



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

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

(11)



1-0026649

(51)⁷ B01D 11/00

(13) B

(21) 1-2015-01021

(22) 28/08/2013

(86) PCT/AU2013/000964 28/08/2013

(87) WO/2014/032100 06/03/2014

(30) 2012903726 28/08/2012 AU

(45) 25/12/2020 393

(43) 27/07/2015 328A

(73) THE PRODUCT MAKERS (AUSTRALIA) PTY LTD. (AU)

50-60 Popes Road, Keysborough, Victoria 3173, Australia

(72) KANNAR, David (AU); KITCHEN, Barry James (AU); SPARROW, Lance (AU).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẤT CHIẾT TỪ CÂY MÍA VÀ CHẤT CHIẾT THU ĐƯỢC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chất chiết từ cây mía bao gồm các bước:

i) trộn sản phẩm thu được từ cây mía với etanol để tạo ra hỗn hợp chiết chứa ít nhất khoảng 50% thể tích etanol;

ii) để chất kết tủa tạo ra trong hỗn hợp chiết;

iii) loại bỏ chất kết tủa ra khỏi hỗn hợp chiết để thu được dịch nổi bề mặt; và

iv) loại bỏ etanol ra khỏi dịch nổi bề mặt để thu được chất chiết từ cây mía.

Sáng chế còn đề cập đến chất chiết thu được theo phương pháp của sáng chế. Chất chiết này được sử dụng để làm giảm chỉ số calo khả dụng của thực phẩm hoặc đồ uống, điều trị hoặc phòng bệnh, và chế phẩm ở dạng sản phẩm bổ sung dinh dưỡng, thực phẩm bổ sung, sản phẩm dinh dưỡng dùng trong thể thao, chế phẩm để bao thực phẩm hoặc dược phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất chiết từ cây mía và các dòng xử lý sau đó (ví dụ, đường thô, mật mía, bã mía, bùn cặn ép mía và phế thải từ cánh đồng mía). Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất chất chiết này. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng chất chiết này để làm giảm chỉ số calo khả dụng và/hoặc chỉ số đường huyết của thực phẩm và đồ uống, và sử dụng chất chiết này trong phương pháp điều trị hoặc phòng các bệnh như bệnh đái tháo đường và hội chứng chuyển hóa cũng như các tình trạng bệnh nền bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tình trạng viêm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sau khi được thu hoạch bằng máy, cây mía được vận chuyển tới máy ép thô và được ép giập giữa các trục ép có răng cưa. Sau đó, cây mía đã ép giập này được ép để chiết nước mía ép thô, trong khi bã mía (chất xơ còn lại) được sử dụng làm nhiên liệu. Nước mía ép thô này được gia nhiệt đến điểm sôi của nó để tách chất bẩn bất kỳ, tiếp đó vôi và chất tẩy trắng được bổ sung vào và bùn cặn ép mía được loại bỏ. Nước mía ép thô được gia nhiệt tiếp trong chân không để cô và làm tăng chỉ số Brix. Nước đường đã cô này được cấy mầm kết tinh để tạo ra các tinh thể đường rời và nước mật đặc được gọi là mật mía. Tinh thể đường và nước mật này được tách bằng máy ly tâm và dòng chất thải là mật mía được thu hồi để sử dụng làm thức ăn cho động vật bậc thấp. Do vậy, phương pháp tinh chế đường này tạo ra rất nhiều sản phẩm bao gồm nước mía ép thô, bã mía, bùn cặn ép mía, nước mía ép đã làm trong, mật mía, bột nước mía ép và tinh thể đường. Bột nước mía ép được tạo ra khi đường hoặc mật mía được lên men trong điều kiện có kiểm soát để tạo ra etanol.

Tinh thể đường rời thu được từ quá trình nêu trên được tinh chế tiếp để thu được nhiều loại sản phẩm đường có bán trên thị trường. Ví dụ, quá trình tinh chế tiếp có thể bao gồm trộn tinh thể đường rời với nước đường đặc nóng để làm mềm lớp bao ngoài cùng của các tinh thể này. Tiếp đó, các tinh thể đường được thu hồi bằng máy ly tâm và sau đó hòa tan trong nước nóng, đôi khi bước này được gọi là bước tinh luyện đường. Sau đó, nước đường này được tinh chế tiếp bằng cách sục khí cacbonic hoặc phosphat hóa, lọc, khử màu và tạo mầm kết tinh bằng tinh thể đường mịn. Khi tinh thể

đường đã lớn lên tới kích thước cần thiết, tinh thể này được tách khỏi nước đường bằng cách ly tâm, tiếp đó sấy, phân loại và đóng gói. Có thể lặp lại nhiều lần bước thu hồi tinh thể đường từ nước đường. Nước đường sẫm màu còn lại sau khi thu hồi toàn bộ tinh thể đường còn được gọi là mật mía của nhà máy tinh chế đường.

Mật mía và các sản phẩm khác của quá trình tinh chế đường, đặc biệt là nước đường đặc và nước mía ép, là các hỗn hợp phức tạp của nhiều chất. Thông thường, chúng khó tinh chế thêm và trong thành phần của chúng thường có các chất gây độc cho các nguyên liệu tách chuẩn. Mật mía và nước đường đặc và nước mía ép này thường chứa polyphenol, polysacarit, flavonoid, peptit và protein, chất khoáng, axit hữu cơ, và mono và disacarit. Các polyme phức tạp cũng được tạo ra trong quá trình tinh chế đường (ví dụ, melanoidin).

Cân nhắc chính đối với thao tác ép mía sơ bộ là làm tăng tối đa lượng chất chiết và lượng sucroza thu hồi. Tương tự, cân nhắc chính đối với các nhà máy tinh chế đường để xử lý nước mía ép thô là làm tăng độ tinh khiết của sucroza. Etanol đã được sử dụng để thu hồi sucroza từ các dòng thải như mật mía (US 1,730,473) và loại bỏ chất bẩn (US 4,116,712; US 2,000,202). Etanol cũng đã được sử dụng để tách các polyphenol riêng biệt ra khỏi bột nước mía ép, bao gồm trixin, luteolin hoặc apigenin (WO 2004/014159). Theo phương pháp đã biết này, etanol trước hết được sử dụng trong bước làm sạch đường thô để loại bỏ chất bẩn và sau đó được sử dụng như một phần của hỗn hợp dung môi để tách bằng cách sắc ký các phân đoạn chứa polyphenol cụ thể.

Mật mía, nước đường vàng và nước rỉ đường đã được sử dụng làm thực phẩm bổ dưỡng từ những năm đầu của thế kỷ 20 và chúng được cho là liệu pháp điều trị hoặc chữa bệnh tốt đối với nhiều rối loạn khác nhau. Bằng chứng gần đây cho thấy rằng các hóa chất thực vật mới của cây mía có trong các sản phẩm của quá trình tinh chế đường mía làm giảm chỉ số đường huyết (glycaemic index: GI) và do đó làm giảm nguy cơ bệnh béo phì và bệnh đái tháo đường. Tuy nhiên, vị mạnh của các sản phẩm từ cây mía chứa các chất màu có trọng lượng phân tử cao làm cho chúng trở thành không ngon đối với nhiều người và độ nhớt cao của nước rỉ đường và mật mía làm cho chúng khó xử lý và không ổn định để đưa vào các thực phẩm khác. Các sản phẩm khác của quá trình tinh chế đường mía như bã mía và bùn cặn ép mía được biết là bao gồm

các chất có thể hữu ích nhưng cho đến nay bản chất khó xử lý và tính không ổn định đã làm cho chúng thường bị bỏ đi dưới dạng chất thải.

Trước đây, chất chiết từ cây mía chứa các polyphenol riêng biệt đã được sản xuất nhưng không hiệu quả bằng hỗn hợp phức tạp của polyphenol và flavonoid thu được từ các sản phẩm mía đường. Chất chiết từ cây mía chứa hỗn hợp của polyphenol và flavonoid đã được sản xuất nhưng có màu sẫm và vị đắng, do vậy làm giảm vị ngon và/hoặc hình thức của thực phẩm hoặc đồ uống thành phẩm có bổ sung các chất này. Do đó, cần phát triển phương pháp chiết cải tiến để thu được chất chiết từ cây mía có nồng độ polyphenol cao, lượng chất màu ít hơn và vị đắng giảm để tránh các vấn đề về vị ngon liên quan đến các chất chiết đã biết. Các chất chiết có đặc tính được cải thiện này sẽ được sử dụng nhiều hơn trong thực phẩm, dược phẩm dinh dưỡng và dược phẩm so với các chất chiết hiện nay.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp sản xuất chất chiết từ cây mía chứa polyphenol và/hoặc flavonoid với lượng hiệu quả về chức năng hơn và có vị ngon hơn, lượng chất màu ít hơn và hàm lượng polysaccharit thấp hơn. Chất chiết theo sáng chế được cho là tạo ra hỗn hợp có tác dụng hiệp đồng của polyphenol và các thành phần khác, hỗn hợp này chưa được tính đến trong giải pháp đã biết. Do đó, chất chiết này có thể được bổ sung lại vào thực phẩm và đồ uống với lượng nhỏ hơn mà không ảnh hưởng đáng kể đến vị ngon và/hoặc màu của sản phẩm.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chất chiết từ cây mía bao gồm các bước:

- i) trộn sản phẩm thu được từ cây mía với etanol để tạo ra hỗn hợp chiết chứa ít nhất khoảng 50% thể tích etanol;
- ii) để chất kết tủa tạo ra trong hỗn hợp chiết;
- iii) loại bỏ chất kết tủa ra khỏi hỗn hợp chiết để thu được dịch nổi bề mặt.

Chất chiết này có thể là bột, bao gồm bột sấy khô nhiệt độ thấp hoặc bột được loại nước. Tốt hơn nếu chất chiết là chất chiết lỏng, tốt hơn nữa là chất chiết trong nước.

Theo một phương án, phương pháp này cũng có thể bao gồm các bước:

i) trộn sản phẩm thu được từ cây mía với etanol để tạo ra hỗn hợp chiết sơ bộ (ví dụ, chứa ít nhất khoảng 25% thể tích etanol);

ii) để chất kết tủa tạo ra trong hỗn hợp chiết sơ bộ; và

iii) loại bỏ chất kết tủa ra khỏi hỗn hợp chiết sơ bộ để thu được dịch nổi bề mặt sơ bộ.

Dịch nổi bề mặt sơ bộ này có thể được xử lý bằng phương pháp theo sáng chế được mô tả ở trên.

Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ, isopropanol có thể được sử dụng thay cho etanol. Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ biết rõ, dung môi phân cực loại dùng cho thực phẩm thích hợp bất kỳ cũng có thể được sử dụng thay cho etanol. Dung môi phân cực loại dùng cho thực phẩm thích hợp bao gồm butanol, axeton, etyl axetat và/hoặc propyl axetat.

Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm bước loại bỏ nước ra khỏi chất chiết, tốt hơn là bằng cách làm bay hơi trong chân không, để thu được chất chiết trong nước có chỉ số Brix khoảng 65°.

Sản phẩm thải bất kỳ thích hợp của quá trình ép mía hoặc tinh chế đường mía có thể được sử dụng làm sản phẩm thu được từ cây mía trong phương pháp của sáng chế. Theo một phương án, sản phẩm thu được từ cây mía được chọn từ mật mía, bã mía, nước mía ép lần đầu, bùn cặn ép mía, nước ép mía đã làm trong, nước đường đã làm trong, nước rỉ đường, nước đường vàng, phế thải cánh đồng mía, vỏ mía và/hoặc bột nước mía ép.

Theo một phương án cụ thể, sản phẩm thu được từ cây mía là mật mía hoặc bột nước mía ép, tốt hơn là mật mía.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng trong một số trường hợp, sản phẩm thu được từ cây mía được trộn với nước để cho phép trộn hiệu quả và/hoặc trộn đều sản phẩm thu được từ cây mía với etanol để tạo ra hỗn hợp chiết. Do đó, theo một phương án, sản phẩm thu được từ cây mía là hỗn hợp của nước với sản phẩm được chọn từ mật mía, bã mía, nước mía ép lần đầu, bùn cặn ép mía, nước ép mía đã làm trong, nước đường đã làm trong, nước rỉ đường, nước đường vàng, phế thải cánh đồng mía, vỏ mía và/hoặc bột nước mía ép.

Trong các trường hợp trong đó sản phẩm thu được từ cây mía chứa các thành phần dạng rắn, trước hết có thể cần trộn hoặc làm đồng nhất sản phẩm thu được từ cây mía trước khi trộn nó với etanol để tạo ra hỗn hợp chiết. Do đó, theo một phương án khác, sản phẩm thu được từ cây mía là bã mía, phế thải cánh đồng mía và/hoặc vỏ mía được trộn hoặc làm đồng nhất với nước.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định được khoảng thời gian thích hợp để chất kết tủa tạo ra trong hỗn hợp phản ứng. Theo một phương án, chất kết tủa được để tạo ra trong thời gian 10 phút đến khoảng 24 giờ trước khi loại bỏ chất kết tủa.

Theo một phương án, chất kết tủa được loại bỏ ra khỏi hỗn hợp chiết bằng cách lọc, ly tâm, và/hoặc để lắng chất kết tủa.

Theo một phương án khác, hỗn hợp chiết được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến khoảng 30°C.

Theo một phương án khác nữa, etanol được loại bỏ ra khỏi dịch nổi bề mặt bằng cách làm bay hơi trong chân không.

Theo một phương án, phương pháp này được thực hiện theo mẻ. Theo một phương án khác, phương pháp này được thực hiện theo dòng liên tục.

Theo một phương án khác, phương pháp này còn bao gồm bước xử lý dịch nổi bề mặt bằng cách lọc màng và/hoặc trao đổi ion, sắc ký kỵ nước hoặc sắc ký loại trừ kích thước và thu hồi một hoặc nhiều phân đoạn chứa flavonoid và/hoặc polyphenol để thu được chất chiết từ cây mía.

Tốt hơn nếu chất chiết từ cây mía bao gồm hỗn hợp của flavonoid và/hoặc polyphenol. Tốt hơn nữa nếu chất chiết còn bao gồm các thành phần tồn tại cùng với flavonoid và/hoặc polyphenol trong cây mía bao gồm chất khoáng, vitamin, hydrat cacbon, axit hữu cơ và/hoặc chất xơ. Tốt hơn nữa nếu chất chiết này bao gồm hỗn hợp của flavonoid và/hoặc polyphenol dưới dạng glycon và aglycon.

Theo một phương án, dịch nổi bề mặt được lọc màng loại trừ kích thước hoặc sắc ký loại trừ kích thước.

Theo một phương án khác, phương pháp này còn bao gồm bước xử lý dịch nổi bề mặt bằng cách sắc ký trao đổi ion, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký lỏng khối phổ

(liquid chromatography-mass spectrometry: LCMS) và/hoặc khối phổ ion hóa giải hấp thụ bằng laze với sự trợ giúp nền - thời gian bay (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight: MALDI-TOF) để thu được chất chiết, tốt hơn là bằng cách sắc ký tương tác kỵ nước.

Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm bước xử lý dịch nổi bề mặt bằng cách sắc ký tương tác kỵ nước trên nhựa loại dùng cho thực phẩm, tốt hơn là FPX66 hoặc nhựa loại tương tự.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, hỗn hợp chiết chứa khoảng 70% đến khoảng 85% etanol.

Theo một phương án, chất chiết chứa một hoặc nhiều thành phần trong số trixin, apigenin, luteolin, axit cafeic, axit hydroxyxinamic, axit sinapic và các dẫn xuất của chúng.

Theo một phương án, chất chiết thu được bằng phương pháp theo sáng chế có lượng chất màu cho một nồng độ đơn vị polyphenol giảm đi so với các hỗn hợp đã biết. Chất màu của chất chiết có thể được phân tích bằng cách đo năng suất hấp thụ của dịch nổi bề mặt ở 420nm. Tốt hơn nếu dịch nổi bề mặt có năng suất hấp thụ ở 420nm nằm trong khoảng từ 800 đến khoảng 140 mili đơn vị năng suất hấp thụ (milliabsorbance unit: mAU). Chất màu của chất chiết cũng có thể được phân tích bằng cách sử dụng quy trình ICUMSA.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chất chiết thu được bằng phương pháp theo sáng chế.

Theo một phương án, chất chiết thu được bằng phương pháp theo sáng chế chứa ít nhất 25mg/ml flavonoid và/hoặc ít nhất 25mg/ml polyphenol.

Theo một phương án cụ thể, chất chiết thu được bằng phương pháp theo sáng chế chứa một hoặc nhiều thành phần trong số trixin, apigenin, luteolin, axit cafeic, axit hydroxyxinamic, axit sinapic và các dẫn xuất của chúng.

Theo một phương án, chất chiết thu được bằng phương pháp theo sáng chế có hoạt tính ức chế α -glucosidaza và/hoặc hoạt tính ức chế α -amylaza.

Theo một phương án, chất chiết thu được bằng phương pháp theo sáng chế có hoạt tính kháng viêm.

Theo một phương án, chất chiết thu được bằng phương pháp theo sáng chế có đặc tính làm giảm chỉ số calo và/hoặc hoạt tính làm chậm dòng hydrat cacbon, cụ thể là monosacarit, từ ruột vào máu. Theo cách tùy ý, chất chiết cũng có đặc tính làm giảm chỉ số đường huyết.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chất chiết từ cây mía, trong đó chất chiết này chứa ít nhất 25mg/ml flavanoit và/hoặc ít nhất 25mg/ml polyphenol.

Theo một phương án, chất chiết từ cây mía chứa một hoặc nhiều thành phần trong số trixin, apigenin, luteolin, axit cafeic, axit hydroxyxinamic, axit sinapic và các dẫn xuất của chúng.

Theo một phương án khác, chất chiết từ cây mía có hoạt tính ức chế α -glucosidaza và/hoặc hoạt tính ức chế α -amylaza.

Theo một phương án, chất chiết từ cây mía có hoạt tính kháng viêm.

Theo một phương án, chất chiết từ cây mía có đặc tính làm giảm chỉ số calo và/hoặc hoạt tính làm chậm dòng hydrat cacbon, cụ thể là monosacarit, từ ruột vào máu. Theo cách tùy ý, chất chiết này còn có đặc tính làm giảm chỉ số đường huyết.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chất chiết theo sáng chế.

Theo một phương án, chế phẩm này là dược phẩm dinh dưỡng, thực phẩm bổ sung, sản phẩm dinh dưỡng dùng trong thể thao, chế phẩm để bao thực phẩm hoặc dược phẩm. Tốt hơn nếu chế phẩm này là thực phẩm bổ sung hoặc dược phẩm.

Theo một phương án khác, chế phẩm này có thể bao gồm một hoặc nhiều hoạt chất bổ sung. Hoạt chất có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, fucodian và arcaboza. Các chế phẩm này được cho là có thể có tác dụng hiệp đồng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thực phẩm hoặc đồ uống chứa chất chiết theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Theo một phương án, thực phẩm hoặc đồ uống này được chọn từ sản phẩm bánh mì, đường kết tinh, các loại kẹo, ngũ cốc ăn sáng, chất xơ có nguồn gốc tự nhiên, chất xơ có nguồn gốc hóa học, sản phẩm từ sữa, đồ uống không cồn, nước, cà phê, cacao, chè hoặc đồ uống có cồn.

Theo một phương án khác, thực phẩm hoặc đồ uống này là đồ uống không còn được chọn từ đồ uống chứa nước quả ép và đồ uống không còn có ga.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm chỉ số đường huyết của thực phẩm hoặc đồ uống, phương pháp này bao gồm bước bổ sung chất chiết theo sáng chế và/hoặc chế phẩm theo sáng chế vào thực phẩm hoặc đồ uống.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm chỉ số calo khả dụng của thực phẩm hoặc đồ uống, phương pháp này bao gồm bước bổ sung chất chiết theo sáng chế và/hoặc chế phẩm theo sáng chế vào thực phẩm hoặc đồ uống. Ngoài ra, hoặc theo cách khác, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử dụng chế phẩm theo sáng chế trước khi, cùng với, hoặc sau khi sử dụng thực phẩm hoặc đồ uống.

Theo một phương án, thực phẩm hoặc đồ uống này được chọn từ sản phẩm bánh mì, đường kết tinh, bánh kẹo, ngũ cốc ăn sáng, chất xơ có nguồn gốc tự nhiên, chất xơ có nguồn gốc hóa học, sản phẩm từ sữa, đồ uống không cồn, nước, cà phê, cacao, chè hoặc đồ uống có cồn.

Theo một phương án cụ thể, thực phẩm là đường kết tinh.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng bệnh ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng chất chiết theo sáng chế, chế phẩm theo sáng chế và/hoặc thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế.

Theo một phương án, bệnh được điều trị hoặc phòng ngừa là bệnh đái tháo đường và/hoặc hội chứng chuyển hóa. Theo một phương án cụ thể, bệnh đái tháo đường là bệnh đái tháo đường typ II. Theo một phương án khác, bệnh đái tháo đường là bệnh đái tháo đường typ I.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chất chiết theo sáng chế, chế phẩm theo sáng chế và/hoặc thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế dùng để điều trị hoặc phòng bệnh.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng chất chiết theo sáng chế, chế phẩm theo sáng chế và/hoặc thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị hoặc phòng bệnh.

Như sẽ thấy rõ, các dấu hiệu ưu tiên và các dấu hiệu đặc trưng của một khía cạnh theo sáng chế có thể áp dụng cho nhiều khía cạnh khác của sáng chế.

Trong bản mô tả này, từ “chứa” hoặc các biến thể của nó sẽ được hiểu là bao gồm thành phần, số nguyên hoặc bước, hoặc nhóm các thành phần, số nguyên hoặc bước đã nêu, nhưng không loại trừ thành phần, số nguyên hoặc bước, hoặc nhóm các thành phần, số nguyên hoặc bước bất kỳ khác.

Sau đây, sáng chế được mô tả bằng các ví dụ không làm giới hạn phạm vi sáng chế và dựa vào các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả phân tích lượng polyphenol, trixin và chất màu (ở 420nm) trong các mẫu dịch nổi chứa etanol. Mẫu 1 = 0% etanol, mẫu 2 = 50% etanol, mẫu 3 = 66% etanol, mẫu 4 = 75% etanol, mẫu 5 = 80% etanol, mẫu 6 = 83% etanol, mẫu 7 = 86% etanol.

Fig.2 là đồ thị thể hiện tỷ lệ % ức chế glucosidaza theo log 1,4μg/ml của fucoidan (mẫu đối chứng), bột nước mía ép (mẫu 6) và mật mía (mẫu 3).

Fig.3 thể hiện kết quả so sánh tỷ lệ phần trăm ức chế PGE2 của aspirin (mẫu đối chứng), ibuprofen (mẫu đối chứng), bột nước mía ép (mẫu 6) và mật mía (mẫu 3).

Fig.4 thể hiện phổ HPLC của: (a) mẫu 1; (b) mẫu 2; (c) mẫu 3; (d) mẫu 4; (e) mẫu 5; (f) mẫu 6; (g) hợp chất phenolic ở thời gian lưu khác nhau; và (h) hợp chất flavonoid ở thời gian lưu khác nhau.

Fig.5 là đồ thị thể hiện tỷ lệ % thu hồi polyphenol (PP) theo tỷ lệ % etanol và tỷ lệ % loại bỏ chất màu theo tỷ lệ % etanol của các mẫu nguyên liệu mật mía có chỉ số Brix bằng 25° và 48°; trục x = % etanol; trục y = % polyphenol thu hồi và tỷ lệ % loại bỏ chất màu.

Fig.6 thể hiện sơ đồ công nghệ của phương pháp chiết để thu được chất chiết chuẩn theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Kỹ thuật và định nghĩa chung

Nếu không được xác định rõ theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật sử dụng ở đây sẽ có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết

trung bình trong lĩnh vực này (ví dụ, hóa học, hóa sinh, khoa học thực phẩm và dinh dưỡng, nuôi cấy tế bào, sinh học phân tử và miễn dịch).

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, kỹ thuật protein tái tổ hợp, nuôi cấy tế bào và miễn dịch sử dụng trong sáng chế là các quy trình chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết rõ. Các kỹ thuật này được mô tả và giải thích trong tài liệu chuyên ngành như J. Perbal, *Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook và cộng sự, *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, 3rd edn, Cold Spring Harbour Laboratory Press (2001), R. Scopes, *Protein Purification – Principles and Practice*, 3rd edn, Springer (1994), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes 1-4, IRL Press (1995 và 1996), và F.M. Ausubel et al. (editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, bao gồm tất cả các tài liệu cập nhật cho đến nay), Ed Harlow and David Lane (editors) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), và J.E. Coligan và cộng sự (editors) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (bao gồm tất cả các tài liệu cập nhật cho đến nay).

Thuật ngữ “sử dụng” như được sử dụng ở đây cần được hiểu theo nghĩa rộng và bao gồm việc sử dụng chất chiết hoặc chế phẩm chứa chất chiết như được mô tả ở đây cho đối tượng cũng như cung cấp chất chiết hoặc chế phẩm chứa chất chiết như được mô tả ở đây cho tế bào.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “điều trị” bao gồm việc sử dụng chất chiết hoặc chế phẩm chứa chất chiết như được mô tả ở đây với lượng hữu hiệu điều trị đủ để làm giảm hoặc làm chậm sự khởi phát hoặc sự tiến triển của bệnh đã nêu, hoặc để làm giảm hoặc loại trừ ít nhất một triệu chứng của bệnh này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phòng bệnh” bao gồm việc sử dụng chất chiết hoặc chế phẩm chứa chất chiết với lượng hữu hiệu điều trị đủ để làm ngừng hoặc cản trở sự phát triển của ít nhất một triệu chứng của bệnh đã nêu.

Thuật ngữ “khoảng” như được sử dụng ở đây để chỉ khoảng $\pm 5\%$ của giá trị đã nêu.

Thuật ngữ “thực phẩm bổ sung” như được sử dụng ở đây cần được hiểu theo nghĩa rộng và để chỉ chế phẩm được bổ sung vào hoặc theo cách khác được đưa vào chế độ ăn thông thường của đối tượng, và được bổ sung ngoài chế độ ăn thông thường. Thực phẩm bổ sung có thể được sử dụng cho đối tượng trước khi, cùng với, hoặc sau khi sử dụng thực phẩm hoặc đồ uống.

Phương pháp sản xuất chất chiết từ cây mía

Nguyên liệu của quá trình chiết

Sau khi được thu hoạch bằng máy, cây mía được vận chuyển tới máy ép và ép giập giữa các trục ép có răng cưa. Cây mía đã ép giập được ép tiếp để chiết nước mía ép thô, trong khi bã mía (chất xơ còn lại) thường được sử dụng làm nhiên liệu. Nước mía ép thô được gia nhiệt đến điểm sôi của nó để tách chất bẩn bất kỳ, tiếp đó vôi và chất tẩy trắng được bổ sung vào và bùn cặn ép mía được loại bỏ. Nước mía ép thô được gia nhiệt tiếp trong chân không để cô và làm tăng chỉ số Brix. Nước đường đã cô này được cấy mầm tinh thể để tạo ra các tinh thể đường rời và nước đường đặc được gọi là mật mía. Hai sản phẩm này được tách bằng máy ly tâm và thông thường dòng chất thải là mật mía được thu hồi để sử dụng làm thức ăn cho động vật bậc thấp.

Chất chiết thu được theo phương pháp của sáng chế có thể có nguồn gốc từ sản phẩm bất kỳ thu được từ cây mía, bao gồm các sản phẩm được tạo ra trong quá trình ép mía, quá trình tinh chế đường mía và các quá trình khác sử dụng sản phẩm từ cây mía.

Do đó, thuật ngữ “sản phẩm thu được từ cây mía” như được sử dụng ở đây để chỉ các sản phẩm của quá trình ép mía và tinh chế đường mía bao gồm mật mía, bã mía, nước mía ép lần đầu, bùn cặn ép mía, nước mía ép đã làm trong, nước đường đã làm trong, nước rỉ đường, nước đường vàng, phế thải cánh đồng mía, vỏ mía, ngọn mía, bột bã mía và bột nước mía ép. Các sản phẩm thu được từ cây mía này là hỗn hợp phức tạp của các chất bao gồm flavonoid, flavon và polyphenol (Duarte-Almeida và cộng sự, 2006; Colombo và cộng sự, 2006; Payet và cộng sự, 2006; US 2012/0115941) cũng như phytosterol, oligosacarit, polysacarit, mono và disacarit, axit hữu cơ (ví dụ axit cis và trans aconitic), peptit và protein. Loại và lượng của các thành phần này thay đổi theo các sản phẩm thu được từ cây mía khác nhau. Ví dụ, mật mía bao gồm mono và disacarit trong khi bột nước mía ép hầu như không chứa các thành

phần đường. Điều này làm tăng vị ngon của chất chiết từ mật mía so với chất chiết từ bột nước mía ép, chất chiết này có vị đắng hơn và kém ngon hơn. Điều này cũng ảnh hưởng đến thành phần của polyphenol trong chất chiết từ mật mía so với bột nước mía ép. Mật mía chứa polyphenol liên kết với mạch chính hydrat cacbon của mono, disacarit và polysacarit và xenluloza và các chất bán xenluloza như lignan, v.v.. Do đó, thành phần của polyphenol trong mật mía và bột nước mía ép là khác nhau. Chất chiết chứa các hợp chất như polyphenol và flavonoit được chiết từ sản phẩm thu được từ cây mía có thể được sử dụng để sản xuất thực phẩm chức năng và đồ uống và thực phẩm bổ sung dinh dưỡng chẳng hạn. Có lợi nếu chất chiết là hỗn hợp phức tạp của các chất này có đặc tính được cải thiện so với chất chiết chứa các thành phần đã tách riêng, như trixin, luteolin hoặc apigenin, hoặc hỗn hợp của các hợp chất tổng hợp. Do đó, chất chiết theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều chất trong số trixin, apigenin, luteolin, axit cafeic, axit hydroxyxinamic, axit sinapic và các dẫn xuất của chúng. Các hỗn hợp sinh học tự nhiên được cho là có thể có tác dụng hiệp đồng và có thể có tác dụng tốt hơn các sản phẩm tổng hợp hoặc các sản phẩm tự nhiên đã được tách riêng.

Trong phương pháp của sáng chế, sản phẩm thu được từ cây mía được sử dụng làm nguyên liệu và được trộn với etanol để tạo ra hỗn hợp chiết. Etanol được sử dụng để chiết hỗn hợp của các hợp chất flavonoit và/hoặc polyphenol. Ngược lại, giải pháp đã biết sử dụng etanol để loại bỏ chất bẩn trong quá trình chiết sucroza hoặc trong quá trình tách các polyphenol riêng biệt (WO 2004/014159). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng để tạo thuận lợi cho quá trình chiết hỗn hợp của flavonoit và/hoặc polyphenol, có thể cần điều chỉnh tỷ lệ trộn của nguyên liệu với etanol cũng như mức độ trộn, tức là độ đồng nhất.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng để tạo thuận lợi cho quá trình trộn sản phẩm thu được từ cây mía với etanol, sản phẩm thu được từ cây mía có thể cần được trộn với chất lỏng, thường là nước, và/hoặc được gia nhiệt để đạt được độ nhớt mong muốn. Ví dụ, mật mía là chất nhớt ở nhiệt độ trong phòng và do đó, có thể khó trộn đều, hiệu quả hoặc đồng nhất mật mía với etanol nếu không điều chỉnh độ nhớt của mật mía. Theo các phương án của sáng chế trong đó sản phẩm thu được từ cây mía là mật mía, ví dụ, mật mía có thể được trộn với nước ở tỷ lệ mật mía với nước nằm trong khoảng từ 75:25 đến khoảng 25:75. Theo một phương án, tỷ lệ mật mía với nước bằng khoảng 50:50.

Sản phẩm thu được từ cây mía, đã được trộn với nước hoặc không trộn với nước, có thể được gia nhiệt để làm giảm độ nhớt. Ví dụ, sản phẩm thu được từ cây mía có thể được gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến khoảng 60°C, tốt hơn nữa là 25°C đến khoảng 40°C, tốt hơn nữa là 26°C đến khoảng 30°C.

Đối với các sản phẩm thu được từ cây mía là chất rắn như bã mía, phế thải cánh đồng mía và vỏ mía, sản phẩm này trước hết cần được trộn hoặc làm đồng nhất với nước trước khi trộn với etanol để tạo ra hỗn hợp chiết. Lượng nước để trộn hoặc làm đồng nhất sản phẩm thu được từ cây mía có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để thu được sản phẩm từ cây mía có độ nhớt thích hợp để trộn với etanol để tạo ra hỗn hợp chiết.

Tốt hơn nếu sản phẩm thu được từ cây mía sẽ có độ nhớt thấp hơn hoặc bằng khoảng 100 xentipoa, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50 đến khoảng 100 xentipoa.

Độ nhớt cao của mật mía là do tổng hàm lượng chất rắn cao (cụ thể là hydrat cacbon hòa tan) và độ nhớt này thường được đo bằng cách xác định chỉ số Brix. Tốt hơn nếu sản phẩm thu được từ cây mía có chỉ số Brix nằm trong khoảng từ 20° đến khoảng 50°. Nguyên liệu có chỉ số Brix cao (>50°) có khả năng tách polyphenol và chất màu khác với nguyên liệu có chỉ số Brix thấp (<30°) khi tăng lượng etanol. Quan sát này là quan trọng trong cả quá trình tách ở quy mô lớn lẫn quy mô nhỏ.

Trong phương pháp của sáng chế, cũng cần tránh độ pH cực đoan trong hỗn hợp chiết. Độ pH cực đoan có thể có ảnh hưởng có hại đến các thành phần của hỗn hợp chiết. Do đó, theo một phương án, hỗn hợp chiết có độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến khoảng 7,5.

Chất chiết thu được từ phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. Theo cách tùy ý, chất chiết này có thể được tinh chế, tốt hơn là được sắc ký tương tác kỵ nước. Bước tinh chế này sẽ loại bỏ các chất bẩn, như chất tạo màu làm cho chất chiết có màu. Ngược lại, giải pháp đã biết sử dụng phương pháp sắc ký để tách các phân đoạn chứa polyphenol riêng biệt (WO 2004/014159).

Bổ sung etanol vào sản phẩm thu được từ cây mía

Để chiết các hợp chất như polyphenol và flavonoid, sản phẩm thu được từ cây mía được trộn với etanol để tạo ra hỗn hợp chiết. Các tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng bằng cách tạo ra hỗn hợp chiết chứa ít nhất 50% thể tích etanol sẽ làm tăng

mức độ tạo chất kết tủa trong hỗn hợp phản ứng. Sau khi loại bỏ chất kết tủa, có lợi là dịch nổi bề mặt còn lại có lượng chất màu và vị đắng giảm đi so với dịch nổi bề mặt thu được từ hỗn hợp chiết chứa dưới 50% thể tích etanol.

Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng khi tăng nồng độ etanol trong hỗn hợp chiết cao hơn 50% thể tích sẽ làm giảm thêm lượng chất màu của dịch nổi bề mặt còn lại sau khi loại bỏ chất kết tủa (Fig.1). Do đó, theo một phương án, hỗn hợp chiết chứa ít nhất 50% thể tích etanol. Theo một phương án khác, hỗn hợp chiết chứa ít nhất 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 65%, 70%, hoặc 75% thể tích etanol, hoặc ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84% hoặc 85% thể tích etanol.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng nồng độ tối ưu của etanol trong hỗn hợp chiết để loại bỏ chất màu trong dịch nổi bề mặt trong khi làm giảm đến mức tối thiểu mức độ giảm lượng polyphenol là từ 75% đến khoảng 85% thể tích. Do đó, theo một phương án, hỗn hợp chiết chứa khoảng 75% đến khoảng 85% thể tích etanol. Theo một phương án khác, hỗn hợp chiết chứa khoảng 83% thể tích etanol.

Các tác giả sáng chế cũng phát hiện được rằng mặc dù chất màu được loại bỏ đáng kể bằng hỗn hợp phản ứng chứa khoảng 70% thể tích etanol, hỗn hợp chiết chứa 80% đến khoảng 83% thể tích etanol sẽ tạo ra chất chiết ổn định và không tạo ra chất kết tủa trong thời gian 6 tháng. Do vậy, theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, hỗn hợp chiết chứa khoảng 80% đến khoảng 83% thể tích etanol.

Loại bỏ chất kết tủa và etanol

Sau khi tạo chất kết tủa trong hỗn hợp chiết, chất kết tủa này có thể được loại bỏ ra khỏi hỗn hợp bằng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, chất kết tủa có thể được loại bỏ bằng cách ly tâm và thu được dịch nổi bề mặt. Theo cách khác, chất kết tủa có thể được để lắng trong thời gian đủ để cho phép thu được dịch nổi bề mặt trong khi bỏ lại chất kết tủa, như bằng cách lắng dưới tác dụng của trọng lực chẳng hạn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng các kỹ thuật khác như lọc có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với phương pháp ly tâm hoặc lắng để thu được chất chiết từ cây mía.

Sau khi thu được dịch nổi bề mặt, etanol được loại bỏ bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Theo một ví dụ không làm giới hạn phạm vi sáng chế, etanol có thể được loại bỏ ra khỏi dịch nổi bề mặt bằng cách làm bay hơi, như bằng

cách sử dụng thiết bị làm bay hơi kiểu quay với bề gia nhiệt ở nhiệt độ khoảng 45°C hoặc nhiệt độ cao hơn. Trong một số trường hợp, có thể cần loại bỏ thêm nước ra khỏi dịch nổi bề mặt để thu được chất chiết trong nước có chỉ số Brix bằng 64-65°.

Phương pháp chiết nhiều lần

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, phương pháp này bao gồm nhiều bước chiết.

Trong bước chiết sơ bộ, sản phẩm thu được từ cây mía được trộn với etanol để tạo ra hỗn hợp chiết sơ bộ (ví dụ, chứa ít nhất khoảng 25% thể tích etanol), chất kết tủa được để tạo ra trong hỗn hợp chiết sơ bộ và chất kết tủa được loại bỏ ra khỏi hỗn hợp chiết sơ bộ này để thu được dịch nổi bề mặt sơ bộ.

Trong bước chiết tiếp theo, dịch nổi bề mặt sơ bộ này được trộn với etanol để tạo ra hỗn hợp chiết tiếp theo chứa ít nhất khoảng 50% thể tích etanol, chất kết tủa được để tạo ra trong hỗn hợp chiết tiếp theo này, chất kết tủa được loại bỏ ra khỏi hỗn hợp chiết tiếp theo để thu được dịch nổi bề mặt tiếp theo và etanol được loại bỏ ra khỏi dịch nổi bề mặt tiếp theo để thu được chất chiết từ cây mía. Etanol có thể được bổ sung thêm vào dịch nổi bề mặt chứa 50% etanol để lượng etanol nằm trong khoảng từ 75 đến 83%. Chất kết tủa tạo ra thêm và có thể được thu hồi. Dịch nổi bề mặt này có thể là chất chiết cuối.

Cắt phân đoạn chất chiết

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, dịch nổi bề mặt chứa etanol, hoặc chất chiết đã loại bỏ etanol, được cắt phân đoạn để thu được chất chiết từ cây mía. Theo một ví dụ không làm giới hạn phạm vi sáng chế, dịch nổi bề mặt hoặc chất chiết có thể được lọc màng, sắc ký loại trừ kích thước, sắc ký trao đổi ion, và/hoặc sắc ký tương tác kỵ nước.

Một số kỹ thuật là đã biết trong lĩnh vực này để tách các hợp chất dựa trên kích thước. Ví dụ, trong lĩnh vực này đã biết rằng các thành phần của dịch nổi bề mặt hoặc chất chiết nằm trong một khoảng trọng lượng phân tử cụ thể có thể được tách bằng phương pháp xử lý loại trừ kích thước như sắc ký thẩm gel hoặc siêu lọc.

Việc tách các thành phần trong dịch nổi bề mặt hoặc chất chiết cũng có thể đạt được bằng cách sử dụng các kỹ thuật sắc ký hoặc tổ hợp các kỹ thuật như sắc ký trao đổi ion, sắc ký tương tác kỵ nước, như sắc ký trên XAD hoặc tốt hơn là trên nhựa loại

dùng cho thực phẩm như nhựa FPX66, phương pháp sắc ký này có thể bao gồm bước rửa giải phân đoạn bằng cách tăng từng bước độ pH hoặc rửa giải bằng dung môi thích hợp, sắc ký lỏng khối phổ (liquid chromatography-mass spectrometry: LCMS) và/hoặc khối phổ ion hóa giải hấp thụ bằng laze với sự trợ giúp nền - thời gian bay (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight: MALDI-TOF) để thu được chất chiết.

Dịch nổi bề mặt hoặc chất chiết này có thể được xử lý tiếp bằng các kỹ thuật chuẩn như nhưng không chỉ giới hạn ở, vi lọc, thẩm thấu ngược, thẩm gel, làm bay hơi trong chân không và sấy khô nhiệt độ thấp, sấy phun và sấy trong lò hầm.

Thử nghiệm hoạt tính sinh học của chất chiết

Chất chiết từ cây mía theo sáng chế có thể được thử nghiệm về hoạt tính sinh học bằng cách sử dụng các kỹ thuật và thử nghiệm đã biết. Ví dụ, chất chiết theo sáng chế có thể được thử nghiệm về hoạt tính enzym. Theo các ví dụ không làm giới hạn phạm vi sáng chế, chất chiết có thể được thử nghiệm về hoạt tính ức chế α -glucosidaza và/hoặc hoạt tính ức chế α -amylaza.

Như đã biết trong lĩnh vực này, hoạt tính ức chế α -glucosidaza có thể được xác định là khả năng của các mẫu thử nghiệm ngăn chặn quá trình thủy phân 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranosidaza bởi α -glucosidaza của nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết. Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được, acarboza có thể được đưa vào thử nghiệm để làm chất đối chứng dương.

Ngoài ra, hoạt tính ức chế α -amylaza có thể được xác định bằng khả năng của mẫu làm chậm tốc độ thủy phân tinh bột được đánh dấu bằng chất đồng vị (E-11954, Molecular Probes) của amylaza tụy lợn. Như đã biết trong lĩnh vực này, acarboza có thể được đưa vào thử nghiệm để làm chất đối chứng dương.

Chất chiết theo sáng chế cũng có thể được thử nghiệm về hoạt tính kháng viêm. Theo một ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế, chất chiết có thể được thử nghiệm về hoạt tính ức chế prostaglandin E2 (PGE2). Như đã biết trong lĩnh vực này, hoạt tính ức chế PGE2 có thể được xác định bằng khả năng của các mẫu thử nghiệm ức chế quá trình sản sinh PGE2 trong tế bào 3T3 khi được kích thích bằng canxi

ionopho. Như đã biết trong lĩnh vực này, aspirin và ibuprofen có thể được sử dụng trong thử nghiệm để làm chất đối chứng dương.

Sử dụng chất chiết từ cây mía

Chất chiết thu được theo phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng trong các ứng dụng khác nhau hữu ích về mặt kinh tế.

Thực phẩm và đồ uống

Theo một phương án của sáng chế, chất chiết thu được bằng phương pháp theo sáng chế được đưa vào sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống. Thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế có thể được điều chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi sáng chế về sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống này là đồ nướng, thực phẩm và đồ uống từ sữa, đồ ăn nhẹ, v.v.. Lượng chất chiết cần sử dụng trong thực phẩm hoặc đồ uống có thể thay đổi do chính chất chiết là chất dinh dưỡng.

Do đó, chất chiết có thể được sử dụng trong thực phẩm hoặc sản phẩm thực phẩm bất kỳ như nhưng không chỉ giới hạn ở, đường, ví dụ đường kết tinh, các loại kẹo, đồ ăn nhẹ (ngọt và mặn), thực phẩm chứa cacao, đồ gia vị, sản phẩm từ sữa bao gồm pho mát, bơ, kem, sữa chua, và chất phết từ sữa khác; các sản phẩm trên cơ sở chất béo bao gồm margarin, chất phết, sốt mayonnaise, dầu shortening (dầu thực vật hydro hóa), dầu ăn và dầu rán, và nước sốt; sản phẩm trên cơ sở ngũ cốc và sản phẩm bánh mì bao gồm bánh mì và mì pasta (mì Ý), các sản phẩm này được nấu, nướng trong lò hoặc được chế biến theo cách khác; các loại kẹo bao gồm kẹo sôcôla, kẹo, kẹo cao su, món tráng miệng, kem không sữa để phủ trên bánh, kem trái cây, kem đường và kem làm nhân bánh khác; và các sản phẩm thực phẩm khác bao gồm trứng và các sản phẩm từ trứng, thực phẩm chế biến như súp và mì pasta chế biến sẵn.

Do đó, chất chiết có thể được đưa vào hoặc bổ sung vào thực phẩm chế biến bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: bánh mì, mì pasta, bánh quy, nước sốt, súp, thực phẩm dạng thanh, sản phẩm từ sữa (ví dụ, sữa, sữa chua, pho mát, kem), bánh, bột ăn liền và ngũ cốc ăn sáng.

Ngoài ra, chất chiết có thể được sử dụng trong đồ uống, hoặc đồ uống nóng hoặc đồ uống lạnh bao gồm cà phê, chè, cacao, ngũ cốc, rau diếp xoắn và đồ uống trên cơ sở chất chiết thực vật khác, đồ uống có cồn và không cồn và bao gồm nước côla và

đồ uống không còn có ga và không có ga khác, nước quả ép, đồ uống ép từ quả, đồ uống từ sữa và đồ uống thay thế bữa ăn.

Chất chiết cũng có thể được bổ sung vào các thành phần dùng cho thực phẩm như chất xơ hòa tan (ví dụ oligofructosacarit), chất xơ không hòa tan (ví dụ chất xơ từ hạt cacao, chất xơ mía, cám yến mạch), chất xơ có nguồn gốc tự nhiên (ví dụ, hemixenluloza, lignoxenluloza), chất xơ có nguồn gốc hóa học (ví dụ, inulin), bột mì, tinh bột, tinh bột cải biến, gelatin, hoặc thực phẩm khác, để tạo ra chế phẩm hoặc thành phần duy nhất có lượng gia tăng của polyphenol, flavonoid và/hoặc các hóa chất thực vật khác từ cây mía.

Chất chiết theo sáng chế là đặc biệt hữu dụng để làm tăng hàm lượng hóa chất thực vật hoạt tính của sản phẩm cà phê mà không làm tăng vị đắng. Quá trình rang hạt cà phê tạo ra vị mong muốn của cà phê. Quá trình rang cũng tạo ra vị đắng hơn của cà phê, điều này liên quan đến sự tăng lượng chất chống oxy hóa, lacton của axit clorogenic và phenylindan. Hạt cà phê càng được rang kỹ, lượng lacton clorogenic và phenylindan tạo ra càng nhiều. Chất chiết theo sáng chế có thể được sử dụng để làm tăng lượng các hóa chất thực vật hoạt tính (như polyphenol) trong sản phẩm cà phê.

Thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế có thể bao gồm các thành phần bổ sung kể cả chất mang hoặc chất pha loãng ăn được. Nhiều chất mang hoặc chất pha loãng ăn được là đã biết trong ngành thực phẩm. Các chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngũ cốc chế biến, sản phẩm rau hoặc quả, đồ uống hoặc đồ uống cô đặc, sản phẩm bột nghiền hoặc sản phẩm rau tương tự, và chất pha loãng, chất mang hoặc tá được trợ bất kỳ đã biết trong lĩnh vực dược phẩm.

Thực phẩm bổ sung dinh dưỡng và sản phẩm dinh dưỡng dùng trong thể thao

Chất chiết thu được theo phương pháp của sáng chế có thể được bổ sung vào hoặc đưa vào sản phẩm bổ sung dinh dưỡng. Như được sử dụng ở đây, “sản phẩm bổ sung dinh dưỡng” là sản phẩm ăn được dùng để cải thiện tình trạng dinh dưỡng chung, tình trạng sức khỏe, thể trạng, hoặc khả năng hoạt động của đối tượng và/hoặc sản phẩm ăn được để tạo ra lợi ích dinh dưỡng hoặc sinh học bổ sung cho đối tượng. Như sẽ hiểu rõ, sản phẩm bổ sung dinh dưỡng có thể được cung cấp ở dạng đặc, do vậy, cho phép bổ sung sản phẩm bổ sung dinh dưỡng vào thực phẩm hoặc đồ uống để cho phép tiêu thụ lượng mong muốn của chất chiết theo sáng chế với khẩu phần ăn hợp lý.

Theo một phương án, sản phẩm bổ sung dinh dưỡng là sản phẩm dinh dưỡng dùng trong thể thao. Do vậy, chất chiết có thể được bổ sung vào sản phẩm dinh dưỡng dùng trong thể thao bao gồm, ví dụ, bột dùng trong thể thao, đồ uống dùng trong thể thao, đồ uống tăng lực, hỗn hợp trộn sẵn, nước mía ép, sản phẩm tăng lực dạng thanh, gel tăng lực, đồ uống đẳng trương và gelatin, thạch trên cơ sở tinh bột hoặc thạch pectin.

Thực phẩm bổ sung dinh dưỡng và sản phẩm dinh dưỡng dùng trong thể thao theo sáng chế có thể bao gồm các thành phần bổ sung. Theo một số phương án, nhiều hơn một chất chiết theo sáng chế có thể được đưa vào cùng một sản phẩm bổ sung dinh dưỡng hoặc chế phẩm dinh dưỡng dùng trong thể thao. Các thành phần bổ sung khác bao gồm sản phẩm ăn được bất kỳ. Các thành phần bổ sung được ưu tiên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thành phần thực phẩm bổ sung hoạt tính khác như chất dinh dưỡng vi lượng như vitamin và chất khoáng hoặc chất dinh dưỡng đa lượng như axit béo có nhiều liên kết không no hoặc chất xơ. Chất phụ gia thực phẩm cũng có thể bao gồm chất phân tán và chất tạo hỗn dịch chấp nhận được và nước. Các thực phẩm bổ sung dinh dưỡng thông thường khác cũng có thể được đưa vào, nếu cần. Sản phẩm bổ sung dinh dưỡng hoặc sản phẩm dinh dưỡng dùng trong thể thao có thể có nhiều dạng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bột, chất lỏng, viên nén, viên nang, dung dịch, dịch cô, xi rô, hỗn dịch hoặc thể phân tán.

Sản phẩm có chỉ số GI thấp

Chỉ số đường huyết hoặc chỉ số GI sẽ phân loại hydrat cacbon theo tác dụng của chúng đối với mức đường huyết. Chỉ số GI càng thấp, mức đường huyết sẽ tăng càng chậm khi thực phẩm được tiêu thụ. Một số nghiên cứu đã cho thấy rằng khi ăn chế độ ăn có GI thấp hơn, người bị bệnh đái tháo đường có thể giảm mức đường huyết trung bình của họ. Điều này là quan trọng trong việc làm giảm nguy cơ phát triển các biến chứng liên quan đến bệnh đái tháo đường.

Để xác định chỉ số GI của thực phẩm, các phần thực phẩm xác định chứa 10-50g hydrat cacbon được cho ít nhất 10 người khỏe mạnh ăn sau khi nhịn đói qua đêm. Các mẫu máu chích từ ngón tay được lấy ở các thời khoảng 15-30 phút trong hai giờ tiếp theo. Các mẫu máu này được sử dụng để lập đường cong đáp ứng đường huyết trong thời gian 2 giờ. Diện tích dưới đường cong (area under the curve: AUC) được tính để biết được tổng mức tăng lượng glucoza huyết sau khi ăn thực phẩm thử

nghiệm. Chỉ số GI (%) được tính bằng cách chia AUC của thực phẩm thử nghiệm cho AUC của thực phẩm so sánh (thường là glucoza hoặc bánh mì trắng) và nhân với 100. Chỉ số GI nhỏ hơn hoặc bằng 55 được cho là “thấp”, 56-69 được cho là “trung bình” và trên 70 được cho là “cao”.

Chỉ số đường huyết thấp hơn gợi ý tốc độ tiêu hóa và hấp thụ hydrat cacbon thấp hơn và được cho là tương ứng với nhu cầu insulin thấp hơn, kiểm soát đường huyết dài hạn tốt hơn và giảm lượng lipid trong máu. Đã thấy rằng những người theo chế độ ăn có chỉ số GI thấp trong nhiều năm có nguy cơ phát triển cả bệnh đái tháo đường typ II và các bệnh liên quan như bệnh đục thủy tinh thể cũng như bệnh tim mạch vành thấp hơn đáng kể. Mức đường huyết cao hoặc các “đỉnh nhọn” đường huyết sau khi ăn có thể làm cho các bệnh này nặng thêm do làm tăng cả mức độ tổn thương mạch máu do oxy hóa lẫn làm tăng trực tiếp mức insulin. Tình trạng tăng đường huyết sau khi ăn được coi là yếu tố nguy cơ chủ yếu liên quan đến bệnh đái tháo đường nhưng ngày nay nó cũng được cho là nguy cơ làm tăng bệnh vữa xơ động mạch và các bệnh khác ở những người không bị bệnh đái tháo đường.

Thực phẩm có chỉ số GI thấp do chúng được tiêu hóa và hấp thu chậm tạo ra sự tăng từ từ mức đường huyết và insulin và đã được chứng minh là cải thiện cả mức glucoza và lipid ở những người bị bệnh đái tháo đường (typ I và typ II) và có lợi đối với việc kiểm soát cân nặng do chúng giúp kiểm soát cảm giác ngon miệng và trì hoãn cảm giác đói. Chế độ ăn có chỉ số GI thấp cũng làm giảm mức insulin và tình trạng kháng insulin.

Do vậy, chất chiết thu được theo phương pháp của sáng chế có thể được sử dụng trong thực phẩm hoặc đồ uống, ví dụ, để hạ thấp hoặc làm giảm chỉ số GI của thực phẩm hoặc đồ uống. Ví dụ, chất chiết theo sáng chế ở dạng chất chiết dạng lỏng có thể được phun lên đường chuẩn (đường mía hoặc đường củ cải) để tạo ra đường có chỉ số GI thấp. Chất chiết theo sáng chế ở dạng chất chiết dạng lỏng cũng có thể được phun lên các chất mang khác như bột mì, tinh bột, bã mía hoặc chất xơ, nhờ đó làm tăng lượng polyphenol và/hoặc flavonoit trong các thành phần thực phẩm này.

Polyphenol nội sinh và “được hấp thụ” và các hóa chất thực vật khác của cây mía sử dụng chất xơ để bảo vệ các hợp chất này khỏi bị biến đổi chuyển hóa sớm trong ruột và tăng lượng cung cấp tới các vị trí đặc hiệu trong đại tràng, ở đó các hợp chất

này có tác dụng làm giảm tình trạng viêm và các quá trình phát triển bệnh khác có sự tham gia của các enzym xyclooxygenaza liên quan đến sự sinh bệnh ung thư ruột hoặc tạo polip ruột (Cai và cộng sự).

Sản phẩm có chỉ số calo khả dụng thấp

Chỉ số calo khả dụng của thực phẩm hoặc đồ uống liên quan đến lượng năng lượng có thể thu được từ thực phẩm hoặc đồ uống này khi ăn vào. Lượng calo trong thực phẩm hoặc đồ uống, cũng như chỉ số GI của thực phẩm hoặc đồ uống, ảnh hưởng đến tốc độ tiêu hóa và hấp thu, có góp phần vào chỉ số calo của thực phẩm hoặc đồ uống. Ví dụ, mặc dù kẹo sôcôla là thực phẩm có chỉ số GI thấp, nó chứa lượng calo cao và do đó có chỉ số calo khả dụng cao như được xác định bằng phương pháp thông thường bao gồm phương pháp đo nhiệt lượng bằng bình kín.

Chất chiết thu được theo phương pháp của sáng chế có thể được sử dụng trong thực phẩm hoặc đồ uống, ví dụ, để hạ thấp hoặc làm giảm chỉ số calo khả dụng của thực phẩm hoặc đồ uống. Ngoài ra, hoặc theo cách khác, phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để hạ thấp hoặc làm giảm chỉ số calo khả dụng của thực phẩm hoặc đồ uống bằng cách cho đối tượng sử dụng chế phẩm theo sáng chế, bao gồm thực phẩm bổ sung và/hoặc dược phẩm, trước khi, cùng với, hoặc sau khi sử dụng thực phẩm hoặc đồ uống. Theo cách này, khi thực phẩm hoặc đồ uống này được tiêu hóa, lượng hydrat cacbon hấp thu sẽ giảm đi. Điều này làm giảm hữu hiệu lượng năng lượng khả dụng nhận được từ thực phẩm hoặc đồ uống này khi chúng được tiêu hóa. Ví dụ, chất chiết theo sáng chế ở dạng chất chiết dạng lỏng có thể được phun lên đường chuẩn (đường mía hoặc đường củ cải) để tạo ra đường có chỉ số calo khả dụng giảm (sucroza). Chất chiết theo sáng chế ở dạng chất chiết dạng lỏng cũng có thể được phun lên các chất mang khác như bột mì, tinh bột hoặc chất xơ, nhờ đó làm tăng lượng polyphenol và/hoặc flavonoid trong các thành phần thực phẩm này. Như sẽ thấy rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bột, như bột sấy khô nhiệt độ thấp hoặc bột được loại nước, có thể được sử dụng thay cho chất chiết dạng lỏng.

Phương pháp điều trị và phòng bệnh

Trong chế độ ăn ở các nước phương Tây, 50-70% lượng calo trong thức ăn là từ hydrat cacbon. Khoảng một nửa lượng calo là từ các đường đơn (glucoza, fructoza, sucroza, lactoza, maltoza và trehaloza) với lượng calo còn lại là từ hydrat cacbon phức tạp (hemixenluloza, galactan, manan và tinh bột). Các hydrat cacbon phức tạp không

phải tinh bột được gọi là chất xơ, chúng được tiêu hóa một phần hoặc hoàn toàn trong đại tràng.

Quá trình tiêu hóa hydrat cacbon trong thức ăn là quá trình được điều tiết về mặt sinh lý trong đường dạ dày-ruột. Các enzym quan trọng trong quá trình này bao gồm α -amylaza trong nước bọt và trong tụy và α -glucosidaza trong ruột. Khi bắt đầu tiêu hóa trong miệng, thức ăn được nhai và trộn với α -amylaza trong nước bọt. Tinh bột giải phóng ra bắt đầu phân hủy ngay. Quá trình thủy phân này chậm lại hoặc ngừng lại trong dạ dày do sự thay đổi độ pH nhưng bắt đầu lại trong tá tràng ở đó α -amylaza trong tụy được tiết ra. Kết quả là tạo ra maltoza và maltotrioza từ amylaza và tạo ra maltoza, maltotrioza, glucoza và dextrin từ amylopectin.

Trong những năm 60 và 70 của thế kỷ 20, bắt đầu có sự tranh cãi về vai trò có thể đóng góp của sucroza và fructoza trong bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì và bệnh tim mạch. Nhiều nhóm nghiên cứu đã gợi ý rằng đường và fructoza làm tăng nguy cơ mắc bệnh đái tháo đường và bệnh tim bằng cách cho thấy rằng việc tiêu thụ chúng với lượng lớn làm tăng mức lipit, glucoza, insulin và axit uric trong máu. Do đó, Ủy ban về lựa chọn dinh dưỡng của Thượng viện Mỹ khuyến cáo rằng mỗi người nên giảm lượng đường trong chế độ ăn của mình.

Kết quả phân tích mức tiêu thụ đường từ năm 1980 đến năm 2003 ở Úc, Vương quốc Anh và Mỹ cho thấy rằng mức tiêu thụ sucroza tính chế theo đầu người giảm lần lượt là 23%, 10% và 20%. Tỷ lệ lưu hành của bệnh béo phì trong khoảng thời gian này tăng 3 lần ở Úc. Khi tất cả các nguồn chất tạo ngọt dinh dưỡng, bao gồm xi rô ngô có hàm lượng fructoza cao, được xem xét, mức tiêu thụ theo đầu người vẫn giảm đi ở Úc (-16%) và Vương quốc Anh (-5%), nhưng tăng lên ở Mỹ (+23%). Điều này gợi ý rằng khi tính tới tổng mức hấp thu năng lượng, sự thay đổi theo đầu người của mức năng lượng cung cấp từ sucroza có thể không giải thích được sự thay đổi về tỷ lệ mắc bệnh béo phì. Khi sucroza, glucoza, hoặc tinh bột được thay thế bằng fructoza với lượng >100g/ngày, mức tăng trọng lượng 0,44kg/tuần được quan sát ở người lớn. Bằng chứng gần đây cho thấy rằng các hóa chất thực vật mới của cây mía làm giảm chỉ số GI và do đó giảm nguy cơ mắc bệnh béo phì và bệnh đái tháo đường.

Các enzym chủ yếu chịu trách nhiệm phân hủy hydrat cacbon trong cơ thể người là α -amylaza và α -glucosidaza và do vậy việc ức chế một hoặc cả hai enzym này

có thể làm giảm chỉ số GI của thực phẩm. Chất chiết theo sáng chế có tác dụng ức chế hoạt tính của α -glucosidaza và α -amylaza *in vitro* sẽ làm chậm quá trình hấp thu hydrat cacbon *in vivo*, do vậy làm giảm mức độ tăng mức blood glucoza huyết sau khi ăn. Ngoài ra, chất chiết theo sáng chế có thể làm giảm chỉ số GI của thực phẩm hoặc đồ uống.

Do vậy, chất chiết thu được bằng phương pháp theo sáng chế được sử dụng để điều chỉnh các con đường sinh học liên quan đến bệnh bao gồm bệnh đái tháo đường và hội chứng chuyển hóa. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng bệnh bằng cách cho đối tượng sử dụng chất chiết theo sáng chế, chế phẩm theo sáng chế, và/hoặc thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế.

Chế phẩm và sử dụng

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chất chiết theo sáng chế và chất mang hoặc tá dược thích hợp. Theo một phương án, chế phẩm này là dược phẩm chứa chất mang dược dụng. Chất chiết được đưa vào dược phẩm thích hợp để sử dụng cho đối tượng là động vật có vú, ví dụ, người. Chất chiết có thể được đưa vào dược phẩm bằng cách bao cho dạng liều. Chế phẩm này thường chứa hợp chất “hoạt tính” (tức là chất chiết từ cây mía) và “chất mang dược dụng”. Như được sử dụng sau đây, thuật ngữ “chất mang dược dụng” được dự định bao gồm dung môi bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất bao, chất kháng khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương và chất làm chậm hấp thu, và chất tương tự, phù hợp với việc sử dụng dược phẩm. Việc sử dụng môi trường và chất này cho các hoạt chất là đã biết rõ trong lĩnh vực này. Trừ môi trường hoặc chất thông thường bất kỳ không tương hợp với hoạt chất, môi trường thông thường bất kỳ có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Hoạt chất bổ sung cũng có thể được đưa vào chế phẩm này.

Do chất chiết theo sáng chế có nồng độ polyphenol cao hơn (polyphenol (mg)/chất chiết (ml)) và lượng chất màu thấp hơn so với các chất chiết khác từ đường, chất chiết này là “hiệu quả hơn” trong việc cung cấp lượng có tác dụng điều trị của hoạt chất sinh học. Lượng chất màu ít hơn và yêu cầu cảm quan nghiêm ngặt đối với một số nước đường được điều chế theo sáng chế đã mở rộng khả năng sử dụng chúng trong nhiều thực phẩm và chất mang.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Điều chế chất chiết

Chuẩn bị nguyên liệu

100ml mật mía từ trạm cuối Mackay được đông vào cốc thủy tinh ở nhiệt độ trong phòng (RT). Trọng lượng mẫu là 140g. Tiếp đó, 100ml nước cất được bổ sung và khuấy tay bằng đũa khuấy thủy tinh cho đến khi phần lớn lượng mật mía sền sệt được trộn lẫn với nước. Tiếp đó, cốc này được đặt trên máy khuấy từ và trộn trong 10-15 phút. Nhiệt độ được duy trì ở 26-28°C. Độ pH của dung dịch này là 5,4-5,6.

Thể tích cuối là 200ml. 1ml mẫu được lấy ra và pha loãng bằng 1ml nước, trộn kỹ và sau đó một giọt mẫu được cho lên khúc xạ kế Ella. Chỉ số Brix là 48°.

Xử lý bằng etanol AR (100% thể tích)

Nguyên liệu (200ml) được cho vào cốc thủy tinh trên máy khuấy từ và được điều chỉnh sao cho hỗn hợp xoáy trong suốt tạo ra, etanol được bổ sung từ từ vào hỗn hợp này để đảm bảo trộn nhanh nguyên liệu với etanol. 950ml etanol được bổ sung trong thời gian khoảng 30 phút. Nhiệt độ được duy trì ở 26-28°C. Lượng etanol cuối trong hỗn hợp là 83% thể tích. Hỗn hợp này được khuấy trong 30 phút nữa. Một số mẫu nhỏ được lấy trong quá trình bổ sung etanol để giúp quan sát khi dung dịch đổi màu và chất kết tủa có màu khác nhau tạo ra khi tỷ lệ % etanol tăng lên.

Thu hồi dịch nổi bề mặt/chất chiết chứa 83% etanol

Hỗn hợp cuối là đục và có chất kết tủa gelatin màu đen đông tụ rõ ràng ở đáy của cốc. Dịch nổi bề mặt được lấy ra và ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút ($2500 \times g$) trong 5 phút. Dịch nổi bề mặt trong suốt màu vàng được lắng gạn để lại một cục chất kết tủa màu đen trong ống ly tâm. Khoảng 950ml hỗn hợp được ly tâm và thể tích cuối của dịch nổi bề mặt thu hồi được là 880ml.

Loại bỏ etanol ra khỏi dịch nổi bề mặt

Etanol được loại bỏ bằng cách sử dụng thiết bị làm bay hơi kiểu quay Buchi trong chân không. Nhiệt độ bể là 45°C. Thể tích dịch cô cuối (không có mùi etanol bất kỳ) là 62ml và chỉ số Brix là 64-65°. Etanol, hỗn hợp đồng sôi của nó và nước đều được loại bỏ trong quá trình này.

Chất chiết có hoạt tính sinh học

Chất chiết cuối có hoạt tính sinh học có màu sẫm/màu vàng, không chứa chất dạng hạt bất kỳ và có vị ngọt mát giống vị của nước đường vàng hoặc nước rỉ đường.

Ví dụ 2. Điều chế chất chiết

Chuẩn bị nguyên liệu

200ml nguyên liệu được chuẩn bị từ mật mía của trạm cuối Mackay như đã mô tả ở trên trong ví dụ 1. Chỉ số Brix là 48°.

Bổ sung ethanol AR (100%)

1000ml ethanol được bổ sung theo các phần nhỏ 200ml để tạo ra chất kết tủa, màu sắc và hình dạng của chất kết tủa có thể được quan sát khi tỷ lệ phần trăm của ethanol tăng lên. Quan sát được thực hiện ở tỷ lệ 50, 66, 75, 80 và 83% ethanol (thể tích), nhưng không mẫu nào được lấy. Thể tích hỗn hợp cuối (83% thể tích ethanol) là 1200ml và hỗn hợp này được để yên ở nhiệt độ 20-25°C qua đêm (khoảng 18 giờ). Như nêu trên, ethanol được bổ sung từ từ vào hỗn hợp xoáy được tạo ra bằng cách khuấy từ nhanh hỗn hợp này.

Thu hồi dịch nổi bề mặt 83%

Dịch nổi bề mặt được thu hồi theo cách giống như được mô tả trong ví dụ 1. Thể tích thu được là 1050ml.

Loại bỏ ethanol

Ethanol được loại bỏ ở nhiệt độ 45°C trong chân không như được mô tả trong ví dụ 1. Thể tích nước đường cuối là 78ml và chỉ số Brix là 63-65°. Nước đường này có màu sẫm/màu vàng và vị tương tự, gần giống với nước đường thu được từ ví dụ 1.

Nhận xét

Ở tỷ lệ ethanol bằng 50% thể tích, chất keo tụ dạng vô định hình/chất kết tủa tạo ra và hỗn hợp có màu sẫm đến màu xám. Cấu trúc hạt của nó trông giống như sữa vón cục trong cà phê.

Việc bổ sung thêm ethanol tới 66% thể tích dẫn đến sự thay đổi đáng kể do chất gelatin dính màu đen tách ra khỏi dung dịch và bắt đầu sa lắng. Chất này dường như dính vào thành cốc thủy tinh nhưng nó cũng lắng nhanh xuống đáy cốc. Khi chất kết tủa màu đen này tạo ra, hỗn hợp có màu vàng trong hơn nhưng vẫn có vẻ đục. Chất kết tủa vô định hình màu xám tạo ra ở tỷ lệ ethanol 50% dường như biến mất hoặc nó đã bị

“giữ” bởi chất kết tủa mới màu đen này. Một khả năng khác là chất kết tủa tạo ra ở tỷ lệ etanol 50% bị thay đổi (hoặc thậm chí hòa tan lại) ở tỷ lệ etanol từ 50 đến 66%. Hai chất kết tủa đầu tiên ở tỷ lệ etanol tới 66% này là rất quan trọng xét về lượng chất được loại ra khỏi dung dịch.

Khi etanol được bổ sung tiếp, chất kết tủa mịn màu caramen vẫn đục tạo ra (lượng nhỏ) cho đến khi đạt tới dịch nổi bề mặt cuối có tỷ lệ etanol 83%. Khi tỷ lệ etanol nằm trong khoảng từ 66% đến 75% etanol, chất kết tủa nhỏ, dính, màu đen tạo ra tiếp, giống với chất kết tủa xuất hiện ở tỷ lệ etanol tới 66%.

Ví dụ 3. Điều chế chất chiết

Chuẩn bị nguyên liệu

100ml mật mía từ thiết bị ép mía sơ bộ được sử dụng. Mật mía thô có chỉ số Brix bằng 78° khi sử dụng khúc xạ kế số Atago-Pal 2. Trọng lượng mẫu là 145g. Như được mô tả trong các ví dụ trên đây, 100ml nước cất được bổ sung vào 100ml mật mía, trộn và khuấy trong 15 phút để đảm bảo nguyên liệu đồng nhất. Nguyên liệu cuối có chỉ số Brix bằng 49-50°.

Ảnh hưởng của việc bổ sung lượng etanol tăng dần (100% thể tích)

Hai lô riêng biệt có 7 ống ly tâm được sử dụng và 10ml nguyên liệu được bổ sung vào mỗi ống. Lượng nước cất được bổ sung vào 7 ống thứ nhất lần lượt là như sau: 0, 10, 20, 30, 40, 50 và 60ml. Etanol với tỷ lệ 100% thể tích được bổ sung vào 7 ống thứ hai với lượng như sau: 0, 10, 20, 30, 40, 50 và 60ml. Tất cả các ống được trộn và lắc ba lần trong khi để yên ở nhiệt độ trong phòng (25°C) trong 90 phút.

Loại bỏ chất kết tủa

Tất cả các ống được ly tâm như được mô tả ở trên. Dịch nổi bề mặt được thu hồi và xác định. Hình thức của hỗn hợp ban đầu cũng như dịch nổi bề mặt và chất kết tủa được ghi bằng cách sắc ký (dữ liệu không được thể hiện) và quan sát bằng mắt thường.

Tóm tắt ảnh hưởng của sự tăng lượng etanol đến nguyên liệu

Chất kết tủa màu xám tạo ra ở tỷ lệ etanol 50% là lớn hơn đáng kể so với tất cả các chất kết tủa ở tỷ lệ etanol khác và rất khác về hình thức. Khi tăng tỷ lệ etanol tới 66%, chất kết tủa đặc màu đen có thể tích nhỏ hơn tạo ra và dấu hiệu bất kỳ của chất kết tủa màu xám ban đầu đã tạo ra khi tỷ lệ etanol là 50% đều biến mất. Ở tỷ lệ etanol

66%, dịch nổi bề mặt là trong suốt và có màu vàng sẫm. Khi tỷ lệ etanol tăng lên, chất kết tủa màu đen tương tự tạo ra, có thể có kích thước to hơn một chút so với chất kết tủa tạo ra ở tỷ lệ etanol 66%. Khi tỷ lệ % etanol tăng lên, dịch nổi bề mặt có màu vàng nhạt hơn. Tất cả các dịch nổi bề mặt thu được khi tỷ lệ etanol từ 66% trở lên đều là trong suốt (không có hiện tượng đục bất kỳ). Tóm tắt các nhận xét này được nêu trong bảng 1.

Bảng 1. Tóm tắt các nhận xét (ppt = chất kết tủa)

Ống	Thể tích nguyên liệu, ml	Lượng etanol được bổ sung, ml	Etanol, %	Thể tích dịch nổi bề mặt, ml	Thể tích chất kết tủa, ml	Nhận xét
1	10	0	0	9,5	0,2-0,3	chất kết tủa có kích thước nhỏ
2	10	10	50	15,5	4-5	chất kết tủa màu xám có kích thước lớn
3	10	20	66	27	3-3,5	chất kết tủa màu đen, có kích thước nhỏ hơn
4	10	30	75	29,5	4	chất kết tủa màu đen
5	10	40	80	46	4	chất kết tủa màu đen
6	10	50	83	55	5	chất kết tủa màu đen
7	10	60	86	65	6	chất kết tủa màu đen

Ví dụ 4. Phân tích lượng polyphenol và chất màu trong chất chiết

Dịch nổi bề mặt được phân tích lượng polyphenol (phương pháp so màu) và lượng chất màu (ở 420nm) để xác định hiệu suất thu hồi polyphenol và mức độ loại bỏ chất màu khi tăng tỷ lệ etanol. Kết quả phân tích lượng polyphenol trong các mẫu dịch

nồi bề mặt được nêu trong bảng 2, kết quả phân tích lượng trixin trong các mẫu dịch nồi bề mặt được nêu trong bảng 3, và kết quả phân tích lượng chất màu trong mẫu dịch nồi bề mặt được nêu trong bảng 4.

Bảng 2. Kết quả phân tích lượng polyphenol (PP) trong các mẫu dịch nồi bề mặt.

Mẫu	% EtOH	Dịch nồi bề mặt (ml)	Chất rắn, %	PP (mg/ml)	Tổng lượng polyphenol (mg)	Tỷ lệ % thu hồi	PP (mg/ml) cho một đơn vị chất rắn
1	0	9,5	44,8	12,71	120,70	100	28,36
2	50	15,5	33,6	5,71	88,57	73	17,01
3	66	27	13,5	2,99	80,61	67	22,12
4	75	36	8,8	1,89	67,96	56	21,45
5	80	46	6,3	1,39	64,06	53	22,11
6	83	55	4,8	0,97	53,54	44	20,28
7	86	65	4,2	0,83	54,08	45	19,81

Bảng 3. Phân tích lượng trixin trong các mẫu dịch nồi bề mặt

Mẫu	Tỷ lệ % EtOH	Thể tích dịch nồi bề mặt (ml)	Lượng trixin mg/g	Tính cho một đơn vị chất rắn	Lượng trixin trong dịch nồi bề mặt (mg)	Tỷ lệ % thu hồi
1	0	9,5	0,113	0,252	1,25	100
2	50	15,5	0,062	0,186	0,92	74
3	66	27	0,039	0,288	0,92	74
4	75	36	0,018	0,206	0,45	61
5	80	46	0,016	0,246	0,60	48
6	83	55	0,010	0,200	0,43	35
7	86	65	0,006	0,149	0,33	26

Bảng 4. Phân tích lượng chất màu của mẫu dịch nồi bề mặt (số đơn vị chất màu ở bước sóng 420nm)

Mẫu	Tỷ lệ %	Thể tích	Số đơn vị	Tổng lượng	Tỷ lệ % thu hồi
-----	---------	----------	-----------	------------	-----------------

	EtOH	dịch nổi bề mặt (ml)	chất màu/ml	chất màu	
1	0	9,5	318,8	3028,5	100
2	50	15,5	106,5	1650,1	54
3	66	27	40,0	1080,0	36
4	75	36	19,2	689,8	23
5	80	46	4,5	207,6	7
6	83	55	3,1	167,9	6
7	86	65	2,5	160,6	5

Ví dụ 5. Ưc chế α -glucosidaza

Hoạt tính ức chế α -glucosidaza được xác định là khả năng của các mẫu thử nghiệm ngăn chặn quá trình thủy phân 4-metylbelferyl- α -D-glucopyranosidaza bởi α -glucosidaza của nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*).

Bảng 5 liệt kê các mẫu được thử nghiệm. Mỗi mẫu (0,5ml) được cân và sấy khô nhiệt độ thấp để xác định tỷ lệ % chất khô của nó. Tiếp đó, các mẫu được tái tạo huyền phù trong dimetyl sulfoxit (DMSO) hoặc hỗn hợp DMSO:nước (1:1) tới nồng độ 15mg/ml, sau đó mẫu được pha loãng theo bậc.

Bảng 5. Thành phần của các mẫu được thử nghiệm

Mẫu	Mô tả mẫu	Tỷ lệ % chất khô	Dung môi
1	Mật mía, đã được làm trong	27,50	DMSO
2	Mật mía, 50-75% chất kết tủa trong H ₂ O	10,91	DMSO-H ₂ O
3	Mật mía, dịch nổi bề mặt 75%	43,46	DMSO
4	Bọt nước mía ép, đã được làm trong	22,42	DMSO
5	Bọt nước mía ép, 50-75% chất kết tủa trong H ₂ O	23,92	DMSO-H ₂ O
6	Bọt nước mía ép, dịch nổi bề mặt 75%	32,07	DMSO

Cơ chất 4-metylbelferyl- α -D-glucopyranosit và enzym α -glucosidaza của nấm men được chuẩn bị trong dung dịch đệm thử nghiệm là dung dịch đệm natri axetat (độ pH=5,5). Cơ chất (nồng độ cuối 83 μ M, 45 μ l) được bổ sung vào các đĩa có 96 lỗ

chứa 45µl enzym (nồng độ cuối 1,7mU/ml) và 10µl mẫu. Đã được trộn trên máy lắc kiểu quỹ đạo trong 30 giây và ủ trong 20 phút ở nhiệt độ 37°C. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung dung dịch đệm natri glyxin 100mM (100µl, độ pH=10,6), đã được lắc trong 30 giây nữa, và cường độ huỳnh quang được xác định ở bước sóng kích thích λ_{ex} 355nm và bước sóng phát xạ λ_{em} 460nm. Fucoidan được sử dụng làm chất đối chứng dương và dung dịch đệm natri axetat (độ pH=5,5) được sử dụng làm chất đối chứng âm.

Tất cả các mẫu đều có hoạt tính ức chế α -glucosidaza nhất định. Hoạt tính cao nhất được quan sát ở mẫu 4 có $IC_{50} = 64\mu\text{g/ml}$ và hoạt tính thấp nhất được quan sát ở mẫu 3 có $IC_{50} = 1,037\mu\text{g/ml}$. Tất cả các mẫu đều có hoạt tính thấp hơn mẫu đối chứng dương fucoidan ($IC_{50} = 0,17\mu\text{g/ml}$). Mẫu 6 làm giảm hoạt tính enzym hiệu quả hơn mẫu 3. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng, với nồng độ cao hơn, chất chiết có thể chứa lượng polyphenol cao hơn và do đó còn hiệu quả hơn trong việc ức chế hoạt tính của α -glucosidaza.

Ví dụ 6. Ức chế PEG2

Mức độ tạo ra PEG2 *in vitro* từ các tế bào 3T3 được xác định bằng cách sử dụng kit thử nghiệm miễn dịch enzym (Enzyme Immuno Assay: EIA) Cayman Chemical Prostaglandin E2 đơn dòng. Tế bào được tiếp xúc với mẫu 3 và mẫu 6 và kích thích bằng canxi ionophore. Dịch nổi bề mặt tế bào được thử nghiệm để xác định mức độ tạo ra PEG2. Độ tính tế bào của các mẫu được thử nghiệm đối với các tế bào 3T3 để khẳng định rằng tác dụng ức chế PEG2 quan sát được không phải là do độc tính tế bào. Aspirin và ibuprofen được sử dụng làm mẫu đối chứng dương.

Tác dụng ức chế PEG2 cao nhất được quan sát đối với mẫu 3 và mẫu 6 lần lượt là 29,90% và 42,33% ở nồng độ 0,488µg/ml. Như được thể hiện trên Fig.3, tác dụng ức chế PEG2 của mẫu 6 là giống với tác dụng ức chế của ibuprofen (42,14% ở nồng độ 0,488µg/ml). Tác dụng ức chế sự tạo ra PEG2 trong tế bào so với các tế bào đối chứng không tiếp xúc với mẫu cho thấy rằng các mẫu thử nghiệm tác dụng như chất kháng viêm *in vitro*.

Ví dụ 7. Chiết polyphenol từ mật mía bằng cách sử dụng nhựa trao đổi ion

Đôi khi nhựa trao đổi ion được sử dụng trong các nhà máy tinh chế đường để loại bỏ các chất màu bản ra khỏi nước đường tinh luyện thu được sau bước thứ nhất để

tạo ra đường trắng. Các chất màu này bao gồm melanoidin, caramen (đây là các sản phẩm phản ứng Maillard tạo bởi phản ứng giữa đường và axit amin, phản ứng này chịu tác động của nhiệt độ và độ pH kiềm), và chất màu tự nhiên như polyphenol và flavonoid. Nước đường tinh luyện được xử lý bằng nhựa và đường và một lượng nhỏ chất màu đi qua nhựa và tiếp đó, chất này được xử lý tiếp để thu được mật mía loại dùng trong thực phẩm (rất khác với mật mía ép sơ bộ). Nhựa được tái sinh bằng cách rửa bằng axit và nước rửa chứa một số chất màu và một lượng nhỏ polyphenol được bỏ đi. Sau đó, nhựa này được rửa bằng dung dịch kiềm có độ pH =12-13 để tách polyphenol và flavonoid liên kết với nhựa, và nước rửa giải được điều chỉnh tới độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,0 bằng axit hoặc tốt hơn là nước rửa giải này được cho đi qua cột nhựa axit để “trao đổi” ion kiềm cho ion H^+ để độ pH của nước rửa giải nhỏ hơn 7. Quá trình này được mô phỏng trong phòng thí nghiệm trên quy mô nhỏ.

Đồ thị sắc ký lỏng của polyphenol được theo dõi lúc đầu trong nước đường tinh luyện (độ pH= 5,0-6,0) và tiếp đó trong chất chiết bằng nhựa có tính kiềm (độ pH=12-13) và sau khi điều chỉnh chất chiết này (độ pH=6,5-7,0). Polyphenol rất nhạy với điều kiện độ pH cao để tạo ra flavon. Sự thay đổi này có thể làm thay đổi hoạt tính sinh học của các hợp chất này và thậm chí việc đảo ngược độ pH từ kiềm sang trung tính chưa hẳn đã làm cho chúng trở lại hoạt tính sinh học trước đó.

Đồ thị sắc ký lỏng của chất chiết ở độ pH kiềm =12-13 khác đáng kể với đồ thị sắc ký của chất chiết giống hệt nhưng được điều chỉnh tới độ pH=6,5-7,0. Nhiều đỉnh chính của chất chiết có độ pH kiềm dường như dịch chuyển về phía thời gian rửa giải ít hơn trên đồ thị sắc ký, có thể cho thấy sự thay đổi cấu trúc thành flavon. Khi độ pH của chất chiết có độ pH kiềm này được điều chỉnh tới độ pH trung tính, các đỉnh này dịch chuyển về phía thời gian rửa giải dài hơn và đóng thẳng hàng với các đỉnh thu được từ nguyên liệu lỏng ban đầu.

Việc bảo quản chất chiết có tính kiềm trong thời gian tới 14 ngày ở nhiệt độ trong phòng không làm thay đổi đáng kể đồ thị sắc ký lỏng gợi ý rằng không xảy ra thêm sự biến đổi thành flavon theo thời gian. Ngoài ra, nếu chất chiết có tính kiềm được điều chỉnh ngay về trung tính, các đỉnh tương ứng với polyphenol cũng vẫn ổn định trong thời gian bảo quản 14 ngày.

Ví dụ 8. Giảm lượng chất màu và thu hồi polyphenol

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện được rằng chất màu có thể được loại bỏ hiệu quả mà không làm giảm đáng kể lượng polyphenol. Khi nồng độ etanol tăng cao hơn 40% sẽ thu được chất chiết thích hợp hơn.

Bảng 6 thể hiện chi tiết các mẫu khác nhau được thử nghiệm.

Bảng 6. Đặc tính của các mẫu được thử nghiệm

Mẫu	Lượng chất màu, chỉ số ICUMSA	Tổng lượng hợp chất phenolic (số mg đương lượng catechon /100g) (catechin equivalents: CE)
1	32240	808
2	37710	1356
3	65210	1169
4	66030	1797
5	32440	943
6	10960	349

Mẫu 1: Mật mía của trạm cuối Townsville được làm trong bằng cách ly tâm. Mật mía thô (chỉ số Brix khoảng 75°) được điều chỉnh tới chỉ số Brix bằng 25° bằng nước và ly tâm (4000 vòng/phút trong 10 phút). Chất kết tủa được loại bỏ. Nguyên liệu ban đầu đã được làm trong này vẫn có chỉ số Brix bằng 25° và được sử dụng để tạo ra dịch nổi bề mặt chứa 75%, đây là mẫu 2. 200ml nguyên liệu đã được làm trong này được sử dụng để điều chế chất chiết là dịch nổi dịch nổi bề mặt chứa 75% etanol. Tổng lượng CE/100g = 808mg. chỉ số ICUMSA = 32240.

Mẫu 2: dịch nổi bề mặt chứa 75% etanol này được điều chế bằng cách đầu tiên loại bỏ 50% chất kết tủa, thu hồi dịch nổi bề mặt chứa 50% etanol và tiếp đó bổ sung thêm etanol tới nồng độ 75%. Chất kết tủa được loại bỏ, dịch nổi bề mặt chứa 75% etanol được thu hồi và etanol được loại bỏ. Thể tích cuối là 80ml và chỉ số Brix = 40°. Tổng lượng CE/100mg = 1356mg. chỉ số ICUMSA = 37710.

Mẫu 3: Bọt nước mía ép có chỉ số Brix = 22° (do toàn bộ lượng đường đã bị loại bỏ). Bọt nước mía ép được ly tâm như nêu trên và chất kết tủa bất kỳ được loại bỏ. 200ml bọt nước mía ép đã được làm trong này được sử dụng để điều chế chất chiết là

dịch nổi bề mặt chứa 75% etanol (mẫu 4). Tổng lượng CE/100mg = 1169mg. ICUMSA 65210.

Mẫu 4: Dịch nổi bề mặt chứa 75% etanol này được điều chế bằng cách đầu tiên loại bỏ 50% chất kết tủa, thu hồi dịch nổi bề mặt chứa 50% etanol và tiếp đó bổ sung thêm etanol tới 75%. Chất kết tủa được loại bỏ, dịch nổi bề mặt chứa 75% etanol được thu hồi và etanol được loại bỏ. Thể tích cuối là 80ml và có chỉ số Brix = 32°.

Mẫu 5: chất chiết thu được từ mẫu 4 bằng cách sắc ký kỵ nước. FPX66 được thu hồi từ 15ml mẫu 4. Đỉnh được tách bằng 70% etanol được gộp lại (các phần phân ước được kết hợp) và etanol được loại bỏ. Thể tích cuối là 25ml.

Mẫu 6: chiết mẫu 2 bằng cách sắc ký kỵ nước. FPX66 được thu hồi từ 15ml mẫu 2. Đỉnh được tách bằng 70% etanol được gộp lại (các phần phân ước được kết hợp) và etanol được loại bỏ. Thể tích cuối là 40ml.

Lượng polyphenol thu hồi và lượng chất màu giảm đi được tính như nêu chi tiết dưới đây.

Các mẫu 1 & 2: (i) Lượng polyphenol thu hồi – 200ml mật mía có chỉ số Brix 25 có lượng polyphenol bằng 808mg CE. Sau khi pha loãng, chiết và giảm lượng chất màu, chỉ số Brix tăng từ 25 tới 40 ($40/25 = 1,6$) và thể tích giảm từ 200ml xuống 80ml ($200/80 = 2,5$). Do đó, nếu tỷ lệ thu hồi phenol đạt 100%, tổng lượng hợp chất phenolic sẽ tăng tới mức: $808\text{mg CE} \times 2,5 = 2020\text{ CE}$. Tổng lượng hợp chất phenolic được phát hiện là 1356 CE, nghĩa là $1356\text{ CE}/2020\text{ CE} \times 100 = 67,13\%$ tổng lượng CE được thu hồi. (ii) Sự giảm lượng chất màu – theo lý thuyết, lượng chất màu sẽ tăng 2,5 lần từ 32240 đến 80600 đơn vị ICUMSA. Tuy nhiên, lượng chất màu được phát hiện chỉ là 37710 đơn vị ICUMSA. Do đó, lượng chất màu giảm 2,14 lần ($80600/37710$) hoặc 42890 đơn vị ICUMSA.

Các mẫu 3 & 4: (i) thu hồi polyphenol – 200ml bột nước mía ép có chỉ số Brix 22 có lượng polyphenol bằng 1169mg CE. Sau khi pha loãng, chiết và giảm lượng chất màu, chỉ số Brix tăng từ 22 lên 32 ($32/22 = 1,45$) và thể tích giảm từ 200ml xuống 80ml ($200/80 = 2,5$). Do đó, nếu hiệu suất thu hồi phenol đạt 100%, tổng lượng hợp chất phenolic sẽ tăng tới $1169\text{mg CE} \times 2,5 = 2922\text{mg CE}$. Tổng lượng hợp chất phenolic được phát hiện là 1797mg CE, nghĩa là $1797\text{mg CE}/2922\text{mg CE} \times 100 = 61,5\%$ tổng lượng CE được thu hồi. (ii) Sự giảm lượng chất màu – Theo lý thuyết,

lượng chất màu sẽ tăng 2,5 lần từ chỉ số ICUMSA bằng 65210 lên 163025. Tuy nhiên, lượng chất màu được phát hiện chỉ là 66030 đơn vị ICUMSA. Do đó, lượng chất màu giảm 2,5 lần ($163025/66030$) hoặc 96995 đơn vị ICUMSA.

Mẫu 5: (i) thu hồi polyphenol– 25ml mẫu 4 được điều chế từ thể tích ban đầu 15ml. Do đó, mức độ pha loãng hợp chất phenolic theo lý thuyết là ($15\text{ml}/25\text{ml} = 0,6$) hoặc $1797 \times 0,6 = 1078\text{mg CE}$. Kết quả phân tích mẫu 5 là 943mg CE. Điều này nghĩa là $(943\text{mg CE}/1078\text{mg CE}) = 87,5\%$ tổng lượng hợp chất phenolic được thu hồi (12,5% đã mất đi). (ii) Sự giảm lượng chất màu – Theo lý thuyết, lượng chất màu giảm 40% từ 66030 xuống 39618 đơn vị ICUMSA. Tuy nhiên, lượng chất màu phát hiện được là 32440 đơn vị ICUMSA. Do đó, lượng chất màu giảm đi $(39618 - 32440 = 7178/39618 = 18,1\%)$ hoặc 7178 đơn vị ICUMSA. Do vậy, phương pháp sắc ký trên nhựa FPX66 là hiệu quả hơn trong việc làm giảm lượng chất màu của bột nước mía ép mà không làm giảm tương ứng hợp chất phenolic. $12,5/18,1 = 69,1\%$. Điều này có nghĩa là đối với mỗi đơn vị màu ICUMSA được loại bỏ, chỉ có 30,9% lượng hợp chất phenolic bị loại bỏ.

Mẫu 6: (i) thu hồi polyphenol– 40ml mẫu 2 được điều chế từ thể tích ban đầu là 15ml. Do đó, tỷ lệ pha loãng theo lý thuyết của hợp chất phenolic là ($15\text{ml}/40\text{ml} = 0,375$) hoặc $1356 \times 0,375 = 508\text{mg CE}$. Kết quả phân tích mẫu 6 là 349mg CE. Điều này có nghĩa là 68,7% ($349\text{mg CE}/508\text{mg CE}$) tổng lượng hợp chất phenolic được thu hồi (lượng mất đi là 31,3%). (ii) Sự giảm lượng chất màu – theo lý thuyết lượng chất màu sẽ giảm 31,3% từ 37710 đơn vị ICUMSA xuống 25907. Tuy nhiên, lượng chất màu phát hiện được là 10960 đơn vị ICUMSA. Do đó, lượng chất màu giảm đi $(25907-10960 = 14947/25907 = 57,7\%)$ hoặc 14947 đơn vị ICUMSA. Do đó, phương pháp sắc ký trên FPX66 là rất hiệu quả trong việc làm giảm lượng chất màu của mật mía mà không làm giảm tương ứng lượng hợp chất phenolic. $57,7/31,3 = 54,25\%$. Điều này có nghĩa là đối với mỗi đơn vị màu ICUMSA được loại bỏ, chỉ có 54,25% hợp chất phenolic bị loại bỏ.

Fig.4 thể hiện đồ thị sắc ký HPLC của các mẫu cũng như một số sắc ký đồ của hợp chất phenolic và flavonoid chưa được xác định ở thời gian lưu khác nhau.

Như được thể hiện trên Fig.5, các tác giả sáng chế thấy rằng nồng độ EtOH bằng 75-85% là nồng độ tối ưu (điều này là khác với nội dung được thông báo trong

WO 2004/014159) do nồng độ này làm giảm tối đa lượng chất màu và không làm giảm đáng kể lượng polyphenol.

Các tác giả sáng chế cũng thấy rằng nếu mật mía được pha loãng tới chỉ số Brix bằng 25° và sau đó bằng 48° và quá trình chiết được chia thành hai giai đoạn thì lượng chất màu của chất chiết cuối là thấp hơn và lượng polyphenol thu hồi là cao hơn. Do đó, phương pháp chiết để thu được chất chiết chuẩn được thể hiện trên Fig.6.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần hiểu rằng nhiều thay đổi và/hoặc cải biến có thể được thực hiện đối với các phương án được mô tả ở trên, mà không đi chệch khỏi phạm vi chung và rộng của sáng chế. Do đó, các phương án của sáng chế được coi là minh họa cho sáng chế và không làm giới hạn phạm vi sáng chế về tất cả các mặt.

Các bước, dấu hiệu, số nguyên, chế phẩm và/hoặc hợp chất được bộc lộ ở đây hoặc được nêu chung hoặc riêng trong bản mô tả này, và tổ hợp bất kỳ và tất cả các tổ hợp của hai hoặc nhiều bước hoặc dấu hiệu nêu trên.

Tất cả các tài liệu công bố được bàn luận và/hoặc nói tới ở đây được viện dẫn toàn bộ ở đây.

Phần bàn luận bất kỳ về các tài liệu, hiệp ước, chất, thiết bị, bài báo hoặc bàn luận tương tự được đưa vào bản mô tả này là chỉ nhằm mục đích đưa ra ngữ cảnh của sáng chế. Nó không được coi là sự thừa nhận rằng vấn đề bất kỳ hoặc tất cả các vấn đề này là một phần của kiến thức cơ bản đã biết hoặc là kiến thức chung thông thường trong lĩnh vực phù hợp với sáng chế do nó xuất hiện trước ngày ưu tiên của mỗi yêu cầu bảo hộ của đơn này.

Tài liệu tham khảo

Colombo và cộng sự (2006) *Phytochem Anal*, 17:337–343.

Duarte-Almeida và cộng sự (2006) *Plant Foods for Human Nutrition*, 61:187-192.

Cai H và cộng sự (2005) *Mol Cancer Ther*, 4:1287–1292.

Payet và cộng sự (2006) *J Agric Food Chem*, 54:7270-7276.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất chất chiết từ cây mía bao gồm các bước:
 - i) trộn sản phẩm thu được từ cây mía với etanol để tạo ra hỗn hợp chiết chứa từ 70% đến 85% thể tích etanol;
 - ii) để chất kết tủa tạo ra trong hỗn hợp chiết;
 - iii) loại bỏ chất kết tủa ra khỏi hỗn hợp chiết để thu được dịch nổi bề mặt; và
 - iv) loại bỏ etanol ra khỏi dịch nổi bề mặt để thu được chất chiết từ cây mía.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hỗn hợp chiết chứa 70% etanol.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước loại bỏ nước ra khỏi chất chiết để làm tăng chỉ số Brix của chất chiết
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó chất chiết có chỉ số Brix khoảng 60°.
5. Phương pháp theo điểm 3, trong đó chất chiết có chỉ số Brix khoảng 65°.
6. Phương pháp theo bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó sản phẩm thu được từ cây mía được chọn từ mật mía, bã mía, nước mía ép lần đầu, bùn cặn ép mía, nước mía ép đã làm trong, nước đường đã làm trong, nước rỉ đường, nước đường vàng, phế thải cánh đồng mía, vỏ mía và/hoặc bột nước mía ép.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó sản phẩm thu được từ cây mía được chọn từ mật mía và bột nước mía ép.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước xử lý dịch nổi bề mặt bằng cách sắc ký trao đổi ion, sắc ký tương tác kỵ nước, LCMS và/hoặc MALDI-TOF để thu được chất chiết.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước xử lý dịch nổi bằng sắc ký tương tác kỵ nước để tạo ra chất chiết.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó sắc ký tương tác kỵ nước bao gồm nhựa XAD hoặc FPX66.
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trước bước (i) sản phẩm thu được từ cây mía được trộn với nước và/hoặc gia nhiệt.

12. Chất chiết được tạo ra bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất chiết này chứa ít nhất 21mg/ml polyphenol.
13. Chất chiết theo điểm 12, trong đó chất chiết này chứa ít nhất 22mg/ml polyphenol.
14. Chất chiết theo điểm 12, trong đó chất chiết này chứa ít nhất 25mg/ml flavonoid, và/hoặc ít nhất 25mg/ml polyphenol.
15. Chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 14, trong đó chất chiết này chứa một hoặc nhiều thành phần trong số trixin, apigenin, luteolin, axit cafeic, axit hydroxyxinamic, axit sinapic và các dẫn xuất của chúng.
16. Chất chiết theo điểm 15, trong đó chất chiết này chứa một hoặc nhiều axit hydroxyxinamic và các dẫn xuất của nó.
17. Chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 16, trong đó chất chiết này chứa chất xơ.
18. Chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 17, trong đó chất chiết này ở dạng bột.
19. Chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 17, trong đó chất chiết này ở dạng dịch lỏng hoặc xi rô.
20. Chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 19, trong đó chất chiết này có hoạt tính ức chế α -glucosidaza và/hoặc hoạt tính ức chế α -amylaza.
21. Chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 19, trong đó chất chiết này có hoạt tính kháng viêm.
22. Chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 19, trong đó chất chiết này có tác dụng làm giảm giá trị calo.
23. Chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 19, trong đó chất chiết này có tác dụng làm giảm chỉ số đường huyết (glycemic index –GI).
24. Chế phẩm chứa chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 23.

25. Chế phẩm theo điểm 24, trong đó chế phẩm này chứa chất xơ.
26. Chế phẩm theo điểm 24 hoặc 25, trong đó chế phẩm này là sản phẩm bổ sung dinh dưỡng, thực phẩm bổ sung, sản phẩm dinh dưỡng dùng trong thể thao, chế phẩm để bao thực phẩm hoặc dược phẩm.
27. Thực phẩm chứa chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 23 hoặc chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24 đến 26.
28. Đồ uống chứa chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 23 hoặc chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24 đến 26.
29. Phương pháp làm giảm chỉ số calo khả dụng của thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm bước bổ sung chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 23 và/hoặc chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24 đến 26 vào thực phẩm hoặc đồ uống này.
30. Phương pháp làm giảm GI của thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm bước bổ sung chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 23 và/hoặc chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24 đến 26 vào thực phẩm hoặc đồ uống này.
31. Thuốc dùng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh chứa chất chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm 12 đến 23 và/hoặc chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24 đến 26.

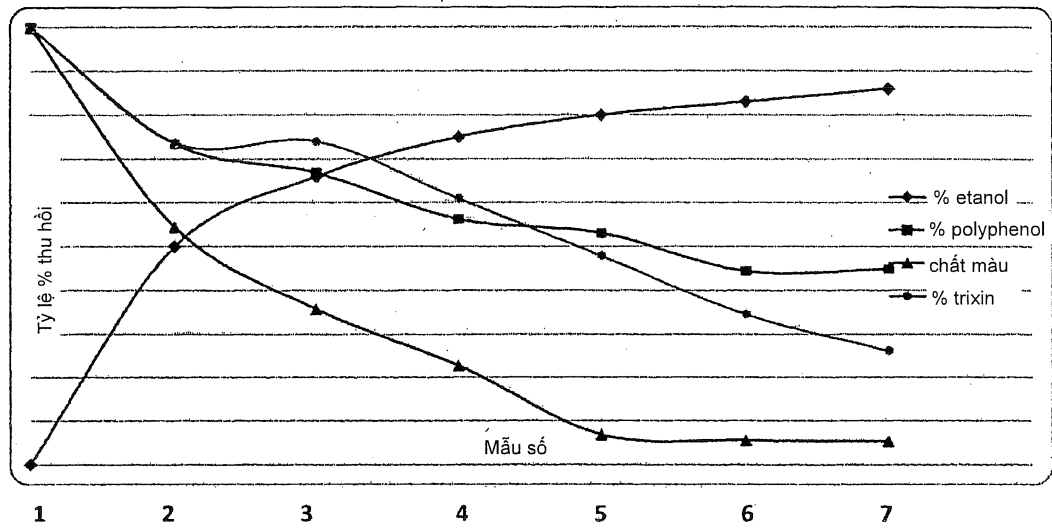


Fig.1

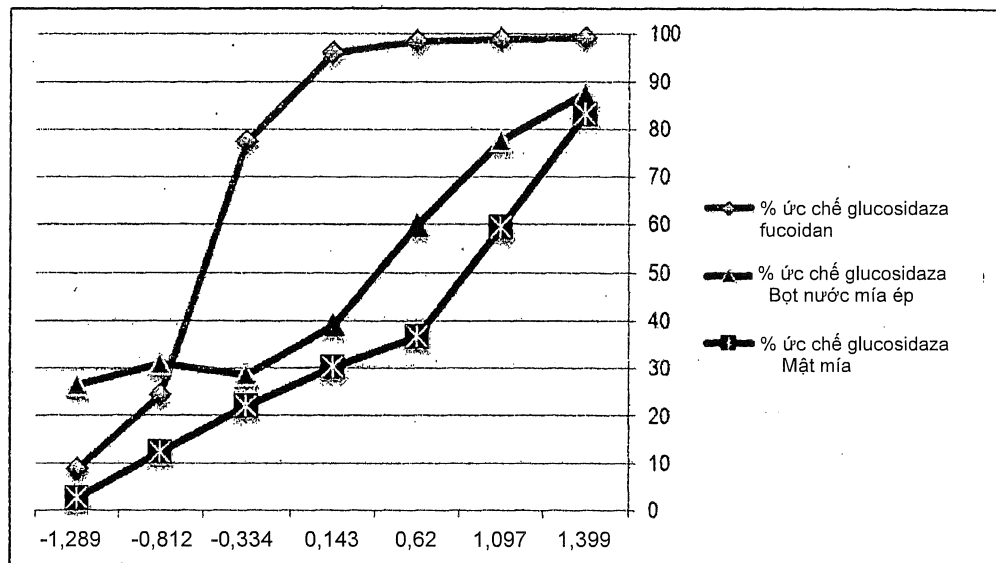


Fig.2

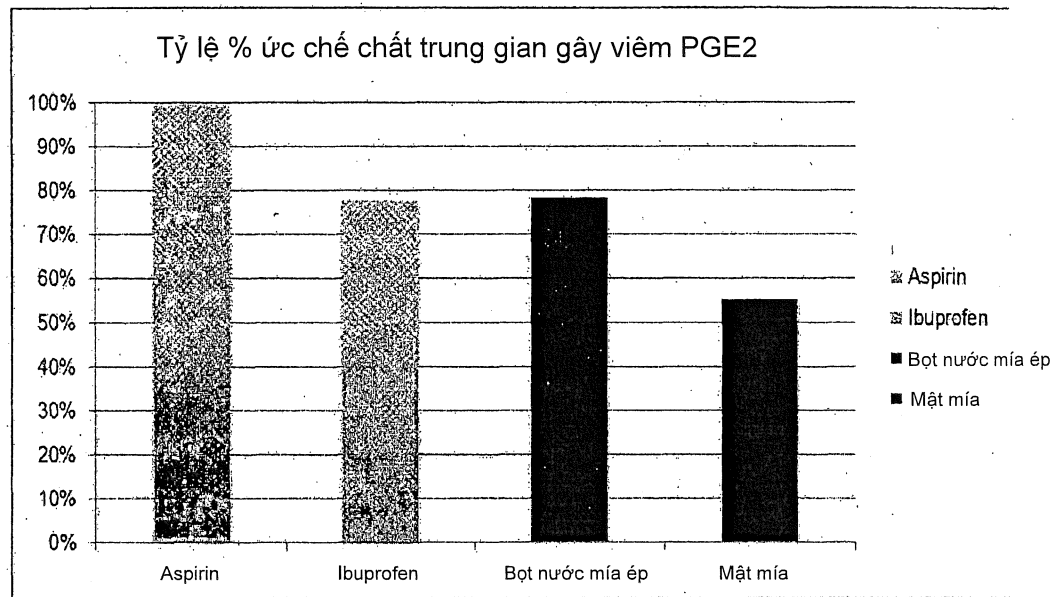


Fig.3

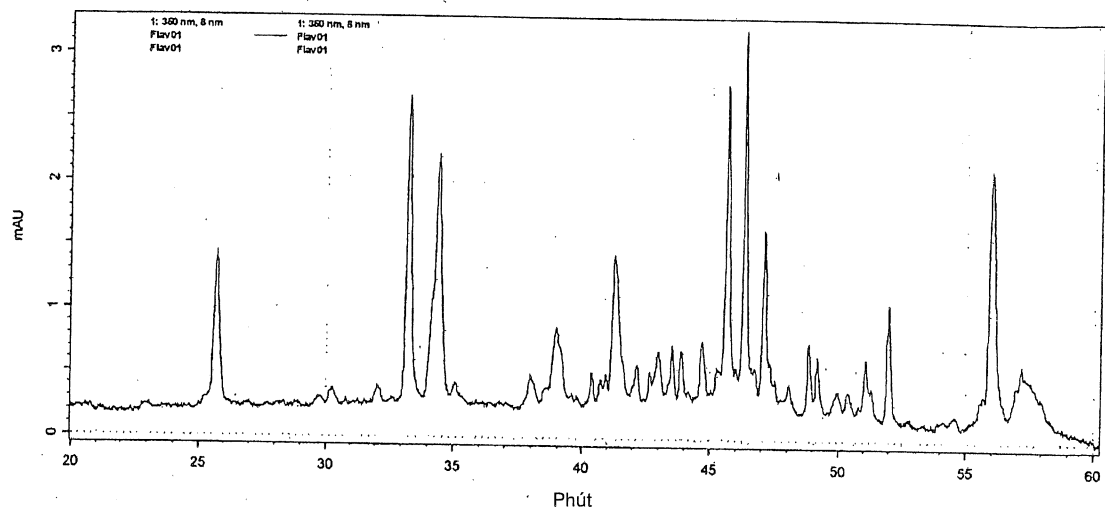


Fig.4a

Fig.4b

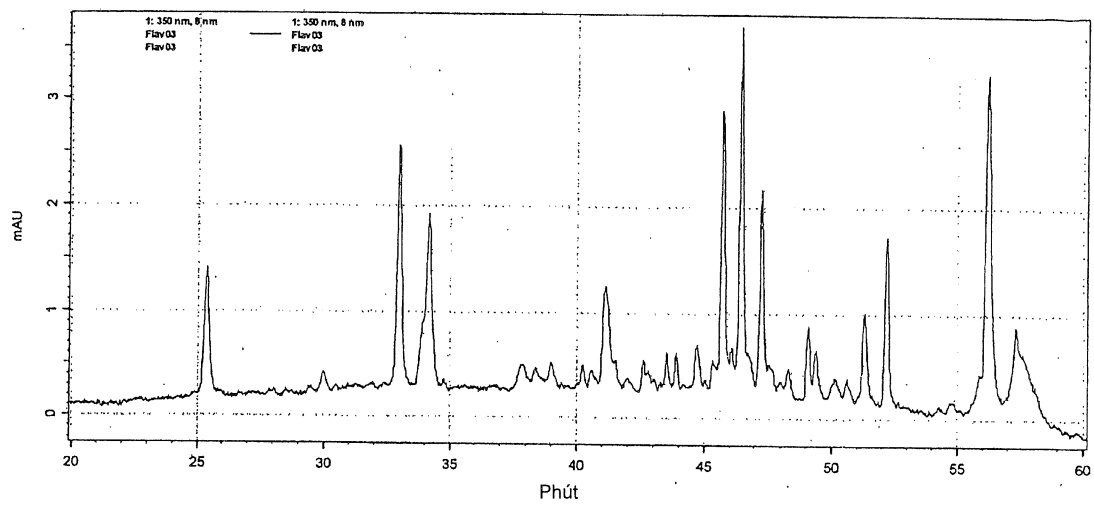


Fig.4c

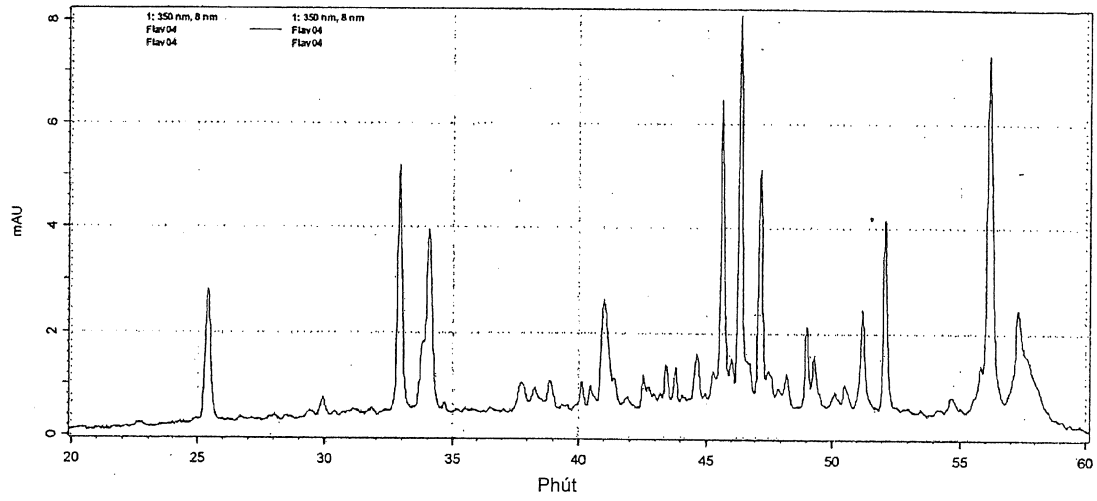


Fig.4d

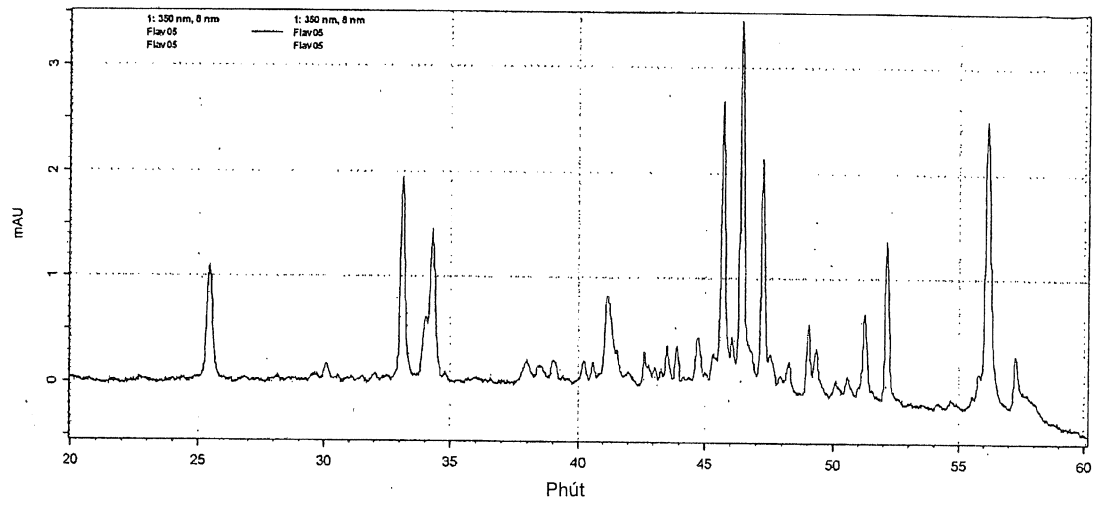


Fig.4e

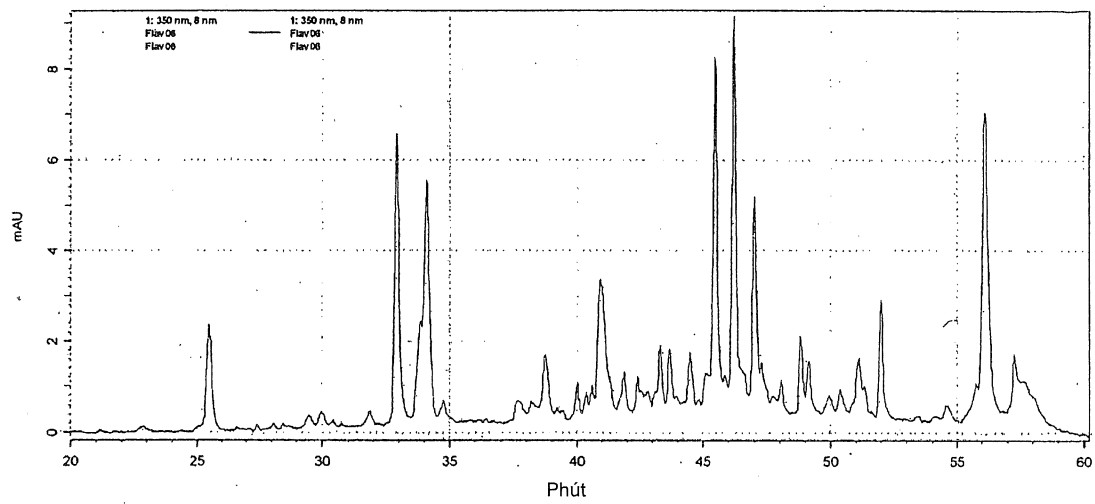
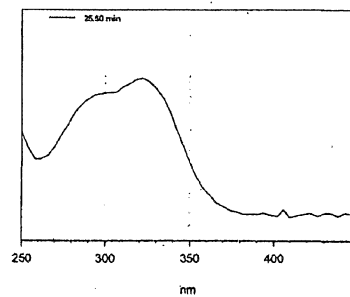
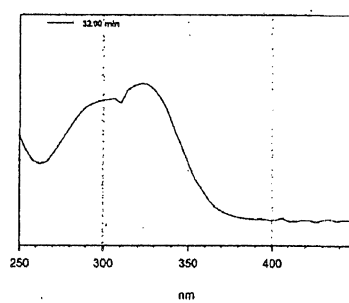


Fig.4f

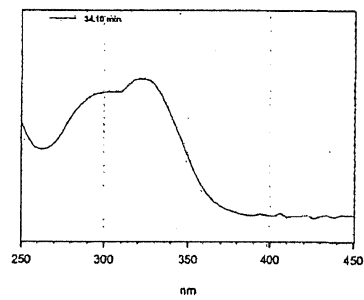
Phổ HPLC ở thời điểm 25,50 phút



Phổ HPLC ở thời điểm 32,90 phút



Phổ HPLC ở thời điểm 34,10 phút



Phổ HPLC ở thời điểm 41,00 phút

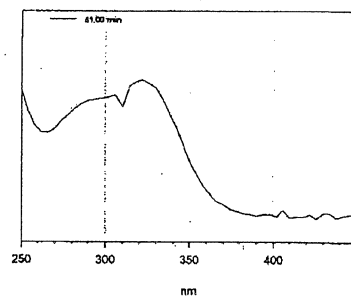
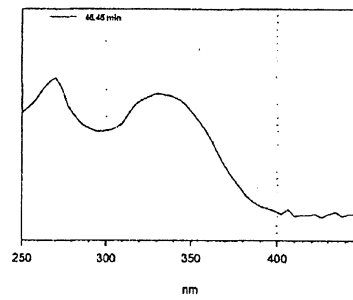
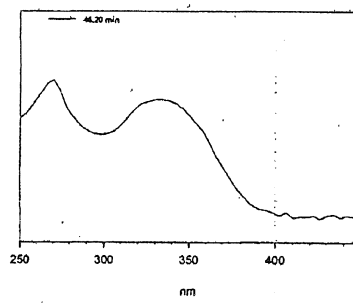


Fig.4g

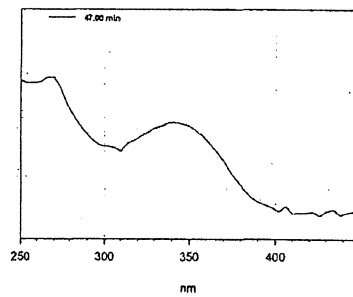
Phổ HPLC ở thời điểm 45,45 phút



Phổ HPLC ở thời điểm 46,20 phút



Phổ HPLC ở thời điểm 47,00 phút



Phổ HPLC ở thời điểm 56,10 phút

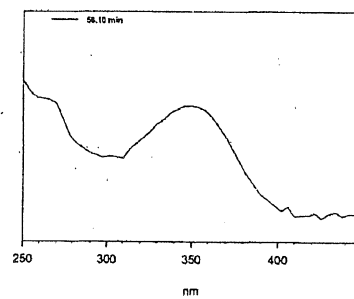


Fig.4h

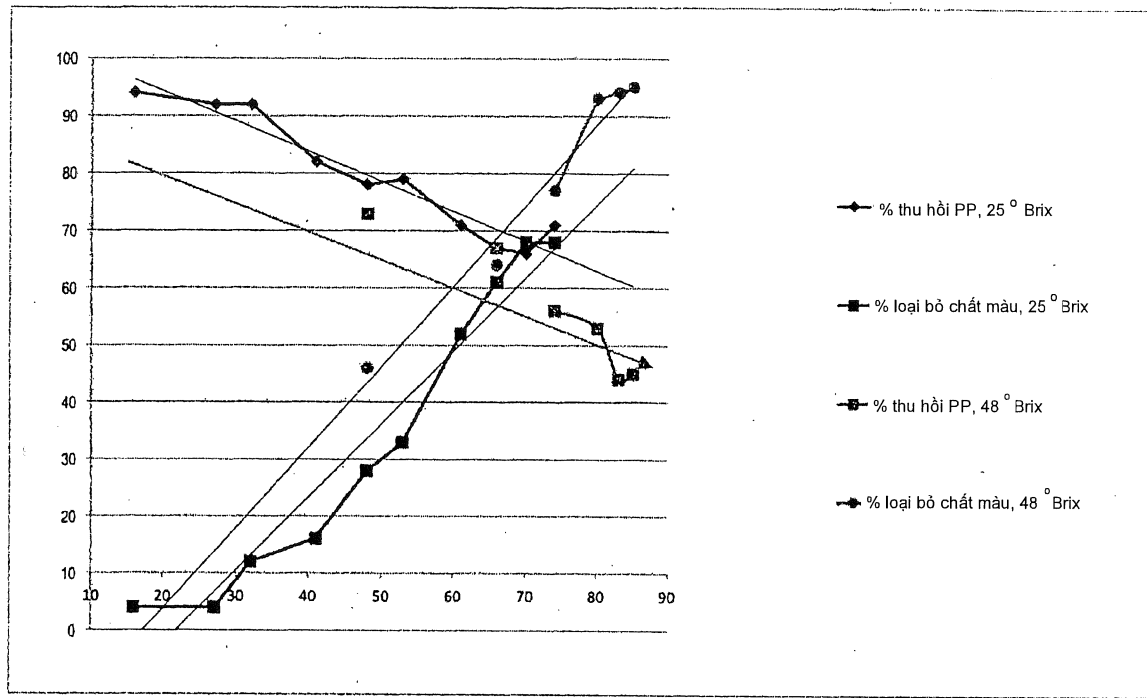


Fig.5

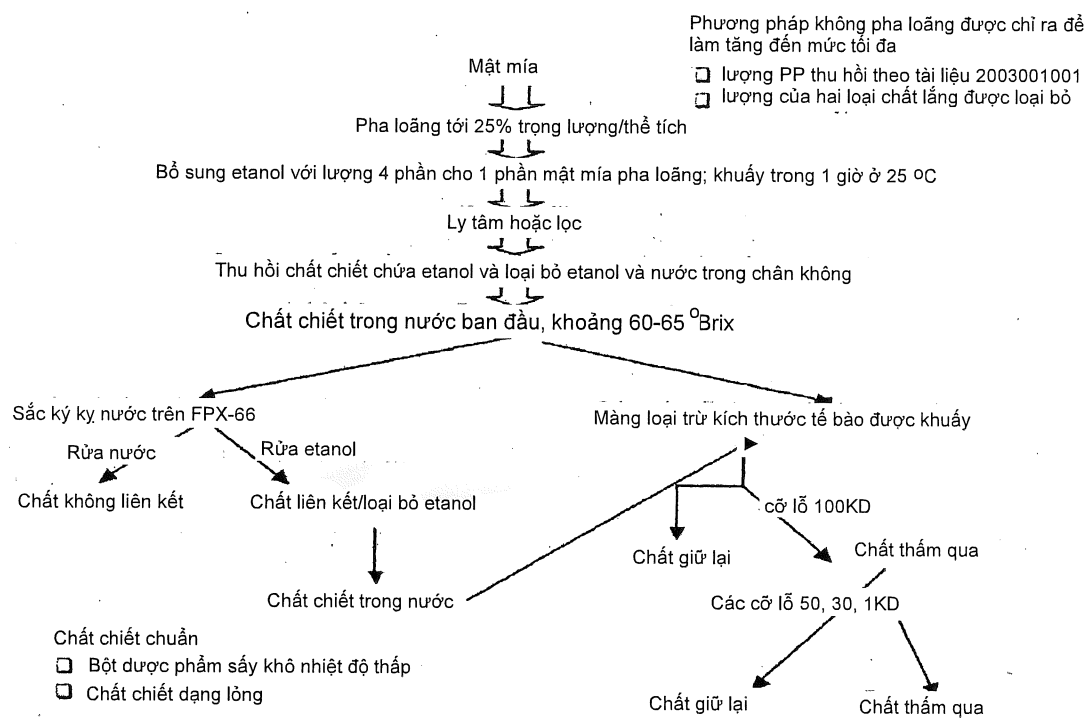


Fig.6