



(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) (11)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**



**2-0002686**

(51)<sup>7</sup> **C12P 19/04; C12N 1/18 (13) Y**

(21) 2-2019-00128

(22) 22/04/2019

(45) 25/08/2021 401

(43) 25/07/2019 376A

(73) Công ty Cổ phần Công nghệ Hóa sinh Việt Nam (VN)

Số 9 Nghĩa Tân, phường Nghĩa Tân, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Văn Năm (VN); Nguyễn Văn Thiết (VN).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ NEWAVE (NEWAVE IP COMPANY LIMITED)

(54) QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT  $\beta$ -GLUCAN TỪ THÀNH TẾ BÀO NẤM MEN BIA

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất  $\beta$ -glucan từ thành tế bào nấm men bia bao gồm các bước: tự phân tế bào nấm men bia; thủy phân bằng enzym bằng cách sử dụng chế phẩm Oryzaezyme thu được từ chủng nấm mốc tương *Aspergillus oryzae*; xử lý bằng hydro peroxit; xử lý bằng dung dịch NaOH 0,2-0,3M ở nhiệt độ phòng; xử lý bằng dung dịch NaOH 0,2-0,3M ở nhiệt độ  $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; trung hòa và chiết bằng dung dịch axit axetic 0,5N hoặc etanol 96%; và rửa bằng nước RO để thu được chế phẩm  $\beta$ -glucan có hàm lượng  $\beta$ -glucan đạt 40-60% theo khối lượng.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách chiết  $\beta$ -glucan từ thành tế bào nấm men bia.

### Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

$\beta$ -glucan là một polysacarit có hoạt tính kích thích miễn dịch, được nhiều nước trên thế giới sử dụng trong y học, cũng như trong lĩnh vực chăn nuôi gia súc, gia cầm và nuôi trồng thủy hải sản để làm tăng cường khả năng miễn dịch của người, vật nuôi và cây trồng, với mục đích phòng chống/ngăn ngừa và điều trị bệnh. Polysacarit này là một trong các thành phần cấu trúc chính của thành tế bào nấm men *Sacchromyces cerevisiae*.

Thành tế bào nấm men bia *S. cerevisiae* có cấu trúc rất bền vững, gồm có ba lớp, được cấu tạo chủ yếu từ các polysacarit và protein: 1) lớp ngoài cùng cấu tạo từ lipoproteid dày khoảng 10-30nm, thực chất là một lớp màng lipoproteid; 2) lớp giữa có thể dày tới 100nm, cấu tạo từ phức hợp mannoprotein (hầu hết các protein của thành tế bào nấm men đều liên kết với các mannan oligosacarit - MOS). Các mannoprotein được đóng gói dày đặc, có tác dụng như một màng lọc hạn chế tính thấm của thành tế bào đối với các chất hòa tan; 3) lớp trong cùng tiếp giáp với màng sinh chất, cấu tạo hầu như hoàn toàn từ glucan (khoảng 94% glucoza và 6% hexosamin), có chiều dày 10-250nm, về bản chất là phức hợp  $\beta$ -1,3-glucan-chitin. Phức hợp này tạo thành khung đỡ dạng sợi của thành tế bào. Glucan là thành phần bền vững về mặt hóa học. Các glucan là thành phần thiết yếu, chịu trách nhiệm về độ bền cơ học, hình dạng và độ đàn hồi của thành tế bào. Ngoài các thành phần cấu trúc kể trên, thành tế bào nấm men bia còn chứa  $\alpha$ -glucan với lượng trong khoảng khá rộng – từ 1 đến 29%, phụ thuộc vào điều kiện dinh dưỡng. Sự tồn tại các liên kết cộng hóa trị giữa các thành phần cấu trúc khác nhau càng làm tăng thêm tính bền vững của thành tế bào nấm men bia.

Do thành tế bào nấm men có cấu trúc rất bền vững, nên việc tách chiết  $\beta$ -glucan từ thành tế bào là rất khó khăn. Một tính chất hóa lý quan trọng của  $\beta$ -glucan là không tan trong nước (và không tan trong dung dịch kiềm), cho nên nguyên lý chung của tất cả các quy trình tách chiết và tinh chế  $\beta$ -glucan từ thành tế bào nấm men là phá hủy và/hoặc hòa

tan các chất khác đồng hành với  $\beta$ -glucan trong thành tế bào nấm men để thu được  $\beta$ -glucan có độ sạch cao ở dạng không hòa tan trong nước.

Trước đây, phương pháp chủ yếu để tách chiết  $\beta$ -glucan từ thành tế bào nấm men là loại bỏ mannoprotein khỏi thành tế bào nấm men bằng cách xử lý bằng kiềm nồng độ cao (dung dịch NaOH nồng độ lớn hơn hoặc bằng 1M) ở nhiệt độ cao (80 - 100°C) (phương pháp nấu kiềm), hoặc nấu kiềm kết hợp xử lý bằng axit (HCl hoặc axit axetic), hoặc xử lý bằng các tác nhân oxy hóa, tác nhân khử và các dung môi hữu cơ.

Theo phương pháp này, không chỉ protein sẽ hòa tan trong dung dịch kiềm, mà cả mannan (một polysaccharit chính khác của thành tế bào nấm men) cũng bị hòa tan. Khi hòa tan được hai thành phần này của thành tế bào nấm men thì sẽ thu được  $\beta$ -glucan (không tan trong kiềm) có độ sạch cao. Phương pháp này có ưu điểm là đơn giản, tuy nhiên có nhược điểm lớn là đòi hỏi thiết bị chịu kiềm, chịu nhiệt độ cao và đặc biệt là gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng.

Hiện nay, xu hướng chung trên thế giới là tạo ra và ứng dụng các công nghệ thân thiện môi trường, cụ thể là chuyển đổi từng phần hoặc hoàn toàn từ việc sản xuất dựa trên nền tảng là công nghệ hóa học sang công nghệ sinh học sử dụng enzym trong các điều kiện “mềm” ít gây ô nhiễm môi trường hơn.

US 6,444,448 B1 bộc lộ quy trình sản xuất chế phẩm chứa  $\beta$ -glucan và mannan bằng cách tự phân tế bào vi sinh vật, bao gồm tế bào nấm men bia, ở độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 6 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35 đến 60°C trong thời gian 6 đến 48 giờ và tách chất rắn ra khỏi sản phẩm tự phân. Quá trình tự phân có thể được thực hiện với sự có mặt của một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm enzym thủy phân protein, mannaza, amylaza, và  $\beta$ -glucanaza.

US 8,753,668 B2 bộc lộ quy trình sản xuất chế phẩm chứa  $\beta$ -glucan và mannan từ nấm men bằng cách tự phân tế bào nấm men bia, sau đó xử lý bằng enzym với một hoặc nhiều proteaza, glucanaza, amylaza hoặc lipaza.

Lý Thị Minh Hiền và các đồng tác giả đã nghiên cứu quy trình tách chiết  $\beta$ -glucan từ tế bào *Saccharomyces Cerevisiae* trong bã men bia có bổ sung enzym proteaza, trong đó quy trình tách chiết  $\beta$ -glucan này về cơ bản bao gồm các bước: i) rửa bã nấm men bia với nước vô khuẩn, ii) xử lý với proteaza, iii) ly tâm thu cặn, iv) xử lý bằng dung dịch NaOH 1M, v) ly tâm thu cặn, vi) xử lý bằng axeton, vii) rửa bằng etanol, và viii) thu  $\beta$ -

glucan (xem tài liệu: “Nghiên cứu quy trình tách chiết beta glucan từ tế bào *Saccharomyces Cerevisiae* trong bã men bia”, Tạp chí Khoa học trường Đại học Mở TP. HCM, số 1 (40) 2015, trang 61-67).

### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Mục đích của giải pháp hữu ích là cần tiếp tục tìm ra quy trình chiết  $\beta$ -glucan không sử dụng nồng độ kiềm hoặc axit cao và không sử dụng nhiệt độ cao, ít gây ô nhiễm môi trường.

Để đạt được mục đích này, các tác giả giải pháp hữu ích đã sử dụng hydro peroxit và chế phẩm enzym để phá hủy/thủy phân các thành phần cấu trúc đồng hành với  $\beta$ -glucan trong thành tế bào nấm men bia, làm cho việc tách chiết  $\beta$ -glucan từ thành tế bào nấm men bia được dễ dàng hơn và đã hoàn thành giải pháp hữu ích. Cơ sở giải pháp này là protein của thành tế bào có thể bị thủy phân bởi proteinaza và  $\alpha$ -glucan bị thủy phân bởi amylaza. Khi protein bị thủy phân bởi proteinaza thì các mannan oligosacarit (MOS) cũng dễ dàng bị loại bỏ/tách khỏi  $\beta$ -glucan, vì nó hòa tan trong nước, và khi đó protein sẽ được loại bỏ/tách chiết khỏi  $\beta$ -glucan trong các điều kiện mềm hơn (ở nồng độ kiềm thấp hơn và ở nhiệt độ xử lý kiềm cũng thấp hơn). Do đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách chiết  $\beta$ -glucan từ thành tế bào nấm men bia bao gồm các bước: tự phân tế bào nấm men bia; thủy phân bằng enzym bằng cách sử dụng chế phẩm *Oryzae*zyme thu được từ chủng nấm mốc tương *Aspergillus oryzae*; xử lý bằng hydro peroxit; xử lý bằng dung dịch NaOH 0,2-0,3M ở nhiệt độ phòng; xử lý bằng dung dịch NaOH 0,2-0,3M ở nhiệt độ  $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; trung hòa và chiết bằng dung dịch axit axetic 0,5N hoặc etanol 96%; và rửa bằng nước RO để thu được chế phẩm  $\beta$ -glucan.

### **Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích**

Theo một phương án cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách chiết  $\beta$ -glucan từ thành tế bào nấm men bia bao gồm các bước sau:

Bước 1: Tự phân tế bào nấm men bia

Quá trình tự phân nấm men bia được thực hiện ở nhiệt độ  $55-60^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 48 giờ. Sau quá trình tự phân, dịch huyền phù xác tế bào nấm men được ly tâm ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong thời gian 5-10 phút để thu phần cặn (thành tế bào) chứa  $\beta$ -glucan.

Có thể bổ sung thêm chế phẩm Oryzaezyme vào quá trình tự phân. Trong trường hợp này enzym được bổ sung theo tỉ lệ 20ml dịch chiết chế phẩm Oryzaezyme/100g bã men bia đã ép nước (có tỉ lệ chất khô khoảng 20%). Sau khi bổ sung thêm chế phẩm Oryzaezyme, quá trình tự phân cũng được thực hiện trong các điều kiện như mô tả ở trên.

#### Bước 2: Thủy phân bằng enzym

Hòa phần cặn thành tế bào thu được ở bước 1 với dịch chiết chế phẩm Oryzaezyme theo tỉ lệ 20ml dịch chiết chế phẩm Oryzaezyme/100g cặn thành tế bào, sau đó ủ hỗn hợp thu được ở 55-60°C trong thời gian ít nhất 30 giờ, có khuấy để thực hiện quá trình thủy phân. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, ly tâm ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút để thu lấy phần cặn chứa thành tế bào đã được xử lý bằng enzym.

#### Bước 3: Xử lý bằng hydro peroxit

Hòa cặn thu ở bước 2 trong nước theo tỉ lệ cặn/nước là 1/2 (khối lượng/thể tích), sau đó cho dung dịch hydro peroxit 50% vào tới nồng độ cuối là 2,5 ÷ 3%, quá trình xử lý này được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng trong 2-3 giờ, có khuấy, sau đó ly tâm thu cặn ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút.

#### Bước 4: Xử lý bằng dung dịch NaOH 0,2-0,3M ở nhiệt độ trong phòng

Cặn chứa thành tế bào thu được ở bước 3 được xử lý bằng dung dịch NaOH 0,2-0,3M với tỉ lệ cặn/dung dịch NaOH 0,2-0,3M nằm trong khoảng từ 1/4 – 1/3 theo thể tích ở nhiệt độ phòng, sau đó ly tâm thu cặn ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút.

#### Bước 5: Xử lý bằng dung dịch NaOH 0,2-0,3M ở 80°C ± 2°C

Hòa cặn thu được ở bước 4 trong dung dịch NaOH 0,2-0,3M với tỉ lệ cặn/dung dịch NaOH 0,2-0,3M nằm trong khoảng từ 1/4 – 1/3 theo thể tích, sau đó ủ ở 80°C ± 2°C trong 1 giờ, có khuấy. Sau đó, ly tâm ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút để thu lấy cặn.

#### Bước 6: Trung hòa và chiết bằng dung dịch axit axetic 0,5N hoặc etanol 96%

Hòa cặn chứa β-glucan thu được ở bước 5 trong nước theo tỉ lệ cặn/nước nằm trong khoảng từ 1/3 – 1/2 (khối lượng/thể tích), trung hòa bằng dung dịch HCl 10% hoặc 1N đến độ pH = 7, sau đó ly tâm thu cặn ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút và

chiết cận thu được bằng dung dịch axit axetic 0,5N ở nhiệt độ < 75°C trong 30 phút, có khuấy liên tục hoặc khuấy định kỳ, với tỉ lệ cận/dung dịch axit axetic là 1/2 (khối lượng/thể tích). Sau đó ly tâm ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút để thu cận (sản phẩm  $\beta$ -glucan).

#### Bước 7: Rửa bằng nước RO

Rửa một đến hai lần cận chứa sản phẩm  $\beta$ -glucan thu được ở bước 6 bằng nước RO với tỉ lệ cận/nước RO mỗi lần rửa nằm trong khoảng từ 1/3 – 1/2 (khối lượng/thể tích) để thu được chế phẩm  $\beta$ -glucan.

Chế phẩm thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích có hàm lượng  $\beta$ -glucan đạt 40÷ 60%.

Theo một phương án được ưu tiên, nồng độ dung dịch NaOH sử dụng trong các bước 4 và 5 là 2,5M.

Chế phẩm Oryzaezyme sử dụng theo giải pháp hữu ích là chế phẩm enzym thu được từ chủng nấm mốc tương *Aspergillus oryzae* chứa proteinaza, amylaza và xenlulaza với lượng lần lượt là 500 – 750 IU/g, 800 – 1000 IU/g và 400 – 700 IU/g tính theo chế phẩm khô. Dịch chiết chế phẩm Oryzaezyme được điều chế bằng cách hòa chế phẩm Oryzaezyme trong dung dịch đệm Tris hoặc đệm phosphat 10mM, độ pH= 7,0 theo tỉ lệ 1/20 (g/ml).

Trong bước tự phân tế bào nấm men bia, bã men bia thải là loại bã men bia tươi hoặc được bảo quản ở -20°C. Bã men bia này được ép nước tới hàm lượng nước là khoảng 80%. Quá trình tự phân có thể được thực hiện có bổ sung thêm chế phẩm Oryzaezyme. Sau khi thực hiện quá trình tự phân và ly tâm sẽ thu được dịch chiết tế bào (pha lỏng) và phần cận là thành tế bào (pha rắn) chứa  $\beta$ -glucan. Dịch chiết tế bào được sử dụng để sản xuất cao nấm men và/hoặc sản phẩm siêu dinh dưỡng để dùng trong chăn nuôi gia súc gia cầm và nuôi trồng thủy hải sản. Phần thành tế bào được sử dụng trong bước tiếp theo để sản xuất  $\beta$ -glucan.

Trong bước xử lý thành tế bào nấm men với enzym, protein của thành tế bào nấm men bị phá hủy bởi proteinaza và  $\alpha$ -glucan bị thủy phân bởi amylaza có trong chế phẩm Oryzaezyme.

Trong công nghệ tách chiết và tinh chế các chất từ các nguồn khác nhau, chất oxy hóa khử hydro peroxit thường được sử dụng ở công đoạn cuối cùng của quy trình sản xuất với tác dụng tẩy màu của sản phẩm. Tuy nhiên, trong quy trình sản xuất  $\beta$ -glucan theo giải pháp hữu ích, hydro peroxit được sử dụng không phải để tẩy màu sản phẩm, mà được sử dụng với mục đích khác là phá vỡ cấu trúc dạng lưới rất bền vững của lớp  $\beta$ -glucan của thành tế bào nấm men và phá hủy (dù chỉ một phần) các liên kết cộng hóa trị giữa  $\beta$ -glucan với các thành phần cấu trúc khác trong thành tế bào nấm men bia, giúp cho việc tách chiết và làm sạch  $\beta$ -glucan từ thành tế bào nấm men bia được thuận tiện, dễ dàng hơn.

Sau khi protein của phức hợp mannoprotein bị thủy phân, các mannan oligosacarit (MOS) trở thành tan được trong dung dịch nước. Dung dịch kiềm là dung môi rất tốt, nó hòa tan được hầu hết các protein, kể cả các protein cấu trúc khó tan.

Theo giải pháp hữu ích, nhờ bước thủy phân thành tế bào bằng enzym và thực hiện bước xử lý bằng hydro peroxit ngay sau bước thủy phân này, chỉ cần sử dụng nồng độ thấp của dung dịch NaOH để chiết protein. Theo giải pháp hữu ích, nồng độ của dung dịch NaOH được sử dụng là 0,2-0,3M. Tốt hơn nếu sử dụng dung dịch NaOH 0,25M để rửa và chiết cặn chứa  $\beta$ -glucan thu được sau khi xử lý huyền phù thành tế bào với hydro peroxit.

Bước xử lý bằng dung dịch NaOH ở nhiệt độ cao ( $80^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) nhằm loại bỏ các protein liên kết cộng hóa trị với  $\beta$ -glucan.

### **Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích**

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ. Cần hiểu rằng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa cho giải pháp hữu ích và không nhằm giới hạn phạm vi của giải pháp hữu ích theo cách bất kỳ.

Ví dụ 1. Tách chiết  $\beta$ -glucan từ bã men bia thải theo quy trình gồm 7 bước, trong đó có 2 bước thủy phân enzym:

Bước 1: tự phân tế bào nấm men bia (có bổ sung enzym);

Bước 2: thủy phân (thành tế bào) bằng enzym;

Bước 3: xử lý bằng hydro peroxit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ );

Bước 4: xử lý bằng dung dịch NaOH 0,25M ở nhiệt độ phòng;

Bước 5: xử lý bằng dung dịch NaOH 0,25M ở  $80 \pm 2^\circ\text{C}$ ;

Bước 6: trung hòa và chiết bằng dung dịch axit axetic 0,5N hoặc etanol 96%;

Bước 7: rửa bằng nước RO.

Trộn 1kg bã men bia thái đã ép nước (có hàm lượng nước khoảng 80%) với 200ml dịch chiết chế phẩm Oryzaezyme (được chiết theo tỉ lệ 20ml đệm phosphat 10mM, độ pH=7,0/1g chế phẩm enzym), sau đó chuyển vào bình phản ứng (dung tích 2 lít) để thực hiện quá trình tự phân ở  $55-60^\circ\text{C}$  trong thời gian 48 giờ, có khuấy liên tục. Sau quá trình tự phân, làm nguội dịch huyền phù xác tế bào nấm men đến nhiệt độ phòng và ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong thời gian 10 phút để thu phần cặn (thành tế bào) chứa  $\beta$ -glucan (từ 1kg bã men bia ép nước sau tự phân thu được khoảng 200g cặn chứa thành tế bào).

Hòa phần cặn thành tế bào thu được này trong 40ml dịch chiết chế phẩm Oryzaezyme (cũng được chiết theo tỉ lệ 20ml đệm phosphat 10mM, độ pH =7,0/1g chế phẩm enzym), bổ sung thêm 60ml nước RO, khuấy đều và ủ hỗn hợp thu được ở  $55-60^\circ\text{C}$  trong thời gian 30 giờ, có khuấy liên tục để thực hiện quá trình thủy phân. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ phòng, ly tâm như nêu trên để thu lấy phần cặn chứa thành tế bào đã được xử lý bằng enzym.

Hòa cặn chứa thành tế bào đã được xử lý bằng enzym vào 400ml nước RO, bổ sung thêm 35ml dung dịch  $\text{H}_2\text{O}_2$  50%, khuấy đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ có khuấy liên tục, sau đó ly tâm thu cặn như nêu trên.

Tiếp theo, hòa cặn thu được trong dung dịch NaOH 0,25M với tỉ lệ cặn/dung dịch là 1/3 theo thể tích, khuấy liên tục và để chiết ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút để thu cặn. Tiếp theo, hòa cặn thu được trong dung dịch NaOH 0,25M với tỉ lệ cặn/dung dịch là 1/3 theo thể tích và ủ ở  $80 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 1 giờ có khuấy liên tục. Sau khi kết thúc xử lý kiềm ở nhiệt độ cao, hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ phòng và ly tâm thu lấy cặn chứa  $\beta$ -glucan như nêu trên.

Sau đó, hòa cặn chứa  $\beta$ -glucan thu được trong nước RO theo tỉ lệ cặn/nước là 1/2 (khối lượng/thể tích), trung hòa bằng dung dịch HCl 10% đến độ pH =7, sau đó ly tâm thu cặn như nêu trên và chiết cặn thu được bằng dung dịch axit axetic 0,5N ở nhiệt độ <



75°C trong 30 phút, với tỉ lệ cặn/dung dịch axit axetic là 1/2 (khối lượng/thể tích), có khuấy liên tục. Sau đó ly tâm thu cặn chứa  $\beta$ -glucan như nêu trên.

Rửa hai lần cặn chứa  $\beta$ -glucan này bằng nước RO với tỉ lệ cặn/nước RO mỗi lần rửa là 1/3 (khối lượng/thể tích). Sau khi ly tâm, cặn được sấy khô, nghiền mịn và xác định hàm lượng  $\beta$ -glucan trong chế phẩm  $\beta$ -glucan thu được. Từ 1kg bã men bia ép nước đã thu được 20,14g chế phẩm  $\beta$ -glucan với hàm lượng  $\beta$ -glucan là 62,15%  $\beta$ -glucan, đạt hiệu suất 10,07% (tính theo trọng lượng khô). Hàm lượng  $\beta$ -glucan được xác định bằng kit Megazyme của hãng Megazyme (Ireland).

Ví dụ 2. Tách chiết  $\beta$ -glucan từ bã men bia thải theo quy trình giống với quy trình tách chiết  $\beta$ -glucan trong ví dụ 1, chỉ khác là quá trình tự phân (bước 1) không được bổ sung thêm chế phẩm Oryzaezyme. Từ 1kg nấm men bia ép nước đã thu được 23,17g chế phẩm  $\beta$ -glucan với hàm lượng  $\beta$ -glucan là 54,35% và hiệu suất đạt 11,59%.

Ví dụ 3. (Ví dụ so sánh) Tách chiết  $\beta$ -glucan từ bã men bia thải theo quy trình gồm 7 bước giống như trong ví dụ 2, trong đó bước xử lý bằng hydro peroxit được chuyển thành bước 6:

- 1) tự phân tế bào nấm men
- 2) thủy phân enzym;
- 3) xử lý bằng dung dịch NaOH 0,25M ở nhiệt độ phòng;
- 4) xử lý bằng dung dịch NaOH 0,25M ở nhiệt độ cao;
- 5) trung hòa và chiết bằng dung dịch axit axetic 0,5 N hoặc etanol 96%;
- 6) tẩy màu bằng  $H_2O_2$ ;
- 7) rửa sản phẩm bằng nước RO.

Trong quy trình này, hydro peroxit được sử dụng để tẩy màu sản phẩm  $\beta$ -glucan. Từ 1kg nấm men bia ép nước đã thu được 31,24 g chế phẩm  $\beta$ -glucan với hàm lượng  $\beta$ -glucan là 40,58% và hiệu suất đạt 15,62%.

Ví dụ 4. (Ví dụ so sánh) Tách chiết  $\beta$ -glucan từ bã men bia thải theo quy trình gồm 6 bước sau:

- Bước 1: tự phân tế bào nấm men bia;
- Bước 2: xử lý bằng dung dịch  $H_2O_2$ ;

Bước 3: xử lý bằng dung dịch NaOH 0,25M ở nhiệt độ phòng;

Bước 4: xử lý bằng dung dịch NaOH 0,25M ở  $80 \pm 2$  °C;

Bước 5: trung hòa và chiết bằng dung dịch axit axetic 0,5N hoặc etanol 96%;

Bước 6: Rửa bằng nước RO.

Quy trình tách chiết  $\beta$ -glucan trong ví dụ này chính là giống với quy trình tách chiết  $\beta$ -glucan trong ví dụ 2, chỉ khác là không thực hiện bước 2 - thủy phân (thành tế bào) bằng enzym. Khi tách chiết  $\beta$ -glucan theo quy trình này, từ 1kg bã men bia thái ép nước đã thu được 30,76g chế phẩm  $\beta$ -glucan chứa 41,25%  $\beta$ -glucan, với hiệu suất đạt 15,18%.

Ví dụ 5. (Ví dụ so sánh) Quy trình tách chiết  $\beta$ -glucan trong ví dụ này là giống với quy trình trong ví dụ 1, chỉ khác là không thực hiện bước 2 – thủy phân bằng enzym và bước xử lý với  $H_2O_2$  được chuyển thành bước 5 và được sử dụng để tẩy màu sản phẩm  $\beta$ -glucan. Cụ thể là quy trình này bao gồm các bước sau:

- 1) Tự phân tế bào nấm men có bổ sung chế phẩm Oryzaenzyme;
- 2) Xử lý bằng dung dịch NaOH 0,25M ở nhiệt độ phòng;
- 3) Xử lý bằng dung dịch NaOH 0,25M ở nhiệt độ cao;
- 4) Trung hòa và chiết bằng dung dịch axit axetic 0,5 N hoặc etanol 96%;
- 5) Tẩy màu bằng  $H_2O_2$ ;
- 6) Rửa sản phẩm bằng nước RO.

Trong quy trình này,  $H_2O_2$  không được sử dụng để phá vỡ cấu trúc của thành tế bào nấm men bia, mà là để tẩy màu sản phẩm  $\beta$ -glucan (sản phẩm thu được có màu tối và được tẩy màu bằng  $H_2O_2$ ). Bằng quy trình này từ 1kg bã men bia đã ép nước thu được 44,30g chế phẩm  $\beta$ -glucan với hàm lượng  $\beta$ -glucan 31,34% và hiệu suất đạt 22,15%.

Ví dụ 6. (Ví dụ so sánh) Quy trình tách chiết  $\beta$ -glucan gồm 6 bước như quy trình trong ví dụ 4, chỉ khác là bước xử lý với  $H_2O_2$  được thực hiện sau bước trung hòa và chiết bằng axit axetic:

Bước 1: Tự phân tế bào nấm men bia;

Bước 2: Xử lý bằng dung dịch NaOH 0,25M ở nhiệt độ phòng;

Bước 3: Xử lý bằng dung dịch NaOH 0,25M ở  $80 \pm 2$  °C;

Bước 4: Trung hòa và chiết bằng dung dịch axit axetic 0,5N hoặc etanol 96%;

Bước 5: Xử lý bằng  $H_2O_2$  (tẩy màu sản phẩm);

Bước 6: Rửa bằng nước RO.

Trong quy trình này,  $H_2O_2$  không được sử dụng để phá vỡ cấu trúc của thành tế bào nấm men bia (như trong ví dụ trên), mà là để tẩy màu sản phẩm  $\beta$ -glucan (sản phẩm thu được có màu tối và được tẩy màu bằng  $H_2O_2$ ). Bằng quy trình này, từ 1kg bã men bia đã ép nước thu được 58,52g chế phẩm  $\beta$ -glucan với hàm lượng  $\beta$ -glucan 21,62% và hiệu suất đạt 29,26%.

#### **Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Quy trình tách chiết  $\beta$ -glucan theo giải pháp hữu ích không sử dụng nồng độ kiềm hoặc axit cao và không sử dụng nhiệt độ cao, ít gây ô nhiễm môi trường.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tách chiết  $\beta$ -glucan từ thành tế bào nấm men bia bao gồm các bước: tự phân tế bào nấm men bia; thủy phân bằng enzym bằng cách sử dụng chế phẩm Oryzaezyme thu được từ chủng nấm mốc tương *Aspergillus oryzae* chứa proteinaza, amylaza và xenlulaza với lượng lần lượt là 500-750 IU/g, 800-1000 IU/g và 400-700 IU/g tính theo chế phẩm khô; xử lý bằng hydro peroxit; xử lý bằng dung dịch NaOH 0,2-0,3M ở nhiệt độ phòng; xử lý bằng dung dịch NaOH 0,2-0,3M ở nhiệt độ  $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; trung hòa và chiết bằng dung dịch axit axetic 0,5N hoặc etanol 96%; và rửa bằng nước RO để thu được chế phẩm  $\beta$ -glucan có hàm lượng  $\beta$ -glucan đạt 40-60% theo khối lượng.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó

bước tự phân tế bào nấm men bia được thực hiện ở nhiệt độ  $55-60^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 48 giờ, sau đó ly tâm ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút để thu lấy phần cặn chứa thành tế bào;

bước thủy phân bằng enzym được thực hiện ở nhiệt độ  $55-60^{\circ}\text{C}$  trong thời gian ít nhất 30 giờ, với sự có mặt của dịch chiết chế phẩm Oryzaezyme theo tỉ lệ 20ml dịch chiết chế phẩm Oryzaezyme/100g cặn thành tế bào, ly tâm ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút để thu được phần cặn chứa thành tế bào đã được xử lý bằng enzym; trong đó dịch chiết chế phẩm Oryzaezyme được điều chế bằng cách hòa tan chế phẩm Oryzaezyme trong dung dịch đệm Tris hoặc đệm phosphat 10mM, độ pH= 7,0 theo tỉ lệ 1/20 (g/ml);

bước xử lý bằng hydro peroxit được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 2-3 giờ có khuấy, sau đó ly tâm ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút để thu cặn;

bước xử lý bằng dung dịch NaOH 0,2-0,3M ở nhiệt độ phòng được thực hiện với tỉ lệ cặn/dung dịch NaOH 0,2-0,3M nằm trong khoảng từ 1/4 – 1/3 theo thể tích, sau đó ly tâm ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút để thu cặn;

bước xử lý bằng dung dịch NaOH 0,2-0,3M ở  $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  được thực hiện trong thời gian 1 giờ với tỉ lệ cặn/dung dịch NaOH 0,2-0,3M là nằm trong khoảng từ 1/4 – 1/3 theo thể tích, sau đó ly tâm ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút để thu lấy cặn;

bước trung hòa được thực hiện bằng dung dịch HCl 10% đến độ pH = 7, sau đó ly tâm ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút để thu cặn và chiết cặn này bằng dung dịch axit axetic 0,5N hoặc etanol 96% ở nhiệt độ  $< 75^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút, với tỉ lệ cặn/dung

dịch axit axetic là 1/2 (khối lượng/thể tích), sau đó ly tâm ở tốc độ 6000-8000 vòng/phút trong 5-10 phút để thu cặn sản phẩm  $\beta$ -glucan; và

bước rửa cặn sản phẩm  $\beta$ -glucan được thực hiện một đến hai lần bằng nước RO với tỉ lệ cặn/nước RO mỗi lần rửa nằm trong khoảng từ 1/3-1/2 (khối lượng/thể tích) để thu được chế phẩm  $\beta$ -glucan.

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó trong bước tự phân sử dụng dịch chiết chế phẩm Oryzaenzyme theo tỉ lệ 20ml dịch chiết chế phẩm Oryzaenzyme/100g cặn thành tế bào.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó trong bước xử lý bằng hydro peroxit, hòa cặn thu được ở bước thủy phân bằng enzym trong nước theo tỉ lệ cặn/nước là 1/2 (khối lượng/thể tích), sau đó cho dung dịch hydro peroxit 50% vào tới nồng độ cuối là 2,5-3%.

5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó dung dịch NaOH sử dụng trong bước xử lý ở nhiệt độ phòng và bước xử lý ở nhiệt độ  $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  là dung dịch NaOH 0,25M.