



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

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

(11)



2-0004448

(51)⁷ **C12P 19/14**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00587

(22) 23/12/2019

(45) 27/10/2025 451

(43) 25/06/2021 399A

(73) Viện Công nghệ tiên tiến - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 1B, đường TL 29, khu phố 1, phường An Phú Đông, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Hoàng Thị Kim Dung (VN); Nguyễn Thị Hồng Nơ (VN).

(54) **PHƯƠNG PHÁP CHẾ TẠO OLIGOCHITOSAN**

(21) 2-2019-00587

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp chế tạo oligochitosan kết hợp xử lý đơn và hỗn hợp enzym. Phương pháp này gồm các bước: chuẩn bị dung dịch thủy phân chitosan, xử lý đơn enzym dung dịch chitosan này bằng α -amylaza, tiếp đến xử lý bằng hỗn hợp enzym α -amylaza và pepsin, và bất hoạt enzym thu sản phẩm. Với việc kết hợp xử lý đơn và hỗn hợp enzym, phương pháp này cho phép mỗi chủng enzym sử dụng đều phát huy tốt nhất hoạt tính xúc tác của mình, từ đó cho phép tối ưu hóa lượng enzym sử dụng, đồng thời nâng cao hiệu suất phản ứng cũng như nâng cao chất lượng sản phẩm oligochitosan thu được. Ngoài ra, phương pháp này không gây ô nhiễm, có chi phí sản xuất thấp, thích hợp ứng dụng sản xuất quy mô công nghiệp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp chế tạo chitosan khối lượng phân tử thấp, cụ thể liên quan đến phương pháp chế tạo oligochitosan kết hợp xử lý đơn enzym với hỗn hợp enzym.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chitosan là polysaccharide tự nhiên, nhận được từ quá trình deacetyl hóa chitin hợp phần chính trong khung xương ngoài của loài giáp xác (tôm, cua, ghẹ, ...), tường tế bào nấm và côn trùng. Chitosan được xem là polyme sinh học chức năng, được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như thực phẩm, dinh dưỡng, y dược, hóa mỹ phẩm, môi trường, nông nghiệp. Tuy nhiên, do có khối lượng phân tử lớn (thường từ 50-2000kD), dẫn đến ít tan trong nước, cơ thể con người khó hấp thụ đã hạn chế nhiều tiềm năng ứng dụng của chúng. Những hạn chế này có thể được khắc phục bằng sự thủy phân chitosan thành oligochitosan (chitosan có khối lượng phân tử thấp có thể tan trong nước). Quá trình thủy phân chitosan thành oligochitosan thường bao gồm depolyme hóa vật lý sử dụng bức xạ sóng siêu âm hoặc cắt thủy động lực, depolyme hóa hóa học thông qua thủy phân với axit hoặc phản ứng oxy hóa khử với O_3 , $NaNO_2$, H_2O_2 và depolyme hóa enzym. Quá trình depolyme hóa vật lý đòi hỏi sử dụng thiết bị đặc biệt và khó khống chế khối lượng phân tử của oligochitosan thu được. Quá trình depolyme hóa hóa học cho độ chọn lọc thấp, hiệu suất không cao và nguy cơ ô nhiễm môi trường cao. Trong khi quá trình depolyme hóa enzym có ưu điểm vượt trội như dễ khống chế, không gây ô nhiễm, độ chọn lọc cao, oligochitosan thu được có chất lượng tốt, hoạt tính sinh học được đảm bảo, vì vậy chúng thích hợp hơn cho ứng dụng sau này. Hầu hết enzym sử dụng sản xuất oligochitosan là enzym đặc chủng chitosanaza hoặc chitinaza. Tuy nhiên, giá thành cao cộng thêm tính khan hiếm đã hạn chế khả năng ứng dụng của chúng. Nhiều enzym không đặc chủng đã được đề xuất cho quá trình thủy phân chitosan như xellulaza, pectinaza, pepsin, papain, proteinaza, neutral proteaza, pronaza, lipaza, hemicellulaza, α -amylaza, glucoamylaza, extracellular. Nhưng nếu chỉ sử dụng đơn thuần một loại enzym không đặc chủng sẽ cho hiệu suất sản phẩm oligochitosan thấp và lượng enzym cần dùng lớn. Gần đây, để nâng cao hiệu quả thủy phân chitosan và giảm lượng enzym, người ta sử dụng hỗn hợp hai hoặc nhiều loại enzym, tuy vậy hiệu suất thu oligochitosan vẫn thấp và sản phẩm có phân bố khối lượng phân tử rộng. Nguyên nhân chính của vấn đề này là do mỗi chủng enzym thường thể hiện hoạt tính xúc tác tốt ở mỗi điều kiện phản ứng nhất định,

trong khi sự thủy phân chitosan sử dụng hỗn hợp enzym nêu trên thường chỉ được tiến hành ở một điều kiện nhất định, vì vậy rất có thể chỉ một chủng enzym thể hiện hoạt tính tốt hoặc rất khó tìm được điều kiện phản ứng thích hợp ở đó có sự tương trợ hoạt tính xúc tác giữa các enzym.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế này là nhằm giải quyết các vấn đề còn tồn tại của các phương pháp depolyme hóa enzym chế tạo oligochitosan nêu trên, như hiệu suất thu oligochitosan thấp, lượng enzym cần dùng lớn, hiệu quả sử dụng xúc tác enzym không cao và sản phẩm có khối lượng phân tử phân bố rộng.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp chế tạo oligochitosan bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị dung dịch thủy phân chitosan bằng cách khuấy hòa tan chitosan trong dung dịch axit axetic 0,8-1,2%, ưu tiên chọn 1%, thu được dung dịch chitosan với nồng độ 30-50 g/l, ưu tiên chọn 35-45 g/l;
- (ii) xử lý đơn enzym bằng cách gia nhiệt dung dịch chitosan thu được ở bước (i) đến 50-80°C, ưu tiên chọn 65-75°C, điều chỉnh pH 2-5, ưu tiên pH 3,5-4,5, thêm enzym α -amylaza với tỷ lệ khối lượng α -amylaza/chitosan là 0,5-5%, ưu tiên 1-3% vào, tiếp tục khuấy tiến hành phản ứng thủy phân trong 5-15 giờ, ưu tiên 9-11 giờ thu hỗn hợp sau xử lý đơn enzym;
- (iii) xử lý hỗn hợp enzym bằng cách điều chỉnh nhiệt độ và pH của hỗn hợp sau xử lý đơn enzym ở bước (ii) về 30-50°C, ưu tiên chọn 35-45°C và điều chỉnh pH 2-4,5, ưu tiên pH 3-4, thêm enzym pepsin vào, tiếp tục khuấy tiến hành phản ứng thủy phân trong 2-6 giờ, ưu tiên 3-5 giờ, với tỷ lệ khối lượng enzym pepsin/chitosan là 0,1-5 %, ưu tiên 1-2% thu hỗn hợp; và
- (iv) thu oligochitosan bằng cách gia nhiệt hỗn hợp thu được ở bước (iii) đến 90-100°C trong 10 phút để bất hoạt enzym ngừng phản ứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp chế tạo oligochitosan bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị dung dịch thủy phân chitosan bằng cách khuấy hòa tan chitosan trong dung dịch axit axetic 0,8-1,2%, ưu tiên chọn 1%, thu được dung dịch chitosan với nồng độ 30-50 g/l, ưu tiên chọn 35-45 g/l;
- (ii) xử lý đơn enzym bằng cách gia nhiệt dung dịch chitosan thu được ở bước (i) đến 50-80°C, ưu tiên chọn 65-75°C, điều chỉnh pH 2-5, ưu tiên pH 3,5-4,5,

thêm enzym α -amylaza với tỷ lệ khối lượng α -amylaza/chitosan là 0,5-5%, ưu tiên 1-3% vào, tiếp tục khuấy tiến hành phản ứng thủy phân trong 5-15 giờ, ưu tiên 9-11 giờ thu hỗn hợp sau xử lý đơn enzym;

(iii) xử lý hỗn hợp enzym bằng cách điều chỉnh nhiệt độ và pH của hỗn hợp sau xử lý đơn enzym ở bước (ii) về 30-50°C, ưu tiên chọn 35-45°C và điều chỉnh pH 2-4,5, ưu tiên pH 3-4, thêm enzym pepsin vào, tiếp tục khuấy tiến hành phản ứng thủy phân trong 2-6 giờ, ưu tiên 3-5 giờ, với tỷ lệ khối lượng enzym pepsin/chitosan là 0,1-5%, ưu tiên 1-2% thu hỗn hợp; và

(iv) thu oligochitosan bằng cách gia nhiệt hỗn hợp sau xử lý ở bước (iii) đến 90-100°C trong 10 phút để bất hoạt enzym ngừng phản ứng.

Trong sáng chế này, chitosan nguyên liệu có mức độ deacetyl hóa > 90%, trọng lượng phân tử 10-300 kDa. Enzym α -amylaza ở dạng lỏng, có độ thuần khiết cấp thực phẩm, hoạt độ ≥ 100 U/mg. Enzym pepsin ở dạng bột có độ thuần khiết cấp thực phẩm, hoạt độ ≥ 3000 U/mg. Sản phẩm oligochitosan thu được trong bước (iv) tan hoàn toàn trong nước, có màu vàng nhạt, có trọng lượng phân tử trung bình 10-20 kDa, hiệu suất 95-99%.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Khuấy hòa tan 4 gam chitosan trong 100 ml dung dịch axit axetic 1% thu được dung dịch chitosan với nồng độ 40 g/l, gia nhiệt đến 73°C, điều chỉnh pH 4, thêm enzym α -amylaza với tỷ lệ khối lượng α -amylaza/chitosan là 2% vào tiếp tục khuấy tiến hành phản ứng thủy phân trong 10 giờ, sau đó điều chỉnh nhiệt độ và pH của hỗn hợp về 40°C và pH 4,5, thêm enzym pepsin vào với tỷ lệ khối lượng enzym pepsin/chitosan là 1%, tiếp tục khuấy tiếp 4 tiếng, sau đó gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến 95°C trong 10 phút để bất hoạt enzym, hỗn hợp sau phản ứng được làm lạnh đến nhiệt độ phòng và li tâm để tách enzym, dung dịch đã tách enzym được sấy loại nước thu được oligochitosan. Sản phẩm oligochitosan tan hoàn toàn trong nước, có màu vàng nhạt, có trọng lượng phân tử trung bình 16 kDa, hiệu suất 97%.

Hiệu quả có thể đạt được của sáng chế

Sự kết hợp xử lý đơn enzym và hỗn hợp enzym trong quá trình thủy phân chitosan trọng lượng phân tử lớn thành oligochitosan trong sáng chế này cho phép mỗi chủng enzym sử dụng đều phát huy được một cách tốt nhất hoạt tính xúc tác của mình thông qua việc điều chỉnh đơn giản và dễ dàng các tham số như nhiệt độ, pH của hỗn hợp phản ứng. Từ đó hiệu suất phản ứng cũng như chất lượng sản phẩm oligochitosan cũng được nâng cao. Phương pháp chế tạo này cũng cho phép tiết

kiệm lượng enzym sử dụng, giá thành sản xuất thấp, thích hợp sản xuất quy mô công nghiệp.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp chế tạo oligochitosan bao gồm các bước:

(i) chuẩn bị dung dịch thủy phân chitosan bằng cách khuấy hòa tan chitosan trong dung dịch axit axetic 0,8-1,2% thu được dung dịch chitosan với nồng độ 30-50 g/l;

(ii) xử lý đơn enzym bằng cách gia nhiệt dung dịch chitosan thu được ở bước (i) đến 50-80°C, điều chỉnh pH 2-5, thêm enzym α -amylaza với tỷ lệ khối lượng α -amylaza/chitosan là 0,5-5%, tiếp tục khuấy và tiến hành phản ứng thủy phân trong 5-15 giờ thu hỗn hợp sau xử lý đơn enzym;

(iii) xử lý hỗn hợp enzym bằng cách điều chỉnh nhiệt độ và pH của hỗn hợp sau xử lý đơn enzym ở bước (ii) về 30-50°C và pH 2-4,5, thêm enzym pepsin vào rồi tiếp tục khuấy và tiến hành phản ứng thủy phân trong 2-6 giờ với tỷ lệ khối lượng enzym pepsin/chitosan là 0,1-5% thu hỗn hợp; và

(iv) thu oligochitosan bằng cách gia nhiệt hỗn hợp thu được ở bước (iii) đến 90-100°C trong 10 phút để bất hoạt enzym ngừng phản ứng thu sản phẩm.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chitosan hòa tan trong dung dịch axit axetic 1% thu được dung dịch chitosan với nồng độ 35-45 g/l.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó điều kiện tối ưu ở bước (ii) là nhiệt độ 65-75°C, pH 3,5-4,5, tỷ lệ khối lượng α -amylaza/chitosan 1-3%, thời gian 9-11 giờ, chitosan nguyên liệu có mức độ deacetyl hóa $\geq 95\%$.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó điều kiện tối ưu ở bước (iii) là nhiệt độ 35- 45°C, pH 3-4, tỷ lệ khối lượng pepsin/chitosan 1-2 %, thời gian 3-5 giờ.