



(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)



2-0002659

(51) **C12Q 1/68; A23L 1/33**
2007.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00004

(22) 03/12/2019

(67) 1-2019-06790

(45) 25/07/2021 400

(43) 25/02/2020 383A

(73) Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Nhà 1H, số 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Lê Tất Thành (VN); Đỗ Thị Thanh Trung (VN); Nguyễn Văn Tuyên Anh (VN); Nguyễn Thị Phương Lan (VN); Văn Thư Vũ (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT SẢN PHẨM PEPTIT THỦY PHÂN TỪ CUA LỘT

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) xử lý nguyên liệu; b) thủy phân protein của cua lột; c) lọc bỏ bã cua; d) thu các phân đoạn peptit; và e) thu sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột. Quy trình theo sáng chế sử dụng hệ enzyme proteaza để phân cắt cấu trúc tế bào và protein thành các phân đoạn peptit có kích thước thích hợp để có thể thu được protein trên màng polyethersulfon có kích thước lỗ 100kDa, 30kDa, 10kDa, 5kDa, 3kDa, 1kDa. Sản phẩm thu được ở dạng bột, mùi thơm, màu vàng sáng thích hợp dùng làm thực phẩm chức năng để chống oxy hóa, giảm thoái hóa khớp. Bột cua lột thủy phân chứa khoáng có tác dụng bổ sung canxi và khoáng vi lượng cho xương trẻ em và chống loãng xương ở người trưởng thành.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học và công nghệ thực phẩm, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột. Sản phẩm thủy phân từ cua lột chứa hàm lượng cao oligopeptit có hoạt tính sinh học và có chứa hàm lượng khoáng vi lượng cao thích hợp sử dụng làm thực phẩm chức năng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các peptit hoạt tính sinh học lần đầu tiên được phát hiện và phân lập trong các loài sinh vật biển như là neurotoxin, peptit điều trị bệnh tim, peptit kháng virus và ngăn ngừa khối u, cardiotoxin và peptit kháng sinh. Phổ hoạt động sinh học rộng của các peptit biển có tiềm năng dinh dưỡng cao và các giá trị được phẩm thu hút sự chú ý của ngành công nghiệp dược phẩm và dinh dưỡng, với hy vọng rằng chúng có thể được sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh khác nhau. Trong những năm gần đây, những nỗ lực nghiên cứu đã được dành riêng cho lĩnh vực thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Thực phẩm bảo vệ sức khỏe là các thành phần có nguồn gốc thực phẩm (tìm thấy tự nhiên hoặc tạo ra nhờ enzym hoặc nhờ lên men), ngoài giá trị dinh dưỡng chúng còn ảnh hưởng sinh lý trên cơ thể. Những sản phẩm này được sử dụng nhằm ngăn ngừa bệnh mãn tính, tăng cường hệ thống miễn dịch, kiểm soát các stress, kiểm soát trọng lượng cơ thể, điều chỉnh mức đường huyết, cải thiện chức năng nhận thức, trì hoãn quá trình lão hóa hoặc tăng tuổi thọ. Các hoạt chất sinh học peptit thường được kết hợp vào các sản phẩm dinh dưỡng. Chúng được chuyển đổi thành dạng hoạt động sau tiêu hóa, hấp thu qua ruột và vận chuyển đến hệ thống tuần hoàn để sử dụng năng lượng sinh học đa dạng của chúng.

Gần đây, có hai sản phẩm dược phẩm có nguồn gốc từ peptit biển, zicotit và brentuximab vedotin, là một loại peptit biển tự nhiên và dẫn xuất peptit, đã

được đưa ra thị trường. Cả hai sản phẩm đều được sản xuất bằng tổng hợp hóa học. Ziconotide (Prialt®), một peptit được tìm thấy trong ốc sên biển, là loại peptit biển đầu tiên được FDA chấp thuận trong năm 2004 cho việc sử dụng như thuốc giảm đau. Sau đó, trong năm 2011, một loại thuốc có chứa peptit biển (Adcetris®) từ biển đã được FDA chấp thuận để điều trị ung thư. Một số hợp chất có nguồn gốc peptit biển khác hiện đang được đánh giá trong các giai đoạn thử nghiệm lâm sàng khác nhau ở Hoa Kỳ và Châu Âu, plitidepsin và vedotin glembatumumab, dùng để điều trị các bệnh ung thư khác nhau. Với sự tiến bộ của việc nghiên cứu peptit biển hiện nay, sự hợp tác giữa các nhà điều tra cơ bản và công nghiệp là rất quan trọng để đảm bảo tương lai thành công của các peptit biển như là các liệu pháp mới trong việc điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh khác nhau.

Oligopeptit thường có kích thước từ vài acid amin đến vài chục acid amin và hoạt tính sinh học thường được quyết định bởi kích thước và trình tự acid amin của peptit đó. Hsu và cộng sự đã điều tra hoạt tính chống tăng sinh của peptit từ sản phẩm phụ của cá Tuna Dark (*Thunnus tonggol*), và kết quả cho thấy phân đoạn peptit với trọng lượng phân tử từ 390 đến 1400 Da có hoạt tính chống tăng sinh lớn nhất. Kim và cộng sự đã sử dụng màng siêu lọc để tách protein thủy phân của cá Hoki (*Johnius belengerii*) cho thấy phân đoạn peptit có trọng lượng phân tử từ 3 đến 5 kDa thể hiện hoạt tính chống oxy hóa cao nhất. Hơn thế nữa, Wang và cộng sự khi nghiên cứu peptit chống oxy hóa chiết xuất từ cá thu cho thấy rằng peptit có trọng lượng phân tử dưới 3 kDa thể hiện hoạt tính loại bỏ gốc 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl cao nhất.

Nhiều nghiên cứu gần đây tập trung vào sàng lọc các peptit có hoạt tính sinh học có nguồn gốc tự nhiên từ sinh vật biển. Tuy nhiên, hàm lượng các peptit tự nhiên hòa tan trong sinh vật thường thấp, trong khi hàm lượng protein trong cơ thể sinh vật bậc cao lại rất cao. Vì vậy, việc lựa chọn nguồn nguyên liệu chứa các peptit có hoạt tính cũng cần chú ý. Cua bùn (*Scylla* sp.) thuộc họ Portunidae, bộ Decapoda, lớp Crustacea, ngành Arthropoda ngày càng được nuôi trồng với quy mô lớn. Cua được thu hoạch ở thời kỳ lột xác (cua lột), cung

cấp một nguồn thực phẩm có hàm lượng protein cao vượt trội, chiếm khoảng 30% khối lượng khô, ngoài ra thành phần acid amin đã được công bố có chứa nhiều acid amin thiết yếu như lysin, arginin, serin. Vì vậy, việc tạo ra và phân tách peptit có hoạt tính sinh học từ protein ứng dụng công nghệ enzym mang lại giá trị cao cho ngành chế biến của lột.

Trong quy mô công nghiệp, peptit có hoạt tính sinh học hoặc protein thủy phân có thể được chiết xuất và phân lập từ protein của các loài sinh vật biển bằng nhiều phương pháp khác nhau. Phương pháp chiết dung môi hữu cơ đã được sử dụng theo truyền thống, nhưng đó là một kỹ thuật tốn thời gian, tốn kém và không thân thiện với môi trường. Ngày nay, các kỹ thuật chiết xuất tốt hơn như chiết xuất dịch siêu tới hạn (supercritical fluid extraction), chiết xuất dung môi điều áp, chiết xuất bằng vi sóng, chiết xuất bằng siêu âm, hỗ trợ điện trường. Sau quy trình chiết, protein được thủy phân thành các peptit có hoạt tính sinh học. Ứng dụng enzym được ưa thích hơn trong các ngành công nghiệp dược phẩm và thực phẩm để tránh xử lý hóa học và vật lý và duy trì các chức năng và giá trị dinh dưỡng. Các sản phẩm thủy phân, peptit có hoạt tính, được tách theo trọng lượng phân tử khác nhau bằng cách lọc qua màng. Thông thường một màng siêu lọc với kích thước lỗ theo trọng lượng phân tử (MWCO) trên 20 kDa được sử dụng để tách các peptit khỏi protein không bị thủy phân. Màng có lỗ (MWCO) khoảng từ 4 đến 8 kDa thích hợp cho phân đoạn của các peptit có hoạt tính với trọng lượng phân tử mong muốn. Màng có MWCO thấp khoảng 0,2 kDa được sử dụng để thu các peptit. Kỹ thuật lọc màng sử dụng một màng lọc nano được sử dụng để khử muối, khử mùi và khử màu cho dung dịch peptit. Tuy nhiên, vẫn cần có giải pháp có khả năng thủy phân hiệu quả và thu hồi được các oligopeptit một cách hiệu quả và đơn giản.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý nguyên liệu bằng cách thu gom cua ở giai đoạn lột vỏ, rửa sạch bằng nước và giã để loại bỏ muối, sau đó đưa lên thiết bị chiếu vi sóng 2.450 MHz, công suất 600W trong 3 phút để bất hoạt enzym nội sinh thu được nguyên liệu cua lột;

b) thủy phân protein của lột bằng cách nghiền nhỏ nguyên liệu cua lột, bổ sung hệ enzym proteaza có hoạt lực khoảng 2.000UI/g theo tỷ lệ 1/1000 (theo trọng lượng), nhiệt độ thủy phân 50°C, tốc độ khuấy 200 vòng/phút trong 15 giờ, tiếp đó tăng nhiệt độ lên 80°C và khuấy trong 10 phút nhằm bất hoạt enzym thu được nguyên liệu cua lột được thủy phân;

c) lọc bỏ bã cua bằng cách đưa phần dịch thủy phân vào máy ly tâm, tiến hành ly tâm dịch thủy phân ở tốc độ 1500 vòng/phút thu phần dịch lọc;

d) thu các phân đoạn peptit bằng cách chuyển phần dịch lọc vào thiết bị lọc có các hệ thống màng lọc polyethersulfon có kích thước lỗ lần lượt là 100 kDa, 30 kDa, 10 kDa, 5kDa, 3kDa, 1kDa, tiến hành lọc với áp suất lọc nằm trong khoảng từ 29,6 MPa đến 49,3 MPa (từ 3 đến 5 atm), thu hồi oligopeptit có các phân đoạn tương ứng trên màng lọc; và

e) thu sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột bằng cách thu các phân đoạn oligopeptit và sấy khô ở nhiệt độ thấp hơn 10°C thu được sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột dạng bột màu vàng sáng.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó phần bã rắn thu được từ bước lọc thô còn được sấy khô, nghiền mịn để dùng làm chất bổ sung canxi cho thức ăn chăn nuôi.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó sau bước lọc tinh, phần dịch còn được loại bỏ nước để thu hồi khoáng vi lượng và sấy khô ở nhiệt độ dưới 10°C để thu thành phần giàu canxi.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ quy trình sản xuất sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với những phương án ưu tiên và các ví dụ thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể này chỉ nhằm làm rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) xử lý nguyên liệu; b) thủy phân protein của cua lột; c) lọc bỏ bã cua; d) thu các phân đoạn peptit; và e) thu sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột.

Cua lột theo sáng chế chỉ cua được thu hoạch ở thời kỳ lột xác, cua giai đoạn này đã được chứng minh có các đặc tính cũng như chứa các loại protein khác biệt cung cấp một nguồn thực phẩm có hàm lượng protein cao vượt trội, chiếm khoảng 30% khối lượng khô. Ngoài các thành phần axit amin đã được công bố có chứa nhiều axit amin thiết yếu như lysin, arginin, serin. Các loài cua nói chung đều có thể được sử dụng làm nguyên liệu, tuy nhiên, tốt nhất là loài cua bùn (*Scylla* sp.) thuộc họ Portunidae, bộ Decapoda, lớp Crustacea, ngành Arthropoda vì chúng là một loài ngày càng được nuôi trồng với quy mô lớn.

Trong bước xử lý nguyên liệu, tiến hành bằng cách thu gom cua ở giai đoạn lột vỏ. Sau khi rửa sạch bằng nước và giã để loại bỏ muối, chuyển cua lên thiết bị chiếu vi sóng 2.450 MHz, công suất 600W trong 3 phút để bất hoạt enzym nội sinh thu được nguyên liệu cua lột.

Trong bước thủy phân protein của lột, tiến hành nghiền nhỏ nguyên liệu cua lột và bổ sung hệ enzym proteaza có hoạt lực khoảng 2.000UI/g. Tỷ lệ enzym bổ sung theo trọng lượng nguyên liệu là 1/1000 (theo trọng lượng), Nhiệt độ thủy phân là 50°C, tốc độ khuấy 200 vòng/phút trong 15 giờ. Tiếp đó tăng

nhệt độ lên 80°C và khuấy trong 10 phút nhằm bắt hoạt enzym thu được nguyên liệu của lột được thủy phân.

Trong bước lọc bỏ bã cua, tiến hành đưa phần dịch thủy phân vào máy ly tâm, tiến hành ly tâm dịch thủy phân ở tốc độ 1500 vòng/phút thu phần dịch lọc.

Phần bã bã rắn thu được từ bước lọc thô này còn được sấy khô, nghiền mịn để dùng làm chất bổ sung canxi cho thức ăn chăn nuôi.

Trong bước thu các phân đoạn peptit, tiến hành chuyển phần dịch lọc vào thiết bị lọc có các hệ thống màng lọc polyethersulfon có kích thước lỗ lần lượt là 100 kDa, 30 kDa, 10 kDa, 5kDa, 3kDa, 1kDa. Tiến hành lọc với áp suất lọc nằm trong khoảng từ 29,6 MPa đến 49,3 MPa (từ 3 đến 5 atm), thu hồi oligopeptit có các phân đoạn tương ứng trên màng lọc.

Trong bước thu sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột, tiến hành thu các phân đoạn oligopeptit theo kích thước màng lọc. Tiến hành sấy khô ở nhiệt độ thấp, tốt nhất là ở nhiệt độ thấp hơn 10°C thu được sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột dạng bột màu vàng sáng. Sản phẩm peptit thủy phân có mùi đặc trưng của cua, thơm nhẹ, có khả năng hòa tan tốt trong nước, trong đó peptit kích thước dưới 5 kDa chiếm >70%; 30% còn lại chứa peptit 10 kDa, 30 kDa

Phần dịch sau khi lọc được loại bỏ nước để thu hồi khoáng vi lượng và sấy khô ở nhiệt độ dưới 10°C để thu thành phần giàu canxi.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột

Cân 20 kg cua đang ở giai đoạn lột, rửa sạch, bỏ yếm và đưa vào thiết bị chiếu vi sóng với tần số 2.450 MHz, cường độ 600W trong thời gian 3 phút. Sau đó nghiền nhỏ nguyên liệu bằng máy nghiền trục vít.

Sản phẩm sau khi nghiền được đưa vào thiết bị lên men chuyên dụng dung tích 80 lít. Bổ sung thêm 20 lít nước, bổ sung 200 gram enzym bromelain (hoạt lực > 2.000 UI/g), nâng nhiệt độ từ từ lên 50°C, khuấy đều (200 vòng/phút). Giữ

ổn định nhiệt độ và khuấy trong 15 giờ. Sau đó, tăng nhiệt độ lên 80°C trong vòng 10 phút nhằm bắt hoạt enzym.

Sau 15 giờ thủy phân, hỗn hợp được lọc bằng máy ly tâm tốc độ 1500 vòng/phút, thu được hỗn hợp dịch thủy phân lọc thô chứa peptit hòa tan.

Dịch lọc thô được đưa dần vào một thùng chứa kín dung tích 20 lít chịu áp suất, sử dụng bơm nén đưa áp suất lên tới 3 atm. Sau khi áp suất đạt đến 3 atm, tiến hành mở van đưa dịch lọc qua hệ thống các màng polyethersulfon được bố trí liên tiếp có các kích thước lỗ lần lượt là 100 kDa, 30 kDa, 10 kDa, 5kDa, 3kDa, 1kDa.

Các oligopeptit hòa tan bị giữ lại trên màng theo kích thước được thu hồi, sấy khô ở nhiệt độ thấp ($< 10^{\circ}\text{C}$), sử dụng làm thực phẩm bổ sung dinh dưỡng có tác dụng tăng cường sinh lực, bồi bổ cơ thể cho người suy nhược.

Sản phẩm bột peptit thủy phân được đóng trong túi kín, bảo quản ở nhiệt độ $< 10^{\circ}\text{C}$.

Sản phẩm bột peptit thủy phân thu được có màu vàng sáng, mùi đặc trưng của đạm thủy phân. Hiệu suất thu hồi đạt $>75\%$. Hàm lượng các chất chính: peptit kích thước $< 5 \text{ kDa}$.

Ví dụ 2. Sản xuất sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột

Cân 50 kg cua lột, rửa sạch, sau đó đưa vào thiết bị chiếu vi sóng (2.450 MHz, 1500W) trong thời gian 3 phút sau đó được nghiền nhỏ bằng máy nghiền trục vít.

Sản phẩm sau khi nghiền được đưa vào thiết bị lên men chuyên dụng dung tích 200 lít. Bổ sung thêm 50 lít nước, bổ sung 500 gram enzym bromelain (hoạt lực $> 2000 \text{ UI/g}$), nâng nhiệt độ từ từ lên 50°C và giữ ổn định nhiệt độ và khuấy đều trong 15 giờ.

Sau khi thủy phân, hỗn hợp được đưa vào máy ly tâm, tốc độ 1500 vòng/phút.

Dịch lọc thô được đưa dần vào một thùng chứa kín dung tích 20 lít chịu áp suất, sử dụng bơm nén đưa áp suất lên tới 3 atm. Sau khi áp suất đạt đến 3 atm, tiến hành mở van đưa dịch lọc qua hệ thống các màng polyethersulfone được bố trí liên tiếp có các kích thước lỗ lần lượt là 100 kDa, 30 kDa, 10 kDa, 5kDa, 3kDa, 1kDa.

Các oligopeptit hòa tan bị giữ lại trên màng theo định kỳ được thu hồi, sấy khô ở nhiệt độ thấp ($< 10^{\circ}\text{C}$), sử dụng làm thực phẩm chức năng.

Sản phẩm bột peptit của lột thủy phân được đóng trong túi kín, bảo quản ở nhiệt độ $< 10^{\circ}\text{C}$.

Sản phẩm bột peptit thủy phân thu được có màu vàng sáng, mùi đặc trưng của đạm thủy phân. Hiệu suất thu hồi đạt $>75\%$.

Hàm lượng các chất chính: peptit kích thước $< 5 \text{ kDa}$.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình sản xuất sản phẩm sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột sử dụng hệ enzym proteaza cho phép thu hồi được lượng lớn oligosacarit có hoạt tính sinh học đối với cơ thể, các oligopeptit này đã được chứng minh có các hoạt tính sinh học đối với cơ thể. Quy trình theo sáng chế cho phép thu hồi và giữ được các oligopeptit đặc trưng vốn có của cua lột thích hợp làm thực phẩm chức năng cho người và động vật.

Quy trình theo sáng chế cho phép cung cấp một lượng lớn sản phẩm chứa hàm lượng cao peptit có hoạt tính sinh học đủ để phục vụ các nghiên cứu sâu về tác dụng sinh học của hợp chất này cũng như làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe bổ sung cho cơ thể.

Quy trình theo sáng chế sử dụng enzym ứng dụng trên đối tượng cua lột để thu nhận peptit có hoạt tính sinh học cao, không sử dụng dung môi và hóa chất độc hại, lượng chất thải ra môi trường rất ít. Vì vậy, đây là một công nghệ xanh, sạch, thân thiện với môi trường và có khả năng áp dụng rộng rãi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý nguyên liệu bằng cách thu gom cua ở giai đoạn lột vỏ, rửa sạch bằng nước và giấm để loại bỏ muối, sau đó đưa lên thiết bị chiếu vi sóng 2.450 MHz, công suất 600W trong 3 phút để bất hoạt enzym nội sinh thu được nguyên liệu cua lột;

b) thủy phân protein của lột bằng cách nghiền nhỏ nguyên liệu cua lột, bổ sung hệ enzym proteaza có hoạt lực khoảng 2.000UI/g theo tỷ lệ 1/1000 (theo trọng lượng), nhiệt độ thủy phân 50°C, tốc độ khuấy 200 vòng/phút trong 15 giờ, tiếp đó tăng nhiệt độ lên 80°C và khuấy trong 10 phút nhằm bất hoạt enzym thu được nguyên liệu cua lột được thủy phân;

c) lọc bỏ bã cua bằng cách đưa phần dịch thủy phân vào máy ly tâm, tiến hành ly tâm dịch thủy phân ở tốc độ 1500 vòng/phút thu phần dịch lọc;

d) thu các phân đoạn peptit bằng cách chuyển phần dịch lọc vào thiết bị lọc có các hệ thống màng lọc polyethersulfon có kích thước lỗ lần lượt là 100 kDa, 30 kDa, 10 kDa, 5kDa, 3kDa, 1kDa, tiến hành lọc với áp suất lọc nằm trong khoảng từ 29,6 MPa đến 49,3 MPa (từ 3 đến 5 atm), thu hồi oligopeptit có các phân đoạn tương ứng trên màng lọc; và

e) thu sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột bằng cách thu các phân đoạn oligopeptit và sấy khô ở nhiệt độ thấp hơn 10⁰C thu được sản phẩm peptit thủy phân từ cua lột dạng bột màu vàng sáng.

HÌNH 1