



(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)



2-0002508

(51) **C12N 9/64; C12N 9/68**
2006.01

(13) **Y**

(21) 2-2018-00487

(22) 30/11/2018

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/07/2019 376A

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

(72) Đỗ Thị Tuyên (VN); Lê Thanh Hoàng (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM LUMBROKINAZA CÓ TÁC DỤNG THỦY
PHÂN CỤC MÁU ĐÔNG

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm Lumbrokinaza có tác dụng thủy phân cục máu đông từ loài giun *Eisenia fetida* bao gồm các bước: a) tách enzym Lumbrokinaza thô; b) tinh sạch enzym Lumbrokinaza; và c) tạo chế phẩm enzym Lumbrokinaza,

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm Lumbrokinaza chất lượng cao có tác dụng thủy phân cục máu đông.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Lumbrokinaza là tên gọi chung chỉ một nhóm gồm 6 isozym có tác dụng thủy phân fibrin, làm tan cục máu đông. Khối lượng phân tử trung bình của Lumbrokinaza từ 25 đến 37 kDa (Cho et al., 2004). Lumbrokinaza là những chuỗi polypeptit đơn giàu asparagin hoặc axit aspartic, rất ít prolin là lysin, không chứa thành phần đường. Chúng được xếp vào serin proteaza kiềm giống trypsin. Tuy nhiên chúng giàu asparagin và axit aspartic hơn so với các serin proteaza khác đã biết. Lumbrokinaza được tìm thấy trong ruột, dịch mô và dịch ruột của rất nhiều loài giun đất. Chúng có tác dụng tiêu sợi huyết mạnh, người ta giải thích sự có mặt của nó trong các loại giun là do chúng cần để tiêu hóa thức ăn là những mảnh vụn thực vật và các chất hữu cơ trong đất nên chúng sản xuất Lumbrokinaza như một serin proteaza (Mahendra Kumar Verma and Pulicherla 2011).

Một số nghiên cứu gần đây cho rằng các enzym thủy phân fibrin có thể hòa tan cục máu đông và hạn chế được khả năng vón cục (Dong et al. 2004; Jin et al. 2000). Các nghiên cứu đã tách chiết, tinh sạch và đánh giá tính chất lý hóa và ứng dụng lâm sàng của enzym thủy phân fibrin từ giun đất *Lumbricus rubellus*, *Lumbricus bimastus*, *Eisenia fetida* hoặc *Eisenia Andrei* (Hu et al. 2004; Yan et al. 2010; Yuan et al. 2006). Một số tác giả thử nghiệm tác dụng chống tắc nghẽn mạch ở mức độ sâu trên động vật thực nghiệm, nghiên cứu biến đổi hóa học nhằm mục đích làm enzym bền hơn, nghiên cứu các đặc tính và biến đổi hóa học của enzym khi đưa vào cơ thể (Nakajima et al. 1993).

Từ năm 2002 đến 2003, các nhà khoa học Trung quốc cũng tách chiết được enzym có hoạt tính thủy phân fibrin cao từ loài giun *Eisenia fetida* (Liu and Ge 2002; Tang et al. 2003). Họ đã chứng minh rằng các enzym này có thể sử dụng làm thuốc

uống thay thế một số thuốc chữa bệnh tim mạch rất đắt trên thị trường hiện nay như urokinase và tPA (Yan et al. 2010). Liu và Ge (2002) đã nghiên cứu các nhân tố ảnh hưởng đến các enzym có hoạt tính thủy phân fibrin từ giun đất *Eisenia fetida*. Nghiên cứu đã chứng minh được giun nuôi ở trong phân gia súc sẽ có hoạt tính thủy phân fibrin cao hơn giun nuôi ở trong rác. Hàm lượng arsen ở trong giun đất có thể làm tăng hoạt tính thủy phân fibrin của nó. Selen thì có ảnh hưởng ít hơn đến hoạt tính thủy phân. Các phương pháp tách chiết khác nhau cũng ảnh hưởng đến hoạt tính thủy phân fibrin của enzym. Trong nghiên cứu này tác giả đã dùng 3 phương pháp chiết bằng cồn 75%; NaCl 0,9% và sucroza 10%. Trong đó, phương pháp chiết bằng cồn 75% có hoạt tính thủy phân fibrin cao nhất (Liu and Ge 2002).

Ưu điểm lớn nhất của enzym thủy phân fibrin từ giun đất là có thể hấp thụ qua đường ruột vào máu. Khi vào trong máu, enzym này vừa có tác dụng hoạt hóa hệ thống thủy phân fibrin, vừa có hoạt tính plasmin hòa tan trực tiếp fibrin. Đây chính là những cơ sở của các nghiên cứu ứng dụng enzym thủy phân fibrin từ giun đất làm thuốc uống chữa bệnh tim mạch (Fan et al., 2001; Nakajima et al., 1993; Sumi et al., 1993).

Để tinh sạch được enzym Lumbrokinaza, hầu hết các phòng thí nghiệm đều bắt đầu bằng việc sử dụng các phương pháp tinh sạch bằng phương pháp sắc ký trên các cột sắc ký sephadex, cột sắc ký trao đổi ion... rất tốn kém, hiệu suất tinh sạch không cao, khả năng thu hồi còn thấp. Cho và cộng sự (2004) đã tinh sạch được 6 phân đoạn Lumbrokinaza (F1 đến F6) từ giun đất *L. rubellus* có hoạt tính thủy phân fibrin bằng phương pháp tủa muối amoni sulfat và sắc ký cột (Cho et al. 2004b). Phan Thị Bích Trâm và cộng sự (2007) đã tinh sạch nhóm enzym Lumbrokinaza từ giun đất bằng việc sử dụng phương pháp tủa bằng axeton, phối hợp với sắc ký trao đổi ion và tương tác kỵ nước cho thấy thành phần proteaza trong giun đất khá phức tạp, có đến 10 phân đoạn enzym khác nhau với trọng lượng phân tử từ 24,0 kDa đến 58,3 kDa.

Ở Việt Nam, lĩnh vực nghiên cứu các chế phẩm chống tắc nghẽn mạch máu đang vẫn còn mới mẻ, đặc biệt là nghiên cứu về các dòng enzym sạch có chất lượng cao. Những năm gần đây, nghiên cứu sử dụng các yếu tố chống tắc nghẽn mạch máu dạng tự nhiên và tái tổ hợp bắt đầu được quan tâm. Năm 2001-2002, Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp Hải Phòng đã thực hiện một nhiệm vụ nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ hằng năm của Sở Khoa học, mã số 240: “Nghiên cứu ứng dụng điều trị

bệnh nhồi máu cơ tim cấp bằng streptokinaza tại bệnh viện Việt Tiệp Hải Phòng” (Sở Khoa học và Công nghệ Hải Phòng, <http://www.haiphong.gov.vn/sokhcn/vn/index>). Lê Văn Nam và Lê Thị Cẩm Dung (2003) đã nghiên cứu cách điều trị huyết khối trong tai biến mạch máu não. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã đưa ra công thức và phác đồ điều trị huyết khối. Các thuốc làm phân hủy huyết khối đã được thành lập trong lòng mạch máu, các thuốc này đa số tác động qua cơ chế kích hoạt plasmin và chính plasmin sẽ làm phân giải huyết khối. Các thuốc ly giải huyết khối gồm: streptokinaza, urokinaza, scu-PA, rTPA (Lê Văn Nam and Lê Thị Cẩm Dung 2003).

Một số nghiên cứu về Lumbrokinaza từ giun đất ứng dụng tạo ra sản phẩm thuốc chống đông máu ở Việt Nam cũng mới bắt đầu. Nhóm nghiên cứu của PGS Nguyễn Thị Ngọc Dao (Viện CNSH, Viện KH&CN Việt Nam), đã nghiên cứu và sản xuất thành công chế phẩm tương tự như Lumbrokinaza từ giun quế Việt Nam *Perionyx escavatus* có tác dụng làm tan cục máu đông làm nghẽn động mạch, tạo ra vết thương bị tụ máu (Lý TBT and Nguyễn TND 2004; Lý TBT et al. 2006; Lý Thị Bích Thủy 2004). Tuy nhiên đây mới chỉ là những sản phẩm Lumbrokinaza thô từ bột giun còn chứa rất nhiều các protein tạp khác.

Trước đây, các tác giả của giải pháp hữu ích cũng đã thành công trong việc nghiên cứu enzym Lumbrokinaza tái tổ hợp, cụ thể đã tiến hành nâng cao sinh tổng hợp Lumbrokinaza từ chủng nấm men *Pichia pastoris* (Do Thi Tuyen et al., 2015). Tuy nhiên việc tinh sạch Lumbrokinaza tái tổ hợp sử dụng cột Histag vẫn chưa có tính khả thi cao khi cần phải tinh sạch một lượng lớn, và độ an toàn của những chế phẩm từ chủng tái tổ hợp vẫn còn nhiều tranh cãi.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để khắc phục nhược điểm của các giải pháp đã biết, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình tinh sạch enzym lumbrokinaza sử dụng các cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng (hollow fiber) với kích thước màng siêu lọc theo MWCO (molecular weight cutoff) là 50 kDa và 10 kDa để tạo ra chế phẩm Lumbrokinaza chất lượng cao có tác dụng thủy phân cục máu đông. Giải pháp hữu ích sử dụng loài giun *Eisenia fetida* có hoạt tính thủy phân fibrin cao được thu thập tại các vùng xung quanh Hà Nội để tách chiết enzym Lumbrokinaza, như vậy đã tận dụng được nguồn tài nguyên thiên nhiên ở Việt Nam để tạo ra dòng chế phẩm có giá trị. Việc sản xuất, tinh chế Lumbrokinaza từ loài

giun *Eisenia fetida* là hoàn toàn chủ động với các bước đơn giản, cùng nguồn nguyên liệu tự nhiên dồi dào, môi trường chi phí thấp, không thải ra bên ngoài môi trường các chất độc hại, tạo ra dòng chế phẩm hỗ trợ điều trị bệnh tắc nghẽn mạch.

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm Lumbrokinaza từ loài giun *Eisenia fetida*. Chế phẩm thu được bao gồm các protein có khối lượng từ 25- 35 kDa. Hoạt tính thủy phân fibrin của sản phẩm Lumbrokinaza đạt hơn 20000 FU/g chế phẩm. Quy trình tạo chế phẩm Lumbrokinaza có tác dụng chống đông máu bao gồm các bước:

a) Tách enzyme Lumbrokinaza thô: giun *Eisenia fetida* đã được làm sạch, loại bỏ những con chết, rửa sạch trong đệm natri phosphat 0,02 M, pH 7,4, sau đó bổ sung đệm kali phosphat 0,02M, pH 7,4 vào với tỷ lệ đệm/nguyên liệu giun là 1:2 (theo v/w), nghiền trong máy nghiền đồng thể sao cho dung dịch đồng nhất, sau đó dịch nghiền đồng thể được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút, loại tủa, thu phần dịch trong màu nâu đỏ, phần dịch trong này được tiếp tục rửa bằng muối amoni sulfat nồng độ 65% bão hòa, sau đó thẩm tích, thu được dịch chứa enzyme Lumbrokinaza thô;

b) Tinh sạch enzyme Lumbrokinaza: dịch enzyme Lumbrokinaza thô thu được ở bước a) được bổ sung vào cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng (hollow fiber) với kích thước màng siêu lọc theo MWCO (molecular weight cutoff) là 50kDa để loại bỏ các protein không mong muốn có kích thước lớn hơn 50 kDa, dịch sau khi qua cột này tiếp tục được đưa lên cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng với kích thước màng siêu lọc theo MWCO là 10 kDa để cô đặc enzyme nhằm thu được dịch enzyme Lumbrokinaza tinh sạch có kích thước phân tử nằm trong khoảng 25- 35 kDa khi được kiểm tra trên điện di polyacrylamit 12,5%; và

c) Sản xuất chế phẩm enzyme Lumbrokinaza: dịch enzyme Lumbrokinaza thu được ở bước b) được bổ sung maltodextrin vào theo tỷ lệ enzyme/maltodextrin là: 10: 1 (theo v/w), sau đó sấy phun tạo bột với các thông số kỹ thuật: nhiệt độ đầu vào 120°C- 130°C; nhiệt độ đầu ra: 65-70°C; bơm nhu động: 7 lít/giờ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện điện di đồ sản phẩm protein tinh sạch sau khi qua cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng (1: mẫu enzyme trước khi qua cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng có kích thước màng siêu lọc theo MWCO là 50 kDa; 2-7: mẫu enzyme sau khi qua cột lọc tiếp tuyến

sợi rỗng có kích thước màng siêu lọc theo MWCO là 50 kDa và cô đặc bằng cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng có kích thước màng siêu lọc theo MWCO là 10 kDa).

Hình 2 thể hiện hoạt tính thủy phân đĩa fibrin của sản phẩm Lumbrokinaza tinh sạch.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất chế phẩm Lumbrokinaza có tác dụng thủy phân cục máu đông được sản xuất bởi phòng Công nghệ sinh học Enzym, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chế phẩm thu được được lưu giữ ở nhiệt độ phòng và nhiệt độ 4°C.

Trong phạm vi của giải pháp hữu ích, các bước của quy trình sản xuất Lumbrokinaza được bộc lộ rõ ràng ở đây thông qua các phương án thực hiện giải pháp hữu ích.

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm Lumbrokinaza có hoạt tính thủy phân cục máu đông bao gồm các bước: a) tách enzym Lumbrokinaza thô; b) tinh sạch enzym Lumbrokinaza; và c) tạo chế phẩm enzym Lumbrokinaza, được mô tả chi tiết như sau:

a) Tách enzym Lumbrokinaza thô:

Loài giun *Eisenia fetida* được sử dụng trong giải pháp hữu ích dễ dàng được thu thập tại các vùng xung quanh Hà Nội để tách chiết enzym Lumbrokinaza. Giun *Eisenia fetida* sau khi thu thập được làm sạch, loại bỏ những con chết, và rửa sạch trong đệm natri phosphat 0,02 M, pH 7,4. Nguyên liệu sau khi làm sạch được bổ sung đệm kali phosphat 0,02 M, pH 7,4 theo tỷ lệ đệm/nguyên liệu giun là 1:2 (theo v/w), hỗn hợp được đem nghiền trong máy nghiền đồng thể sao cho dung dịch đồng nhất. Dịch nghiền đồng thể này được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút, loại tủa để thu được phần dịch trong màu nâu đỏ. Dịch enzym trong này được tiếp tục rửa bằng muối amoni sulfat nồng độ 65% bão hòa, sau đó thẩm tích để thu được dịch enzym Lumbrokinaza thô.

b) Tinh sạch enzym Lumbrokinaza:

Theo như nghiên cứu của Cho và cộng sự, enzym Lumbrokinaza là một nhóm các enzym thủy phân protein có khối lượng phân tử ~25-37 kDa (Cho et al., 2004), do

đó việc sử dụng các cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng với diện tích màng lọc $1,25 \text{ m}^2$, kích thước màng siêu lọc theo MWCO là 10 kDa và 50 kDa là rất hiệu quả, trong đó màng siêu lọc với MWCO là 50 kDa để loại bỏ các protein không mong muốn có kích thước lớn hơn 50 kDa và màng siêu lọc với MWCO là 10 kDa được dùng để cô đặc enzym. Bên cạnh đó, việc loại bỏ các phân tử lớn như lipid cũng rất quan trọng nhằm thu được enzym tinh sạch. Các cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng này do hãng WaterSep Technology, Mỹ cung cấp.

Dịch enzym Lumbrokinaza thô thu được ở bước a) được bổ sung vào cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng (Hollow Fiber) với kích thước màng siêu lọc theo MWCO là 50kDa để loại bỏ các protein không mong muốn có kích thước lớn hơn 50 kDa (tốc độ dòng qua cột 5L/phút, tốc độ dòng thải 0,1L/phút, thời gian 3-4 giờ với thể tích 20L, áp suất màng $<0,4 \text{ atm}$); dịch thu được sau khi qua cột này tiếp tục được đưa lên cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng với kích thước màng siêu lọc theo MWCO là 10 kDa để cô đặc enzym (tốc độ dòng qua cột 5L/phút, tốc độ dòng thải 0,1L/phút, thời gian 2 giờ với thể tích 20L, áp suất màng $<0,25 \text{ atm}$) nhằm thu được dịch enzym Lumbrokinaza tinh sạch có kích thước phân tử nằm trong khoảng 25- 35 kDa khi được kiểm tra trên điện di polyacrylamit 12,5% và có hoạt tính thủy phân fibrin cao;

c) Tạo chế phẩm enzym Lumbrokinaza:

Dịch enzym Lumbrokinaza được tinh sạch được bổ sung maltodextrin theo tỷ lệ enzym/maltodextrin là 10/1 (theo v/w), sau đó hỗn hợp này được sấy phun tạo bột với các thông số kỹ thuật: nhiệt độ đầu vào 120°C - 130°C , nhiệt độ đầu ra: 65 - 70°C , dùng khí nén phun sương; bơm nhu động: 7lít/giờ.

Chế phẩm thu được theo giải pháp hữu ích ở dạng bột tơi xốp, mùi thơm nhẹ, có hoạt tính thủy phân fibrin cao đạt 20 000 FU/g.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Sản xuất chế phẩm Lumbrokinaza

Loài giun *Eisenia fetida* sau khi thu thập được làm sạch, loại bỏ những con chết, và rửa sạch trong đệm natri phosphat 0,02 M, pH 7,4. 10 kg nguyên liệu sau khi làm sạch được bổ sung đệm kali phosphat 0,02 M, pH 7,4 theo tỷ lệ đệm /nguyên liệu

là 1:2 (theo v/w). Hỗn hợp được đem nghiền trong máy nghiền đồng thể để thu được dịch đồng nhất. Dịch nghiền đồng thể sau đó được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút, loại tủa để thu được dịch trong. Phần dịch trong được tiếp tục tủa bằng muối amoni sulfat nồng độ 65% bão hòa, sau đó thẩm tích để thu được dịch enzym Lumbrokinaza thô. Phần dịch này được bổ sung lần lượt vào các cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng với kích thước các màng siêu lọc theo MWCO là 50 kDa và 10 kDa thu được dịch enzym Lumbrokinaza tinh sạch. Kích thước phân tử của enzym thu được được kiểm tra trên điện di polyacrylamit 12,5% (Hình 1) và có hoạt tính thủy phân fibrin cao, tập trung ở các băng protein có kích thước phân tử nằm trong khoảng 25-35 kDa.

Enzym Lumbrokinaza được tinh sạch được bổ sung maltodextrin vào theo tỷ lệ enzym/maltodextrin là 10/1 (theo v/w), đem sấy phun tạo bột với các thông số kỹ thuật: nhiệt độ đầu vào 120°C-130°C, nhiệt độ đầu ra: 65-70°C, dùng khí nén phun sương, bơm nhu động: 7 lít/giờ. Chế phẩm thu được ở dạng bột tơi xốp, mùi thơm nhẹ.

Ví dụ 2: Xác định hoạt tính thủy phân fibrin.

Hoạt tính enzym được xác định theo phương pháp đĩa fibrin của Astrup và Mullertz, sử dụng plasmin (yếu tố thủy phân fibrin có sẵn trong cơ thể người) làm chuẩn (Astrup and Mullertz 1952). Dựa trên sự thủy phân fibrin bằng Lumbrokinaza tạo vòng tròn trong suốt. Đo đường kính, tính diện tích vòng phản ứng.

Hoạt tính thủy phân fibrin của Lumbrokinaza được xác định dựa trên đường chuẩn plasmin. Mỗi đĩa petri đường kính 10 cm chứa 10 ml dung dịch fibrinogen tinh khiết trong NaCl 0,9% (nồng độ 0,2%) được ngưng kết bằng 15 µl thrombin (100 UI/ml). Đĩa đặt ở vị trí phẳng, dung dịch được đổ cho đồng đều, tránh tạo bọt khí. Đĩa được để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ để fibrin đông tụ hoàn toàn. Nhỏ từng giọt 10 µl dịch enzym lên đĩa (giọt phải tròn), ủ 37°C trong 5 giờ. Khi đông tụ, fibrin có màu trắng đục, do đó, các vùng bị thủy phân trở nên trong suốt, dễ dàng quan sát bằng mắt thường. Sau 5 giờ, đo đường kính, tính diện tích vòng phản ứng. Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần để lấy giá trị trung bình (Hình 2).

Kết quả Bảng 1 cho thấy các mẫu Lumbrokinaza sạch đều đạt 20 000 FU/g chế phẩm.

Bảng 1. Hoạt tính của Lumbrokinaza sau 3 lần lặp lại

Mẫu	Đường kính (Φ: mm)	Hoạt tính (FU/g chế phẩm)
Lần 1	14,9±0,02	21 100
Lần 2	15,4±0,01	22 000
Lần 3	13,3±0,015	19 500
Trung bình		20 866

Ví dụ 3: Thử nghiệm hoạt tính thủy phân cục máu đông của chế phẩm Lumbrokinaza

0,5 ml máu thỏ được lấy vào ống eppendorf để đông tự nhiên bằng cách giữ ở 37°C trong 2-3 giờ, tạo cục máu đông. Ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/5 phút để loại hết huyết thanh. Mẫu máu đông hoàn toàn sau khi loại hết huyết thanh sẽ được sử dụng để đánh giá khả năng thủy phân cục máu đông của chế phẩm Lumbrokinaza. Mẫu Lumbrokinaza được pha trong nước cất ở các nồng độ Lumbrokinaza đạt 50, 200, 400 và 500 FU).

Sau khi thu được cục máu đông bằng cách loại huyết thanh. Tiến hành cân trọng lượng cục máu đông (= trọng lượng ống eppendorf chứa cục máu đông đã loại bỏ huyết tương - trọng lượng ống eppendorf không chứa máu ban đầu). Bổ sung 100 µl dịch enzyme đã pha loãng sao cho hoạt tính đạt 50-500 FU. Ủ 37°C qua đêm, tiến hành kiểm tra mức độ thủy phân cục máu đông. Sau ủ, loại bỏ dịch máu bị làm tan, cân trọng lượng phần máu đông còn lại. Tính phần trăm lượng máu bị thủy phân trên tổng lượng máu đông ban đầu. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với mỗi nồng độ. Kết quả Bảng 2 cho thấy ở các nồng độ từ 50 FU đến 200 FU hoạt tính thủy phân cục máu đông tương đối thấp chỉ đạt được 19,7% -36,6%. Khi tăng nồng độ Lumbrokinaza lên 500 FU đã thủy phân được 66,8% cục máu đông. Rõ ràng Lumbrokinaza đã có tác dụng thủy phân cục máu đông rất tốt khi bổ sung nồng độ tăng dần.

Bảng 2. Khả năng thủy phân cục máu đông của chế phẩm lumbrokinaza

Nồng độ	Tỷ lệ thủy phân cục máu đông (%)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
500 FU	65,7	66,8	67,8	66,8±1,1

400 FU	58,0	57,5	59,5	58,3±1,0
200 FU	35,0	38,0	36,9	36,6±1,5
50 FU	18,5	20,0	20,5	19,7±1,0
Đối chứng âm (NaCl 0,9%)	2,6	3,0	2,8	2,8±0,2

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình của giải pháp hữu ích được thực hiện đơn giản, sử dụng các cột lọc tiếp tuyến với màng siêu lọc theo kích thước để tinh sạch protein. Chế phẩm Lumbrokinaza thu được có tác dụng thủy phân cục máu đông, với hoạt tính fibrin đạt hơn 20 000 FU/g chế phẩm. Chế phẩm sẽ ổn định hơn, bền hơn và không bị phân hủy khi được lưu hành trên thị trường.

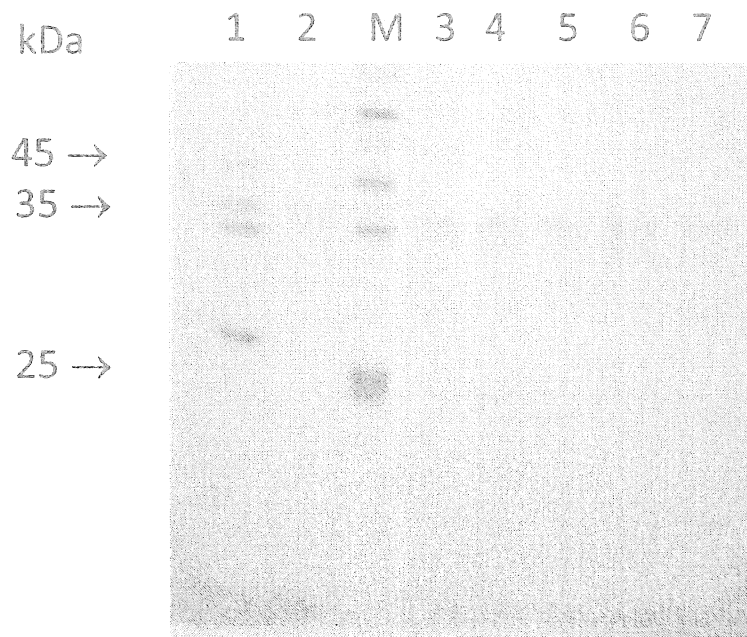
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm Lumbrokinaza có tác dụng thủy phân cục máu đông bao gồm các bước:

a) Tách enzym Lumbrokinaza thô: giun *Eisenia fetida* đã được làm sạch, loại bỏ những con chết, rửa sạch trong đệm natri phosphat 0,02 M, pH 7,4, sau đó bổ sung đệm kali phosphat 0,02M, pH 7,4 vào với tỷ lệ đệm/nguyên liệu giun là 1:2 (theo v/w), nghiền trong máy nghiền đồng thể sao cho dung dịch đồng nhất, sau đó dịch nghiền đồng thể được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút, loại tử, thu phần dịch trong màu nâu đỏ, phần dịch trong này được tiếp tục tử bằng muối amoni sulfat nồng độ 65% bão hòa, sau đó thẩm tích, thu được dịch chứa enzym Lumbrokinaza thô;

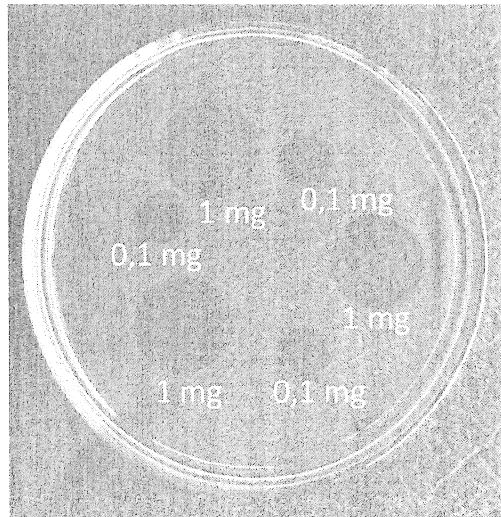
b) Tinh sạch enzym Lumbrokinaza: dịch enzym Lumbrokinaza thô thu được ở bước a) được bổ sung vào cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng với kích thước màng siêu lọc theo MWCO là 50kDa để loại bỏ các protein không mong muốn có kích thước lớn hơn 50 kDa, dịch sau khi qua cột này tiếp tục được đưa lên cột lọc tiếp tuyến sợi rỗng với kích thước màng siêu lọc theo MWCO là 10 kDa để cô đặc enzym nhằm thu được dịch enzym Lumbrokinaza tinh sạch có kích thước phân tử nằm trong khoảng 25- 35 kDa khi được kiểm tra trên điện di polyacrylamit 12,5%; và

c) Sản xuất chế phẩm enzym Lumbrokinaza: dịch enzym Lumbrokinaza thu được ở bước b) được bổ sung maltodextrin vào theo tỷ lệ enzym/maltodextrin là: 10/ 1 (theo v/w), sau đó sấy phun tạo bột với các thông số kỹ thuật: nhiệt độ đầu vào 120°C- 130°C; nhiệt độ đầu ra: 65-70°C; bơm nhu động: 7 lít/giờ.



A

Hình 1.



Hình 2.