT QUẢ CÀ PHÊ VÀ PECTIN TỪ CÀ PHÊ

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình xử lý phần thịt quả cà phê bao gồm (a) cung cấp phần thịt quả cà phê, có thể thu được từ quy trình sản xuất để tạo ra hạt cà phê thô từ quả cà phê tươi; (b) chiết từ phần thịt quả cà phê phần chiết chứa pectin, trong đó việc chiết được tiến hành ở điều kiện axit hoặc điều kiện kiềm, để cung cấp phần chiết chứa pectin; (c) xử lý bằng enzym phần chiết chứa pectin, trong đó xử lý bằng enzym bao gồm xử lý với một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm gồm esterase và reductaza, để cung cấp vật liệu pectin được xử lý bằng enzym; và (d) chiết phần chiết chứa pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol từ vật liệu pectin được xử lý bằng enzym.



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến quy trình xử lý phần thịt quả cà phê cũng như (các) sản phẩm thu được từ quy trình này.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Phần thịt quả cà phê được tạo ra từ quá trình sản xuất cà phê. Với bất kỳ nguồn nào (xử lý ướt hay khô), sản phẩm phụ và chất thải thường là vấn đề. Ví dụ, phần thịt quả và dịch nhầy có tính axit tương đối, ăn mòn thiết bị, và khó khăn cho việc xử lý an toàn. Ngoài ra, ở nơi mà phần thịt quả bị vứt bỏ trong bãi rác hoặc bãi phế liệu khác, phần thịt quả thối rữa có thể dẫn tới mùi khó chịu. Do đó, sản phẩm phụ và chất thải thường được xem là vật liệu mà hoặc không dùng được, độc hại, hoặc có giá trị không đáng kể.

WO2004098320 mô tả phương pháp phân lập chất dinh dưỡng từ quả cà phê tươi hoặc sản xuất thực phẩm mà chứa quả cà phê tươi hoặc một phần của nó. Theo WO2004098320, được ưu tiên đặc biệt là, quả cà phê tươi sẽ có hàm lượng vô cùng thấp độc tố của nấm (mycotoxin), bao gồm các aflatoxin, fumonisin, ocratoxin, và/hoặc vomitoxin (DON, deoxynivalenol) khác nhau.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Như được làm rõ ở trên đây, và cũng sẽ được thể hiện rõ hơn ở dưới đây, có mong muốn tạo ra quy trình sản xuất cà phê cải tiến hơn, đặc biệt là sử dụng lại sinh lợi các phần sản phẩm phụ của quy trình, như phần thịt quả cà phê. Trong quy trình thu hạt cà phê xanh, dòng sinh khối chính được tạo ra. Sinh khối này có nhiều trong các hợp chất sinh học hữu ích; tuy nhiên, kỹ thuật thực tế đã biết cho việc thu hồi và sử dụng của các hợp chất này là không có. Ngoài ra, hàm lượng cao của các hợp chất gây độc (chủ yếu là polyphenol và cafein) trong các dòng làm cho sinh khối gây ra vấn đề về môi trường trong vùng sản xuất cà phê. Một số chú thích chung đầu tiên được đưa ra bên dưới.

Sau khi thu hoạch quả cà phê tươi, quả cà phê tươi được đưa vào các quá trình chế biến khác nhau để thu được hạt cà phê tươi (nghĩa là, hạt cà phê không rang). Việc sản xuất cà phê trên thế giới hầu hết được xử lý bằng 2 phương pháp; phương pháp khô và phương pháp ướt.

Trong phương pháp ướt, quả được thu hoạch và được nghiền tươi, loại bỏ chất nhầy (vỏ quả trong) và vỏ lụa dính với phần hạt; sau khi nghiền, hạt thường được di chuyển tới bể lên men cho giai đoạn nằm trong khoảng 12-24 giờ trong đó chất nhầy được loại bỏ khỏi hạt và vỏ lụa. Hạt sau đó được làm khô (làm khô bởi mặt trời hoặc khí nóng), vỏ lụa được loại bỏ và hạt xanh được đóng gói và lưu trữ để kinh doanh sau này. Trong suốt các quy trình này, khoảng 45% sinh khối của quả cà phê tươi bị vứt bỏ như là phần nguyên liệu phế thải. Phần sinh khối này có lượng polyphenol và cafein cao, và do đó trở thành độc hại với hàm lượng cao. Mặc dù ủ phân là một giải pháp thay thế, nhưng vẫn cần thiết phải mở rộng diện tích đất đai và lao động nặng nhọc. Trên tất cả các yêu cầu này, nồng độ polyphenol cao làm cho loại phân trộn này trở thành phân bón kém chất lượng với nguy cơ gây nhiễm độc đất và làm đất chua (có tính axit).

Do đó, thuật ngữ “phần thịt quả cà phê” trong bản mô tả này cụ thể chỉ phần thịt quả thu được sau quá trình xử lý quả. Do đó, thuật ngữ “phần thịt quả cà phê” có thể còn chỉ “phần thịt quả cà phê tươi”. Ngoài ra, thuật ngữ “phần thịt quả cà phê” có thể còn bao gồm quả chín quá mức và chưa chín được loại bỏ, không sử dụng được trong sản xuất hạt tươi chất lượng (cao). Do đó, thuật ngữ phần thịt quả cà phê có thể cụ thể chỉ một hoặc nhiều phần thịt quả thu được sau quá trình xử lý quả, quả chưa chín được loại bỏ không sử dụng được trong sản xuất hạt tươi chất lượng (cao) và quả chín quá mức được loại bỏ không sử dụng được trong sản xuất hạt tươi chất lượng (cao). Phần thịt quả cà phê có thể liên quan tới một hoặc nhiều vỏ quả ngoài, phần ngoài vỏ giữa quả (bản thân phần thịt quả), và vỏ giữa quả (dịch nhầy hoặc vỏ trấu). Trấu (cũng được biết đến là vỏ lụa hoặc vỏ trấu) không được xem xét. Chú ý rằng, vỏ lụa là một phần của hạt, không phải một phần của vỏ quả. Vỏ quả cụ thể gồm màng (vỏ quả ngoài), phần thịt quả (phần ngoài vỏ giữa quả), dịch nhầy (vỏ quả trong). Vỏ lụa là một phần của nội nhũ. Ngoài ra, trong số các tài liệu khác, có thể tham khảo Esquivel et al, “Functional properties of coffee and coffee by-products”, Food Research International

46 (2012) 488-495, mà được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Cụ thể là, phần thịt quả cà phê là sản phẩm phụ từ phương pháp chế biến ướt, hoặc chế biến khô chưa hoàn toàn, của hạt cà phê.

Trong phương pháp khô, quả cà phê tươi được làm khô, cụ thể dưới ánh nắng mặt trời, thông thường trong vài ngày. Sau đó, phần thịt quả khô được tách ra từ hạt tươi bằng cách xát vỏ. Phương pháp này không dễ dàng cho phép điều khiển quy trình chế biến khô và có thể do đó tạo ra chất lượng cà phê thấp (hơn).

Hiện tại, hầu hết các loại cà phê được chế biến sử dụng phương pháp ướt (xem phần trên) với các thay đổi để làm giảm sự tiêu thụ nước và điều khiển quy trình chế biến khô (khô chưa hoàn toàn, xay tự nhiên v.v.). Tuy nhiên, lượng sinh khối tương đối lớn vẫn đổ ra sông.

Hiện tại, phần lớn phần thịt quả cà phê không được xử lý chuyển thẳng tới điểm xử lý chất thải lớn không có bất kỳ xử lý nào, cuối cùng hợp chất độc hại từ quả lên men ngấm vào sông, gây ô nhiễm nguồn nước trong vùng sản xuất cà phê. Phần thịt quả cà phê do đó tạo ra vấn đề môi trường nghiêm trọng, và là thách thức cho phát triển bền vững chuỗi cung cấp cà phê. Với việc sản xuất cà phê thực tế đạt 10 triệu tấn mỗi năm, kỹ thuật chiết dòng chất thải này là cần thiết. Hiện nay, phần thịt quả cà phê thường chỉ được sử dụng như phân trộn. Có nghiên cứu về việc sử dụng phần thịt quả cà phê như là thức ăn cho gia súc để lấy sữa ở Trung Mỹ và Nam Mỹ. Tuy nhiên, thực tế chỉ sử dụng tỉ lệ phần trăm rất nhỏ của cả dòng chất thải do có các hợp chất kháng dinh dưỡng và độc hại trong sinh khối. Ngoài ra, trong lĩnh vực kỹ thuật này, người ta đề xuất sử dụng xơ thô từ phần thịt quả cà phê cũng như các sản phẩm phụ khác từ sinh khối này. Tuy nhiên, không có kỹ thuật đã biết nào cho chiết riêng rẽ và cải biến của pectin từ phần thịt quả cà phê và dịch nhầy.

Phần thịt quả cà phê chiếm 45% khối lượng tổng của quả cà phê tươi. Phần sinh khối thịt quả giàu hydrat cacbon, polyphenol và cafein. Vì hàm lượng cao của axit hữu cơ, catechin, và tanin, phần thịt quả cà phê và nước xử lý đặt ra vấn đề môi trường nghiêm trọng trong vùng sản xuất diễn ra. Các dòng chất thải được loại bỏ cà phê (phần thịt quả và nước xử lý được sử dụng để tách riêng phần dịch nhầy từ hạt trong nhà máy xay xát ướt) có BOD (nhu cầu oxy hóa sinh) cao, đe dọa nguồn nước. Một

trong các thành phần của phần thịt quả cà phê là pectin. Pectin được biết đến giữa các chất khác trong công nghiệp thực phẩm như là chất gel hóa. Tuy nhiên, pectin từ phần thịt quả cà phê đã được báo cáo như chất gel hóa nghèo và do đó không hữu dụng trong các ứng dụng vào được phẩm và thực phẩm. Nó được đưa ra giả thuyết rằng, tính chất tạo gel nghèo là kết quả của phần xương sống có độ dài ngắn của pectin, khối lượng phân tử thấp của pectin và mức độ axetyl hóa cao của pectin tự nhiên trong phần thịt quả và dịch nhầy của quả cà phê tươi.

Do đó, một phương án theo sáng chế đề cập tới quy trình xử lý phần thịt quả cà phê thay thế, mà tốt hơn là ít nhất ngăn ngừa một phần của một hoặc nhiều hạn chế được mô tả phía trên. Một phương án nữa theo sáng chế cung cấp pectin thay thế, có nguồn gốc từ phần thịt quả cà phê, mà có thể được sử dụng trong các ứng dụng thực phẩm như chất gel hóa và/hoặc có thể có các ứng dụng hữu dụng khác. Một phương án nữa theo sáng chế cung cấp dung dịch cho phần thịt quả cà phê, theo đó quy trình sản xuất cà phê có thể trở nên bền vững hơn về mặt môi trường.

Sáng chế bao gồm sự chiết và sử dụng của ít nhất một hợp chất được chiết từ phần thịt quả và dịch nhầy sau khi loại bỏ phần thịt quả và rửa hạt, trong chế biến ướt hoặc bán khô của sản xuất cà phê thô. Thuận lợi là, sự chiết hợp chất sinh học này sẽ làm giảm hàm lượng của các hợp chất độc hại khác trong nước xử lý của các thiết bị loại bỏ phần thịt quả cà phê. Ngoài ra, hợp chất được chiết trong đó pectin là thành phần chính, là hợp phần giá trị cao cho công nghiệp dược phẩm và/hoặc thực phẩm. Ngoài ra, nó thể hiện một cách ngạc nhiên rằng, các hợp chất sinh học được chiết thể hiện khả năng có thể điều chỉnh được cho các mục đích cụ thể do sự đa dạng của polysacharit được chứa trong phân đoạn pectin được chiết. Pectin thu được với quy trình theo sáng chế có thể cho phép các ứng dụng như prebiotic và chất gel hóa, và còn lưới cho mảnh cây phẫu thuật là các cách dùng có thể của hợp chất được chiết theo sáng chế. Ngoài ra, pectin thu được có thể được dùng như chất gây lắng hoặc chất nhũ tương.

Kỹ thuật được đề xuất ở đây nhằm mục đích chiết pectin từ phần thịt quả cà phê, và cải biến tùy ý (nghĩa là, chức năng hóa) của pectin (được chiết) với enzym. Sự cải biến như vậy có thể bao gồm khử metyl và/hoặc liên kết chéo pectin qua nhóm este hóa. Kỹ thuật được đưa ra ở đây cụ thể nhằm mục đích chiết pectin từ phần thịt quả cà

phê, và sự cải biến của cùng một pectin với enzym, để liên kết chéo pectin qua nhóm este hóa. Các sự cải biến với enzym thể hiện một cách ngạc nhiên sự cải thiện đặc tính thủy keo của pectin được chiết. Các đặc tính của pectin thu được rất thu hút. Trong chế biến, dòng chất thải còn lại có thể được loại bỏ độc tố qua sự thủy phân tanin, polyme hóa phenol và loại bỏ cafein trong chế biến; điều này sẽ giúp dòng chất thải giảm đáng kể BOD (nhu cầu oxy sinh học) và COD (nhu cầu oxy hóa học). Do đó, hậu quả về môi trường của sản xuất cà phê sẽ giảm bớt. Phương pháp có thể còn tạo ra thu nhập từ chiết chất thải sinh khối như là sản phẩm phụ của chuỗi cà phê. Sáng chế hiện tại có thể đóng góp đáng kể vào cải thiện sự phát triển bền vững của phần lớn hàng hóa toàn cầu. Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp kỹ thuật sản xuất nhiên liệu sinh học trong đó hóa học và công nghệ sinh học xanh được áp dụng. Các bước chế biến có thể bao gồm bảo quản phần thịt quả cà phê ở nước sản xuất, vận chuyển tới điểm chế biến, tách riêng và tinh chế sản phẩm, và thương mại hóa các sản phẩm này ở thị trường có triển vọng của chúng. Thị trường có thể là thị trường của các hợp phần thực phẩm, trong đó pectin chất lượng cao là sự thay thế tiềm năng cho nhựa cây keo (Arabic Gum) được đề xuất. Với kỹ thuật sáng tạo hiện tại, pectin từ cà phê có thể được điều chỉnh để đạt tiêu chuẩn của các loại ứng dụng khác nhau trong công nghiệp dược phẩm và thực phẩm. Thành phần cafein trong phần chất thải còn lại có thể dưới mức 10 ppm một cách thuận lợi, thậm chí ví dụ dưới 1 ppm. Do đó, sự loại bỏ của cafein có thể là rất hiệu quả trong khi mặt khác sản phẩm pectin hữu dụng cũng được đề cập.

Được biết đến rằng, polyphenol với nồng độ cao có thể là độc hại với gia súc, ức chế lên men và sinh trưởng của vi sinh vật. Thuận lợi là, theo sáng chế sự có mặt của polyphenol là mong muốn thực tế nhằm cho phép cải biến của pectin mà không phá hủy polyme sinh học. Kỹ thuật này là phương pháp thay thế tốt nhất tại thời điểm này, để quản lý và chiết chất thải từ cà phê. Do đó, kỹ thuật được bộc lộ này có thể được điều chỉnh để sử dụng ở quy mô lớn. Do đó, theo khía cạnh đầu tiên, sáng chế đề xuất quy trình xử lý phần thịt quả cà phê bao gồm:

- a. Cung cấp phần thịt quả cà phê, có khả năng thu được từ quy trình sản xuất để sản xuất hạt cà phê thô (nghĩa là, không rang) từ quả cà phê tươi;
- b. Chiết phần chiết chứa pectin từ phần thịt quả cà phê, trong đó sự chiết được tiến hành ở điều kiện axit hoặc điều kiện kiềm (hoặc điều kiện này sau điều kiện

kia), để cung cấp (hoặc tạo ra) phần chiết chứa pectin, trong đó cụ thể sự chiết bao gồm việc chiết phần chiết chứa pectin từ phần thịt quả cà phê, trong đó sự chiết được tiến hành ở điều kiện (ít nhất là) axit;

c. (tùy ý) phần chiết chứa pectin được xử lý bằng enzym, trong đó (tùy ý) xử lý bằng enzym bao gồm xử lý với một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm esteraza và/hoặc reductaza, để cung cấp vật liệu pectin (hoặc được cải biến) được xử lý bằng enzym, cụ thể phần chiết chứa pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol, cụ thể trong đó xử lý bằng enzym bao gồm ít nhất là xử lý bằng oxidoreductaza; và

d. (tùy ý) chiết phần chiết chứa pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol từ sản phẩm của (tùy ý) phần chiết chứa pectin được xử lý bằng enzym (nghĩa là, sản phẩm thu được ở c).

Với quy trình này, thuận lợi là theo một phương án phần chiết chứa pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol được tạo ra, là sản phẩm mà có thể được sử dụng cho một vài ứng dụng, và dẫn đến sản phẩm còn lại mà hàm lượng polyphenol giảm đáng kể, và do đó, có thể được tái sử dụng hoặc loại bỏ như chất thải dễ dàng hơn.

Phần thịt quả cà phê mà được dùng cho chế biến có thể thu được trực tiếp từ cây, nhưng có thể còn được đưa vào quy trình bảo quản. Phần thịt quả cà phê được sử dụng có thể còn thu được từ vùng xa (như > 10 km, hoặc thậm chí >100 km hoặc thậm chí xa hơn), và sau khi vận chuyển, được sử dụng như phần thịt quả cà phê trong chế biến theo sáng chế. Trước khi vận chuyển, phần thịt quả cà phê có thể được xử lý tùy ý cho các mục đích bảo quản.

Bản chất của sự chiết, cụ thể bao gồm quy trình có tính kiềm hay axit, cũng xem phía dưới, cũng là một khía cạnh theo sáng chế. Cụ thể, xử lý bằng enzym được áp dụng, mà có thể được sử dụng để khử metyl và/hoặc liên kết chéo.

Thuật ngữ “hạt cà phê tươi” được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này và cụ thể chỉ hạt cà phê không rang. Quả được dùng để loại bỏ phần thịt quả có thể ở trạng thái chín hoặc chưa chín. Hỗn hợp giữa quả chưa chín và chín cũng có thể được áp dụng.

Đặc tính của phần chiết chứa pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol có thể phụ thuộc vào hạt cà phê hoặc chín và/hoặc chưa chín được áp dụng.

Pectin có thể được chiết từ nhiều nguồn, tuy nhiên pectin chủ yếu được chiết từ vỏ cam quýt và bột táo nghiền. Như được đề cập phía trên, pectin được cải biến bằng hóa học và/hoặc enzym để thu được cấu trúc gel mong muốn. Một nguồn khác của pectin mà được công nhận là pectin được chiết từ dư lượng công nghiệp của đường từ rễ củ cải (SBP). Khác biệt lý hóa giữa SBP và loại khác của pectin truyền thống bao gồm tỉ lệ cao hơn của chuỗi bên của đường trung hòa, hàm lượng cao hơn của nhóm axetyl ở vị trí O2 và O3 trong phần xương sống galacturonic và hàm lượng cao hơn của este phenol trong chuỗi bên cụ thể là trong arabinoza và galactoza, và hàm lượng cao hơn của vật liệu từ protein liên kết với chuỗi bên nhờ liên kết cộng hóa trị. Bất ngờ thay, pectin từ cà phê có chung một vài đặc tính về cơ bản với SBP, khối lượng phân tử thấp của phân tử pectin, sự có mặt với lượng quan trọng của galactoza và arabinoza trong chuỗi bên trung hòa, và sự có mặt của polyphenol giữa các chất khác. Do đó được giả thuyết rằng pectin từ cà phê có thể được cải biến dưới dạng SBP và tạo ra pectin giá trị cao với đặc tính tạo nhũ tương. Pectin từ cà phê còn có thể được cải biến về mặt hóa học như pectin từ vỏ cam quýt để sản xuất gel mong muốn, theo khía cạnh nghiên cứu này và sự chuẩn hóa vẫn cần thiết.

Thay vì phần thịt quả cà phê, các sản phẩm phụ nông nghiệp chứa pectin khác cũng có thể được áp dụng, cụ thể pectin được chiết từ dư lượng công nghiệp của ca cao, dầu cọ, dầu ô liu và đường từ rễ củ cải (SBP). Do đó, theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến sản phẩm phụ nông nghiệp chứa pectin quy trình xử lý bao gồm:

- a. Cung cấp sản phẩm phụ nông nghiệp chứa pectin;
- b. Chiết phần chiết chứa pectin từ sản phẩm phụ nông nghiệp chứa pectin, trong đó sự chiết được tiến hành ở điều kiện axit hoặc điều kiện kiềm (hoặc điều kiện này sau điều kiện kia), để cung cấp phần chiết chứa pectin, cụ thể trong đó sự chiết bao gồm chiết phần chiết chứa pectin từ phần thịt quả cà phê, trong đó sự chiết được tiến hành ở (ít nhất) điều kiện axit;
- c. (tùy ý) Xử lý bằng enzym của phần chiết chứa pectin, trong đó xử lý bằng enzym bao gồm xử lý với một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm



esteraza và reductaza, để cung cấp vật liệu pectin được xử lý bằng enzym, cụ thể trong đó xử lý bằng enzym bao gồm ít nhất là xử lý với oxidoreductaza; và

d. (tùy ý) Chiết phần chiết chứa pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol từ sản phẩm của phần chiết chứa pectin được xử lý bằng enzym tùy ý.

Sáng chế sẽ còn được làm sáng tỏ về phần thịt quả cà phê (chứa pectin).

Theo phương án cụ thể, phần thịt quả cà phê được đưa vào bước chiết đầu tiên trong điều kiện axit, dẫn đến sản phẩm chiết đầu tiên và sản phẩm dư, trong đó sản phẩm dư còn được đưa vào bước chiết thứ hai trong điều kiện kiềm, dẫn đến sản phẩm chiết thứ hai và sản phẩm dư thứ hai, và trong đó từ sự chiết thứ hai này thu được sản phẩm chiết thứ hai được kết hợp tùy ý với sản phẩm chiết thứ nhất từ lần chiết thứ nhất, và trong đó những sản phẩm chiết pectin được kết hợp tùy ý này sau đó còn được đưa vào xử lý bằng enzym. Cụ thể là, trong lần chiết thứ hai, chất lỏng chiết thứ hai được áp dụng chứa  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  có thể được sử dụng như chất oxy hóa và/hoặc như cơ chất cho (các) enzym.  $H_2O_2$  có thể cho phép, ví dụ, phản ứng của lacaza và/hoặc peroxidaza, cụ thể peroxidaza, cho liên kết chéo. Tuy nhiên, chất oxy hóa khác có thể được sử dụng (thể cho oxy). Thay thế cho hoặc thêm vào với  $H_2O_2$  là amoni persulfat  $((NH_4)_2S_2O_8)$  và/hoặc natri metabisulfit  $(Na_2S_2O_5)$  có thể được áp dụng. Tùy ý hoặc ngoài ra, ozon cũng có thể được áp dụng. Sự chiết có thể còn bao gồm bước phân tách mà tách riêng phần chiết từ sản phẩm còn lại, ví dụ bởi lọc v.v. (cũng xem ở phía dưới).

Thuật ngữ “điều kiện axit” và các thuật ngữ tương tự cụ thể chỉ pH <7; thuật ngữ điều kiện “kiềm” và các thuật ngữ tương tự cụ thể chỉ pH >7.

Như có thể từ nguồn phía trên, theo một phương án, phương pháp có thể bao gồm chiết phần chiết chứa pectin (từ sản phẩm phụ nông nghiệp chứa pectin), trong đó sự chiết được tiến hành ở điều kiện axit để cung cấp phần chiết chứa pectin, theo sau là xử lý bằng enzym. Sự chiết bổ sung ở điều kiện kiềm là phương án cụ thể. Như có thể từ nguồn phía trên, theo một phương án, phương pháp còn có thể bao gồm chiết phần chiết chứa pectin (từ sản phẩm phụ nông nghiệp chứa pectin), trong đó sự chiết được tiến hành ở điều kiện kiềm, để cung cấp phần chiết chứa pectin, theo sau là xử lý bằng enzym. Sự chiết bổ sung ở điều kiện axit là phương án cụ thể. Quy trình chiết axit cụ

thể cung cấp pectin hữu dụng cho công nghiệp thực phẩm. Chiết kiềm (bổ sung) (pha loãng) có thể hỗ trợ chiết pectin có tính tan thấp trong nước.

Như có thể từ nguồn phía trên, theo một phương án, phương pháp có thể bao gồm chiết phần chiết chứa pectin (từ sản phẩm phụ nông nghiệp chứa pectin), trong đó sự chiết được tiến hành ở điều kiện axit và điều kiện kiềm, để cung cấp phần chiết chứa pectin là kết hợp của sản phẩm chiết kiềm và sản phẩm chiết axit, theo sau là xử lý bằng enzym (của sự kết hợp của chiết). Vì sẽ được thảo luận phía dưới, chiết axit có thể theo sau bởi chiết kiềm hoặc chiết kiềm có thể theo sau bởi chiết axit. Cụm từ “trong đó chiết được tiến hành ở điều kiện axit và điều kiện kiềm” thường chỉ đầu tiên sự chiết được tiến hành ở điều kiện axit hoặc kiềm và (tiếp theo) lần lượt là, vật liệu còn lại từ chiết axit hoặc kiềm được đưa vào chiết kiềm hoặc axit. Phần chiết có thể được kết hợp để xử lý (enzym) thêm và vật liệu còn lại có thể được sử dụng cho các ứng dụng khác hoặc bị loại bỏ (xem các phần khác trong bản mô tả này).

Theo phương án ưu tiên, điều kiện axit của lần chiết thứ nhất là ở pH trong khoảng 0,5-4, cụ thể là 1,5-3. Ngoài ra, lần chiết thứ nhất có thể được tiến hành cụ thể ở nhiệt độ ít nhất là 80 °C. Điều kiện kiềm trong lần chiết thứ hai cụ thể là ở pH trong khoảng 7-14, ví dụ 8-14, thậm chí cụ thể hơn 7-11, ví dụ 9-11, ví dụ cụ thể giữa 7,5-10,5, ví dụ 9,5-10,5. Với chiết kiềm, pH là >7, cụ thể là 7,5-9. Ở pH cao hơn, phân tử pectin có thể bắt đầu thủy phân. Ngoài ra, đặc biệt là quá trình chiết kiềm được tiến hành ở nhiệt độ không cao hơn 45°C, cụ thể là 35°C.

Ngoài ra, theo các phương án, một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm diphenol oxidoreductaza, peroxidaza, laccaza, pectin-esteraza, metyl-esteraza, poly galacturanaza, endo polyglucanaza, và exo polyglucanaza. Thay thế cho hoặc thêm vào với, một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm pectin lyaza, polygalacturonaza (nội và ngoại), endo galactanaza, exo galactanaza, rhamnogalacturonaza có thể được áp dụng. Thay thế cho hoặc thêm vào với, cụ thể là, arabinofuranosidaza, arabinaza, feruloyl esteraza, endo pectin metyl esteraza, exo pectin metyl esteraza, pectin esteraza, lacaza, peroxidaza (cụ thể từ cây cải ngựa) có thể được áp dụng. Với khử metyl, cụ thể enzym như pectin metyl esteraza (EC 3.1.1.11) có thể được áp dụng. Với liên kết chéo, cụ thể enzym như peroxidaza (cụ thể EC 1.10 hoặc EC 1.11, ví dụ peroxidaza từ cây cải ngựa 1.11.1.7) có thể được áp

dụng. Cụ thể, xử lý bằng enzym ít nhất liên quan tới xử lý (các) phần chiết với oxidoreductaza. Oxidoreductaza là enzym xúc tác sự chuyển electron từ một phân tử (chất khử hoặc thể cho electron) đến phân tử khác (chất oxy hóa hoặc thể nhận electron). Các kết quả tốt nhất thu được với oxidoreductaza được chọn từ (phân) lớp EC 1.10 (oxidoreductaza hoạt động trên diphenol và cơ chất có liên quan như thể cho) và EC 1.11 (oxidoreductaza hoạt động trên peroxit như thể nhận (peroxidaza)). Cụ thể, các kết quả tốt thu được với peroxidaza từ cây cải ngựa (1.11.1.7) và lacaza (EC 1.10.3.2). Phương án trước có thể cần  $H_2O_2$  trong khi phương án sau có thể dùng oxy hòa tan và có thể không cần đến thể cho oxy bổ sung. Do đó, cụ thể, xử lý bằng enzym bao gồm ít nhất xử lý (của phần chiết chứa pectin) với một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm EC 1.10 hoặc EC 1.11. Lớp enzym EC 1.10 (hoặc phản ứng enzym) hoạt động trên diphenol và cơ chất có liên quan như thể cho, với ví dụ  $NAD^+$ ,  $NADP^+$ , sắc tố tế bào, oxy, đồng hoặc các thể nhận khác. Cụ thể các thể nhận với oxy như thể nhận được dùng. Lớp enzym EC 1.11 (hoặc phản ứng enzym) hoạt động trên peroxit như thể nhận. Trong bản mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết, danh pháp enzym được công nhận quốc tế, cụ thể như được định nghĩa bởi Liên hiệp hóa sinh và sinh học phân tử quốc tế (NC-IUBMB), được áp dụng.

Tuy nhiên, quy trình có thể còn được tiến hành theo cách thay thế, trong đó thứ tự chiết kiềm và axit được đảo ngược. Do đó, theo một phương án khác, phần thịt quả cà phê được đưa vào lần chiết thứ nhất ở điều kiện kiềm, đem lại sản phẩm chiết thứ nhất và sản phẩm dư, trong đó sản phẩm dư được đưa vào lần chiết thứ hai ở điều kiện axit, đem lại sản phẩm chiết thứ hai và sản phẩm dư thứ hai, và trong đó từ chiết thứ hai này thu được sản phẩm chiết thứ hai được tùy ý kết hợp với sản phẩm chiết thứ nhất từ lần chiết thứ nhất, và trong đó các sự kết hợp tùy ý này sản phẩm chiết pectin sau đó được đưa vào xử lý bằng enzym. Cụ thể, trong lần chiết thứ nhất, chất lỏng chiết thứ nhất được áp dụng chứa  $H_2O_2$ . Như được chỉ ra phía trên,  $H_2O_2$  có thể được sử dụng như thể cho oxy và/hoặc như cơ chất cho (các) enzym. Theo phương án ưu tiên, điều kiện kiềm ở lần chiết thứ nhất là cụ thể ở pH trong khoảng 7-14, như 8-14, cụ thể 7-11, như 9-11, cụ thể hơn 7,5-10,5, như 9,5-10,5. Với chiết kiềm, pH là  $>7$ , cụ thể 7,5-9. Ở pH cao hơn, phân tử pectin có thể bắt đầu bị thủy phân. Ngoài ra, đặc biệt là quá trình chiết kiềm được tiến hành ở nhiệt độ không cao hơn  $45^\circ C$ , cụ thể là  $35^\circ C$ .

Ngoài ra, đặc biệt là điều kiện axit của lần chiết thứ hai là ở độ pH trong khoảng 0,5-4, cụ thể là trong khoảng 1,5-3. Theo các phương án hơn nữa, lần chiết thứ hai được tiến hành cụ thể ở nhiệt độ ít nhất là 80 °C.

Enzym có thể được sử dụng trong một hoặc nhiều ví dụ sau: trong chiết axit, sau khi chiết axit, trong chiết kiềm, sau khi chiết kiềm, và trong giai đoạn khi cả hai loại chiết được kết hợp. Đương nhiên, trong một hoặc nhiều giai đoạn này, enzym có thể được áp dụng. Cụ thể, enzym, và phụ chất tùy ý cho enzym như  $H_2O_2$ , có thể phụ thuộc vào pH và/hoặc nhiệt độ. Ví dụ,  $H_2O_2$  có thể chỉ được áp dụng khi peroxidaza được dùng, cụ thể peroxidaza từ cây củ cải cay. Lacaza không cần đến  $H_2O_2$  để tạo liên kết chéo polyphenol. Tuy nhiên, lacaza thường chỉ hoạt động chủ yếu ở pH giữa khoảng 6,0 tới 8,5. Peroxidaza từ cây củ cải cay hoạt động thường chỉ chủ yếu ở pH cao hơn giữa khoảng 8,5 và 12,5. Do đó, ví dụ, sự chiết, pH có thể còn phụ thuộc vào enzym được sử dụng, mặc dù, nếu cần thiết, sau khi chiết pH có thể còn bị thay đổi để đạt tới pH phù hợp với enzym được chọn. Do đó, theo các phương án trong đó peroxidaza (cây củ cải cay) được áp dụng, sự có mặt của  $H_2O_2$  là mong muốn và khoảng pH, trong ít nhất một phần của quy trình, cụ thể là từ 6,0 tới 11 vì khoảng này trong đó reductaza hoạt động hơn. Nhiệt độ trong chiết kiềm cụ thể là không quá 45 °C. Ngoài ra, nhiệt độ tối ưu cho cả lacaza và peroxidaza là trong khoảng 30-40 °C, ví dụ khoảng 35 °C. Enzym có thể được thêm vào trong bất kỳ giai đoạn nào của quy trình, nhưng tất nhiên ít nhất là có sẵn trong quá trình xử lý bằng enzym.

Theo các phương án hơn nữa, một hoặc nhiều enzym cụ thể được chọn từ nhóm bao gồm diphenol oxidoreductaza, peroxidaza, lacaza, pectin-esteraza, metyl-esteraza, poly galacturanaza, endo polyglucanaza, và exo polyglucanaza. Thay thế cho hoặc thêm vào với, một hoặc nhiều enzym are được chọn từ nhóm bao gồm pectin lyaza, polygalacturonaza (endo và exo), endo galactanaza, exo galactanaza, rhamnogalacturonaza có thể được áp dụng. Thay thế cho hoặc thêm vào với, cụ thể arabinofuranosidaza, arabinaza, feruloyl esteraza, endo pectin metyl esteraza, exo pectin metyl esteraza, pectin esteraza, lacaza, peroxidaza (cụ thể từ cây củ cải ngựa) có thể được áp dụng. Với sự khử metyl, cụ thể enzym như pectinesteraza có thể được áp dụng. Với liên kết chéo, cụ thể enzym như peroxidaza có thể được áp dụng. Như được chỉ ra phía trên, trong xử lý bằng enzym, cụ thể, ít nhất là oxidoreductaza được chọn từ

(phân) lớp EC 1.10 và EC 1.11 được áp dụng. Chú ý rằng thuật ngữ “enzym” hoặc “oxidoreductaza” và các thuật ngữ tương tự có thể cũng chỉ, lần lượt là, phần lớn enzym (khác nhau) hoặc phần lớn oxidoreductaza (khác nhau), v.v. Như được chỉ ra ở đây, ví dụ, xử lý bằng enzym có thể là trong giai đoạn chiết hoặc tiếp sau giai đoạn chiết, hoặc xử lý bằng enzym nhiều lần có thể được áp dụng. Ngoài ra, hỗn hợp của các enzym khác nhau có thể được thêm vào. Giả sử, oxidoreductaza, lượng enzym được dùng sẽ ở trong khoảng 0,5-10 mg, ví dụ cụ thể khoảng 1mg của enzym tinh khiết (100% protein) mỗi 100 ml và giả sử esteraza, lượng enzym được dùng sẽ ở trong khoảng 1-10 mg, cụ thể khoảng 5 mg của enzym tinh khiết (100% protein) mỗi 100 ml. Do đó, sự cải biến enzym có thể được thực hiện trong máy phản ứng, trong đó có sự cải biến thực tế của vật chất. Trong một hoặc nhiều chiết kiềm và axit, có thể không có sự cải biến (enzym). Do đó, chúng có thể được thực hiện trong đơn vị chiết. Trong bước cải biến enzym, (các) enzym có thể cụ thể chuyển pectin thành pectin liên kết chéo và/hoặc có thể cắt nhóm được gắn với pectin (đại phân tử).

Theo phương án cụ thể nữa, trước lần chiết (thứ nhất), phần thịt quả cà phê được đưa vào quy trình rửa, trong đó quy trình rửa gồm trộn phần thịt quả cà phê với chất hòa tan và tiếp theo là loại bỏ ít nhất một phần của chất hòa tan, trong đó hàm lượng nước của chất hòa tan là  $\leq 80$  % theo trọng lượng. Cụ thể, ít nhất 50 % theo trọng lượng, thậm chí nhiều hơn cụ thể ít nhất 80 % theo trọng lượng, của chất hòa tan chứa một hoặc nhiều chất lỏng có tính phân cực thấp hơn nước (xem phía dưới).

Theo một phương án, sự chiết của phần chiết chứa pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol từ sản phẩm của phần chiết chứa pectin được xử lý bằng enzym tùy ý bao gồm trộn ít nhất một phần của vật liệu được xử lý bằng enzym với chất lỏng chiết và tiếp theo là loại bỏ ít nhất một phần của pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol, trong đó chất lỏng chiết có pH trong khoảng 3,5-6, ví dụ 4-6. Cụ thể, chất lỏng chiết chứa etanol. Tuy nhiên, chất lỏng chiết có thể có thể còn chứa chất hòa tan khác, ví dụ metanol, 2-propanol, axeton. Cùng loại với chất hòa tan có thể được sử dụng như sử dụng cho quy trình rửa (cũng xem ở phía dưới). Ngoài ra, chất lỏng chiết có thể được axit hóa. Ngoài ra, chất lỏng chiết có thể chứa hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất hòa tan (như vậy). Chất lỏng chiết này có thể được sử dụng để kết tủa pectin được thêm nhóm chức. Bằng cách bổ sung chất hòa tan, pectin có thể kết tủa tạo

gel mà có thể được tách riêng từ hợp chất khối lượng phân tử thấp được hòa tan trong chất hòa tan.

Với quy trình theo sáng chế, nhưng tùy ý thông qua các đường khác, phần chiết chứa pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol có thể thu được. Do đó, theo một phương án khác nữa, sáng chế cũng cung cấp pectin được thêm nhóm chức polyphenol (về bản chất), cụ thể pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol. Do đó, cụ thể, sáng chế đề cập đến pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol thu được bởi quy trình như được mô tả ở đây. Cụ thể là, pectin từ cà phê được tạo chức polyphenol có tỉ lệ phân tử của nhóm phenol với tổng đơn vị của arabinoza cộng với galactoza nằm trong khoảng từ 20% đến 60%, và có khối lượng phân tử  $> 90000$ Da. Trong pectin (sản phẩm) theo sáng chế, hàm lượng protein có thể nằm trong khoảng 5-18% theo trọng lượng, cụ thể là nằm trong khoảng 8-15% theo trọng lượng. Ngoài ra, hàm lượng polyphenol có thể ở trong khoảng 0,06-0,18 % theo trọng lượng, cụ thể 0,09-0,15 % theo trọng lượng. Như được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, hàm lượng protein có thể được xác định dựa vào phương pháp Dumas (ISO 16634-1:2008); hàm lượng polyphenol có thể được xác định dựa vào phương pháp Folin–Ciocalteu (ISO 14502-1:2005) với thuốc thử Folin–Ciocalteu (FCR) hoặc thuốc thử phenol của Folin hoặc thuốc thử Folin–Denis, còn được gọi là phương pháp Tương đương Axit Gallic (GAE). Thuốc thử này (phương pháp) được thiết kế cụ thể để xác định lượng phenol. Cụ thể là, sáng chế còn đề cập đến pectin từ cà phê được tạo chức polyphenol (như được mô tả trong bản mô tả này), có khối lượng phân tử  $< 200000$  Da, như cụ thể là  $< 120000$  Da, như nằm trong khoảng 90000-120000 Da. Pectin từ cà phê có thể có tổng hàm lượng đường của rhamnoza, arabinoza, xyloza, mannoza, galactoza, glucoza, axit galacturonic, so với tổng hàm lượng đường, nằm trong khoảng 70-95% theo trọng lượng, với tổng hàm lượng axit galacturonic, so với tổng hàm lượng đường, nằm trong khoảng từ 55 đến 80% theo trọng lượng. Ngoài ra, tổng hàm lượng glucoza, tỉ lệ với tổng hàm lượng đường, có thể ở trong khoảng 3-15 % theo trọng lượng. Tổng hàm lượng đường trong pectin (sản phẩm) theo sáng chế có thể ở trong khoảng 40-80 % theo trọng lượng, tỉ lệ với tổng trọng lượng của sản phẩm. Phần còn lại có thể chứa giữa các chất khác là polyphenol và protein. Ngoài ra, cụ thể tỉ lệ Gal/UA có thể ở trong khoảng 0,1-0,2 (tỉ lệ trọng lượng của axit galactoza-uronic).

Thêm vào với phần trên, các bước xử lý tiếp theo (trung gian) có thể được thêm vào, ví dụ một hoặc nhiều bước kết tủa, lọc, rửa và tái lơ lửng. Ví dụ, sau sự tái tổ hợp của hai phần chiết (hoặc sau chiết axit, nhưng) trước xử lý bằng enzym, (cũng) kết tủa, lọc, rửa và tái lơ lửng có thể diễn ra. Thuật ngữ “ngược dòng” và “xuôi dòng” ở đây liên quan tới sự sắp xếp của các phần tử hoặc các đặc tính, hoặc trình tự của các giai đoạn, tỉ lệ với sự vận chuyển trong chuỗi chế biến, trong đó tỉ lệ với giai đoạn đầu tiên trong chuỗi hoạt động chế biến hoặc thiết bị chế biến hoặc giai đoạn chế biến, giai đoạn thứ hai trong chuỗi chế biến gần hơn với điểm bắt đầu của chuỗi là “ngược dòng”, và giai đoạn thứ ba trong chuỗi chế biến xa hơn tính từ điểm bắt đầu chế biến là “xuôi dòng”.

Thuật ngữ “về cơ bản” trong bản mô tả này, như trong “tất cả khí thải về cơ bản” hoặc trong “về cơ bản gồm”, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu. Thuật ngữ “về cơ bản” có thể còn bao gồm phương án với “toàn bộ”, “hoàn toàn”, “tất cả”, v.v. Do đó, theo các phương án tính từ về cơ bản có thể còn được loại bỏ. Khi áp dụng được, thuật ngữ “về cơ bản” có thể còn đề cập tới 90% hoặc cao hơn, ví dụ 95% hoặc cao hơn, cụ thể 99% hoặc cao hơn, thậm chí nhiều hơn, cụ thể 99,5% hoặc cao hơn, bao gồm 100%. Thuật ngữ “bao gồm” kể cả các phương án trong đó thuật ngữ “bao gồm” có nghĩa là “gồm có”. Thuật ngữ “và/hoặc” cụ thể đề cập tới một hoặc nhiều phần tử được đề cập tới trước và sau “và/hoặc”. Ví dụ, cụm từ “phần tử 1 và/hoặc phần tử 2” và cụm từ tương tự có thể đề cập tới một hoặc nhiều phần tử 1 và phần tử 2. Thuật ngữ “bao gồm” có thể theo một phương án chỉ “gồm có” nhưng có thể theo một phương án khác còn chỉ “chứa ít nhất loài được xác định và tùy ý một hoặc nhiều loài khác”.

Ngoài ra, thuật ngữ thứ nhất, thứ hai, thứ ba và tương tự trong phần mô tả và trong yêu cầu bảo hộ, được dùng để phân biệt giữa các thành phần tương tự và không cần thiết để mô tả thứ tự nối tiếp hoặc theo thời gian. Nó được hiểu rằng, thuật ngữ được sử dụng hoán đổi cho nhau ở các bối cảnh thích hợp và các phương án theo sáng chế được mô tả ở đây có khả năng hoạt động trong các trình tự khác hơn là được mô tả hay chú giải ở đây.

Thiết bị được mô tả ở đây trong quá trình hoạt động. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rõ, sáng chế không bị giới hạn ở các phương pháp hoạt động hoặc các thiết bị hoạt động.

Cần lưu ý rằng, các phương án được đề cập phía trên nhằm mục đích minh họa chứ không phải giới hạn sáng chế, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có khả năng thiết kế nhiều phương án thay thế mà không tách rời với phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ. Trong các điểm yêu cầu bảo hộ, số chỉ dẫn bất kỳ được đặt trong ngoặc sẽ không được hiểu là giới hạn yêu cầu bảo hộ. Việc dùng động từ “bao gồm” và cách chia động từ của nó không loại trừ sự có mặt của các phần tử hoặc các bước hơn là các cách dùng được nêu trong yêu cầu bảo hộ. Từ số ít đứng trước một phần tử không loại trừ có số nhiều của phần tử đó. Sáng chế có thể được thực hiện bởi phần cứng bao gồm một vài phần tử khác biệt, và bởi chương trình máy tính thích hợp. Trong yêu cầu bảo hộ thiết bị liệt kê một vài phương pháp, một vài phương pháp có thể được bao hàm bởi một và cùng một phần tử của phần cứng. Thực tế rằng các phép đo nhất định được trích dẫn trong yêu cầu bảo hộ độc lập khác nhau hỗ trợ nhau không chỉ ra rằng sự kết hợp của các phép đo không được sử dụng để đạt lợi ích.

Sáng chế còn áp dụng trên thiết bị gồm có một hoặc nhiều đặc tính được xác định được mô tả trong bản mô tả và/hoặc thể hiện trong bản hình vẽ đính kèm. Sáng chế còn gắn liền với phương pháp hoặc quy trình bao gồm một hoặc nhiều đặc tính được xác định được mô tả trong bản mô tả và/hoặc thể hiện trong bản hình vẽ đính kèm.

Các khía cạnh khác nhau được thảo luận trong sáng chế này có thể được kết hợp để cung cấp các lợi ích bổ sung. Ngoài ra, một số đặc tính có thể hình thành cơ bản cho một hoặc nhiều ứng dụng riêng biệt.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Các phương án theo sáng chế sẽ được mô tả, chỉ bằng các ví dụ, có tham chiếu đến các hình vẽ dạng sơ đồ kèm theo trong đó các ký hiệu chỉ dẫn tương ứng chỉ các phần tương ứng, và trong đó:



Fig. 1 thể hiện lược đồ một phương án của quy trình như được mô tả trong bản mô tả này; Fig. 2a-Fig. 2b thể hiện lược đồ pectin từ cà phê (trước và sau khi chế biến như được mô tả theo một số phương án trong bản mô tả này); Fig. 3 thể hiện sắc ký loại trừ kích thước hiệu năng cao (HPSEC) cho pectin thương mại từ vỏ cam quýt và pectin thu được với quy trình được mô tả trong bản mô tả này; Fig. 4 thể hiện sự có mặt của oligome sau khi phân hủy pectin bằng polygalacturonaza từ *Aspergillus aculeatus* sau khi sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao (HPAEC) cho pectin thương mại từ vỏ cam quýt và pectin thu được từ quy trình được mô tả trong bản mô tả này; Fig. 5a thể hiện sơ đồ hạt cà phê; Fig. 5b thể hiện quy trình quy mô phòng thí nghiệm cho nguyên liệu tươi; Fig. 5c thể hiện sự oxy hóa catechol bởi PPO từ phần thịt quả cà phê theo thời gian (bằng đơn vị hấp thụ, trực y, và với thời gian tính bằng giờ trên trục x). Dữ liệu quang phổ thu được ở 420 nm. Biểu tượng  $\diamond$  chỉ thay đổi của hấp thụ của enzym chiết (thể hiện bởi hình vuông), trừ đi thay đổi của hấp thụ của dung dịch cơ chất (thể hiện bởi hình tam giác), không có enzym; Fig. 5d thể hiện lưu đồ cho bảo quản phần thịt quả cà phê khô ở quy mô lớn; và Fig. 5e thể hiện chiết quy mô lớn từ phần thịt quả ướn đã được bảo quản (với cân bằng khối lượng). Các hình vẽ sơ đồ trong bản mô tả này không nhất thiết theo đúng tỷ lệ.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Fig. 1 thể hiện sơ đồ một phương án chế biến như được mô tả trong bản mô tả này. Phần thịt quả cà phê được xay: phần thịt quả cà phê có thể liên quan tới một hoặc nhiều vỏ quả ngoài, phần ngoài vỏ giữa quả (bản thân phần thịt quả), và vỏ giữa quả (dịch nhầy hoặc vỏ trấu). Vỏ trấu khô (cũng được biết đến là vỏ lụa) không được đưa ra xem xét (sau đó trong suốt quy trình, máy xát khô có thể được sử dụng để loại bỏ để loại bỏ lớp vỏ trấu) từ cà phê được chế biến ướn. Xát vỏ cà phê được chế biến khô chỉ loại bỏ toàn bộ vỏ quả khô - vỏ quả ngoài, vỏ giữa quả & vỏ quả trong - của quả khô. Ngoài ra, đánh bóng tùy ý có thể diễn ra; đây là quy trình tùy ý trong đó bất kỳ vỏ lụa nào còn lại trên hạt sau khi xát vỏ (tùy ý máy đánh bóng có thể được áp dụng). Phần thịt quả được ưu tiên thu lại từ máy loại bỏ phần thịt quả sớm nhất có thể sau sự tạo thành phần thịt quả, tốt hơn là trong 24 giờ đầu tiên. Nếu điều này là không thể, bước bảo quản được ưu tiên sử dụng để giảm thiểu sự phân hủy của pectin do hoạt động của enzym. Bước bảo quản có thể là nhưng không giới hạn ở: axit hóa phần thịt quả tới pH

thấp hơn 4, kiềm hóa tới pH cao hơn 9, giảm hoạt động của nước ( $a_w$ ) tới  $a_w=0,5$  hoặc ít hơn ở các nhiệt độ thấp hơn  $60^\circ\text{C}$ , bất hoạt enzym nội sinh bằng cách bổ sung chất hòa tan, bất hoạt enzym nội sinh bằng cách đun sôi và/hoặc làm lạnh (chu kỳ). Bổ sung một hoặc nhiều chất bảo quản được chọn từ nhóm gồm natri meta bisulfit, axit ascorbic, axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA) có thể cũng được áp dụng. Ví dụ của các chất bảo quản khác được chọn từ nhóm gồm axit ascorbic, axit citric, axit oxalic, natri metabisulfit, kali bisulfit, lưu huỳnh đioxit, glyxin, metionin và EDTA, cụ thể là một hoặc nhiều trong số natri metabisulfit, kali bisulfit, và EDTA.

Do đó, theo các phương án của quy trình, trước khi chiết (nhưng cụ thể sau khi rửa) phần thịt quả được đưa vào quá trình bảo quản, trong đó quá trình bảo quản gồm một hoặc nhiều (i) bổ sung chất bảo quản vào phần thịt quả và (ii) làm khô phần thịt quả. Như được chỉ ra phía trên, chất bảo quản có thể chứa một hoặc nhiều axit ascorbic, axit citric, axit oxalic, natri metabisulfit, kali bisulfit, sulfur đioxit, glycin, metionin và EDTA, cụ thể một hoặc nhiều natri metabisulfit, kali bisulfit, và EDTA, cụ thể một hoặc nhiều natri metabisulfit và kali bisulfit. Ngoài ra, phần thịt quả được ưu tiên xay (hoặc được dầm) tới kích thước hạt thích hợp (sau bảo quản nhưng) trước bất kỳ bước hoặc giai đoạn xử lý nào. Kích thước hạt thích hợp ở trong khoảng giữa 10 và 40, ví dụ 18 lưới. Phần thịt quả cà phê được chỉ ra với số chỉ dẫn 10. Việc sử dụng phần thịt quả được xay có thể đem lại chiết tốt hơn khi sử dụng phần thịt quả không được xay.

Quy trình làm sạch (tùy ý), trong bản mô tả này cũng được chỉ ra dưới dạng quy trình rửa, chỉ ra với số chỉ dẫn 100, có thể bao gồm xử lý phần thịt quả cà phê (được xay) với dung môi có tính phân cực thấp, nó có thể là, nhưng không bị giới hạn ở một hoặc nhiều trong số axit axetic, axeton, axetonitril, axetyl axeton, 2-aminoetanol, anilin, anisol, benzen, benzonitril, rượu benzylic, 1-butanol, 2-butanol, i-butanol, 2-butanon, rượu t-butylic, cacbon disulfua, cacbon tetraclorea, clorobenzen, clorofom, xyclohexan, xyclohexanol, xyclohexanon, di-n-butylphthalat, 1,1-dicloetan, dietylen glycol, 1-Metoxi-2-(2-metoxietoxy)etan (diglym), dimetoxietan (glym), N,N-dimetyl anilin, dimetyl formamit (DMF), dimetyl phthalat, dimetyl sulfoxit (DMSO), dioxan, etanol, ete, etyl axetat, etyl axetoaxetat, etyl benzoat, etylen glycol, glycerin, heptan, 1-heptanol, hexan, 1-hexanol, metanol, metyl axetat, metyl t-butyl ete

(MTBE), metylen clorua, 1-octanol, pentan, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-pentanon, 3-pentanon, 1-propanol, 2-propanol, pyridin, tetrahydrofuran (THF), toluen, như đặc biệt là một hoặc nhiều trong số metanol, hỗn hợp nước metanol, hexan, toluen, etylen glycol, etc, etyl etc. Dung môi có thể tùy ý được axit hóa. Phần thịt quả được trộn với chất hòa tan, tốt hơn là máy chiết ngược dòng. Axit hydroxyanic cũng như polyphenol tự do được hòa tan. Trong dòng này, có thể còn có phân đoạn giàu cafein trong đó trong giai đoạn sau có thể được tinh lọc, và có thể là sản phẩm phụ của pectin chiết. Sản phẩm thu được sau quy trình rửa được chỉ ra với số chỉ dẫn 110. Rửa với chất hòa tan có thể loại bỏ polyphenol tự do và cafein từ phần thịt quả cà phê và nó có thể còn kết tủa polysacharit với mức độ polyme hóa cao hơn. Rửa với chất hòa tan có thể loại bỏ polyphenol tự do nhiều nhất có thể mà không loại bỏ polysacharit chứa polyphenol trong nhóm chức của chúng. Dòng dưới cùng là chất hòa tan có tính phân cực thấp ví dụ etanol và propanol, kết tủa pectin với polyphenol được gắn vào trong khi hòa tan cafein và polyphenol không gắn vào cấu trúc pectin. Điều này cho phép sử dụng enzym về sau, ví dụ lacaza để cải biến có chọn lọc pectin với nhóm biphenolic mà không làm mất quá nhiều enzym polyme hóa lượng lớn polyphenol. Chất lỏng dùng để rửa phần thịt quả có thể cụ thể chứa nước ít hơn 70 % theo trọng lượng, cụ thể nước ít hơn 65 % theo trọng lượng, ví dụ ít hơn 55 % theo trọng lượng, hoặc thậm chí ít hơn. (Các) chất lỏng được sử dụng để chiết cụ thể chứa hàm lượng nước cao hơn chất lỏng dùng để rửa (cho phần thịt quả). Ví dụ, chất lỏng chiết có thể chứa nhiều hơn 65 % theo trọng lượng, cụ thể nhiều hơn 75 % theo trọng lượng, thậm chí nhiều hơn cụ thể ít nhất 80 % theo trọng lượng, ví dụ ít nhất 90 % theo trọng lượng, như ít nhất 95 % theo trọng lượng nước. Ngoài ra, chất lỏng được sử dụng để chiết cụ thể có tính phân cực cao hơn chất lỏng dùng để rửa (cho phần thịt quả). Bằng cách này, polyphenol tự do và cafein có thể được loại bỏ từ phần thịt quả bởi chất lỏng dùng để rửa và bởi chiết với chất hòa tan phân cực (cụ thể chất hòa tan phân cực axit hóa), pectin có thể được chiết từ phần rắn không hòa tan của phần thịt quả. Ngoài ra, như được chỉ ra phía trên, chất lỏng chiết cụ thể có độ pH <7 hoặc độ pH >7. Tùy ý, chất lỏng chiết có thể còn chứa muối (tan) (cũng xem ở phía dưới).

Trong bước hoặc giai đoạn chiết thứ nhất, được chỉ ra với số chỉ dẫn 200, sinh khối, cụ thể, sản phẩm thu được sau quy trình rửa, có thể theo một phương án, được axit hóa tới độ pH=4 hoặc thấp hơn, cụ thể độ pH=2 hoặc thấp hơn, ví dụ, với axit đặc

nhưng không giới hạn ở một hoặc nhiều axit clohydric, axit nitric, axit phosphoric, axit axetic. Ngoài ra, hỗn hợp có thể được gia nhiệt, ví dụ tới nhiệt độ ít nhất 70°C. Độ pH tốt hơn là được làm giảm đi trước bước hoặc giai đoạn đun nóng được áp dụng. Tỷ lệ sinh khối với chất lỏng (chiết) có thể cụ thể ở trong khoảng 0,25:1 – 1:0,25, cụ thể 0,5:1-1:0,5, ví dụ 1:1 (nghĩa là với mỗi kilogam thịt quả tươi, cần một lít dung dịch để chiết). Tốt hơn là sử dụng dung dịch đậm đặc để trộn sinh khối và sau đó điều chỉnh độ pH. Các dung dịch muối có thể là (nhưng không giới hạn ở) một hoặc nhiều natri một nhóm phosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), natri nitrat, natri axetat, và natri clorua. Thay thế cho hoặc thêm vào với, amoni và/hoặc muối kali có thể được áp dụng. Tất nhiên, nhiều hơn một muối có thể được áp dụng. Nồng độ muối có thể ở khoảng giữa 50-400 mM, ví dụ cụ thể 100 mM tới 200 mM (với mỗi muối riêng biệt). Ví dụ, chiết có thể được thực hiện ở ống chiết hoặc máy chiết ngược dòng trong đó chất lỏng và chất rắn được trộn với nhau và trộn liên tục. Việc gia nhiệt được mong muốn tiến hành càng nhanh càng tốt. Do đó, việc làm nóng trước mạch chiết có thể được khuyến khích. Sản phẩm thu được sau bước hoặc giai đoạn chiết thứ nhất được chỉ ra với số chỉ dẫn 210.

Bước hoặc giai đoạn phân tách đầu tiên được ưu tiên, được chỉ ra với số chỉ dẫn 300, được tiến hành trên máy trộn nóng (thu được trong bước hoặc giai đoạn chiết thứ nhất). Thu hồi dung dịch càng nhiều càng tốt được mong muốn (nghĩa là, phân lọc hoặc dịch nổi) trước khi tiếp tục bước hoặc giai đoạn tiếp theo. Theo thiết lập và độ lớn của dòng, các loại đơn vị phân tách khác nhau có thể được sử dụng. Ví dụ là are khung máy phân tách, đĩa máy phân tách, sàng (máy phân tách) và máy ly tâm (máy phân tách). Chất rắn được kết tủa từ chất lỏng được gọi là kết tủa (sản phẩm dư, hoặc sản phẩm dư thứ nhất), hoặc khi được cô đặc lại bằng ly tâm, viên nhỏ. Chất lỏng còn lại phía trên chất rắn trong bất kỳ trường hợp nào được gọi là dung dịch còn lại sau kết tủa hoặc dịch nổi. Lọc bằng máy lọc cũng có thể được tiến hành. Quá trình hỗn hợp đi qua màng lọc được gọi là sự lọc. Chất lỏng được tạo ra sau khi lọc, thường là huyền phù của chất rắn trong chất lỏng, được gọi là dịch lọc, trong khi chất rắn còn lại trong máy lọc được gọi là phần còn lại, phần dư, hoặc phần thừa. Chất lỏng còn lại sau bước phân tách thứ nhất, dịch nổi hoặc dịch lọc (ở đây là sản phẩm chiết thứ nhất), đi tới thiết bị phản ứng trong đó nó có thể được trộn với dịch nổi của bước hoặc giai đoạn phân tách thứ hai. Kết tủa, phần còn lại, phần dư, cặn lắng hoặc phần thừa (sản phẩm dư thứ nhất) cụ thể phải được cấu thành từ càng nhiều chất rắn càng tốt. Ở thời điểm

này, sinh khối (còn lại) nên ở khoảng 50% tới 75% của khối lượng ban đầu (khối lượng khô).

Sản phẩm thu được sau bước hoặc giai đoạn phân tách thứ nhất được chỉ ra với số chỉ dẫn 310 và 320. Số chỉ dẫn 310 chỉ sản phẩm mà còn lại sau bước phân tách thứ nhất, ví dụ phần còn lại, phần dư, hoặc phần thừa, cặn lắng, v.v. Sản phẩm 310 này (sản phẩm dư thứ nhất) cụ thể được đưa vào bước chiết thứ hai 400, cũng xem ở phía dưới. Sản phẩm (mong muốn), được chỉ ra với số chỉ dẫn 320, hoạt động phân tách, nghĩa là, dịch lọc hoặc dịch thấm qua, hoặc dịch nổi, v.v. (sản phẩm chiết thứ nhất) có thể được đưa trực tiếp vào thiết bị phản ứng thứ nhất 600 (hoặc giai đoạn phản ứng), cũng xem ở phía dưới. Sản phẩm chất lỏng chứa pectin (phần chiết sau phân tách), theo phương án này được chỉ ra với số chỉ dẫn 320, (chất lỏng chiết với phần chiết).

Trong bước hoặc giai đoạn chiết thứ hai, được chỉ ra với số chỉ dẫn 400, sản phẩm dư của bước chiết thứ nhất 310 hoặc sinh khối có thể được trộn với kiềm để chiết nhiều hơn polysacharit phân nhánh cũng như nhiều hơn pectin este hóa, mà ở trong phần thịt quả cà phê. Điều này có thể theo một phương án được thực hiện trong một vài bước hoặc giai đoạn. Đầu tiên, với chất lỏng chiết, cụ thể là nước, sinh khối được pha loãng tới 50% tổng số pha loãng đạt được. Sau đó, pH có thể được thay đổi, ví dụ với kiềm đặc (nghĩa là, dung dịch kiềm), tới giá trị cụ thể ít nhất 9, ví dụ 10. Theo một phương án, sau khi bổ sung kiềm, hydro peroxit có thể được thêm vào, cụ thể tới nồng độ 7,5%, cụ thể tới 5% của sinh khối ban đầu. Trong giai đoạn cuối của bước chiết này, thể tích được làm đầy bằng nước. Chiết có thể được thực hiện trong đường ống chiết, đường ống chiết có thể được tạo thành từ thể nhận trong vật liệu cân xứng, ví dụ thép không gỉ 320, 316 hoặc hợp kim ngăn ngừa rỉ sét. Bơm tuần hoàn có hoặc không xuất hiện phụ thuộc vào hoạt động là liên tục hay từng mẻ. Đường ống chiết phải bao gồm nguồn nhiệt và cơ chế trộn. Việc trộn nên được thúc đẩy để thu được tốc độ khử lignin và thủy phân cao hơn của hợp chất este hóa gắn với pectin. Nhiệt độ của đường ống chiết cụ thể được điều tiết để tránh phá vỡ polyme sinh học. Nhiệt độ thích hợp ở trong khoảng 35-65 °C. Nồng độ kiềm (của dung dịch kiềm đặc) cụ thể ở khoảng 6 mol tới 8 mol. (Dung dịch) kiềm có thể dựa trên dung dịch của ví dụ một hoặc nhiều trong số natri hydroxit, kali hydroxit, canxi cacbonat, và amoni axetat.

(Hỗn hợp) sản phẩm thu được sau bước hoặc giai đoạn chiết thứ hai được chỉ ra với số chỉ dẫn 410.

Trong bước hoặc giai đoạn phân tách thứ hai, mục tiêu cụ thể là phân tách chất rắn (từ (hỗn hợp) sản phẩm thu được sau bước chiết thứ hai), nghĩa là, sản phẩm dư của bước (chiết) thứ hai, mà chủ yếu là xenluloza và lignin từ polysaccarit tự do ở trong dung dịch (sản phẩm chiết thứ hai), nếu cần, độ pH có thể được giảm xuống 7 hoặc 8 trước bước phân tách. Việc giảm độ pH có thể được điều chỉnh (về cơ bản) để ngăn ngừa gel hóa pectin, mà có thể dẫn tới tổn thất polyme sinh học với phần còn lại. Bước hoặc giai đoạn phân tách thứ hai được chỉ ra với số chỉ dẫn 500. Theo thiết lập và độ lớn của dòng, các loại bộ phận phân tách khác nhau có thể được sử dụng. Ví dụ là máy phân tách khung, máy phân tách đĩa, (máy phân tách) sàng và (máy phân tách) ly tâm. Sản phẩm (mong muốn) của hoạt động phân tách (thứ hai), nghĩa là, dịch lọc hoặc dịch thấm qua, hoặc dịch nổi, v.v. (nghĩa là, sản phẩm chiết thứ hai), được chỉ ra với số chỉ dẫn 520, có thể (cũng) được đưa trực tiếp vào thiết bị phản ứng thứ nhất 600. Sản phẩm dư của bước chiết thứ hai, không được chỉ ra, có thể được loại bỏ.

Chú ý rằng trong quy trình được chỉ ra dưới dạng lược đồ này, giai đoạn chiết thứ hai 400 là xuôi dòng của giai đoạn phản ứng thứ nhất.

Tuy nhiên, chú ý rằng, chiết axit và kiềm có thể còn được tiến hành theo thứ tự khác, nghĩa là, giai đoạn phản ứng thứ nhất gồm chiết kiềm và giai đoạn phản ứng thứ hai gồm chiết axit. Sản phẩm thu được sau chiết kiềm và axit (hoặc chiết axit và kiềm), có thể cũng liên quan. Tuy nhiên pectin chất lượng cao hơn có thể thu được khi còn xử lý bằng enzym như được xác định ở đây được áp dụng. Chiết kiềm có thể tùy ý bị bỏ qua, tuy nhiên cụ thể chiết axit được mong muốn.

Trong thiết bị thiết bị phản ứng thứ nhất (ở đây còn được chỉ ra như thiết bị phản ứng 600, cả pectin được chiết theo phương pháp axit và nếu có pectin được chiết theo phương pháp kiềm có thể được trộn với nhau. Việc trộn có thể được thực hiện theo cách mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết, như với thiết bị ép hoặc thiết bị khuấy. Do đó, thiết bị thiết bị phản ứng thứ nhất đặc biệt là có thể bao gồm một hoặc nhiều thiết bị ép và thiết bị khuấy. Do thay đổi độ pH một số pectin có thể gel hóa. Do đó, giảm độ pH là đặc biệt được ưu tiên (của chất lỏng kiềm)

dần dần tới điểm gần trung hòa, cụ thể độ pH nằm trong khoảng 6-8, tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng 6,5-7,0. Như được chỉ ra phía trên, tùy ý trực tiếp sau chiết axit, xử lý bằng enzym có thể được thực hiện. Trong ví dụ này, độ pH của sản phẩm phân tách có thể được tăng tới độ pH nằm trong khoảng 6-8 tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng 6,5-7,0.

Trong thiết bị phản ứng thứ nhất, cụ thể hai loại enzym, oxidoreductaza và/hoặc esteraza, được áp dụng riêng biệt hoặc trong hỗn hợp. Oxidoreductaza được thêm vào dựa theo hoạt tính của nó, nghĩa là, lượng cần thiết để phản ứng với polyme pectin được thêm vào. Ví dụ của oxidoreductaza là (nhưng không giới hạn ở): diphenol oxidoreductaza, peroxidaza, và lacaza. Esteraza, cụ thể là pectin esteraza, được bổ sung để kiểm soát mức độ metyl hóa và este hóa của pectin. Ví dụ về (esteraza) enzym là (nhưng không giới hạn ở): pectin-esteraza, metyl-esteraza, poly galacturanaza, feruloyl esteraza, arabinoza, arabinofuranosidaza và polyglucanaza nội và ngoại sinh (cũng xem ở trên). Như được chỉ ra ở trên, ít nhất oxidoreductaza có thể được áp dụng, càng cụ thể hơn là trong hỗn hợp với esteraza (cụ thể là Pectinesteraza (EC 3.1.1.11)). Ngoài enzym ra, còn một hoặc nhiều chất phụ gia có thể được thêm vào. Như được chỉ ra phía trên, độ pH có thể được thay đổi (nếu cần) tới khoảng trung hòa. Các enzym khác được nêu ra ở đây, có cùng chức năng có thể được áp dụng.

Sản phẩm thu được sau xử lý trong thiết bị phản ứng thứ nhất, hoặc sau xử lý trong giai đoạn phản ứng này, được chỉ ra ở số chỉ dẫn 610. Sản phẩm này có thể được đưa vào giai đoạn phản ứng tiếp theo, được chỉ ra với số chỉ dẫn 700. Ở đây, số chỉ dẫn 600 và 700 có thể (cũng) chỉ lần lượt các thiết bị phản ứng khác nhau. Tuy nhiên, các số chỉ dẫn này có thể cũng chỉ các giai đoạn phản ứng, có thể theo một phương án được tiến hành liên tục trong các thiết bị phản ứng khác nhau trong khi nguồn nhiệt, điều khiển độ pH và máy điều nhiệt có mặt hoặc trong cùng bình phản ứng. Số chỉ dẫn 700 ở đây có thể còn chỉ thiết bị phản ứng thứ hai (hoặc đường ống).

Trong thiết bị phản ứng thứ hai (được chỉ ra với số chỉ dẫn 700), dung môi, như etanol, metanol, 2-propanol, axeton cụ thể là dung môi được axit hóa, như etanol axit hóa (như etanol + axit axetic khan 1%) được bổ sung, cụ thể là theo tỉ lệ 1:1-1:10, như 1,2:1:6, như 1:4 dung dịch chiết với dung môi (axit hóa), như etanol. Chức năng của dung môi cụ thể là để thay đổi tính phân cực của dung dịch do đó pectin sẽ kết tủa tạo

ra gel mà có thể được phân tách từ hợp chất khối lượng phân tử thấp được hòa tan trong dung môi. Hỗn hợp được để cho đông tụ và kết tủa của pectin xảy ra. Độ pH trong giai đoạn này thấp hơn 6 được ưu tiên; tuy nhiên không được khuyến khích khi có độ pH thấp hơn 3. Nếu cần, dung môi (hoặc chất lỏng chiết) tốt hơn là có nồng độ rượu là 70% hoặc cao hơn. Theo một phương án, thiết bị phản ứng (thứ hai) là hoặc còn bao gồm bình lắng. Bằng cách này, lớp phía trên của dung dịch có thể được bỏ đi dẫn đến thể tích nhỏ hơn nhiều cho bước hoặc giai đoạn phân tách cuối cùng.

Trong bước hoặc giai đoạn phân tách thứ ba, được chỉ ra với số chỉ dẫn 800, pectin chưa được lọc, được chỉ ra với số chỉ dẫn 710, được phân tách từ (các) dung môi, như ethanol và các dung môi khác được sử dụng trong suốt quy trình. Do đặc tính tạo keo của pectin, theo một phương án ly tâm có thể được áp dụng để phân tách pectin từ (các) dung môi. Do đó, sản phẩm thu được (ở đây là phần còn lại, phần thừa hoặc cặn lắng, v.v.) được chỉ ra ở số chỉ dẫn 810, chứa pectin (cà phê) được thêm nhóm chức polyphenol. Sản phẩm cho giai đoạn phản ứng này (hoặc thiết bị phản ứng này) được chỉ ra với số chỉ dẫn 810, và có thể được chỉ ra như sản phẩm chiết thứ ba (mà là vật liệu rắn). Một lần nữa, số chỉ dẫn 800 có thể còn chỉ thiết bị phản ứng, thiết bị phản ứng thứ ba phải được cấu trúc bằng vật liệu kháng như thép không gỉ 316, và 320, chịu lửa và thích hợp để làm với dung môi bay hơi. Tuy nhiên, số chỉ dẫn 700 và 800 có thể còn chỉ thiết bị phản ứng gồm bình lắng.

Nếu cần, do đó, pectin thu được có thể còn được lọc để đáp ứng các đặc điểm kỹ thuật trong các ngành công nghiệp khác nhau. Ví dụ, pectin khối lượng phân tử cao hơn có thể thu được bởi liên kết chéo với enzym (đã được tinh lọc) và/hoặc pectin tạo gel có thể được khử este để đáp ứng các loại ứng dụng khác nhau trong ngành công nghiệp thực phẩm và đồ uống. Ngoài ra, pectin có thể được cải biến với arabinaza và arabinofuranosidaza để thu được đặc tính huyền phù hóa cụ thể.

Hình vẽ sơ đồ của pectin 20 từ phần thịt quả cà phê được chỉ ra trong fig. 2a. MG chỉ nhóm metyl; AG chỉ nhóm axetyl, GUA chỉ axit galacturonic, Gal chỉ galactosa, RHA chỉ rhamnoza, và Ara chỉ arabinoza. Số chỉ dẫn 21 chỉ vùng homogalacturonan, số chỉ dẫn 22 chỉ vùng rhamanogalacturonan I, và số chỉ dẫn 23 chỉ vùng chuỗi bên trung hòa của pectin.



Fig. 2b thể hiện dưới dạng lược đồ pectin có khả năng thu được với quy trình theo sáng chế, trong đó pectin được liên kết chéo thông qua liên kết chéo CL. Số chỉ dẫn Fer chỉ axit ferulic (phenol là cơ bản của liên kết chéo, cùng với đơn vị arabinoza), trong đó mỗi pectin, thông qua đơn vị arabinoza pectin có thể được liên kết chéo với sự trợ giúp của axit ferulic. Enzym oxidoreductaza, ví dụ lacaza và/hoặc peroxidaza từ cây củ cải cay, có thể tạo ra liên kết chéo ở dạng polyphenol, ví dụ diphenol hoặc thậm chí polyphenol chứa nhiều hơn hai nhóm phenol.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

#### Ví dụ 1

Chiết và cải biến pectin từ phần thịt quả cà phê theo quy trình ở quy mô phòng thí nghiệm:

Phần thịt quả tươi thu được trực tiếp từ nông trại ở Colombia đầu tháng 1 năm 2012. Quả tươi ở trạng thái chín tối ưu để tách hạt trong máy xay ướt. Sau khi thu hồi màng vỏ và thịt quả (vỏ quả ngoài và vỏ quả giữa) được tách theo hướng dẫn. Phần thịt quả, màng vỏ (thịt quả) được xay và đông khô cho vận chuyển tới Hà Lan. 1g vật liệu đông khô được rửa 3 lần với etanol 80% được axit hóa và ly tâm ở 3000 rpm trong 5 phút trong mỗi bước, chất rắn sau đó được tạo huyền phù trong nước, pH được điều chỉnh tới 2,0 với axit clohydric và làm đầy tới thể tích 50ml. Huyền phù được lắc trong bể nước ở 70 °C trong 3 giờ. Huyền phù sau đó được ly tâm ở 3000 rpm trong 10 phút và pha nước được tách riêng với chất rắn. Chất rắn sau đó được trung hòa và natri hydroxit được thêm vào để điều chỉnh pH ở 10 và thể tích cuối cùng là 50ml. Chất rắn được tạo huyền phù và được lắc trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi chiết kiềm, huyền phù được ly tâm ở 3000 RPM trong 10 phút và pha nước được gộp chung lại với dung dịch axit. Độ pH được điều chỉnh tới 6,0 với kiềm hoặc axit pha loãng. Vật liệu được sử dụng sau đó được làm khô cho phân tích tiếp theo. Chất lỏng thu được để chiết có màu nâu. 3 ml Hydro peroxit (30%) được thêm vào chất lỏng và 500ul dung dịch peroxidaza từ cây củ cải ngựa (5mg/ml) được bổ sung và dung dịch được khuấy trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi ủ, 4 lần thể tích của etanol tuyệt đối được thêm vào và pectin được để cho kết tủa trong 2 giờ ở 4 °C. Sau khi kết tủa, huyền phù được lọc qua giấy lọc Whatman #3 với sự hỗ trợ của phễu Buchner. Phần chất rắn còn lại

được rửa với 100 ml axeton và làm khô ở 50 °C trong 12 giờ với đối lưu cao. Màng thu được sau đó được xay trong máy xay bi và bảo quản cho phân tích sau này.

## Ví dụ 2

Quy trình tiếp theo để thu polysacharit hòa tan từ thịt quả cà phê, với mức độ polyme hóa nhất định ở đây, sau đó được gọi là pectin, quy trình này được sử dụng như hướng dẫn. Do đó, tất nhiên là sự cải biến có thể được chọn.

Vật liệu: Phần thịt quả cà phê (chứa pectin từ cà phê): Phần thịt quả cà phê từ hàng loạt loại cà phê *Coffea Arabica* được thu hoạch tươi (quả cà phê tươi được mua trực tiếp từ nông trại ở Colombia từ mùa vụ tháng 12 năm 2011); Peroxidaza từ cây cải ngựa: Peroxidaza từ cây cải ngựa (HRP) được mua từ Sigma Aldrich EC 1.11.1.7 200U/mg, axit clohydric, natri dihydro phosphat và natri hydroxit có độ phân tích được mua từ Merck Dramstad Germany.

Phương pháp: Quả cà phê tươi được rửa với nước và phần thịt quả bị loại bỏ từ hạt và vỏ trấu bằng thủ công. Phần thịt quả được dầm ngay trong máy xay truyền thống với tốc độ cao và đông khô.

## Quy trình làm sạch (quy trình rửa)

1 g thịt quả cà phê được rửa ba lần với hỗn hợp nước metanol 50/50 (% thể tích/thể tích) và ly tâm, dịch nổi được gộp chung lại và làm khô chân không ở nhiệt độ thấp, phần còn lại chuyển tới quy trình chiết.

## Chiết axit

Phần còn lại sau đó được tạo huyền phù trong 35ml nước, độ pH của dung dịch được điều chỉnh tới 2,0 bằng cách bổ sung từng giọt axit clohydric 6M và thể tích cuối cùng điều chỉnh tới 50ml. Hỗn hợp được để trong bể nước lắc ở 90°C trong 1 giờ với lắc liên tục và làm lạnh sau tới nhiệt độ phòng với nước lạnh. Huyền phù được ly tâm ở 3500 rpm.

## Chiết kiềm

Dịch nổi (sản phẩm chiết thứ nhất) được giữ (để sử dụng sau đó, xem ở dưới) và phần còn lại (sản phẩm dư của quá trình chiết thứ nhất) được tạo huyền phù trong

25ml nước. Độ pH được điều chỉnh tới 12 với từng giọt natri hydroxit 4M, 5ml dung dịch hydro peroxit 30% được bổ sung, thể tích cuối cùng được điều chỉnh tới 50ml và được lắc trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Huyền phù được ly tâm ở 3500 rpm trong 5 phút và dịch nổi (sản phẩm chiết thứ hai) được gộp chung với phân đoạn được chiết axit (sản phẩm chiết thứ nhất).

#### Phản ứng enzym

pH của dung dịch được gộp chung được điều chỉnh tới 7,5 sử dụng natri hydroxit loãng. 5 mg enzym đông khô (ở đây là lacaza) được pha loãng trong 1 ml của dung dịch đệm natri dihydro phosphat pH 7,5 và được thêm vào dung dịch được gộp chung. Dung dịch được để cho phản ứng trong 24 giờ ở nhiệt độ 35 °C và khuấy liên tục. Sau khi ủ, dung dịch được đun sôi trong bể nước trong 10 phút nhằm bất hoạt enzym.

#### Kết tủa và làm khô

4 lần thể tích của etanol 96% được thêm vào dung dịch cuối cùng, và được để cho kết tủa trong 3 giờ ở 4°C, sau đó được lọc qua giấy lọc Whatman N° 2 xenluloza trong phễu Buchener. Phần còn lại được rửa 3 lần với 50 ml axeton, được lọc và làm khô ở 50°C trong 12 giờ. Pectin thu được được xay trong máy xay bi Retsch trong 3 phút ở độ lớn lớn nhất.

Liên kết chéo của pectin thông qua nhóm ferulic được gắn vào phần dư arabinan trong phần phân nhánh cao của cấu trúc pectin của pectin từ củ cải đường (SBP), được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tuy nhiên, cơ chế này chỉ giải thích liên kết chéo oxy hóa của vùng rậm của polysacharit. Phần thịt quả cà phê chứa chủ yếu là axit galacturonic (GAU) (ở giữa 60%-70% của đường hòa tan) và chỉ 10% của arabinan và chỉ tỉ lệ % nhỏ của rhamnoza. Điều này dẫn đến kết luận rằng pectin từ cà phê (pectin từ cà phê) thực tế chủ yếu cấu tạo từ homogalacturonan (HG) là vùng nhẵn của pectin, khi so sánh với SBP mà cấu tạo chủ yếu từ RGI là vùng phân nhánh của pectin. Do đó, có thể kết luận rằng, pectin từ SBP và pectin từ cà phê là khác nhau về cấu trúc phân tử, tuy nhiên pectin từ cà phê thể hiện tính nhớt tăng lên khi thêm vào dung dịch natri sulphit và chỉ trong điều kiện kiềm cao.

Từ phân tích trong phòng thí nghiệm, có một lượng polyphenol cao được biết đến được gắn vào vật liệu của thành tế bào trong phần thịt quả cà phê. Có ít nhất hai loại polyphenol xuất hiện; polyphenol gắn với polysaccharit của thành tế bào và phần tự do. Phần tự do được phân tích là tanin và tanin có thể đông đặc. Polyphenol gắn vào đó được thủy phân bởi kiềm trong bước hoặc giai đoạn chiết thứ hai, có thể do cắt liên kết 2-O hoặc 3-O trong chuỗi xương sống của GAU. Tuy nhiên có phản ứng rõ ràng khi peroxidaza enzym được bổ sung vào với cơ chất  $H_2O_2$ .

Từ thử nghiệm này, có thể tuyên bố rằng, các ứng dụng có thể với pectin không được xử lý bằng enzym là có thể xảy ra. Trong trường hợp này chỉ chiết kiềm sẽ là cần thiết để thu được pectin tạo gel không có bất kỳ loại chức năng nào khác. Rõ ràng từ HPSEC (sắc ký loại trừ kích thước áp suất cao) là, pectin từ cà phê không được cải biến có kích thước so sánh được với pectin thương mại từ cam quýt (DM, mức độ metoxyl hóa, 30%) mặc dù vắng mặt tính chất tạo gel trong pectin từ cà phê. Giả thuyết rằng, điều này là do mẫu este hóa methyl và axetyl cao trong pectin từ cà phê (DM 88 %; DA, Mức độ amin hóa, 100 %). Mẫu este hóa là quá cao để cho phép phản ứng polyme trong dung dịch, và do đó vô hiệu hóa phản ứng cần thiết để tạo ra hệ thống gel. Sự cải biến với enzym esteaza methyl pectic có thể còn dẫn tới tăng độ nhớt. Trong bảng 1a, thành phần đường của vật liệu thô. (Rha: rhamnoza, Ara: arabinoza, Xyl: xyloza, Man: mannoza, Gal: galactoza, Glc: glucoza, GalA: axit galacturonic) được chỉ ra theo tỉ lệ phần trăm khối lượng.

Xác định đặc tính của pectin từ phần thịt quả cà phê, các kết quả sơ bộ

Bảng 1a: Thành phần đường của vật liệu thô. (Rha: rhamnoza, Ara: arabinoza, Xyl: xyloza, Man: mannoza, Gal: galactoza, Glc: glucoza, GalA: axit galacturonic)

| Thành phần đường %             | Rha | Ara | Xyl | Man | Gal | Glc | GalA  | Đường tổng |
|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|------------|
| Pectin từ phần thịt quả cà phê | 1   | 5   | 1   | 1   | 4   | 3   | 28,11 | 43         |
| Pectin vỏ trấu                 | 1   | 8   | 3   | 2   | 4   | 22  | 47,22 | 87         |
| Phần chiết pectin thô          | 0   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 24,08 | 29         |

Bảng 1b: Tỷ lệ phân tử cho xác định cấu trúc (UA: axit uronic)

| Tên mẫu                        | Rha/UA | (Ara+Gal)/Rha | Ara/Gal | (Ara+Gal)/UA | Gal/UA |
|--------------------------------|--------|---------------|---------|--------------|--------|
| Pectin từ phần thịt quả cà phê | 0,03   | 10,84         | 1,47    | 0,37         | 0,15   |

Bảng 2: Mức độ metyl hóa và axetyl hóa cho pectin được chiết từ phần thịt quả cà phê

| Mức độ metyl hóa/axetyl hóa    |             |            |          |      |     |
|--------------------------------|-------------|------------|----------|------|-----|
| Mẫu                            | mg/mg MetOH | mg/mg AcOH | mg/mg UA | DM   | DA  |
| Pectin từ phần thịt quả cà phê | 4,85%       | 8,82%      | 0,26740  | 100% | 97% |

Phần thịt quả cà phê có hàm lượng tanin có khả năng thủy phân cao, 3,17% trong điều kiện cơ bản khô (dry basic). Tanin là tên chung cho polyphenol được gắn vào vật liệu của thành tế bào ở thực vật, với cà phê, nó có ở cấu trúc pectin như axit hydro xinamic, clogenic, và caffeic trong đó polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa.

Có các ví dụ trong đó polyphenol như axit ferulic, gắn vào phần hòa tan của vật liệu của thành tế bào thông qua phần dư arabinoza. Như có thể thấy trong bảng 1a-2, arabinoza có mặt với tỷ lệ phần trăm đáng kể trong pectin hòa tan của cà phê, và trong dịch nhầy từ phân đoạn vỏ trấu (pectin vỏ trấu). Do đó, pectin cuối cùng sau quy trình được đề xuất chứa lượng polyphenol cao. Tỷ lệ của nhóm phenolic nhóm với arabinoza cộng với galactosa sẽ ở giữa 20% đến 60%, phụ thuộc năng suất của quy trình. Pectin thương mại chứa nhóm phenolic là khá hiếm, pectin được chiết từ củ cải đường là ví dụ cho loại pectin này, tuy nhiên, pectin từ củ cải đường có mức độ phân nhánh cao hơn và lượng axit galacturonic thấp hơn gây ra tính chất tạo gel thấp. Khác biệt chính nữa là độ tuyến tính của phân tử pectin từ cà phê và khối lượng phân tử (> 90000 Da) mà gần với pectin chanh (120000 Da tới 160000 Da) và không gần với pectin từ củ cải

đường (nằm trong khoảng từ 50000 Da đến 80000 Da), như có thể được thấy ở HPSEC (sắc ký loại trừ kích thước hiệu năng cao) fig. 3.

Pectin còn được chiết từ phần thịt quả cà phê với quy trình này, thể hiện profin phân hủy giống như pectin thương mại được chiết từ vỏ cam quýt khi được xử lý bằng polygalacturonaza nội sinh (PG) như có thể thấy trong sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao (HPAEC) fig. 4, trong khi pectin từ củ cải đường được phân hủy ít bởi PG vì cấu trúc phân nhánh. Sự khác biệt nữa là mức độ axetyl hóa và metyl hóa mà có thể điều chỉnh bằng quy trình này. Tuy nhiên, pectin thô từ phần thịt quả cà phê thể hiện mức độ axetyl hóa và metyl hóa cao độ nhất, điều này dẫn đến khả năng sản xuất hàng loạt loại pectin với mức độ metyl hóa khác nhau từ 10% DM tới cao như 80% DM, điều này cũng độ nhất cho pectin thương mại.

### Ví dụ 3

#### Dữ liệu của thử nghiệm

Các thử nghiệm tiếp theo được tiến hành với mẫu đông khô của thịt quả cà phê (vỏ quả ngoài và vỏ giữa quả). Thiết kế của thử nghiệm như sau: (1) Tạo ra phần thịt quả cà phê đông khô (FD-pectin từ cà phê): 100 g FD-cà phê (nghĩa là, phần thịt quả cà phê đông khô) pectin được xay trong máy xay bi Retsch tới kích thước hạt đi qua lưới 6mm. (2) FD-pectin từ cà phê được đồng hóa trong nước khử khoáng trong một lít nước; pH được điều chỉnh tới pH thấp dùng Axit clohydric (HCl) 37%. Axit được thêm vào từng giọt. (3) Huyền phù được đặt trong bể nước ở nhiệt độ chính xác với lắc liên tục trong khoảng thời gian chính xác. (4) Huyền phù sau đó được lọc nóng qua vải thưa; phần vải được ép bằng tay để loại bỏ hầu hết chất lỏng từ khối chất rắn. (5) Khối chất rắn sau đó được đồng hóa với 0,5 l nước và pH được điều chỉnh với NaOH 4M, kiềm được thêm vào từng giọt. (6) Huyền phù được đặt trong bể đá lạnh với lắc liên tục trong khoảng thời gian chính xác. (7) Huyền phù sau đó được lọc nóng qua vải thưa; phần vải được ép bằng tay để loại bỏ hầu hết chất lỏng từ khối chất rắn. (8) Dung dịch được trộn với, 15 ml Hydro Peroxit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) được thêm vào và dung dịch được trung hòa với NaOH hoặc HCl. (9) 1,5 ml peroxidaza từ cây củ cải cay được thêm vào dung dịch, và được đặt trong bể nước ở 40°C trong 12 giờ với lắc liên tục. (10) 6 l etanol lạnh 90% được thêm vào dung dịch và được để trong 3 giờ ở 4°C. Huyền phù

được tạo thành sau đó được lọc qua giấy lọc Whatman 3 xenluloza với sự hỗ trợ chân không. Phần còn lại được rửa với axeton một vài lần để loại bỏ tạp chất. (11) Phần còn lại được làm khô trong lò nung đối lưu trong 12 giờ ở 50°C và đối lưu không khí tối đa. (12) Pectin từ thịt quả cà phê khô (pectin từ cà phê) được xác định khối lượng cho năng suất và sau đó được xay để phân tích thành phần.

Các kết quả (bảng 4):

|                         | pH1 | Nhiệt độ<br>1 | Thời gian<br>1 | pH2 | Nhiệt độ<br>2 | Thời gian<br>2 | Năng<br>suất |
|-------------------------|-----|---------------|----------------|-----|---------------|----------------|--------------|
| pectin từ cà<br>phê 001 | 1,5 | 90°C          | 30m            | 8   | 4°C           | 30m            | 25%          |
| pectin từ cà<br>phê 002 | 2   | 90°C          | 30m            | 8   | 4°C           | 30m            | 23%          |
| pectin từ cà<br>phê 003 | 1,5 | 80°C          | 120m           | 8   | 25°C          | 120m           | 20%          |
| pectin từ cà<br>phê 004 | 2   | 80°C          | 120m           | 10  | 25°C          | 120m           | 30%          |
| pectin từ cà<br>phê 005 | 2   | 90°C          | 30m            | 13  | 25°C          | 30m            | 5%           |
| pectin từ cà<br>phê 006 | 2   | 90°C          | 30m            | 10  | 25°C          | 30m            | 33%          |

Mặc dù năng suất chiết thấp khi so sánh với lượng pectin được báo cáo trong tài liệu, pectin được tạo ra thể hiện lượng nhóm metyl và axetyl cao một cách ngạc nhiên với DM là 80% và DA 100% trong khi pectin thông thường sau khi chiết không thể hiện DM cao hơn 75% hoặc DA cao hơn 50%. Mặc dù thủy phân kiềm được áp dụng trong quá trình chiết. Ngoài ra, phần chiết từ pectin từ cà phê thể hiện hoạt động gel hóa ở độ pH cao, điều này có thể là lý do vì sao pectin từ cà phê 005 thể hiện năng suất thấp do thực tế rằng trong quá trình chiết thứ hai, gel bị giữ lại với phân đoạn

xenluloza. Ở độ pH này, về cơ bản tất cả pectin có thể bị thủy phân thành các monome của nó mà sau đó sẽ đi vào dung dịch (khi kết tủa xảy ra).

Chiết kích thước trong phòng thí nghiệm của pectin từ phần thịt quả cà phê được bắt đầu tiến hành với vật liệu đông khô. Vì phần thịt quả cà phê được tạo ra với lượng lớn mà có thể được đông khô theo phương pháp khả thi về kinh tế, phương pháp tránh oxy hóa và lên men thịt quả cà phê được phát triển. Trong thực nghiệm các tác giả sáng chế sử dụng quả cà phê tươi, phần thịt quả tươi được ép để loại bỏ nước dư thừa và quy trình tiếp theo về cơ bản được mô tả phía trên. Trong ví dụ này, thịt quả được bảo quản được dùng thay vì phần thịt quả đông khô. Với thử nghiệm bảo quản các tác giả sáng chế bắt đầu với natri bi-sulphit ( $\text{NaHSO}_3$ ) là chất chống nâu phổ biến trong công nghiệp thực phẩm và còn được so sánh pH thấp và xử lý nhiệt để bất hoạt PPO nội sinh (polyphenol oxidaza) gây ra oxy hóa trong phần thịt quả cà phê. Xử lý được tiến hành *in vitro* sử dụng catechol dưới dạng cơ chất là polyphenol phổ biến có trong cà phê cũng như trong vật liệu thực vật khác, laccaza được dùng làm đối chứng dương và cà phê chiết tươi được dùng để oxy hóa polyphenol và ghi lại sự thay đổi hấp thụ.

Sau khi thu được phương pháp thích đáng để bảo quản phần thịt quả, các tác giả sáng chế đã tiến hành thử phương pháp ở quy mô lớn, (50 kg) thịt quả được thu từ máy xay ướt. Điều này chứng tỏ khả năng của phương pháp bảo quản ở quy mô lớn, mà là cần thiết để thu và bảo quản phần thịt quả, cần để làm cho quy trình trở nên khả thi. Với chiết quy mô lớn phần thịt quả cà phê, các tác giả sáng chế đã sử dụng thịt quả được bảo quản ướt (10 kg) và mở rộng quy mô cố gắng tuân theo càng nhiều càng tốt quy trình phòng thí nghiệm, các tác giả sáng chế đã thu được năng suất thấp từ lần chiết này.

Cà phê là một trong các sản phẩm nông nghiệp quan trọng nhất trên thế giới. Các giống trồng trọt phổ biến nhất của nó là *Coffea arabica* sp. và *Coffea robusta* sp. Lượng tổng hạt cà phê tươi được tạo ra trong 2011 là 7,8 triệu tấn; nhu cầu được dự đoán là tăng 10% trong thập kỷ tới. Cơ giới hóa sản xuất cà phê được tiến hành trong 20 năm trở lại đây để đương đầu với nhu cầu, điều này tạo ra thách thức mới trong chuỗi cà phê. Một mặt, cơ giới hóa tăng năng xuất cà phê và làm giảm chi phí sản phẩm; mặt khác, sản xuất được cơ giới hóa tạo ra nhiều hơn chất thải nông nghiệp và



giảm áp lực nhân lực cho trồng trọt. Bởi vì cơ giới hóa, các dòng loại bỏ cà phê được cô đặc ở pha rửa, trong đó quả cà phê tươi được chuyển thành hạt tươi. Ngày nay, phương pháp ướt truyền thống xử lý cà phê đang được thay thế bằng phương pháp bán ướt hoặc xát vỏ dùng nước. Theo phương pháp bán ướt, phần thịt quả được tách riêng từ hạt bằng các phương pháp cơ học, dịch nhầy được loại bỏ bằng cọ xát và được trộn với phần thịt quả. Các dòng được loại bỏ hầu hết chứa màng vỏ, thịt quả, dịch nhầy và vỏ lụa của quả cà phê tươi. Dòng được vớt bỏ này chứa lượng polyphenol cao, polysacharit và đường, cũng như số lượng giới hạn cafein. Sự có mặt của polyphenol và các dạng oxy hóa của nó và cafein làm cho phần dư không phù hợp để dùng cho thức ăn động vật hoặc vật liệu phân trộn. Do đó, các dòng phụ này đặt ra vấn đề môi trường chính trong vùng sản xuất cà phê.

Phần thịt quả cà phê thể hiện khoảng 40% tổng khối lượng tươi của quả cà phê tươi. Trước đây, phần thịt quả cà phê được dùng với lượng nhỏ như phân bón và phân trộn sâu hại. Tuy nhiên, các ứng dụng này không hiệu quả về mặt kỹ thuật cho quy mô sản xuất cà phê lớn. Phần sinh khối thịt quả giàu polyphenol, cafein và phức hợp polysacharit ví dụ pectin. Các cơ chất này có thể được chiết từ phần thịt quả, bằng cách phân tách và lọc sản phẩm theo phương pháp kỹ thuật sản xuất nhiên liệu sinh học. Bằng cách phân tách phần sinh khối thịt quả cà phê lượng ô nhiễm có thể được giảm và vật liệu được lọc có thể chuyển thành hợp chất sinh học có giá trị, các hợp chất này có thể được sử dụng trong công nghiệp dược phẩm và thực phẩm.

Vật liệu đông khô thể hiện tính ổn định về oxy hóa và lên men khi so sánh với phần thịt quả tươi. Tuy nhiên, đông khô là quy trình đắt tiền, và ít được quan tâm trong công nghiệp bảo quản với thể tích tăng lên của sinh khối được vớt bỏ, trong trồng trọt cà phê.

Mặc dù pectin xuất hiện phổ biến ở hầu hết các mô thực vật như là chất xi măng ở giữa lá và dày đặc trên thành tế bào, số lượng nguồn có thể được sử dụng cho sản xuất thương mại pectin còn rất hạn chế. Vì khả năng của pectin để tạo gel phụ thuộc vào kích thước phân tử và mức độ của độ este hóa (DE), pectin từ nguồn khác nhau không có cùng khả năng gel hóa do sự khác biệt trong các thông số này. Do đó, phát hiện lượng lớn pectin chỉ trong quả là không đủ để đánh giá rằng quả là nguồn của pectin thương mại. Hiện tại, vỏ cam quýt là nguồn chính của pectin thương mại.

Pectin thương mại được xác định đặc tính bởi hàm lượng axit galacturonic cao, và nó trở thành một phần của định nghĩa hợp pháp của pectin được dùng như phụ gia thực phẩm hoặc mục đích được phẩm. Các yêu cầu thông thường là ít nhất 65% axit galacturonic trong cơ chất không có tro và hơi ẩm. Pectin thường đến từ một loạt các mô thực vật khác nhau, có thể chứa một vài cấu trúc pectin khác nhau. Nguồn truyền thống của pectin là bột nghiền táo và vỏ cam quýt, cả hai đến từ phần còn lại của công nghiệp nước ép. Giữa các nguồn mới của pectin là củ cải đường và đầu của hoa hướng dương, nhưng chúng không, hiện tại thương mại đáng kể. Chiết pectin, như được thể hiện ở đây, có thể bằng axit hoặc kiềm lỏng, cụ thể với ít nhất là chiết axit. Quy trình chiết cơ bản thu được pectin mức độ este hóa thấp (DE pectin thấp) là kết quả của xà phòng hóa nhóm este, trong khi quy trình chiết axit thường thu được pectin ở mức độ este hóa cao (DE pectin cao), khoảng bằng với DE có trong tự nhiên. DE pectin cao có mức độ este hóa 50% hoặc lớn hơn. DE pectin thấp và DE cao thường có cách sử dụng khác nhau trong sản phẩm thực phẩm, vì chúng gel hóa bởi cơ chế khác nhau. Cả hai đều được bán thương mại.

Trong quy trình chiết axit, vật liệu thực vật được xử lý bằng axit ở nhiệt độ cụ thể nằm trong khoảng từ 70 đến 90°C trong thời gian đủ để loại bỏ lượng mong muốn và lượng pectin từ vật liệu thực vật xenluloza. Phần chiết nước ép từ bước chiết được phân tách từ hỗn hợp phản ứng bằng cách lọc. Lọc chân không trống quay phổ biến trong công nghiệp vì phần đóng bánh rất mềm và khó xử lý. Phần đóng bánh được ép có thể được đặt qua bước chiết lại để chiết nhiều pectin hơn trước khi được lọc và loại bỏ. Pectin được kết tủa từ nước ép được chiết thường bằng kết tủa rượu (metyl, etyl hoặc isopropyl có thể được sử dụng). Loại muối với nhôm clorua được dùng trong quá khứ nhưng quy định mới không cho phép dùng muối đó cho pectin sử dụng trong ngành công nghiệp dược phẩm và thực phẩm (tiêu chuẩn CODEX). Pectin kết tủa được tách riêng từ dung dịch kết tủa bởi sàng lọc hoặc phương pháp khác; nó sau đó được rửa, làm khô và xay tới kích thước của hạt mong muốn. Trong suốt quá trình, pectin có thể trải qua bước trao đổi ion để đặt nó trong dạng natri để dễ sử dụng trong các ứng dụng sản phẩm thực phẩm.

Các phương pháp khác để chiết pectin ngoài chiết axit hoặc kiềm đã được sử dụng với mục tiêu giảm chi phí hoạt động và tăng năng suất chiết mà không mất chức

năng của pectin. Hệ thống áp suất cao có thể cải thiện năng suất pectin mà không phân hủy chuỗi polyme của pectin, sử dụng enzym để phân hủy thành tế bào, sử dụng axit hữu cơ hoặc các kỹ thuật lọc mới như lọc dòng ngang là phương pháp hứa hẹn để chiết pectin theo cách bền vững hơn.

Pectin biệt hóa không chỉ từ nguồn tự nhiên của chúng và loại quá trình chiết, các cải biến khác nhau của cấu trúc phân tử pectin có thể thu được pectin cụ thể với đặc tính nâng cao hoặc duy nhất được áp dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm, nước giải khát và dược phẩm. Pectin có thể được khử este hóa bằng cách hóa học sử dụng axit, kiềm hoặc amoniac. Thay thế cho phương pháp hóa học khử este hóa được thực hiện bằng xử lý bằng enzym. Sự cải biến enzym khác là có thể phụ thuộc vào cấu trúc của phân tử pectin. Trong pectin từ củ cải đường được tìm thấy rằng các nhóm feruloyl este hóa một số đường trung hòa trong chuỗi bên của vùng được gọi là "vùng rậm". Có thể tận dụng lợi thế của các nhóm feruloyl trong pectin (củ cải đường). Cũng có thể liên kết chéo pectin feruloyl hóa được chiết bằng cách thực hiện phản ứng kết đôi. Phản ứng này có thể thu được nhờ enzym bằng cách sử dụng, ví dụ, polyphenol oxidaza, cụ thể là laccaza. Liên kết chéo bị oxy hóa này của pectin có thể thêm tính chất tạo gel vào pectin không có khả năng như vậy. Bởi vì gel dựa trên liên kết hóa học, nó cũng có thể phục hồi liên kết chéo pectin, sau khi làm khô. Các pectin được cải biến có khả năng hấp thụ nước đáng kể. Phần thịt quả cà phê rất giàu polysacharit và có thể là một nguồn tiềm năng của pectin. Phương pháp mới cho biến cải pectin có thể mở ra tiềm năng của thịt quả cà phê, như là nguồn pectin thương mại. Nếu xem xét rằng, phần thịt quả cà phê là một chất thải ô nhiễm với 20 triệu tấn một năm (ước tính từ ICO), tác động của công nghệ này có thể ảnh hưởng đến thị trường pectin. Để có thể chiết pectin từ dòng phụ của cà phê, phương pháp bảo quản phần thịt quả cần phải được tìm thấy và thử nghiệm trong điều kiện trồng cà phê. Khi oxy hóa là quá trình chính sau thu hoạch mà biến đổi sinh khối có sẵn với vấn đề môi trường trong vùng cà phê. Oxy hóa của phần thịt quả cà phê chủ yếu dựa vào phản ứng của polyphenol được xúc tác bởi enzym như peroxidaza nội sinh. Thông tin về các polyphenol từ phần thịt quả cà phê và hoạt tính của polyphenol peroxidaza (PPO) trong quả cà phê là khan hiếm, và không có thông tin về làm thế nào để bảo quản phần thịt quả cà phê tránh bị oxy hóa. Một trong các lí do là, phần thịt quả cà phê chỉ là dòng chất thải của chuỗi cà phê và không sự thay thế công nghiệp nào đang ở vị trí cho sự bình ổn giá của nó. Vấn

đề chính khi sử dụng phần thịt quả cà phê là sự oxy hóa nhanh xảy ra sau hoạt động xay. Mặc dù kiến thức chung rằng oxy hóa xảy ra trong phần thịt quả cà phê, cơ chế của nó chưa được hiểu rõ. Một phần của mục tiêu của nghiên cứu này đi tới phương pháp bảo quản phần thịt quả cà phê bằng cách mà nó có thể được sử dụng trong kế hoạch của kỹ thuật sản xuất nhiên liệu sinh học.

Chiết pectin quy mô phòng thí nghiệm được tiến hành trong thử nghiệm ngoài trời. Tuy nhiên, vật liệu thô trong trường hợp này là quả cà phê tươi. Sau khi thử chiết từ vật liệu tươi, các tác giả sáng chế tiến hành xử lý hóa chất và cơ học thử nghiệm để dừng oxy hóa phần sinh khối. Khi các tác giả sáng chế thu được quá trình bảo quản thích đáng, các tác giả sáng chế sử dụng quy trình để bảo quản thể tích lớn hơn của phần thịt quả cà phê tươi. Với sinh khối được bảo quản, các tác giả sáng chế cố gắng thử tăng quy mô chiết pectin. Các tác giả sáng chế tiến hành phân tích thành phần với các phân đoạn sau chiết khác nhau. Hình rất sơ lược của hạt cà phê được chỉ ra trên fig. 5a, với thành phần đặc trưng về tỉ lệ phần trăm khối lượng, với M chỉ dịch nhầy (4,9% theo trọng lượng), GB chỉ hạt thô (44,7% theo trọng lượng), Pu chỉ thịt quả (44,6% theo trọng lượng), và SS (p) chỉ vỏ lụa (vỏ trấu) (5,8% theo trọng lượng). Các tỉ lệ phần trăm khối lượng này là giá trị đặc trưng mà có thể khác nhau giữa các hạt và giữa các loại hạt cà phê.

#### Phương pháp và vật liệu

##### Chiết quy mô phòng thí nghiệm

Các tác giả sáng chế đã chiết pectin từ phần thịt quả cà phê theo quy trình được phát triển trong phòng thí nghiệm với một số cải biến. Ngắn gọn là, 10g thịt quả tươi được gom và 50ml dung dịch axit nitric 1% được bổ sung và được trộn. Các tác giả sáng chế đã xác nhận độ pH nằm trong khoảng từ 2,0 đến 2,5. Phần thịt quả được chiết trong 3 giờ ở 90°C với khuấy trộn ổn định. Sau khi chiết, huyền phù được làm lạnh tới nhiệt độ phòng và được lọc thông qua vải thưa. Phần đóng bánh được ép sau đó được trộn với 50ml Natri hydroxit 0,1% khác và độ pH được điều chỉnh tới 9,0 bằng kiềm đặc. Huyền phù sau đó được khuấy ổn định trong 1 giờ ở 10 °C. Các tác giả sáng chế điều chỉnh độ pH lần nữa tới 7 và lọc thông qua vải thưa, dung dịch sau đó được gộp chung lại. Độ pH của dung dịch được điều chỉnh (ở đây tới độ pH = 3,5) bằng cách bổ

sung vài giọt NaOH đặc hoặc từng giọt dung dịch axit nitric. Để làm rõ dung dịch, các tác giả sáng chế đã ly tâm chất lỏng được gộp này ở 2500rpm trong 15 phút. Etanol 96% được bổ sung vào chất lỏng với tỉ lệ ba thể tích rượu với mỗi thể tích pectin chiết. Các tác giả sáng chế trộn cẩn thận dung dịch và để nó kết tủa trong 12 giờ ở nhiệt độ phòng. Các tác giả sáng chế đã rửa kết tủa một lần với 100 ml 96% etanol và làm khô với không khí trong 12 giờ. Pectin khô được hòa tan trong 100 ml dung dịch đệm phosphat pH 6,0, pH được xác nhận và 0,1ml dung dịch lacaza (18mg protein mỗi ml) được thêm vào. Các tác giả sáng chế để dung dịch phản ứng được khuấy liên tục trong 12 giờ. Dung dịch sau đó được lọc thông qua giấy Whatman No 2. Dung dịch trong được kết tủa lần nữa với 0,3l 96% etanol và làm khô với không khí. 96% etanol là lớp phân tích. Lacaza được cung cấp ở dạng bột đông khô. Các tác giả sáng chế đã phân tán Lacaza trong 0,01M dung dịch đệm phosphat pH 6,0 và lưu giữ ở 4°C tới khi sử dụng. Mức độ este hóa được đo sử dụng bộ kit Megazyme cho phát hiện pectin. Ngăn gọn, phần thịt quả cà phê, củ cải đường, pectin từ cam quýt methyl este hóa thấp, cam quýt methyl este hóa cao và iota carrageenan được hòa tan trong nước và pH được điều chỉnh tới 12 nhằm xúc tác khử methyl với sự tạo ra vùng polyaxit galacturonic trong polyme. The pectat được ủ với pectat lyaza phân cắt polyaxit galacturonic, giải phóng oligosacharit không bão hòa hấp thụ mạnh ở 235 nm.

#### Thử nghiệm bảo quản

50 kg quả cà phê tươi được thu hoạch trong vùng Cundinamarca Colombia trong tháng 5 năm 2013. Quả cà phê tươi chín được hái tay được vận chuyển tới khu vực phòng thí nghiệm. Khi đến, quả tươi được làm đông ngay ở -20°C để tránh oxy hóa hoặc lên men. Vật liệu được dùng trong hai tuần tiếp theo.

Lacaza được cung cấp ở dạng đông khô. 1g bột chứa 18% protein. Các tác giả sáng chế hòa tan enzym trong 10ml dung dịch đệm phosphat ở pH 6,0 và giữ đông trong một vài lọ. Mỗi lọ là 1ml (18mg protein mỗi ml) và khi tan đông được sử dụng ngay để tránh chu kỳ đông-tan đông.

Cathecol được mua từ Panreac, natri bisulphit, citric và axit nitric ở lớp phân tích. Polyvinyl polyridon PVPP được mua từ nhà cung cấp địa phương và là chất lượng lớp thực phẩm. Màng ống AMICON Spin MWCO 10000 được nhận từ công ty

Millipore. Các tác giả sáng chế tiến hành tất cả phép đo quang phổ với máy quang phổ Pharo 100 (Merck Millipore).

Phương pháp cho phép đo hoạt tính PPO trong phần thịt quả cà phê được mô tả ngắn gọn phía sau: 250g quả cà phê tươi đông lạnh được dầm và hạt với dịch nhầy và vỏ lụa được tách riêng từ phần thịt quả. Tổng lượng thịt quả thu được là 112,70g ở dạng cơ bản tươi (f.b.). Thịt quả này sau đó được xay sử dụng máy trộn cầm tay với 0,4l của dung dịch đệm phosphat 50mM ở độ pH 6,0. Các tác giả sáng chế đã để hỗn hợp được xay lắng trong 10 phút và được lọc. Các tác giả sáng chế đã thu hồi dịch nổi, một lượng 10 ml của dịch nổi được lấy, khoảng 0,1g PVP thương mại không hòa tan được thêm vào. Hỗn hợp được lắc trong khoảng một phút và sau đó được ly tâm trong 15 phút ở 10000 RPM hỗn hợp được giữ ở 4°C trước phân tích.

Các tác giả sáng chế đã lấy 3 ml dịch nổi, thêm nó vào Amicon MCWC của màng 10000 Da và được ly tâm trong 30 phút ở 10000RPM. Quy trình này được lặp lại trong cùng một màng 3 lần. Với 1 ml dung dịch đệm phosphat 50mM pH 6,0, phần còn lại trên màng amicon được rửa ba lần, làm tan và giữ trong lọ hổ phách ở 4°C. Đây là enzym chiết phần thịt quả cà phê (EX). Dung dịch 60 mM của Cathecol được chuẩn bị trong dung dịch đệm phosphat 50mM độ pH 6,0 và được dùng làm cơ chất. Với phép đo, các tác giả sáng chế đã dùng cuvet có chiều dài đường ánh sáng 1cm, 50 ul cơ chất và 50 ul EX được thêm vào 2,9 ml nước cất và hấp thụ tiếp theo ở 420 nm sau 1 giờ, 2 giờ, 12 giờ và 24 giờ.

#### Bảo quản và chiết quy mô lớn

Các tác giả sáng chế đã thu gom phần thịt quả cà phê trong hai mẻ từ hai loại lợi ích khác nhau (quy trình sau thu hoạch). Mẻ đầu tiên 126 kg được thu từ hoạt động của máy xay ướt truyền thống. Trong phương pháp chế biến ướt truyền thống, quả tươi được vận chuyển với nước thông qua máy xát vỏ với tỉ lệ 4 lít nước mỗi kilogram quả tươi. Để loại bỏ nước dư, phần thịt quả được lấy từ đường ống ra máy xát vỏ với bộ lọc. Phần thịt quả sau đó được đặt trong thùng kín (3 thùng mỗi 60L) mà được làm đầy tới 70% tổng thể tích với thịt quả. Thùng sau đó được làm đầy tới đỉnh với dung dịch 1% dung dịch natri bisulphit lớp thương mại, và không khí được dán kín chặt chẽ cho

vận chuyển. Tỷ lệ của dung dịch với thịt quả là khoảng 1 lít dung dịch mỗi kilogram phần thịt quả tươi.

Mẻ thứ hai 96 Kg được thu từ phương pháp hoạt động của máy xay bán ướt (Belcosub hoặc xát vỏ có nước). Trong phương pháp này, vận chuyển cơ học quả tươi thông qua máy xát vỏ không có nước. Sau đó hạt với dịch nhầy đi qua quá trình chà xát, trong đó dịch nhầy được loại bỏ. Phần thịt quả và dịch nhầy được trộn cùng nhau, và được vớt bỏ hoặc được ủ phân. Phần thịt quả từ kiểu có lợi này được thu ngay sau hoạt động xay bằng cách đặt thùng ở đường ra của phần thịt quả. Vì có ít nước hơn trong phần thịt quả với phương pháp truyền thống, thùng được làm đầy chỉ 60% thể tích, và sau đó làm đầy tới đỉnh với dung dịch natri bisulphit 1%. Tỷ lệ dung dịch với thịt quả cao hơn do đóng gói phần thịt quả trong thùng chứa. Tỷ lệ là 0,8l của dung dịch mỗi kilogram thịt quả. Phần thịt quả cả phê thu được và bảo quản trong dung dịch natri bisulphit được kiểm tra định kỳ cho oxy hóa bằng thay đổi trong hấp thụ của dung dịch. Với điều đó, 100 ml dung dịch trong đó phần thịt quả cả phê được tạo huyền phù được lấy mỗi 24 giờ, được ly tâm và hấp thụ của dung dịch đo được ở 420nm.

Đối với việc chiết pectin từ thịt quả tươi được bảo quản, các tác giả sáng chế đã lấy 10 kg sinh khối để loại bỏ nước dư thừa; các tác giả sáng chế đã trộn phần thịt quả với 40L dung dịch axit nitric 1% và xay với máy trộn cầm tay công nghiệp với tốc độ tối đa (18000 RPM) trong khoảng 10 phút. Khi hỗn hợp đã được đồng nhất, các tác giả sáng chế đã đun nóng nó cùng với khuấy liên tục đến 92°C trong 3 giờ. Sau khi làm lạnh, các tác giả sáng chế đã tách chất rắn bằng bộ lọc, và trộn với đất mùn (DIE) làm hỗ trợ lọc theo tỷ lệ 1 kg DIE với mỗi 10L chất lỏng. Các tác giả sáng chế đã lọc huyền phù bằng cách sử dụng khung và đĩa của thiết bị lọc có bề mặt 2,8m<sup>2</sup>. Màng có cỡ lỗ 100µm được cấu tạo từ nylon. Chất lỏng được giữ và bánh được ép để loại bỏ nước dư. Các tác giả sáng chế đã trộn phần bánh dư với 40L NaOH 0,5% và được khuấy ổn định trong một giờ. Huyền phù sau đó được trung hòa (pH 7,0), chất rắn được ép và chất lỏng được lọc sử dụng cùng một hệ thống máy lọc ép và DIE. Các tác giả sáng chế đã trộn cả hai dịch chiết kiềm và axit, điều chỉnh độ pH tới 5,0, đồng hóa và lọc nó một lần nữa để thu được dung dịch trong.

Chất lỏng được lọc là dung dịch pectin thô. Chất lỏng này được trộn với một thể tích ethanol 96% (độ công nghiệp) cho mỗi thể tích của dung dịch. Các pectin được để kết tủa trong 12 giờ. Dung dịch với gel đã được lọc bằng vải thưa; túi lọc được kéo lên cho phép nhỏ giọt dung dịch ethanol thừa trong 24 giờ. Các gel còn lại được sấy khô ở nhiệt độ phòng với luồng không khí (quạt điện). Các pectin khô được hòa tan trong 5L dung dịch đệm phosphat 0,1M và pH 6,0, sau đó 5ml của lacaza (18mg/ml) được bổ sung và các enzym được để ủ trong 12 giờ. Các tác giả sáng chế đã pha trộn các dung dịch pectin được cải biến với một thể tích ethanol 96% và để cho các pectin được cải biến kết tủa trong 24 giờ. Huyền phù pectin với ethanol được lọc qua vải thưa, ép và làm khô bởi dòng không khí ở nhiệt độ phòng. Fig. 5b thể hiện lưu đồ để chiết quy mô 10 kg, với các số chỉ dẫn sau đây.

Bảng 5: số chỉ dẫn của fig. 5b

| Số chỉ dẫn | Nghĩa                       | Số chỉ dẫn | Nghĩa                  | Số chỉ dẫn | Nghĩa                  |
|------------|-----------------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 1.1        | Thịt quả được bảo quản 10 g | 1.12       | Điều chỉnh độ pH       | 1.23       | T=20°C t=12 giờ pH=6,0 |
| 1.2        | Axit nitric 1% 50ml         | 1.13       | Sự lọc                 | 1.24       | Kết tủa rượu           |
| 1.3        | NaOH 0,1% 50 ml             | 1.14       | Dịch lọc               | 1.25       | Sự lọc                 |
| 1.4        | Đồng hóa                    | 1.15       | Bánh                   | 1.26       | Khô                    |
| 1.5        | Chiết axit                  | 1.16       | Phần dư                | 1.27       | Pectin được cải biến   |
| 1.6        | T=90°C t=3 giờ pH=2,0       | 1.17       | điều chỉnh pH đồng hóa | 1.28       | ETOH 96% 400 ml        |
| 1.7        | Sự lọc                      | 1.18       | Kết tủa rượu           | 1.29       | Dung dịch đệm amoni    |



| Số<br>chỉ<br>dẫn | Nghĩa                    |  | Số<br>chỉ<br>dẫn | Nghĩa          |  | Số<br>chỉ<br>dẫn | Nghĩa                      |
|------------------|--------------------------|--|------------------|----------------|--|------------------|----------------------------|
|                  |                          |  |                  |                |  |                  | pH 6,0 50 ml               |
| 1.8              | Bánh                     |  | 1.19             | Sự lọc         |  | 1.30             | Lacaza<br>18mg/ml<br>0,1ml |
| 1.9              | Dịch lọc                 |  | 1.20             | Rửa            |  |                  |                            |
| 1.10             | Chiết kiềm               |  | 1.21             | Tái huyền phù  |  |                  |                            |
| 1.11             | T=10°C t=1 giờ<br>pH=9,0 |  | 1.22             | Phản ứng enzym |  |                  |                            |

### Các kết quả và thảo luận

#### Chiết quy mô phòng thí nghiệm

Đối với việc chiết quy mô phòng thí nghiệm, các tác giả sáng chế đã sử dụng quả cà phê tươi, quy trình chiết được mô tả trong fig. 5b. Quy trình này khác với quy trình được phát triển trước đây ở việc (tùy ý) ép thịt quả tươi trong khi trước đây các tác giả sáng chế đã sử dụng thịt quả đông khô. Quả cà phê tươi có các khác biệt trong thành phần của không chỉ giữa các loài (*Arabica* hoặc *Robusta*) mà còn giữa các giống. Như hầu hết các trang trại cà phê nhỏ trồng hỗn hợp các giống, thành phần cũng có thể thay đổi tùy từng trang trại hoặc với từng vụ thu hoạch. Các thành phần trung bình của quả cà phê tươi được mô tả trong 5a. Để bắt đầu quá trình chiết, bước đầu tiên là tách thịt quả từ hạt khi các tác giả sáng chế sử dụng toàn bộ quả cà phê tươi. Trong các đồn điền cà phê, bước này được thực hiện cơ học bằng cách ép các quả tươi qua sàng mà loại bỏ thịt quả. Bởi vì trong các hoạt động truyền thống quả tươi được vận chuyển với nước, nó có thể là thịt quả thấm nước trong quá trình này. Trong phòng thí nghiệm, hàm lượng nước của thịt quả của quả cà phê tươi là 73% tổng khối lượng. Nhưng đối với bảo quản thịt quả cà phê trong các dung dịch sulfite, hàm lượng

nước là 80%. Để có phần trăm chất rắn trung bình của sinh khối để chiết, đầu tiên các tác giả sáng chế ép thịt quả. Nước ép thu được được trộn với etanol và một số kết tủa nhỏ được tạo thành. Sau khi làm khô kết tủa, các tác giả sáng chế thu được 10mg khối lượng khô, có thể xảy ra nhất pectin tự do hòa tan. Nước ép có hàm lượng pectin thấp vì pectin được gắn chặt chẽ vào thành tế bào, một trong các lý do để tránh xay thịt quả trước khi bảo quản là để giảm bớt mất pectin trong khi ép. Từ 100g thịt quả, 38,6g nước ép được vắt ra. Thịt quả được ép có hàm lượng nước 50%. Khi so sánh với thịt quả từ phương pháp bán ướt, nước ép được vắt từ cùng một lượng thịt quả là chỉ 20g và hàm lượng nước là 41%. Có thể hầu hết các chất nhầy làm tăng thêm khối lượng khô của thịt quả. Sau khi có thịt quả, các tác giả sáng chế đã tiến hành phân tích thành phần. Bảng 6 hiển thị các kết quả của thịt quả cà phê trong điều kiện khô.

Bảng 6: Thành phần của thịt quả cà phê ở dạng cơ bản khô

|                  |       |
|------------------|-------|
| Protein (N*6,25) | 8,2%  |
| Chất béo         | 1,3%  |
| Sợi, thô         | 30,5% |
| Tro              | 5,7%  |
| Hydrat cacbon    | 54,1% |

Sau khi ép, các tác giả sáng chế đã lấy 10g thịt quả để tiến hành chiết pectin như mô tả trong lưu đồ trên fig. 5b. Khi các tác giả sáng chế trộn thịt quả với dung dịch axit, thay đổi đầu tiên là màu sắc của thịt quả. Từ màu vàng nâu đậm do bảo quản bằng sulphit, trở thành màu đỏ tươi. Điều này là có thể xảy ra là do sự thay đổi điện tích của các polyphenol và nó sẽ được thảo luận trong phần bảo quản. Trong quá trình chiết axit là bằng chứng cho làm thế nào thịt quả thấm nước, nếu nhiệt độ không được kiểm soát để tránh bay hơi, thì huyền phù trở nên quá đặc và có thể cháy. Sau khi chiết axit, lọc là một trong các bước quan trọng nhất trong quá trình này. Phương pháp tốt nhất cho đến bây giờ là lọc qua vải thưa. Áp dụng áp suất là cách tốt nhất để loại bỏ càng nhiều càng tốt các chất lỏng đã được ngấm vào sinh khối. Thông thường sau khi

ép, sinh khối có từ 10% đến 15% lượng nước. Tại thời điểm này, các thành phần của phần dư được phân tích, trong Bảng 7 là các kết quả cho sinh khối trong khối lượng khô sau khi thủy phân axit.

Bảng 7: Phần dư của phần thịt quả cà phê sau khi thủy phân axit và lọc

|                  |       |
|------------------|-------|
| Protein (N*6,25) | 16,7% |
| Chất béo         | 2,1%  |
| Sợi, thô         | 27,2% |
| Sợi hòa tan      | 12,1% |
| Tro              | 10,5% |
| Hydrat cacbon    | 40,2% |

Khi tạo huyền phù một lần nữa trong các dung dịch kiềm sự thay đổi màu sắc nhanh chóng có thể nhìn thấy. Màu nâu nhạt đến rất xanh đậm của thịt quả ở bước này phụ thuộc rất nhiều vào độ pH của hệ thống. Tại pH dưới 8,0, thịt quả màu nâu nhạt và độ nhớt của sinh khối là thích đáng. Khi pH được thiết lập ở 9,0, toàn bộ hỗn hợp trở nên nâu đậm và độ nhớt thấp (quan sát). Một trong các lý do để sử dụng dịch chiết kiềm và axit là để đạt được năng suất cao hơn để chiết pectin. Bảng 7 thể hiện rằng dư lượng axit vẫn còn có hàm lượng cao của đường (hydrat cacbon). Điều này chứng minh rằng các điều kiện khắc nghiệt hơn là cần thiết để chiết pectin. Trong các nguồn pectin khác như phần thịt của củ cải đường, nhiều tác giả đã sử dụng phương pháp xử lý có tính kiềm, quy trình bao gồm chiết và khử este trong môi trường kiềm, tiếp theo là rửa axit để loại bỏ tro và sấy khô. Turquois et al đã chứng minh rằng trong điều kiện kiềm, phần thịt của củ cải đường và phần thịt của khoai tây tạo ra sản phẩm chứa cơ chất pectic hàm lượng cao được ước tính trên cơ sở hàm lượng axit galacturonic và sản xuất gel chắc chắn với các ion canxi. Vì quá trình xử lý axit và kiềm đem lại các đặc tính khác nhau và với mục đích tối đa hóa sản lượng cả hai quá trình chiết được thực hiện theo thứ tự. Trong bảng 8 hợp phần của sinh khối, sau khi xử lý kiềm dư lượng axit. Bằng cách so sánh cả hai bảng 2 và 3, rõ ràng rằng lượng hydrat cacbon thấp hơn

sau khi xử lý kiềm. Hơn nữa, hàm lượng sợi và hydrat cacbon là khá gần, điều này có nghĩa rằng hầu hết các polysacarit trong dư lượng kiềm được cấu tạo bởi xenluloza là thành phần chính của sợi thô. Trong cả hai bảng hàm lượng protein là khá cao, dư lượng nitrat từ axit có thể quá ước tính hàm lượng protein.

Bảng 8: Hợp phần trong điều kiện khô của phần thịt quả cà phê sau khi chiết tuần tự bằng axit và kiềm (độ pH 9,0)

|                  |       |
|------------------|-------|
| Protein (N*6,25) | 14,3% |
| Chất béo         | 2,7%  |
| Sợi, thô         | 35,5% |
| Tro              | 8,8%  |
| Hydrat cacbon    | 33,0% |

Sau khi chiết kiềm, dịch lọc được trung hòa và cả hai chất lỏng được gộp lại, một lần nữa độ pH có ảnh hưởng quan trọng đến tính chất của pectin trong dung dịch. Khi độ pH được nâng lên 9,0 và sau đó được trung hòa và kết hợp với dung dịch chiết axit có sự tạo thành của gel dùng ngay được. Trong khi, nếu độ pH được nâng lên 8,0, được trung hòa và gộp chung với dung dịch chiết axit thì sẽ không có sự tạo thành gel. Đây có thể là kết quả của việc khử este hóa phân tử pectin ở độ pH cao. Điều này đem lại mâu thuẫn lớn, nếu pectin từ cà phê được chiết bằng kiềm có thể tạo gel này khi được axit hóa, thì kích thước phân tử là đủ lớn để tạo thành mạng lưới trong hệ thống nước. Đây là hệ quả tất yếu cho các tác giả sáng chế biết rằng pectin được chiết với axit khác với được chiết từ kiềm vì pectin axit không thể hiện độ nhạy canxi hoặc tính chất gel hóa trước khi cải biến enzym.

Khi độ pH được giữ ở 8,0 trong khi chiết kiềm, được trung hòa và được gộp chung với dịch chiết axit, chất lỏng thu được được đồng hóa sau khi trộn. Để loại bỏ polyphenol từ pectin, cần phải kết tủa pectin bằng etanol và sau đó được rửa một vài lần. Sau khi rửa với chất hòa tan, kết tủa được hòa tan trong dung dịch đệm amoni phosphat 0,1M pH 6,0. Lacaza được thêm vào pectin hòa tan với tỉ lệ 0,01:1 gam. Sau

khi phản ứng trong 24 giờ với enzym, dung dịch hiển thị sự thay đổi màu sắc và độ nhớt cao hơn (quan sát) so sánh với dung dịch gốc.

Phần thịt quả cà phê có hàm lượng polyphenol quan trọng. Các tác giả sáng chế đo hàm lượng polyphenol bằng thử nghiệm Folin Ciocalteu với axit tanic như tiêu chuẩn và flavonon bởi phương pháp Vanilin. Các kết quả cho toàn bộ phần thịt quả cà phê ở trong Bảng 9.

Bảng 9: Hàm lượng hợp chất phenol và flavonol trong phần thịt quả cà phê

|           |      |
|-----------|------|
| Phenol    | 1,8% |
| Flavonoit | 1,3% |

Pectin từ cà phê chỉ ra nhiều vùng rậm và nhóm feruloyl. Có thể là các phản ứng xảy ra trong quá trình cải biến enzym có hiệu lực với liên kết chéo oxy hóa của pectin từ cà phê. Màu sắc của dung dịch cũng thay đổi theo sự biến đổi từ sáng đến tối. Gel do đó thu được vài lần rửa cần thiết để loại bỏ màu sắc được hình thành trong quá trình ủ.

Sau khi cải biến, pectin từ cà phê được kết tủa với etanol và được làm khô dưới luồng không khí ở nhiệt độ phòng. Sản lượng từ 10g thịt quả cà phê là 25mg pectin thô. Bảng 10 cho thấy các thành phần của pectin từ cà phê. Bảng 11 biểu diễn sự cân bằng khối lượng của việc chiết quy mô phòng thí nghiệm từ thịt quả cà phê đông khô và thịt quả tươi trong điều kiện khô.

Bảng 10: Hợp phần của pectin từ cà phê sau khi cải biến

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Protein           | 15,2% |
| Sợi hòa tan       | 47,0% |
| Sợi không hòa tan | 0,4%  |
| Tro               | 10%   |
| Flavonon          | 2%    |

|        |    |
|--------|----|
| Phenol | 3% |
|--------|----|

Bảng 11 Cân bằng sinh khối cho mỗi phân đoạn được chiết từ phần thịt quả cà phê đông khô và tươi

| Phân đoạn       | Phần thịt quả đông khô% | Phần thịt quả tươi% |
|-----------------|-------------------------|---------------------|
| Sinh khối khô   | 91                      | 25                  |
| Hydrat cacbon   | 60                      | 54                  |
| Chiết axit      | 21                      | 14                  |
| Chiết kiềm      | 12                      | 7                   |
| Phần dư         | 13                      | 20                  |
| Đường hòa tan * | 14                      | 13                  |

\* Đường hòa tan được tính toán là sự khác nhau của các năng suất với hàm lượng hydrat cacbon.

Để làm sạch pectin, các tác giả sáng chế đã phải rửa một vài lần bằng rượu và metanol, khó khăn hơn khi làm sạch pectin được ủ với lacaza so với pectin không cải biến được chiết. Sau một vài lần rửa bằng etanol và metanol (tinh khiết), các tác giả sáng chế đã thu được gel với màu hồng nhạt. Các tác giả sáng chế đã thu thập gel và làm khô ở nhiệt độ phòng (20°C) dưới luồng không khí trong 24 giờ. Sau khi gel đã khô hoàn toàn, các tác giả sáng chế đã nghiền nó bằng tay trong cối bằng gốm. Các tác giả sáng chế đã gọi đó là pectin từ cà phê được cải biến (MCP). Dịch chiết không có cải biến cũng được rửa bằng dung môi và được làm khô trong điều kiện tương tự, pectin này được gọi là pectin từ cà phê (CP).

Với pectin từ cà phê được cải biến (MCP), các tác giả sáng chế đã đo hàm lượng của dư lượng axit uronic không bão hòa trong polysaccharit pectic. Các phân tích đo hoạt động của lyaza pectin phân cắt liên kết 1-4  $\alpha$  D của axit galacturonic. Khi đó là không bão hòa (không có sự hiện diện của các nhóm methyl hay axetyl) và bằng cách so

sánh với các mẫu pectin được biết hàm lượng của oligosacarit không bão hòa có thể được ngoại suy. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 12 dưới đây:

Bảng 12: Phân tích nồng độ của pectin không bão hòa theo JECFA (Ủy ban chuyên gia về phụ gia thực phẩm của FAO/WHO)

| Polysaccarit                         | Sản phẩm không bão hòa X 10 <sup>-4</sup> M |
|--------------------------------------|---------------------------------------------|
| HECP (pectin từ cam quýt este cao)   | 3,10                                        |
| SBP (pectin từ củ cải đường)         | 2,03                                        |
| MCP (pectin được cải biến từ cà phê) | 0,285                                       |
| CP (pectin từ cà phê)                | 0,476                                       |
| Carrageenan                          | 0,004                                       |

Khối lượng phân tử pectin được tính toán như polyaxit galacturonic với hệ số mở rộng 4600M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

Các kết quả này cho thấy sự khác biệt giữa pectin từ củ cải đường (SBP), MCP và pectin từ cam quýt có este cao (HECP). Giá trị trong bảng càng thấp, polysacarit có vùng tự do càng ít để hình thành liên kết hydro hoặc tương tác với các ion. Điều này có thể giải thích lý do tại sao CP (pectin từ cà phê) và MCP (pectin từ cà phê được cải biến) không gel hóa và do đó nó đem lại khả năng sử dụng các enzym như pectin methyl esterase (PM) hoặc phương pháp xử lý kiềm để khử methyl của polysacarit. Đặc điểm quan trọng khác của MCP là tính không bão hòa của nó là thấp hơn so với SBP, điều này tất nhiên cho thấy rằng mặc dù cả hai đều là pectin, các sản phẩm riêng là khác nhau ở mức phân tử. Hơn nữa, nó cho thấy rằng MCP có tính chất kỵ nước hơn HECP hoặc SBP và nếu tăng hàm lượng protein, ứng dụng của nó như là phụ gia thực phẩm có thể là rõ ràng trong nhũ tương hóa, mà còn trong các ứng dụng hoàn toàn mới khác. Do đó, thực nghiệm xác định này chỉ ra các nguồn chất lượng khác nhau hoặc loại pectin. Nó cho thấy rằng pectin từ cà phê thực sự là khác với pectin từ cam quýt và SBP. Điều này là duy nhất cho keo tan trong nước. Với phân tích trong bảng 12, bộ kit Megazyme để nhận dạng pectin đã được sử dụng, theo quy trình thử nghiệm K-PECID 11/11 (Megazyme International Ireland 2011).

## Bảo quản

Để hiểu sự phát triển quá trình oxy hóa của các hợp chất phenolic có trong thịt quả cà phê, cần phải chiết (các) enzym xúc tác phản ứng trong khi tránh oxy hóa các hợp chất này. Trong các tài liệu trước đó, các tác giả đã chiết và xác định đặc tính của các enzym gây oxy hóa trong lá cà phê và nội nhũ (hạt). Họ phát hiện ra rằng các enzym gây oxy hóa là từ họ peroxidaza polyphenyl PPO (EC 1.10.3.2). Các loại enzym này chứa đồng trong các trung tâm hoạt động của chúng và gây ra hydroxyl hóa monophenol để o-diphenol và quá trình oxy hóa phụ tiếp theo từ o-diphenol đến o-diquinon. Enzym PPO chịu trách nhiệm cho màu hóa nâu bởi enzym trong hầu hết các loại trái cây và thực vật. Màu nâu là kết quả của cả hai quá trình oxy hóa hợp chất phenolic bởi enzym và không bởi enzym. Các sản phẩm oxy hóa ban đầu là quinon, mà nhanh chóng ngưng tụ để tạo ra các hợp chất màu nâu tương đối không tan (melanin). Các yếu tố quan trọng nhất để xác định tỷ lệ màu hóa nâu bởi enzym của các loại trái cây và rau quả là nồng độ của cả hai PPO và các hợp chất phenolic, pH, nhiệt độ và sự sẵn có oxy ở mô thực vật.

Enzym PPO từ cà phê cho hai băng đặc trưng trong SDS-PAGE, các băng kích cỡ 64 và 29 kDa. Các PPO tinh khiết cho thấy ái lực cao với axit chlorogenic, lần lượt là, ( $K_m = 0,14\text{mM}$ ) DOPA ( $K_m = 1,36\text{mM}$ ), catechol ( $K_m = 4,75\text{mM}$ ) và axit pyrogalllic ( $K_m = 6,16\text{mM}$ ). Mặc dù nó đã được dự kiến rằng axit chlorogenic có ái lực hơn với PPO, quá trình oxy hóa của hợp chất này diễn ra nhanh hơn so với phenol khác như catechol. Catechol đã được quyết định sử dụng có điều tiết tốt hơn trong quá trình oxy hóa, hình thành màu sắc của catechol còn được sử dụng bởi các tác giả khác do nó tăng hấp thụ ở 420nm khi bị oxy hóa. Các tác giả sáng chế đã quyết định chiết tất cả các phức hợp enzym của thịt quả và làm theo các quá trình oxy hóa của catechol như cơ chất nền bằng cách sử dụng phần chiết enzym. Khi cô đặc enzym từ thịt quả cà phê, quan trọng khi đề cập rằng các phần còn lại trên màng Amicon là màu nâu đậm. Trong quá trình chiết, PVPP được sử dụng để gắn mono và diphenol mà có thể có trong dung dịch. Sau khi ly tâm, nhiều hợp chất màu được nhìn thấy trong phần chiết thịt quả cà phê được giữ lại, điều này có thể có nghĩa rằng polyphenol được gắn vào phân tử lớn hơn như protein và polysaccarit. Các hợp chất màu không rửa giải qua màng mà nên để cho các phân tử nhỏ hơn 10kDa đi qua. Bởi vì mục tiêu là để kiểm tra



sự ức chế enzym bằng cách bổ sung các chất hóa học (natri bisulphit) hoặc bằng xử lý nhiệt độ trong trường hợp xử lý, các tác giả sáng chế lưu giữ tất cả các kích cỡ enzym có thể mà có thể có ảnh hưởng trong quá trình oxy hóa của các hợp chất polyphenolic. Dịch chiết của enzym được sử dụng như nó được chiết từ màng Amicon, và được tạo huyền phù trong dung dịch đệm phosphat 50mM ở độ pH 6.

#### Ức chế *in vitro*

Để tính toán sự ức chế của quá trình oxy hóa, thay đổi trong hấp thụ sau 24 giờ của dung dịch với enzym và cơ chất được so sánh, với thay đổi của độ hấp thụ của các mẫu với dung dịch Natri bisulphit hoặc khi nhiệt độ được áp dụng. Với ức chế với natri bisulphit, độ hấp thụ của dung dịch chiết enzym giảm mà không cần thêm catechol. Có sự tương tác rõ ràng của dung dịch bisulphit với các hợp chất màu trong phần chiết enzym từ cà phê. Điều này cũng củng cố ý tưởng rằng polyphenol có thể là một phần của các phân tử lớn hơn mà không được tách rửa qua màng Amicon. Hoặc các polyphenol chính là polyme lớn hơn 10kDa. Tương tác của protein và polysacarit với polyphenol như resorcinol và catechol đã được nghiên cứu trong quá khứ. Sự tương tác của albumin huyết thanh bò (BSA) với catechol chỉ ra rằng phức hợp có thể bị đảo ngược, và được thúc đẩy bởi các hiện tượng bề mặt không đặc hiệu. Phức hợp này xảy ra thông qua cả liên kết hydro của các polyphenol với ketoimide ngoại thất, và nhóm phân cực trên protein và tương tác kỵ nước. Các cơ chế này có thể phụ thuộc vào nồng độ protein và độ pH. Nồng độ polyphenol trong thịt quả cà phê là cao. Protein cũng được phân tích trong thịt quả cà phê tươi và đã được tìm thấy là 8% (d.b.) (Bảng 6). Nếu protein từ cùng một phần chiết cà phê đi vào dung dịch khi xay, các polyphenol có thể liên kết với protein. Bởi vì việc chiết diễn ra ở độ pH mà liên kết của polyphenol với protein như BSA là thuận lợi, quá trình liên kết tương tự có thể xảy ra với protein từ thịt quả cà phê.

Mẫu được xử lý nhiệt không có cơ chất đã thể hiện sự hấp thụ tăng, so với cùng loại mẫu không qua xử lý nhiệt. Điều này đã được dự đoán vì nhiệt độ làm tăng tỉ lệ xảy ra quá trình oxy hóa. Trong các mẫu chỉ có cơ chất, cũng có sự gia tăng hấp thụ. Tỷ lệ ức chế đã được làm cho đúng với các thay đổi bằng cách trừ đi độ hấp thụ của dung dịch enzym không có cơ chất, mà có thể được quan sát thấy trong Bảng 13 có độ hấp thụ cao hơn sau 12 giờ ủ ở nhiệt độ phòng (20 ° C).

Bảng 13: Hấp thụ ánh sáng được đo ở 420nm sau 12 giờ cho oxy hóa catechol (cơ chất)

| Xử lý           | Cơ chất trắng (AU<br>(đơn vị hấp thụ)) | Chiết enzym<br>trắng (AU) | Phản ứng oxy<br>hóa (AU) | Ức chế oxy<br>hóa % |
|-----------------|----------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------|
| Không           | 0,072                                  | 0,158                     | 0,385                    | 0%                  |
| Natri bisulphit | 0,063                                  | 0,095                     | 0,083                    | 105%                |
| Nhiệt độ        | 0,137                                  | 0,171                     | 0,184                    | 94%                 |

Hợp chất sulfit có thể được sử dụng để tránh quá trình oxy hóa trong thực phẩm. Như các tác giả sáng chế đã thấy trên fig. 5c, phần chiết enzym từ cà phê oxy hóa catechol, nhưng với sự có mặt của natri sulfit, quá trình oxy hóa dừng lại như được thể hiện ở bảng 13. Phần chiết enzym là hỗn hợp của enzym nội sinh tự nhiên; PPO có mặt trong phần chiết này. Các quá trình oxy hóa của catechol cho thấy phản ứng chính góp phần vào màu nâu của thịt quả cà phê là quá trình oxy hóa xúc tác bởi các PPO.

Nhiệt độ là một phương pháp khác để ngăn chặn màu nâu của các loại trái cây và rau. PPO có thể bị bất hoạt khi nhiệt độ trên 40°C. Như phần lớn các quá trình cho bất hoạt bằng nhiệt được dành cho các loại trái cây tươi và rau, các sản phẩm được mong muốn là tiếp xúc với nhiệt độ cao ít nhất có thể để bảo toàn bề ngoài của sản phẩm. Trong trường hợp của thịt quả cà phê, sự ức chế hóa nâu bởi enzym là mong muốn bảo toàn sinh khối thì các quá trình sau đó mới có thể được áp dụng. Khi bề ngoài hoặc kết cấu của sản phẩm không phải là quan trọng, thịt quả cà phê có thể chịu nhiệt độ cao hơn và thời gian dài hơn. Tuy nhiên, tác động của phương pháp xử lý như vậy với chất lượng cuối cùng của pectin phải được đánh giá. Các tác giả sáng chế quyết định để gia nhiệt phần chiết enzym từ cà phê trong 30 phút và 90 °C, do đó để mô phỏng bước chần bình thường đối với thịt quả, theo cách như vậy không chỉ PPO và các enzym khác cũng như hoạt động của nấm sẽ ngừng lại. Như có thể thấy trong bảng 13, nhiệt độ cũng ức chế hóa nâu bởi enzym, tuy nhiên nó cũng xúc tác quá trình oxy hóa do đó sự thay đổi về độ hấp thụ giữa cơ chất trắng, các enzym trắng và các

mẫu oxy hóa. Độ hấp thụ cao hơn so với các phương pháp sulfite có thể là do quá trình oxy hóa không phải bởi enzyme của polyphenol có trong phần chiết cà phê cũng như các quá trình oxy hóa của catechol bởi sự có mặt của oxy. Trong mọi trường hợp, nhiệt độ có thể được áp dụng cho thịt quả cà phê để ngăn chặn hóa nâu bởi enzyme.

Quy mô bảo quản lớn của phần thịt quả cà phê

Vì dung dịch sulfite đã cho kết quả dương tính với sự ức chế oxy hóa, các tác giả sáng chế sử dụng dung dịch 1% natri bisulphite để ngâm thịt quả thu được từ phương pháp xay ướt.

Trong 24 giờ đầu tiên đã có sự thay đổi về màu sắc của thịt quả từ màu nâu đậm tới màu vàng sáng hơn. Tuy nhiên, không có thay đổi trong độ hấp thụ ở bất kỳ điểm nào ở 420 nm. Màu vàng sáng của dung dịch được ổn định trong suốt phần còn lại của phân tích (15 ngày) sau đó có bằng chứng rõ ràng của quá trình lên men trong thùng chứa. Điều quan trọng là đề cập đến rằng, trong 3 ngày đầu tiên của thử nghiệm thịt quả cà phê mà là ở bề mặt và không ngâm trong dung dịch Natri bisulphite, màu sắc thay đổi (sắc tố màu nâu sẫm), và bị tấn công bởi các loại nấm (có thể là thối trắng bằng phân tích vi sinh, không hiển thị). Tuy nhiên, tất cả các phần còn lại của thịt quả được ngập trong dung dịch tiếp tục để mất sắc tố (từ màu đỏ của quả cà phê tươi sang màu vàng của dung dịch) và không có cuộc tấn công của nấm nào được ghi nhận. Vì vậy, để tiếp tục các thí nghiệm lớp thịt quả oxy hóa đã được gỡ bỏ và trọng lượng đã được áp dụng cho các sinh khối để giữ cho nó ngập trong dung dịch.

Việc sử dụng dung dịch sulfite giải quyết một vấn đề hậu cần rất lớn vì trong dung dịch này thịt quả cà phê có thể được bảo quản trong thời gian lâu hơn. Tuy nhiên, sau một thời gian (20 ngày) thịt quả đã được bảo quản trong dung dịch sulfite bắt đầu lên men. Để giữ sự toàn vẹn của quá trình lên men pectin phải được làm ngừng lại; một cách thức bảo quản tốt hơn phải được thực hiện. Làm khô thịt quả có thể giải quyết các vấn đề của quá trình lên men và giảm chi phí vận chuyển. Các kỹ thuật làm khô có thể được áp dụng cho thịt quả cà phê dựa trên các yếu tố kỹ thuật và kinh tế có thể bao gồm một hoặc nhiều: sấy lò, phơi, sấy hầm, sấy đai và sấy không quay. Đối với máy sấy mẻ một trong các yếu tố hạn chế là tính nén được của thịt quả cà phê. Đối với bốn công nghệ khác khả năng được tính theo sản xuất thịt quả cho nhà máy ướt

quy mô vừa mỗi ngày. Tại đỉnh điểm của mùa, nhà máy kích thước trung bình có thể sản xuất uớt 63,50 tấn thịt quả mỗi ngày, các tác giả sử dụng hàm lượng nước tối đa mà thịt quả có đó là 85%. Vì vậy là cần thiết để loại bỏ 52,16 mét khối nước trong 8 giờ để có được thịt quả cà phê với độ ẩm 10%.

Sấy khô sẽ là chi phí chính trong việc sử dụng sinh khối thịt quả cà phê. Tại thời điểm thịt quả cà phê là được phơi khô dưới luồng không khí không đổi gần với hệ thống sấy khô bằng mặt trời, mất khoảng 8 ngày cho tải trọng 20kg cho mỗi mét vuông. Các tác giả sáng chế đã tìm thấy rằng sau khi chần và ép thịt quả thời gian này được giảm xuống còn 2 ngày ở cùng điều kiện.

Khi thịt quả được lưu trữ trong dung dịch sulfite, sinh khối có thể được vận chuyển, khi để ráo nước và ép, thịt quả không biểu hiện quá trình oxy hóa. Sau khi ráo nước, thịt quả đã được đặt trong khay cho phơi nắng, sau một ngày thịt quả biểu hiện sự tăng trưởng của nấm. Các tác giả sáng chế kiểm tra độ pH của sinh khối và thấy nó là 6,0. Độ pH này là tối ưu cho nấm, đây là lý do tại sao các tác giả sáng chế quyết định điều chỉnh độ pH của sinh khối tới 3,5 ngay trước khi chần. Kết quả là sinh khối chuyển màu sang màu đỏ tươi sáng, và sau nhiều ngày làm khô không có bằng chứng về sự phát triển của nấm hoặc quá trình oxy hóa. Tuy nhiên khi các tác giả sáng chế ép thịt quả, các tác giả sáng chế mất pectin hòa tan, đưa ra xem xét rằng, chần ở độ pH thấp có thể dẫn đến quá trình thủy phân, bảo quản và làm khô thịt quả có thể dẫn đến năng suất thấp của pectin. Các biểu đồ phát triển cho việc bảo quản thịt quả cà phê với quy mô lớn như sau trong fig. 5d với các số chỉ dẫn sau đây.

Bảng 14: số chỉ dẫn của fig. 5d

| Số chỉ dẫn | Nghĩa                  |  | Số chỉ dẫn | Nghĩa                  |
|------------|------------------------|--|------------|------------------------|
| 2.1        | 100 Kg quả cà phê tươi |  | 2.12       | Điều chỉnh pH          |
| 2.2        | Mất 1,26 Kg            |  | 2.13       | Sự tẩy trắng           |
| 2.3        | Loại bỏ phần thịt quả  |  | 2.14       | Ép                     |
| 2.4        | Thịt quả 44,84 Kg      |  | 2.15       | Thịt quả được bảo quản |

| Số chỉ<br>dẫn | Nghĩa                              |  | Số chỉ<br>dẫn | Nghĩa                               |
|---------------|------------------------------------|--|---------------|-------------------------------------|
|               |                                    |  |               | 27 Kg                               |
| 2.5           | Dịch nhầy+vỏ trấu 56,15 Kg         |  | 2.16          | Khô                                 |
| 2.6           | Máy khử dịch nhầy                  |  | 2.17          | Thịt quả được bảo quản<br>khô 10 Kg |
| 2.7           | Vỏ trấu khô của cà phê<br>25,02 Kg |  | 2.18          | NaHSO <sub>3</sub> 1% 44,84 L       |
| 2.8           | Khô                                |  | 2.19          | Axit nitric 20% 0,22 L              |
| 2.9           | Nước 22,96 Kg                      |  | 2.20          | Nước ép 71 L                        |
| 2.10          | Dịch nhầy 8,17 Kg                  |  | 2.21          | Nước 17 Kg                          |
| 2.11          | Bảo quản ngâm Sulphit              |  |               |                                     |

Các quy trình bảo quản cho phép giữ thịt quả ổn định trong thời gian dài, mặc dù sự ổn định của nó và tác động đến chất lượng pectin chưa được đánh giá. Các tác giả sáng chế đã chiết pectin từ vật liệu bảo quản cho kết quả tương tự như vật liệu đông khô. Các tác giả sáng chế chưa kiểm tra hiệu suất của pectin ở bất kỳ đơn xin cấp bằng sáng chế nào.

Chiết pectin quy mô lớn từ phần thịt quả cà phê

Vấn đề đầu tiên khi mở rộng quy mô quy trình này với thịt quả bảo quản ướt là sự đồng nhất của sinh khối với axit. Pha trộn sinh khối cung cấp hỗn hợp thô, tăng năng suất là cần thiết để giảm kích thước hạt của thịt quả. Các tác giả sáng chế cố gắng sử dụng máy đùn thô sơ để đạt được quá trình xay xát thịt quả. Các kết quả là không tốt vì khối thịt quả làm dừng máy đùn rất nhanh. Khả năng giữ nước của sinh khối có thể gây ra vấn đề này. Vì vậy, cách duy nhất để đạt được hỗn hợp tốt là với một máy

xay ngâm. Tuy nhiên, quá trình xay xát thịt quả phải được tối ưu hóa trong tương lai để chiết hoặc thể tích lớn hơn.

Đối với việc chiết quy mô lớn thứ nhất, nguyên liệu ban đầu của các tác giả sáng chế là thịt quả thu được từ quy trình nghiền ướt truyền thống. Thịt quả được bảo quản trong dung dịch sulphit (1%), và không có quá trình oxy hóa được nhìn thấy. Các tác giả sáng chế đã lấy thịt quả với một lưới lọc và ép ra lượng nước đủ để tối đa hóa lượng chất rắn. Nước lọc từ thịt quả thể hiện độ đục. Đây có thể là pectin và vật liệu hòa tan khác ở dạng huyền phù, vì trong quá trình vận chuyển các tác giả sáng chế đã có một ít nước tràn, và không thể làm cân bằng khối lượng với bản thân chất lỏng. Mặc dù, thịt quả được ngâm trong dung dịch sulfit là quan sát được. Khi thịt quả ráo nước được trộn với dung dịch axit, màu sắc của hỗn hợp chuyển sang màu đỏ. Như thảo luận trước đây, điều này có thể là ảnh hưởng của sự thay đổi pH của polyphenol. Khi đun nóng, bùn tách rất nhanh nên việc trộn ổn định là cần thiết để giữ cho các sinh khối tiếp xúc với dung dịch axit.

Các dung dịch đã có một màu đỏ nâu tây sáng, nhưng độ nhớt không cao. Tuy nhiên, tải trọng của các chất rắn lơ lửng thì cao. Độ Brix của dung dịch là 15°. Tính toán độ Brix bởi máy đo chiết xuất là không chính xác, do sự kết tủa của một số các chất rắn theo thời gian. Rõ ràng là có các hạt li ti lơ lửng trong dung dịch, điều này làm hỏng rất nhanh bất kỳ vải thưa hoặc giấy lọc mà các tác giả sáng chế đã thử. Để có được một dung dịch trong các hạt phải được loại bỏ. Ở quy mô phòng thí nghiệm, các tác giả sáng chế loại bỏ tất cả các chất rắn bằng cách lọc qua giấy lọc Whatman # 2 (100µm) bằng cách lọc chân không hoặc với vải. Ở quy mô lớn vải thưa là không hiệu quả và các tác giả sáng chế mất rất nhiều vật liệu.

Với số lượng dung dịch được lọc, quá trình có hiệu quả phải được sử dụng để loại bỏ các hạt. Các tác giả sáng chế đã chọn một bộ lọc tấm ép truyền thống 20cm x 20cm và bảy khung (diện tích lọc 0,28m<sup>2</sup>, Tellarini Pompe Italy). Ban đầu các tác giả sáng chế sử dụng cùng một giấy Whatman # 2 như màng, mà các tác giả sáng chế cũng sử dụng trong phòng thí nghiệm. Thật không may, kết quả là rất thấp, vì giấy lọc đã bị chặn gần như ngay lập tức (hỏng). Để làm cho có khả năng lọc, các tác giả sáng chế thiết kế màng vải tổng hợp có đường kính hạt 100µm tùy chỉnh thực hiện với kích thước ép lọc. Với màng mới được tạo ra, lọc được cải thiện, nhưng chu kỳ hoạt động

vẫn là quá ngắn với ít hơn một lít dung dịch trên mỗi chu kỳ. Các nhà sản xuất màng sau đó khuyên các tác giả sáng chế sử dụng trợ lọc, trong trường hợp này đất mùn (DIE) là vật liệu có hiệu suất tốt nhất. Vì vậy, các tác giả sáng chế trộn lẫn các dung dịch với 1Kg (DIE) cho mỗi 10l của dung dịch. Từ ít hơn một lít mỗi chu kỳ, các tác giả sáng chế tăng hiệu quả đến bảy lít mỗi chu kỳ. Các hạt lơ lửng dính vào DIE và tạo thành vùng lọc trên màng. Sau chu kỳ, bánh được hình thành có thể được rửa sạch cho sự phục hồi của các hạt lơ lửng và DIE. Các tác giả sáng chế thu hồi một phần các hạt lơ lửng và đã làm phân tích thành phần. Các hạt này gồm 23% protein và 51% hydrat cacbon, các hạt này có thể được quan tâm trong tương lai.

Sau khi lọc, nồng độ Brix của dung dịch là 10°. Sau đó, các tác giả sáng chế thêm etanol theo tỷ lệ so với dung dịch 4:1. Các tác giả sáng chế đo tỷ lệ phần trăm etanol với alcoholimeter (tỷ lệ phần trăm trong thể tích/thể tích) và phát hiện ra các dung dịch đã cao hơn giá trị được đề xuất. Điều này có nghĩa là các tác giả sáng chế có thể giảm bớt lượng etanol cho hiệu quả kết tủa, trong các đợt tiếp theo các tác giả sáng chế chỉnh giá trị này chỉ đạt 70%, số tỉ lệ chính xác của etanol là 1:1 thể tích/thể tích.

Sau khi cố định nồng độ etanol và các vấn đề lọc các tác giả sáng chế tiến tới chiết quy mô lớn theo quy trình của lưu đồ trên Fig. 5e với các số chỉ dẫn sau đây:

Bảng 15: số chỉ dẫn của fig. 5e

| Số chỉ dẫn | Nghĩa                            |  | Số chỉ dẫn | Nghĩa                |  | Số chỉ dẫn | Nghĩa                   |
|------------|----------------------------------|--|------------|----------------------|--|------------|-------------------------|
| 3.1        | Thịt quả được bảo quản ướn 10 Kg |  | 3.19       | 30 L chất lỏng       |  | 3.37       | ETOH 96% 3,9 Kg         |
| 3.2        | Đồng hóa                         |  | 3.20       | Axit nitric 1% 40 Kg |  | 3.38       | Sự lọc                  |
| 3.3        | Chiết axit                       |  | 3.21       | DIE 4 Kg             |  | 3.39       | ETOH 70%+Hòa tan 9,9 Kg |

| Số chỉ<br>dẫn | Nghĩa                                |  | Số chỉ<br>dẫn | Nghĩa                                |  | Số chỉ<br>dẫn | Nghĩa                         |
|---------------|--------------------------------------|--|---------------|--------------------------------------|--|---------------|-------------------------------|
| 3.4           | Ép                                   |  | 3.22          | Sự lọc                               |  | 3.40          | Chất rắn 5 Kg                 |
| 3.5           | T=92°C      t=3h<br>pH=2,0           |  | 3.23          | chất rắn được tạo<br>huyền phù 20 Kg |  | 3.41          | Khô                           |
| 3.6           | Bánh 20 Kg                           |  | 3.24          | 14 L                                 |  | 3.42          | Pectin được<br>cải biến 170 g |
| 3.7           | Chiết kiềm                           |  | 3.25          | Điều chỉnh pH<br>đồng hóa            |  |               |                               |
| 3.8           | Điều chỉnh pH                        |  | 3.26          | kết tủa Alcohol                      |  |               |                               |
| 3.9           | Ép khô                               |  | 3.27          | ETOH96%    31,2<br>Kg                |  |               |                               |
| 3.10          | Sự lọc                               |  | 3.28          | Sự lọc                               |  |               |                               |
| 3.11          | chất rắn được tạo<br>huyền phù 34 Kg |  | 3.29          | EOH    70%+Sol,<br>65,2 Kg           |  |               |                               |
| 3.12          | NaOH   0,5%   40<br>Kg               |  | 3.30          | 6 Kg                                 |  |               |                               |
| 3.13          | Khô                                  |  | 3.31          | Đồng hóa                             |  |               |                               |
| 3.14          | Chất rắn 2 Kg                        |  | 3.32          | Dung dịch đậm<br>amonit pH 6,0       |  |               |                               |
| 3.15          | Bánh 4 Kg                            |  | 3.33          | phản ứng enzym                       |  |               |                               |
| 3.16          | DIE 4 Kg                             |  | 3.34          | T=20°C   t=12 giờ<br>pH=6,0          |  |               |                               |
| 3.17          | T=10°C   t=1 giờ<br>pH=9,0           |  | 3.35          | Lacaza 18 mg/ml<br>1 ml              |  |               |                               |



| Số chỉ<br>dẫn | Nghĩa          |  | Số chỉ<br>dẫn | Nghĩa           |  | Số chỉ<br>dẫn | Nghĩa |
|---------------|----------------|--|---------------|-----------------|--|---------------|-------|
| 3.18          | 26 L Chất lỏng |  | 3.36          | kết tủa alcohol |  |               |       |

Với thông tin về cân bằng khối lượng, các tác giả sáng chế tính toán sản lượng chiết từ thịt quả bảo quản ướt, có tính rằng thịt quả ướt là 75% độ ẩm, tổng hàm lượng chất rắn chỉ là 2,5 kg. Sau khi làm khô gel cuối cùng, pectin có khối lượng chỉ là 170g. Điều này đem lại cho các tác giả sáng chế chỉ có 6,8% sản lượng. Bằng cách cải biến các quy trình, các thiệt hại rõ ràng nhất của polysacarit có thể là trong các bước lọc. Các chất rắn được tạo huyền phù có hàm lượng protein và hydrat cacbon cao như đã đề cập trước đây. Tuy nhiên, các hạt không hòa tan ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 7,0 mà là độ pH để ổn định pectin. Yếu tố khác làm giảm năng suất là việc chiết chất rắn hòa tan. Trong phòng thí nghiệm, các tác giả sáng chế đo hàm lượng chất rắn hòa tan trong nước nhưng không hòa tan trong rượu (Sợi hòa tan bảng 7), phương pháp phân tích này làm đúng hàm lượng protein (AOAC 985.29 ấn phẩm lần thứ 18) và giá trị của nó là khoảng tốt của hàm lượng của vật liệu pectic. Sản lượng 170g pectin từ 10Kg thịt quả ướt (6,8% trong điều kiện khô) là ít hơn một nửa của chất xơ hòa tan (12%) trong thịt quả cà phê. Cũng rất quan trọng để đề cập đến là màu của pectin được chiết rất tối, có thể chỉ ra sự có mặt của flavonol làm giảm hàm lượng đường trong tổng khối lượng. Phần lớn công việc vẫn được thực hiện trong quá trình chiết và tinh chế pectin từ thịt quả cà phê.

Khả năng tái sản xuất của phương pháp trong phòng thí nghiệm để chiết pectin từ thịt quả cà phê đã được thử nghiệm và kết quả đồng nhất với quá trình chiết trước đây. Mặc dù phương pháp này có thể tái sản xuất, vẫn còn nhiều cải thiện về thông số kỹ thuật chiết và lọc để tăng năng suất, phương pháp mới để chiết pectin sử dụng trong các thiết bị nhà máy khác như chiết nổi hơi nước, lò vi sóng hoặc áp suất cao có thể nâng cao năng suất của pectin. Khía cạnh khác để nghiên cứu còn là tinh chế pectin. Vì thịt quả cà phê có số lượng polyphenol, là cần thiết để tìm cách loại bỏ chúng để pectin có thể được sử dụng trong các ứng dụng thực phẩm mà không thay đổi màu sắc.

Để tránh quá trình oxy hóa nhanh chóng của thịt quả cà phê, các tác giả sáng chế có thể sử dụng dung dịch natri sulfit để thu thập và lưu trữ sinh khối. Dung dịch sulfit thể hiện tác dụng chống oxy hóa khi áp dụng cho thịt quả cà phê. Phương pháp này có thể được tăng quy mô một cách nhanh chóng và có vẻ là có hiệu quả chi phí cho sinh khối số lượng lớn. Các tác giả sáng chế cũng làm ráo nước và khô sinh khối để tránh quá trình lên men. Sau khi sấy, thịt quả là ổn định và có thể được vận chuyển khắp mọi nơi mà quá trình chiết được thực hiện. Chất lượng và tính ứng dụng của pectin từ cà phê được chiết từ thịt quả được bảo quản và sấy khô cần được kiểm tra trong tương lai để xác nhận tính hữu ích của phương pháp này.

Trong khi mở rộng quy mô của quy trình này, các tác giả sáng chế gặp một số trở ngại cần chú ý trong việc tối ưu hóa trong tương lai. Một trong các vấn đề chính là năng suất thấp của pectin, mà các tác giả sáng chế nhận được từ thịt quả cà phê (bảo quản) tươi. Ngoài ra còn có nhiều vấn đề kỹ thuật trong các phương pháp lọc nơi mà thiệt hại xảy ra là rất quan trọng. Cuối cùng, cần đặt chú ý nhiều hơn vào việc tinh chế pectin đã được chiết. Trọng tâm chính ngay bây giờ nên tìm ra quá trình tối ưu để chiết và tinh chế mà tránh việc sử dụng dung môi.

Tính chất tạo gel của pectin từ cà phê thu được theo sáng chế tốt một cách đáng ngạc nhiên và được so sánh với các chất tạo gel khác. Thậm chí, tính chất tạo gel đường như tốt hơn so với gum arabic, khi so sánh ở cùng nồng độ. Tương tự như vậy, cũng có thể, các thuộc tính tạo gel của pectin từ cà phê như được mô tả trong tài liệu này, là đáng kể hơn so với pectin từ củ cải đường (ở cùng nồng độ). Nó còn xuất hiện rằng không cần xử lý bằng enzym theo sáng chế, cải biến enzym hơn nữa của pectin từ cà phê là rất khó, thậm chí không thể. Do đó, đáng ngạc nhiên là bản thân cải biến enzym của pectin từ cà phê là rất khó khăn hoặc thậm chí không thể, trong khi đó với các pectin khác là không có vấn đề. Chỉ sau khi áp dụng quy trình theo sáng chế, bao gồm chiết axit và cải biến enzym, có thể tiếp tục cải biến enzym với các enzym khác.

Các nguồn pectin khác nhau có các đặc điểm phân tử khác nhau và mức độ methyl hóa, hoặc axetyl hóa khác nhau. Theo như các tài liệu kỹ thuật có liên quan trước đây, chỉ pectin chiết từ củ cải đường có thể thể hiện este feruloyl gắn với cấu trúc pectin. Tuy nhiên, theo sáng chế, được phát hiện ra một cách bất ngờ rằng pectin được chiết bằng quy trình được mô tả trong bản mô tả này từ thịt quả cà phê thể hiện

sự có mặt của hợp chất phenol (axit ferulic là hợp chất phenol còn được gọi là axit cinamic). Ngoài ra, hợp chất phenol được gắn với phân đoạn có trọng lượng phân tử cao hơn của vật liệu thành tế bào không tan trong rượu, tan trong axit của thịt quả cà phê. Chỉ pectin với nhóm feruloyl có thể được liên kết chéo bằng enzym sử dụng enzym như lacaza theo quy trình theo sáng chế. Pectin từ cam quýt hoặc pectin từ táo không thể hiện nhóm feruloyl gắn với nhánh trung hòa của các phân tử. Phân tử pectin có thể được xem như xương sống của axit galacturonic (vùng mịn hoặc HG) gắn liền với cấu trúc nhánh bao gồm rhamnoza, arabinoza và galactoza unitit (vùng rậm hoặc RG). Nhóm methyl và nhóm axetyl được gắn vào phân đoạn của axit galacturonic, trong khi nhóm feruloyl chỉ được tìm thấy trong các chuỗi bên trung hòa. Tại độ pH cao hơn, nhóm methyl có thể được thủy phân từ xương sống pectin. Các nhóm axetyl cần điều kiện khắc nghiệt để được thủy phân (ví dụ độ pH cao và nhiệt độ cao hơn). Tại độ pH cao, cấu trúc pectin được phá vỡ thông qua cơ chế loại bỏ beta, mà chỉ ảnh hưởng đến phân đoạn galacturonic mà không có các nhóm phụ khác. Tóm lại, ở độ pH cao, nhóm methyl được thủy phân và khu vực mịn bị chia cắt ở các vị trí mà không có các nhóm phụ khác. Khi cải biến enzym xảy ra, đặc biệt là nó có thể xảy ra thông qua các chuỗi bên trung hòa trong vùng RG. Điều này đem lại phân tử mới với DM thấp hơn và DA cao hơn. Liên kết chéo bởi enzym của pectin chỉ có thể xảy ra khi nhóm feruloyl có mặt trong phân tử. Từ tài liệu, các tác giả sáng chế biết rằng chỉ có pectin từ củ cải đường và bây giờ là pectin từ cà phê thể hiện kiểu nhóm này trong cấu trúc pectin của chúng. Các phản ứng liên kết chéo được xúc tác đặc biệt ví dụ bởi PPO (polyphenyl peroxidaza) mà chứa peroxidaza cải dầu và lacaza. Do đó công nghệ dựa trên cả loại enzym được sử dụng và nguồn gốc của pectin. Cấu trúc pectin từ củ cải đường thể hiện cấu hình loại RGI trong đó RG có khoảng từ 49 đến 59 mg/g chất khô và tối đa là 656 mg/g chất khô của axit galacturonic khi khử este hóa sử dụng PME thực vật, trong khi so với pectin từ cà phê RG chỉ có 10 mg/g chất khô và axit galacturonic có 281 mg/g chất khô. Do đó, pectin từ cà phê về cơ bản không giống với pectin từ củ cải đường về mặt cấu trúc. Hơn nữa, pectin từ cà phê có mức độ axetyl hóa cao hơn so với pectin từ củ cải đỏ. Trong quá trình thu pectin từ cà phê, hàm lượng polyphenol trong cả hai phần chiết là rất cao, đã được chứng minh ở quy mô phòng thí nghiệm là nếu không có xử lý bất kỳ để làm giảm polyphenol hoạt hóa trong phần chiết pectin, về cơ bản không có phản ứng enzym diễn ra. Phản ứng duy nhất

được thực hiện mà không có hạn chế bất kỳ là liên kết chéo oxy hóa của pectin. Vì vậy, cần có thể cải biến pectin bằng enzym trong chất nền của cà phê (pectin từ cà phê) để loại bỏ giữa các tanin khác hoặc làm cho chúng phản ứng như được mô tả trong bản mô tả này. Nếu không có lacaza và/hoặc oxidoreductaza, có thể không thực hiện được các phản ứng enzym khác với pectin từ cà phê.

Như kết luận thử nghiệm, pectin từ cà phê có thể được chiết từ thịt quả cà phê với sản lượng cao. Ngoài ra, pectin từ cà phê có thể được cải biến về mặt hóa học hoặc enzym để sản xuất pectin có tính chất tạo gel sử dụng được. Polyphenol trong pectin chiết thể hiện thay đổi bước sóng hấp thụ (quang học) theo độ pH tăng lên, và điều này thể hiện chắc chắn sự có mặt của polyphenol trong mạng phức hợp như flavonoid. Chuỗi bên trung hòa do đó có thể feruloyl este hóa hợp lý trong cấu trúc.

Pectin có bán trên thị trường được đặc trưng bởi hàm lượng cao của axit polygalacturonic, định nghĩa hợp pháp cho pectin được sử dụng như chất phụ gia thực phẩm hoặc cho các mục đích được đòi hỏi phải có ít nhất 65% của tro và nồng độ ẩm tự do là axit galacturonic. Yêu cầu này hạn chế nguồn pectin thực phẩm và được phẩm tiềm năng. Sự khác biệt về axit galacturonic giữa các nguồn pectin có liên quan chủ yếu đến sự khác biệt về nồng độ của đường trung hòa mà là một phần của arabinana lớn, phân tử và gốc galactan.

Các đặc tính được biết đến nhiều nhất của pectin là nó tạo ra gel với đường và axit. Điều này có thể được xem như là sự khử nước một phần của phân tử pectin đến mức độ mà nó là thể trung gian giữa dung dịch và kết tủa. Cấu trúc đặc biệt của pectin đặt ra một số hạn chế cụ thể. Pectin metoxyl cao, không giống như alginat, không chứa nhóm axit đủ để gel hóa hay kết tủa với ion canxi. Tại độ pH ngay trên giá trị pK cho các nhóm axit, phân tử có điện tích âm đủ để ngăn chặn sự gel hóa trong điều kiện thực tế ở hệ nước đường. Vì độ pH giảm dần, pectin có khả năng tạo thành gel đầu tiên ở hàm lượng đường cao (khoảng 80% trong quy mô độ Brix) và với hàm lượng đường thấp dần khi độ pH giảm.

Một trong các biến thể thương mại của cấu trúc pectin là mô hình axetyl hóa và metyl hóa do các mối quan hệ của giá trị này với các hành vi gel hóa. Axit galacturonic ở dạng polyme hóa, có khả năng thể hiện nhóm metyl gắn vào nhóm

carboxylic. Phần trăm metyl hóa được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ của nhóm metyl với mỗi mol axit galacturonic có trong pectin. Thật vậy một trong các đặc tính thương mại của pectin là mức độ metyl hóa DM. Mức độ metyl hóa ngăn cách giữa pectin thiết lập nhanh và pectin thiết lập chậm. Tại giá trị độ pH thấp hơn 3,0 pectin thiết lập rất nhanh với mức độ este hóa trên 72% sẽ tạo thành dạng gel với 55% hoặc ít hơn đường. Pectin thiết lập chậm là sản phẩm của quá trình thủy phân nhẹ nhóm este đến mức độ nằm trong khoảng 58% -65% DM, và do đó mang nhiều điện tích hơn ở độ pH đã nêu. Hậu quả là độ bền gel và đường cong nhiệt độ thiết lập được đưa tới độ pH thấp hơn. Các pectin này được dùng ở nơi cần nhiệt độ thiết lập thấp hơn, hoặc nếu không là nơi mà tỷ lệ thiết lập sẽ là quá cao vì chất rắn đường của sản phẩm tăng. Pectin metoxyl thấp được sản xuất bởi khử este hóa đến điểm mà ít hơn 50% tổng số các nhóm carboxyl được este hóa. Nếu quá trình này được thực hiện bằng cách sử dụng axit hoặc kiềm, sự cân bằng tồn tại dưới dạng nhóm axit tự do; các pectin này được gọi là pectin metoxyl bậc thấp thông thường hoặc không được amit hóa. Ngoài ra, pectin có thể được cho phản ứng với amoniac, thường là do phản ứng không đồng nhất trong huyền phù rượu. Phản ứng này sản xuất pectin amit hóa chứa nhóm amit axit ngoài nhóm este axit. Cả hai loại pectin metoxyl bậc thấp được cho là gel trong cơ chế hộp-trứng với ion canxi.

Kết luận là, pectin có thể được cải biến bởi enzym để đáp ứng độ metyl hóa và axetyl hóa đặc hiệu như pectin từ cà phê được mô tả trong bản mô tả này, cho phép đáp ứng các loại đặc tính thiết lập khác nhau cũng như các hành vi khác nhau khi bị gel hóa, do đó pectin thu được với quá trình này có thể được phù hợp cho các ứng dụng khác nhau.

Do đó, sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất sản phẩm dựa trên pectin bao gồm sử dụng phần chiết pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol có thể đạt được bởi quá trình như được xác định trong bản mô tả này (và/) hoặc phần chiết pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol được xác định trong bản mô tả này và xử lý phần chiết pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol cùng với một hoặc nhiều thành phần khác tạo thành các sản phẩm dựa trên pectin. Ví dụ, sản phẩm dựa trên pectin có thể bao gồm sản phẩm thực phẩm. Theo phương án khác, sản phẩm dựa trên pectin bao gồm sản phẩm dược. Theo phương án khác, sản phẩm dựa trên pectin bao gồm sản phẩm dinh dưỡng. Thuật ngữ "sản phẩm dựa trên pectin" có thể liên quan

tới sản phẩm bất kỳ bao gồm phần chiết pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol, thậm chí khi lượng là thấp. Một hoặc nhiều thành phần khác có thể lần lượt là thành phần khác bất kỳ cần thiết để tạo ra sản phẩm thực phẩm, dược phẩm, dược phẩm dinh dưỡng này.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình xử lý phần thịt quả cà phê bao gồm:
  - a. cung cấp phần thịt quả cà phê, có thể thu được từ quy trình sản xuất để tạo ra hạt cà phê thô từ quả cà phê tươi;
  - b. chiết phần chiết chứa pectin từ phần thịt quả cà phê để cung cấp phần chiết chứa pectin, trong đó:
    - (i) phần thịt quả cà phê được đưa vào bước chiết thứ nhất ở điều kiện axit, thu được sản phẩm chiết thứ nhất và sản phẩm dư, trong đó sản phẩm dư còn được đưa vào bước chiết thứ hai ở điều kiện kiềm, thu được sản phẩm chiết thứ hai và sản phẩm dư thứ hai, và trong đó từ bước chiết thứ hai này thu được sản phẩm chiết thứ hai được kết hợp với sản phẩm chiết thứ nhất còn lại từ bước chiết thứ nhất, và trong đó các sản phẩm chiết pectin được kết hợp này sau đó còn được đưa vào xử lý bằng enzym ở giai đoạn c, hoặc
    - (ii) phần thịt quả cà phê được đưa vào bước chiết thứ nhất ở điều kiện kiềm, thu được sản phẩm chiết thứ nhất và sản phẩm dư, trong đó sản phẩm dư còn được đưa vào bước chiết thứ hai ở điều kiện axit, thu được sản phẩm chiết thứ hai và sản phẩm dư thứ hai, và trong đó từ bước chiết thứ hai này thu được sản phẩm chiết thứ hai được kết hợp với sản phẩm chiết thứ nhất từ bước chiết thứ nhất, và trong đó các sản phẩm chiết pectin được kết hợp này sau đó còn được đưa vào xử lý bằng enzym ở giai đoạn c;
  - c. xử lý bằng enzym phần chiết chứa pectin, trong đó việc xử lý bằng enzym bao gồm xử lý với một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm gồm esteraza và reductaza, để cung cấp vật liệu pectin được xử lý bằng enzym, trong đó reductaza là oxidoreductaza, trong đó việc xử lý bằng enzym bao gồm ít nhất xử lý với oxidoreductaza; và
  - d. chiết phần chiết chứa pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol từ vật liệu pectin được xử lý bằng enzym.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó việc xử lý bằng enzym bao gồm ít nhất xử lý với một hoặc nhiều oxidoreductaza được chọn từ nhóm gồm EC 1.10 hoặc EC 1.11.
3. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó điều kiện axit của bước chiết thứ nhất ở điều kiện axit là ở độ pH nằm trong khoảng 0,5-4, trong đó bước chiết thứ nhất được tiến hành ở nhiệt độ ít nhất 80°C, trong đó điều kiện kiềm ở bước chiết thứ hai ở độ pH nằm trong khoảng 8-14, và trong đó oxidoreductaza được chọn từ nhóm gồm diphenol oxidoreductaza, peroxidaza, lacaza, và esteraza được chọn từ nhóm gồm pectin-esteraza, metyl-esteraza, poly galacturanaza, polyglucanaza nội sinh, và polyglucanaza ngoại sinh.
4. Quy trình theo điểm 3, trong đó trong bước chiết thứ nhất, chất lỏng chiết thứ nhất được áp dụng chứa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-2, trong đó điều kiện kiềm ở bước chiết thứ nhất là ở điều kiện kiềm ở độ pH nằm trong khoảng năm 8-14, trong đó điều kiện axit của bước chiết thứ hai ở độ pH nằm trong khoảng 0,5-4, trong đó bước chiết thứ hai được tiến hành ở nhiệt độ ít nhất là 80°C, và trong đó oxidoreductaza được chọn từ nhóm gồm diphenol oxidoreductaza, peroxidaza, lacaza, và esteraza được chọn từ nhóm gồm pectin-esteraza, metyl-esteraza, poly galacturanaza, polyglucanaza nội sinh, và polyglucanaza ngoại sinh.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số điểm 3 hoặc điểm 5, trong đó bước chiết ở điều kiện axit ở độ pH nằm trong khoảng 1,5-3 và/hoặc trong đó bước chiết ở điều kiện kiềm ở độ pH nằm trong khoảng từ 9-11.
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trước khi chiết, phần thịt quả cà phê được đưa vào quy trình rửa, trong đó quy trình rửa bao gồm việc trộn phần thịt quả cà phê với dung môi và tiếp theo là loại bỏ ít nhất một phần của dung môi, trong đó hàm lượng nước của dung môi là  $\leq 80\%$  theo trọng lượng.
8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trước khi chiết phần thịt quả được đưa vào quá trình bảo quản, trong đó quá trình bảo quản bao gồm một hoặc nhiều trong số (i) bổ sung chất bảo quản vào phần thịt quả và (ii) làm khô phần thịt quả.



9. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chiết phần chiết chứa pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol từ vật liệu pectin được xử lý bằng enzym bao gồm việc trộn ít nhất một phần của vật liệu được xử lý bằng enzym với chất lỏng chiết và tiếp theo là loại bỏ ít nhất một phần của pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol, trong đó chất lỏng chiết có độ pH nằm trong khoảng 4-6.
10. Pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol có tỉ lệ phân tử của nhóm phenolic trên tổng của đơn vị arabinoza cộng với galactoza là nằm trong khoảng từ 20% đến 60%, và có khối lượng phân tử  $> 90000$  Da.
11. Pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol có mức độ metyl hóa (DM)  $> 75\%$  và mức độ axetyl hóa (DAc)  $> 75\%$ .
12. Pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol theo điểm bất kỳ trong số các điểm 10-11, trong đó hàm lượng protein nằm trong khoảng 5-18% theo trọng lượng và trong đó hàm lượng polyphenol nằm trong khoảng 0,06-0,18% theo trọng lượng.
13. Pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol theo điểm bất kỳ trong số các điểm 10-11, có khối lượng phân tử trong khoảng 90000-120000 Da, có tổng hàm lượng đường rhamnoza, arabinoza, xyloza, mannoza, galactoza, glucoza, axit galacturonic, tính trên tổng hàm lượng đường, nằm trong khoảng 70-95% theo trọng lượng, với tổng hàm lượng axit galacturonic, tính trên tổng hàm lượng đường, nằm trong khoảng từ 55 đến 80% theo trọng lượng, và có tổng hàm lượng glucoza, tính trên tổng hàm lượng đường, nằm trong khoảng 3-15% theo trọng lượng.
14. Quy trình sản xuất sản phẩm dựa trên pectin bao gồm sử dụng phần chiết chứa pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm 10-13 và xử lý phần chiết chứa pectin từ cà phê được thêm nhóm chức polyphenol cùng với một hoặc nhiều thành phần khác tạo thành sản phẩm dựa trên pectin.
15. Quy trình theo điểm 14, trong đó sản phẩm dựa trên pectin bao gồm sản phẩm thực phẩm, sản phẩm dược hoặc sản phẩm dinh dưỡng.

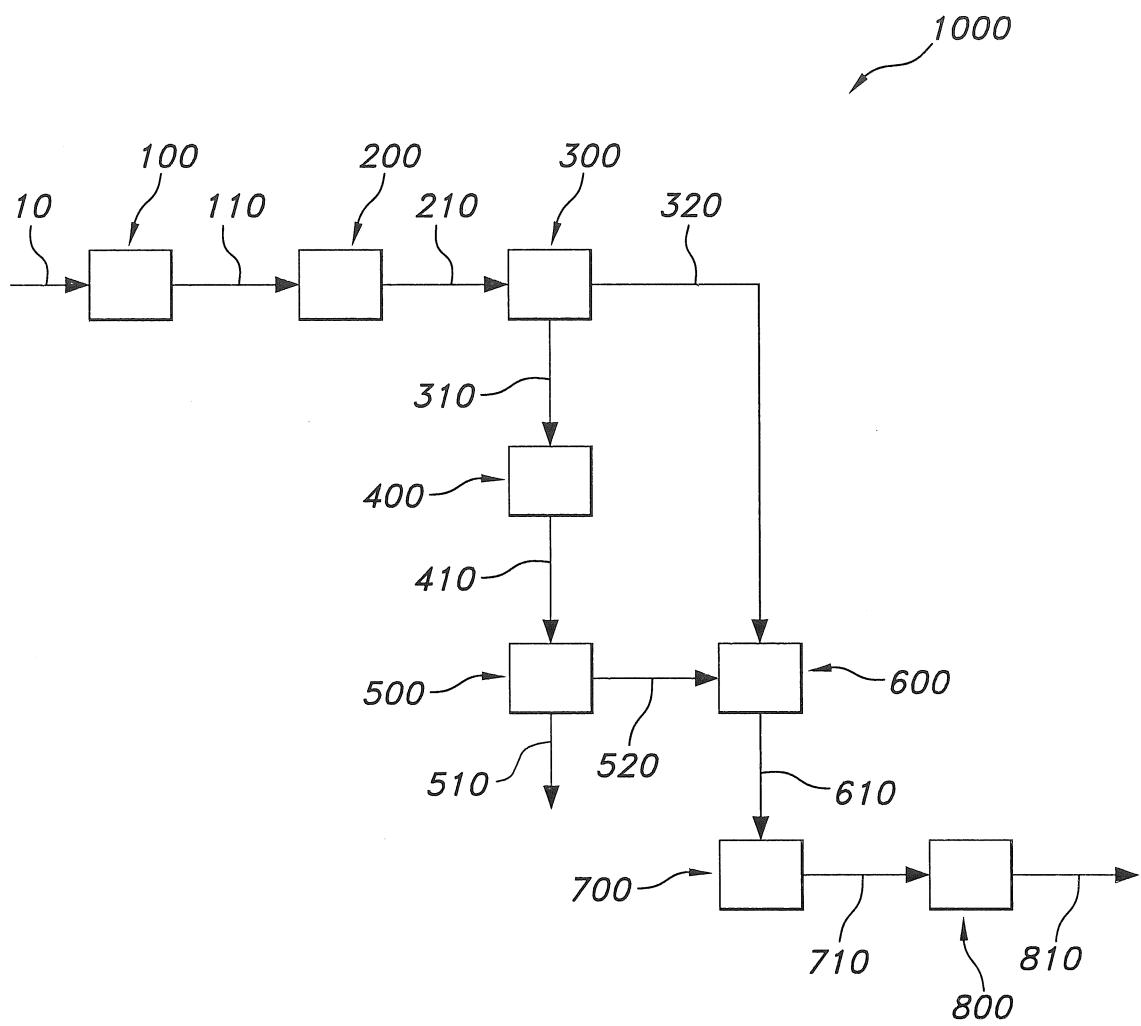


FIG. 1

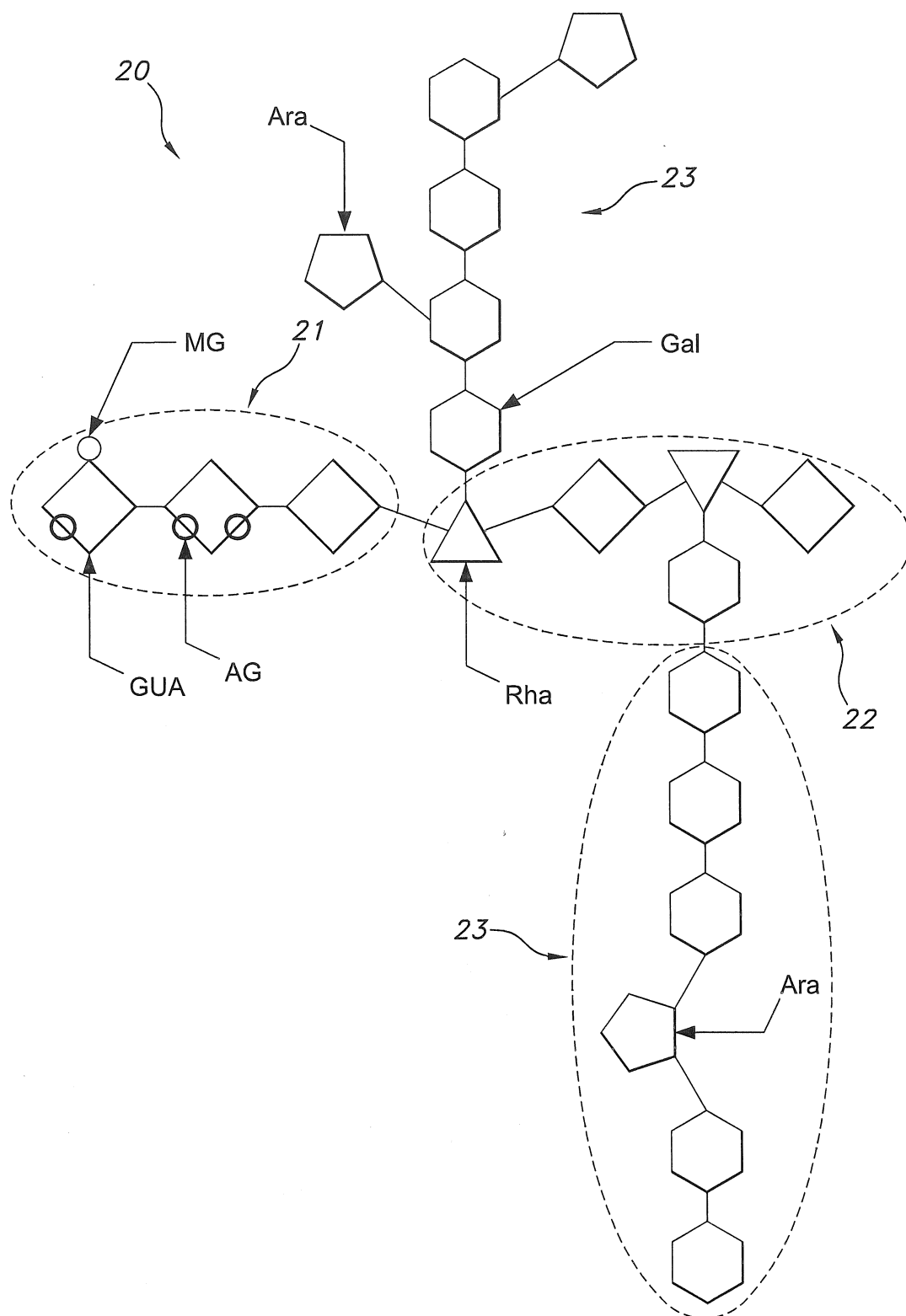


FIG. 2a

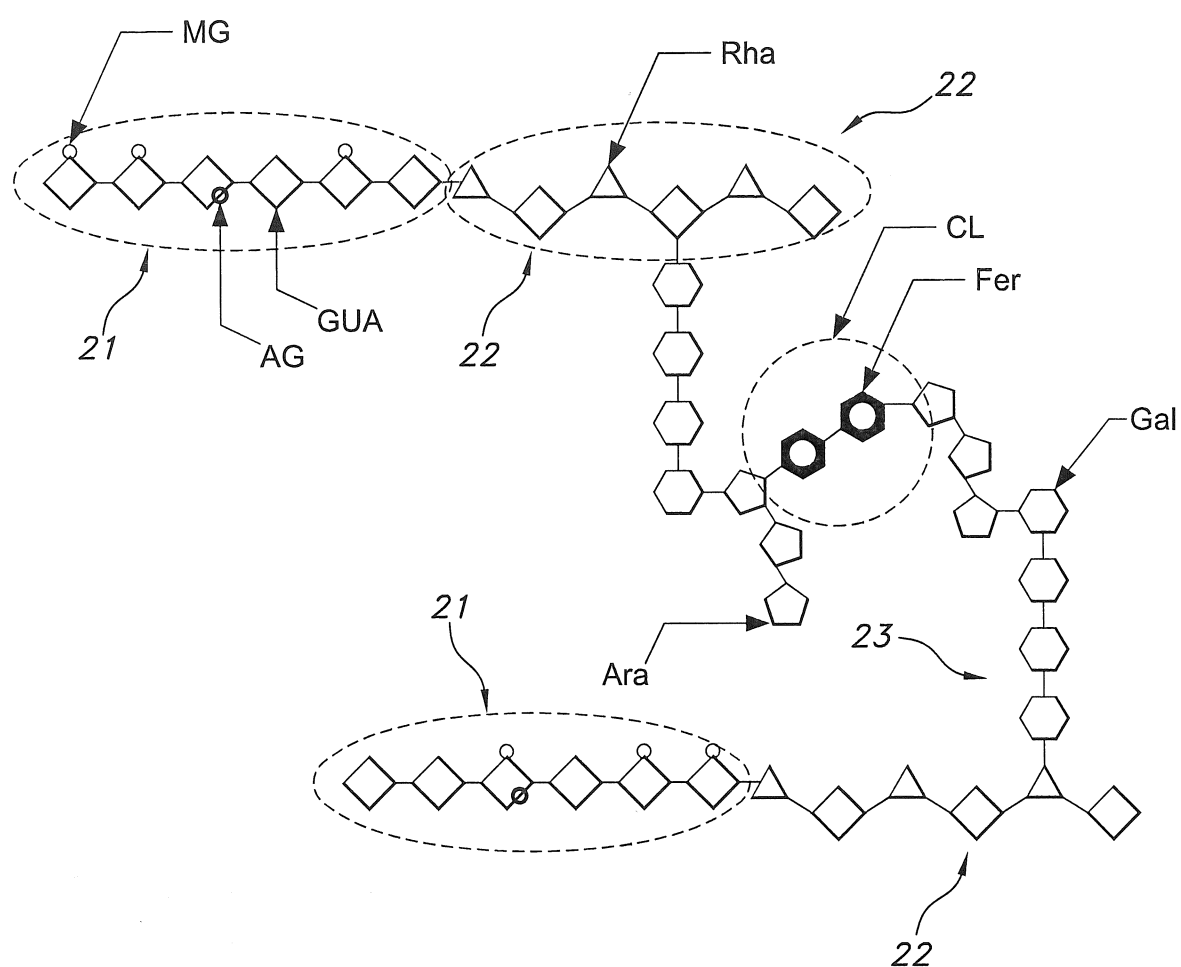


FIG. 2b

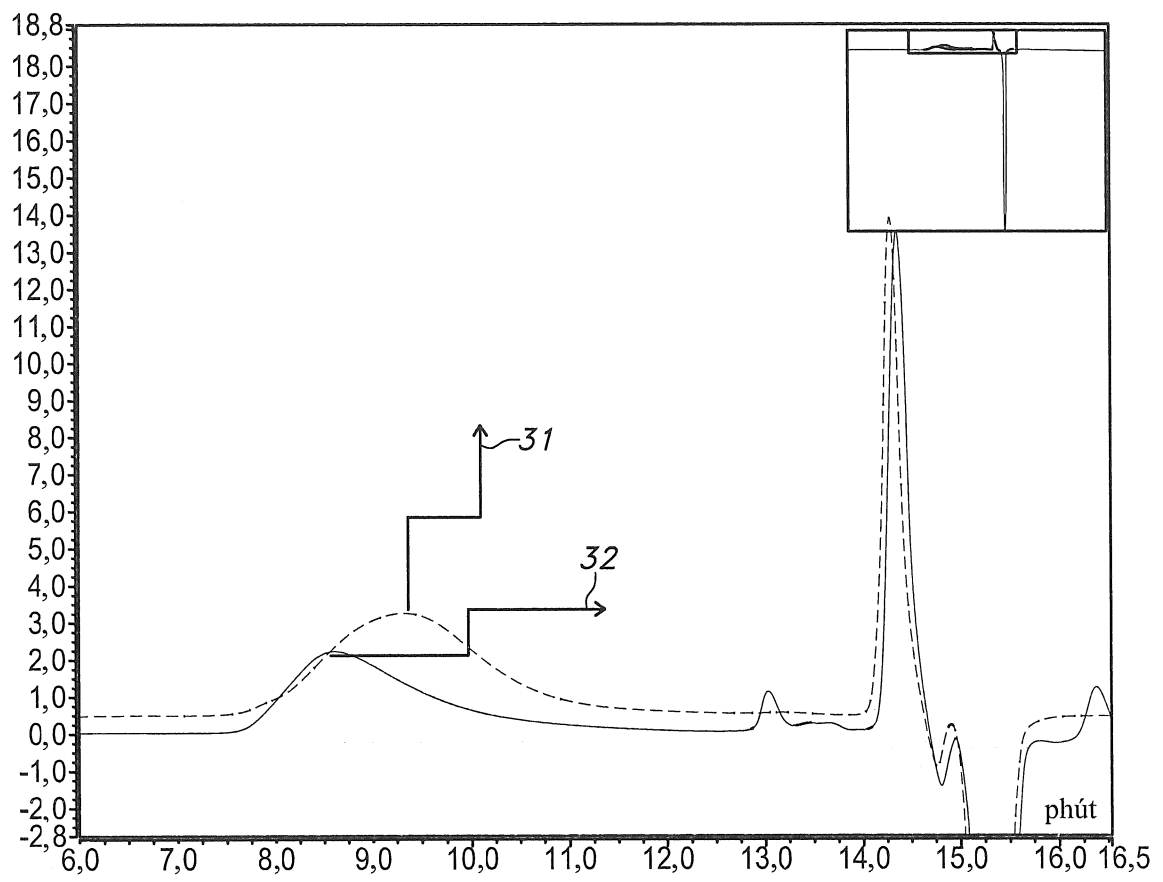


FIG. 3

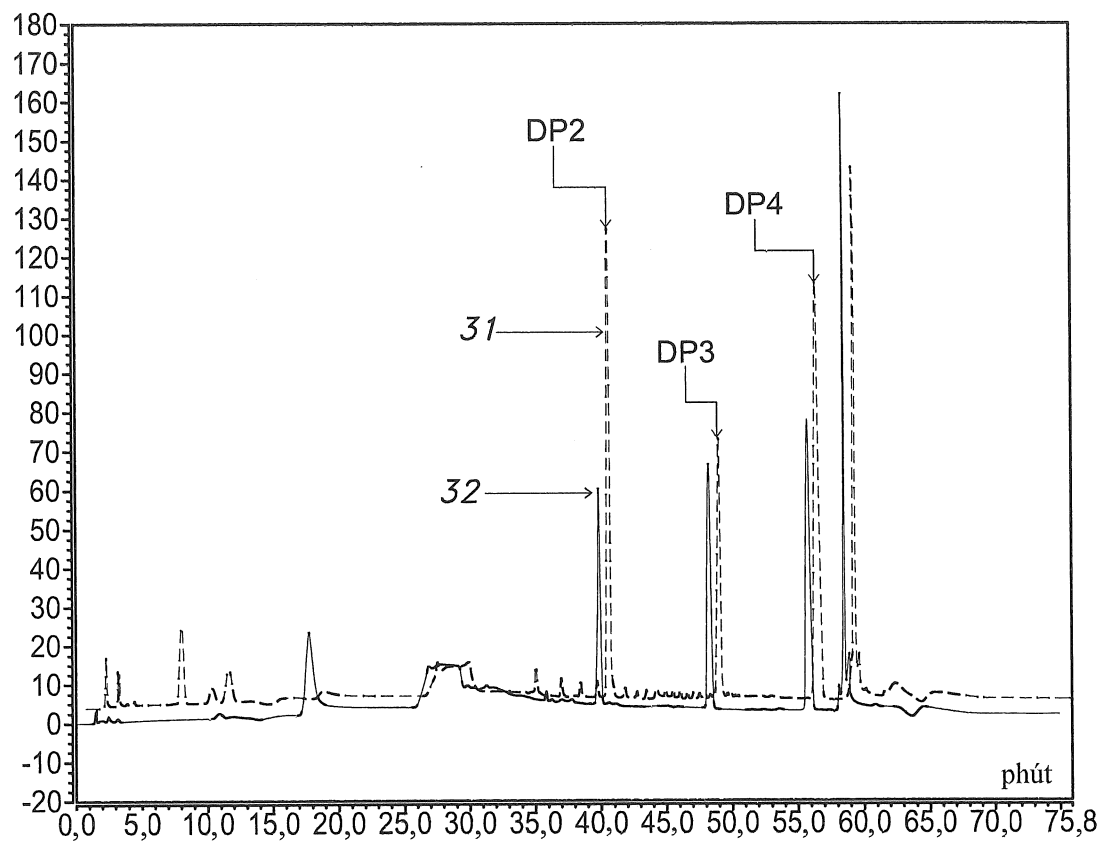


FIG. 4

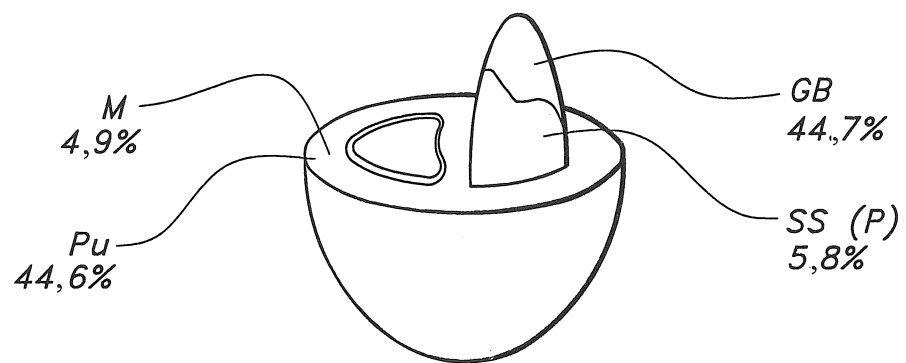


FIG. 5a

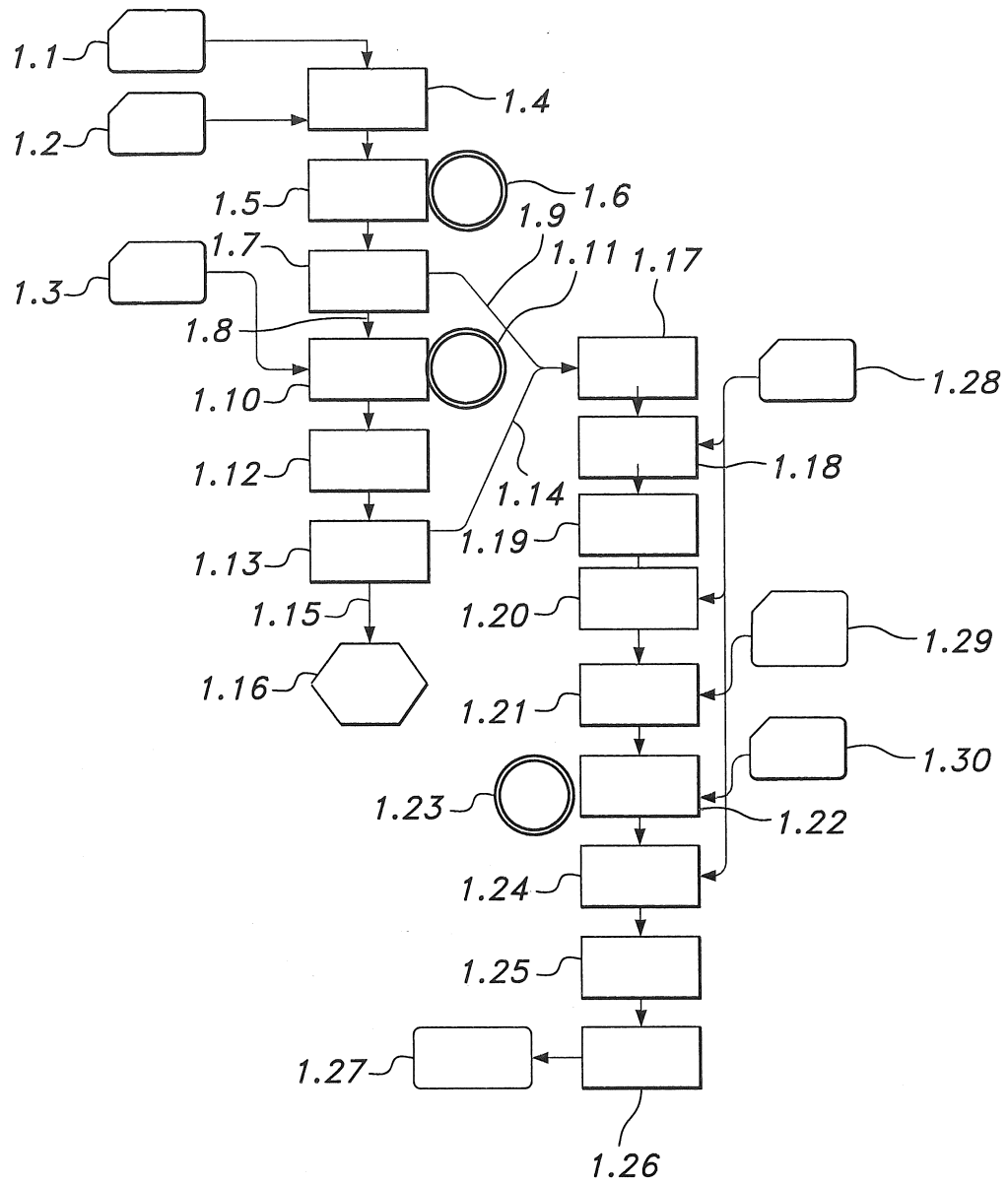


FIG. 5b



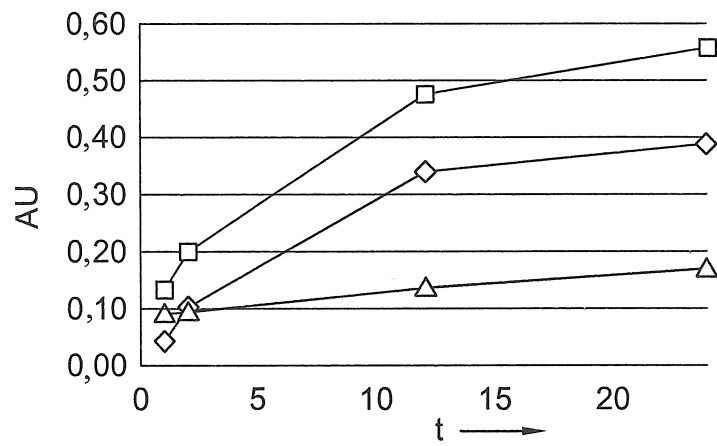


FIG. 5c

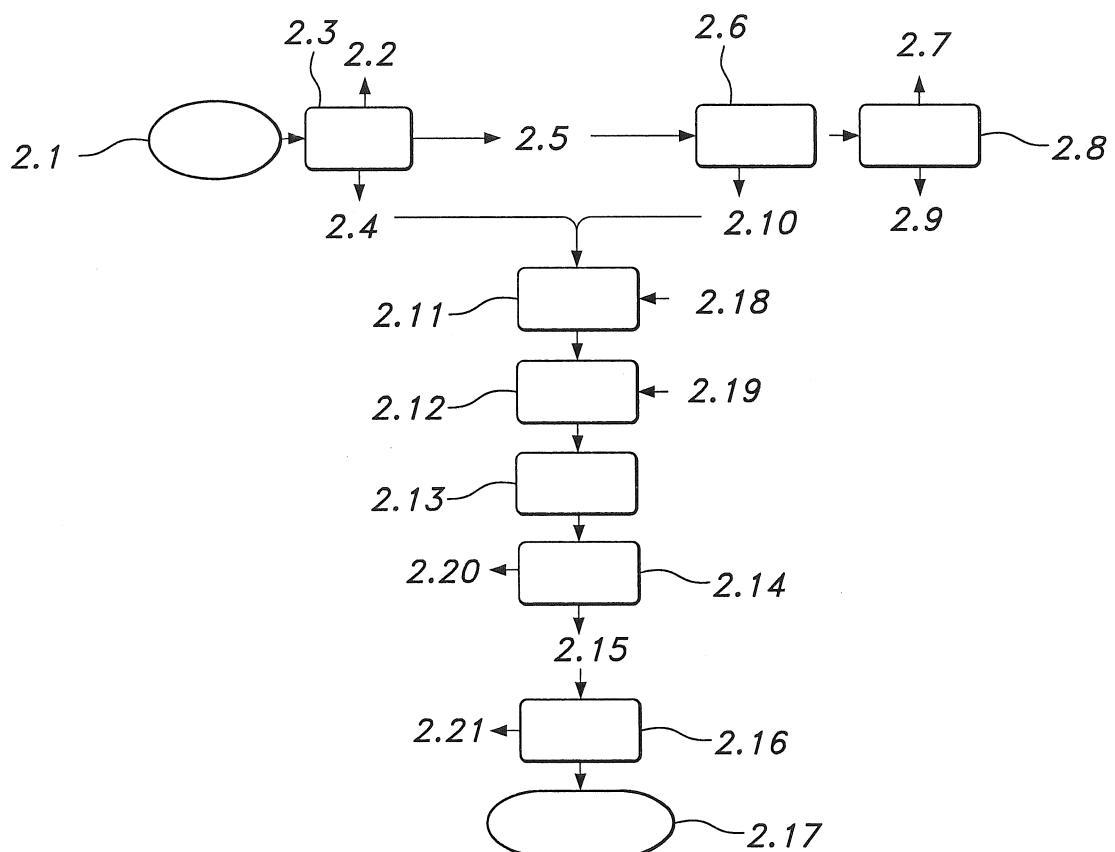


FIG. 5d

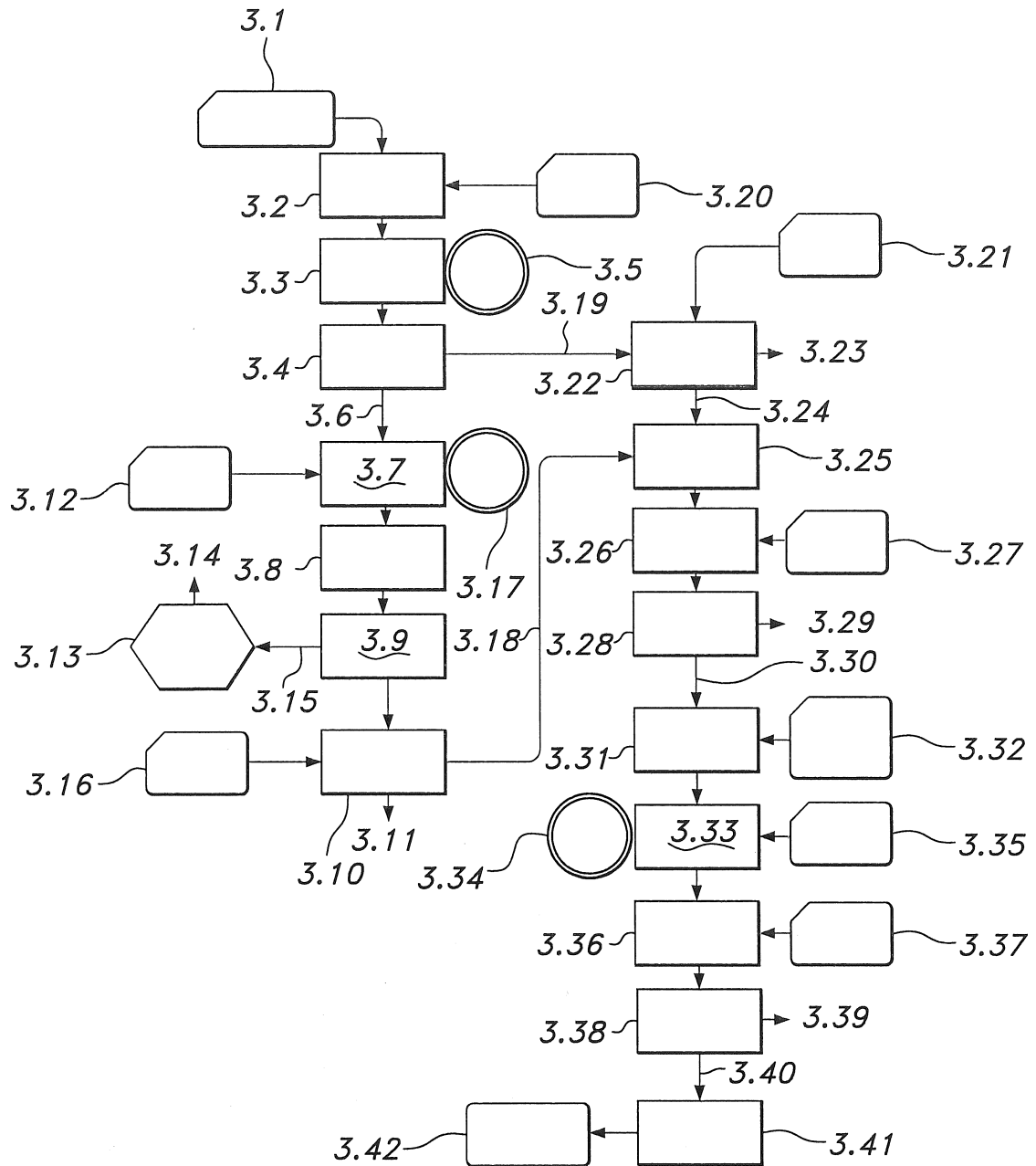


FIG. 5e