



(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)



1-0032734

(51)⁸ C12C 11/00

(13) B

(21) 1-2017-01314

(22) 16/09/2015

(86) PCT/US2015/050509 16/09/2015

(87) WO2016/044473 24/03/2016

(30) 62/071,179 16/09/2014 US; 62/231,592 10/07/2015 US

(45) 25/07/2022 412

(43) 25/09/2017 354A

(73) ROAR HOLDING LLC (US)

Audubon Biomedical Center, 3960 Broadway, New York, New York 10032, United States of America

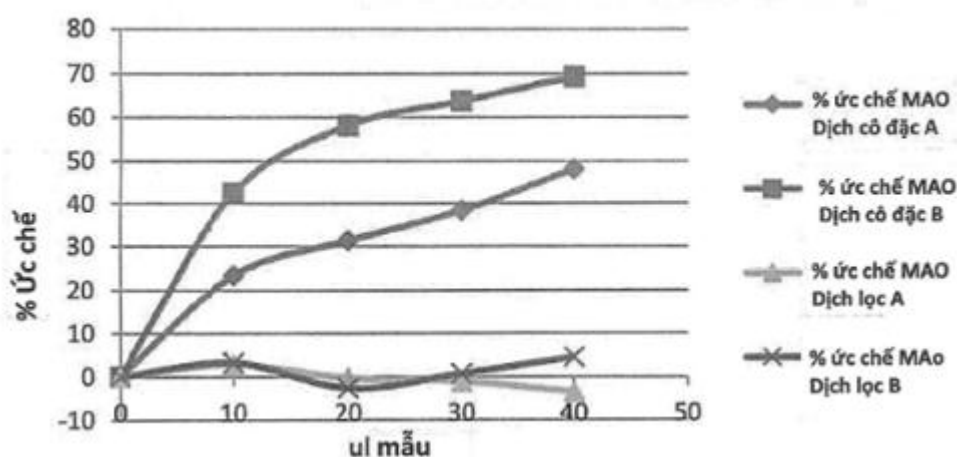
(72) BROCIA, Robert (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA CÁC HỢP CHẤT ỨC CHẾ MONOAMIN OXIDAZA, THỰC PHẨM HOẶC ĐỒ UỐNG CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các chế phẩm chứa các chất ức chế monoamin oxidaza được điều chế bằng cách loại bỏ rượu ra khỏi các đồ uống thu được từ cây thù.

Hoạt tính ức chế MAO từ RO



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dạng không còn của rượu từ cây thù, cụ thể là các loại rượu tequila khác nhau, các dạng này là hữu dụng trong việc điều trị nhiều tình trạng bệnh lý nhờ chất ức chế monoamin oxidaza (MAO) có trong các đồ uống này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Có rất nhiều tài liệu liên quan đến việc sản xuất rượu chung cất từ cây thù - agave. Ví dụ, mô tả chi tiết việc sản xuất tequila từ cây thù - agave cactus được cung cấp trong ấn phẩm *Tequila Processing and Flavor*, của Pedro A. Vazquez-Landaverde và Miriam G. Rodriguez-Olvera, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional Unidad Querretaro, Cerro Blanco 141 Colinas del Cimatarío, Querretaro, Qro., Mexico 76090; 2012 American Chemical Society; trên website //pubs.acs.org, ngày công bố (Web): 16/7/2012 | doi: 10.1021/bk-2012-1104.ch015 In *Flavor Chemistry of Wine and Other Alcoholic Beverages*; Qian, M., *et al.*; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2012, phần bộc lộ của tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn đến phần mô tả của nó về việc xử lý các nguyên liệu ban đầu từ cây thù, lên men, chung cất và tàng trữ. Ngắn gọn là, thân cây thù - agave cactus được gia nhiệt để thủy phân các đường phức và được cắt nhỏ và ép để chiết ra sirô. Sau đó sirô này được pha loãng với nước để tạo ra dịch pha loãng thích hợp để cấy giống nấm men. Sau khi lên men, môi trường lên men được cất để thu được sản phẩm chung cất. Sản phẩm chung cất này được bán dưới dạng các nhãn hiệu rượu tequila khác nhau. Tuy nhiên, sản phẩm chung cất này có thể được tàng trữ trước khi đóng chai và bán.

Phần mô tả cụ thể được nêu trong nguồn viện dẫn trên đây là như sau:

Cây thù trưởng thành được lột bỏ hết lá (được gọi là “pifia”) được cắt thành hai phần, bốn phần, hoặc nhiều hơn để dễ dàng nướng nó trong lò (48 giờ) hoặc nồi hấp (12 giờ) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 106°C đến 116°C. Việc xử lý nhiệt này

là nhằm thủy phân các đường phức như inulin và tinh bột, để thu được glucoza và fructoza để lên men dễ hơn. Các đường này chủ yếu dẫn đến sự tạo thành etanol, nhưng cũng có nhiều hợp chất khác được tạo ra từ quá trình lên men cơ chất này. Các hợp chất được tạo ra từ quá trình xử lý nhiệt pifias, chủ yếu liên quan đến phản ứng Maillard như các hợp chất furan, pyran, aldehyt, các hợp chất nitơ và lưu huỳnh. Các hợp chất Maillard chiếm lượng nhiều nhất là metyl-2-furoat, 2,3-dihydroxy-3,5-dihydro-6-metyl-4(H)-pyran-4-on và 5-hydroxymetylfurfural. Các pyrazin cũng là nhóm các hợp chất hóa học quan trọng thu được từ các phản ứng Maillard. Các pyrazin chiếm lượng nhiều nhất được phát hiện là 2,5-dimetylpyrazin và trimetylpyrazin.

Các sản phẩm phân hủy do nhiệt khác cũng được tạo ra trong bước nướng này. Các axit béo tự do có mạch cacbon ngắn và dài được phát hiện trong pifias nướng chắc là do sự thủy phân các axylglyxerol, β -xyclocitral và β -damascenon có thể là các sản phẩm phân hủy của các carotenoid, trong khi 4-metyl-5-(2-hydroxyetyl)-thiazol là sản phẩm phân hủy của axit amin thiamin. Các phenol như p-cresol và 4-etyl phenol là sản phẩm phân hủy của các axit phenolic.

Sau khi các pifia được nướng, chúng được đưa vào máy xay cắt và máy ép để chiết ra sirô chứa nồng độ đường cao và phần lớn các hợp chất khác. Dịch chiết cây thùa thu được thường được làm sạch để cải thiện dịch chiết đường.

Quá trình lên men rõ ràng là giai đoạn quan trọng và phức tạp nhất của quy trình xử lý cây thùa. Sirô 100% từ cây thùa hoặc sirô hỗn hợp được pha loãng bằng nước để đạt được nồng độ chất khô là từ 12 đến 14°BRIX (nồng độ đường là 80 đến 100 g/L). Quy trình lên men diễn ra trong các thùng ổn nhiệt ở 30°C, mặc dù một số quy trình có thể được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng, quy trình này có thể thay đổi tùy thuộc vào mùa trong năm. Quy trình lên men phụ thuộc hoàn toàn vào sự chuyển hóa của nấm men và phụ thuộc với mức độ ít hơn vào các vi khuẩn axit lactic và axit axetic. Nhiều chủng nấm men đã được phát hiện trong dịch hèm cây thùa, trong đó các chủng quan trọng nhất là *Saccharomyces cerevisiae* và *Kloeckera africana*. Nấm men chuyển hóa các hydrat cacbon, các axit amin, các axit béo và các hợp chất hữu cơ khác, biến chúng thành etanol, glyxerol, cacbon dioxit, và, với lượng ít hơn, thành

các aldehyt, keton, các rượu cao hơn, các axit hữu cơ và các este, các hợp chất này được gọi là “các sản phẩm phụ của quy trình lên men” hoặc “các sản phẩm liên quan”. Các rượu cao hơn, còn gọi là “các rượu tạp” do mùi mạch nha và mùi khê của chúng, được tạo ra bằng sự phân hủy các axit amin thông qua các keto axit (các 2-oxo axit). Các hợp chất quan trọng nhất là 1-propanol, 2-metyl-1-propanol, 2-metyl-butanol, 3-metyl-butanol, và 2-phenyletanol, hợp chất cuối cùng này có mùi như hương hoa hồng. Việc tổng hợp các axit béo trong tế bào nấm men chủ yếu tạo ra các axit béo bão hòa, mạch thẳng với số chẵn từ 4 đến 18 nguyên tử cacbon, và sự có mặt của lượng nhỏ các axit béo có số nguyên tử cacbon lẻ và các hợp chất không bão hòa tùy thuộc vào điều kiện lên men. Các axit béo có thể kết hợp với các rượu để tạo ra các este.

Quy trình lên men tiến hành trong 18 đến 24 giờ ở nhiệt độ từ 30°C đến 35°C. Nhiệt độ quy trình là 35°C tạo ra nhiều hợp chất dễ bay hơi hơn nhiệt độ 30°C. Ngoài ra, đã thấy rằng việc bổ sung nguồn nitơ làm thay đổi sự tạo thành hợp chất bởi nấm men trong quy trình lên men, mặc dù tác dụng này là khác nhau tùy thuộc vào nguồn nitơ được sử dụng. Bằng cách bổ sung hỗn hợp 20 axit amin, chủng *Kloeckera africana* K1 có thể sản sinh và chịu được nồng độ etanol cao hơn, trong khi đó sự sản sinh một số este, rượu, axetaldehyt và α -terpineol được gia tăng. Khi sử dụng *Saccharomyces cerevisiae* trong dịch hèm được bổ sung natri sulfat và các axit amin, nồng độ của các rượu amyl và isobutanol giảm, trong khi nồng độ của propanol và axetaldehyt tăng lên.

Khi quy trình lên men kết thúc, hàm lượng rượu đạt đến khoảng 15% thể tích/thể tích, đây là thời điểm để chưng cất. Dịch lên men được gia nhiệt trong nồi đồng hoặc nồi thép không gỉ ở nhiệt độ từ 78°C đến 80°C để sự bay hơi rượu diễn ra. Hơi bay lên được ngưng tụ trong các ống xoắn ruột gà được làm lạnh và thu gom nước cất. Nước cất đầu đạt đến nồng độ rượu ~25% thể tích/thể tích, và cần bước chưng cất lần thứ hai, còn được gọi là tinh cất, để đạt được nồng độ etanol ~55% thể tích/thể tích. Sau đó chất lỏng được điều chỉnh bằng nước đến nồng độ rượu là 38 đến 40% thể tích/thể tích. Vì phần lớn các hợp chất là dễ bay hơi nên chúng cũng bay hơi cùng với etanol trong quá trình chưng cất. Có thể phân tách các phân đoạn các

chất dễ bay hơi khác nhau hoặc các “đoạn” trong quá trình chưng cất. Đoạn đầu chứa các hợp chất rất dễ bay hơi như axetaldehyt và etyl axetat, trong khi đó đoạn cuối chứa các hợp chất có điểm sôi cao hơn như các etyl este của các axit béo chuỗi mạch dài. Vì cả hai phân đoạn này đều là không mong muốn nên chúng có thể được phân ly ra khỏi đoạn cất giữa. Metanol thu được trong đoạn cuối mặc dù điểm sôi của nó thấp. Etyl lactat, axit axetic và furfural cũng được cất ở phân đoạn cuối. Các rượu isobutyl và isoamyl thể hiện như là các sản phẩm đầu, rượu n-propyl được phát hiện ở phần cất giữa, và rượu phenetyl thể hiện là sản phẩm cuối.

Nhiệt đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra hợp chất trong quá trình chưng cất. Vì có thể có một số phản ứng phân hủy diễn ra, và sự tạo thành các aldehyt, các keton, các furan, các hợp chất lưu huỳnh, các pyrazin, và các phenol xảy ra.

Nước cất đã được tinh cất được điều chỉnh bằng nước đến hàm lượng etanol là 40% có thể được tàng trữ trong hai tháng đến ba năm trong các thùng gỗ sồi. Các aldehyt bay hơi và/hoặc tạo thành các axetal. Bằng cách tàng trữ trong các thùng gỗ, các hợp chất dễ bay hơi như vanilin, guaiacol, eugenol, cresol và các phenolic khác di chuyển từ gỗ vào nước cất, làm tròn hương vị. Các etyl este không chỉ được tạo ra trong quá trình lên men và còn được tạo ra cả trong quá trình tàng trữ. Đã có báo cáo rằng các este có thể được tạo ra sau đó trong quá trình tàng trữ bằng phản ứng este hóa các axit béo với etanol ở nồng độ cao.

Phần mô tả trên đây là như được thấy trong tài liệu viện dẫn nêu trên. Rất nhiều hợp chất là thành phần của sản phẩm chiết xuất từ cây thù và/hoặc rượu được sản xuất từ cây thù đã được nhận diện; tuy nhiên, với kiến thức của người nộp đơn, việc đồ uống thường được bán trên thị trường là tequila hoặc các loại khác thu được từ cây thù có hoạt tính ức chế MAO là chưa được biết đến. Vì đã biết rằng các chất ức chế MAO có thể được sử dụng làm các chất tăng khí sắc, các chất chống trầm cảm và để điều trị nhiều bệnh khác, gồm cả bệnh Parkinson, nên "nước tăng lực" không còn mà chứa các thành phần không còn của các đồ uống này là hữu dụng trong các trường hợp này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Như nêu trên, sáng chế tận dụng sự có mặt của các chất ức chế MAO trong rượu được sản xuất từ các sản phẩm chiết xuất từ cây thù. Các chất ức chế MAO có thể có mặt trong phần chiết từ ban đầu hoặc được tạo ra trong quá trình lên men hoặc được tạo ra trong quá trình chưng cất hoặc tàng trữ hoặc được tạo ra do kết hợp của các quá trình này. Cụ thể là, người nộp đơn đã chỉ ra rằng việc loại bỏ cồn ra khỏi các loại rượu có bán trên thị trường này bằng cách sử dụng chân không làm phá hủy ít nhất một mức hoạt tính ức chế MAO nhất định. Do đó, các chế phẩm theo sáng chế phải được điều chế từ các rượu này bằng các quy trình mà bảo tồn được các thành phần dễ bay hơi này. Các quy trình này bao gồm phương pháp thẩm thấu ngược, cột quay và các phương pháp khác mà không dẫn đến sự mất mát các hợp chất dễ bay hơi.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm được điều chế bằng cách xử lý đồ uống có cồn thu được từ cây thù bằng quy trình thẩm thấu ngược hoặc quy trình bảo tồn thành phần dễ bay hơi khác. Theo một phương án, đồ uống có cồn thu được từ cây thù đã được sản xuất bằng cách gia nhiệt thân cây thù - agave cactus để thủy phân các đường phức; và cắt nhỏ và ép thân cây đã được gia nhiệt này để chiết ra sirô; pha loãng sirô này bằng nước đến 12 đến 14°BRIX và cấy giống nấm men vào môi trường pha loãng này; lên men sirô đã pha loãng được cấy giống nấm men này để thu được sản phẩm lên men; và chưng cất sản phẩm lên men này để thu được sản phẩm chưng cất.

Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp để điều trị các tình trạng bệnh lý được đặc trưng bằng sự hoạt động quá mức của MAO bằng cách cho đối tượng cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm theo sáng chế. Phương pháp này đặc biệt liên quan trong trường hợp bệnh trầm cảm hoặc bệnh Parkinson.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp thử nghiệm hoạt tính ức chế MAO với sự có mặt của etanol. Etanol với lượng đáng kể sẽ gây nhiễu thử nghiệm này. Do đó, các thử nghiệm chuẩn mà không tính đến sự có mặt của cồn sẽ cho kết quả nhầm lẫn.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp thử nghiệm đối với các chất ức chế MAO với sự có mặt của etanol, phương pháp này gồm việc bổ sung nicotinamid adenin dinucleotit và alcohol-dehydrogenaza vào thử nghiệm. Chi tiết hơn, thử nghiệm này gồm việc bổ sung vào mẫu cần phân tích kynuramin dihydrobromua, cùng với nicotinamid adenin dinucleotit và alcohol-dehydrogenaza với lượng hữu hiệu với cơ chất; bổ sung MAO A hoặc MAO B; ủ ở 37°C; dùng phản ứng bằng kiểm mạnh và đánh giá kết quả bằng bước sóng kích thích là 310nm và bước sóng phát xạ là 405nm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả của việc đánh giá hoạt tính ức chế MAO trong tequila có các thời gian tàng trữ khác nhau như được đánh giá bằng kit thử nghiệm thương phẩm chuẩn.

Fig.2 thể hiện kết quả của việc đánh giá hoạt tính ức chế MAO của tequila với các nhãn hàng khác nhau và có thời gian tàng trữ khác nhau sử dụng kynuramin làm cơ chất.

Fig.3 thể hiện kết quả của thử nghiệm ức chế MAO với kynuramin làm cơ chất sau khi tách các tequila thành các phân đoạn khác nhau.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện hoạt tính ức chế MAO của các phân đoạn khác nhau trên cột dựa trên thử nghiệm kynuramin.

Fig.5 thể hiện kết quả của các thử nghiệm ức chế MAO trên mẫu tequila mà đã được đem thẩm thấu ngược và so sánh hoạt tính trong phần cô với hoạt tính trong phần dịch lọc.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các dạng không cồn của đồ uống có cồn được làm từ các sản phẩm chiết xuất từ cây thù là đối tượng của sáng chế. Các đồ uống có cồn này gồm rượu pulque, tequila, rượu mezcal, rượu sotol, rượu Bacanora hoặc các sản phẩm lên men khác được làm từ đường thu được từ cây thù. Theo sáng chế, cồn đã được loại bỏ trong các điều kiện mà các hợp chất dễ bay hơi khác vẫn được giữ lại.

Các chế phẩm này có tính chất ức chế monoamin oxidaza (MAO) và do đó là hữu dụng để sử dụng làm các chất tăng khí sắc, các chất chống trầm cảm hoặc để điều trị các bệnh nhất định như bệnh Parkinson. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp phân loại và điều chế hoặc pha trộn các chiết phẩm khác nhau để chọn lọc tác dụng kích thích sinh lý hoặc chống trầm cảm mong muốn để sử dụng làm nước tăng lực và/hoặc chất tăng khí sắc bằng cách đánh giá hoạt tính MAO với sự có mặt của cồn. Theo khía cạnh về phương thức phân loại/đánh giá của sáng chế, các đồ uống từ cây thùa có điểm số ức chế monoamin oxidaza (MAO) đối với mỗi dạng MAO, A+B, được biểu thị dưới dạng phần trăm ức chế so với đối chứng không có mặt chất ức chế. Ví dụ về điểm số đối với rượu mescal, tequila, Bacanora, sotol và pulque được thể hiện trên ví dụ 6. Ví dụ 7 thể hiện kết quả tương tự khi các phân đoạn thu được bằng quy trình thẩm thấu ngược được phân tích.

Như được thể hiện ở đây, các đồ uống khác nhau thu được từ cây thùa có thể được phân tích trực tiếp về hàm lượng các chất ức chế MAO A và MAO B của chúng. Điều này có thể tạo ra hệ thống điểm số trong đó kết quả đối với đồ uống cụ thể có thể được đưa lên nhãn. Các đồ uống khác nhau có thể được xếp loại với thang đo dựa trên hàm lượng của chúng so với, ví dụ, các đồ uống tương tự với nhãn hàng khác. Điểm số có thể là đối với các tổ hợp các chất ức chế cả MAO A và MAO B hoặc đối với mỗi chất ức chế riêng rẽ. Do đó, đối với thang đo 1 đến 10, với 10 là điểm số tốt nhất và 1 là điểm số kém nhất, đồ uống mà thể hiện mức ức chế 80% đối với MAO A so với mức ức chế 40% của nhãn hàng cạnh tranh trong các thử nghiệm giống nhau, có thể cho điểm 9 so với điểm 5 của đồ uống có hoạt tính thấp hơn. Tương quan giữa mức ức chế với thang điểm nhất định có thể được thiết kế để cung cấp thông tin hữu ích cho người tiêu dùng. Tất nhiên là thang điểm được sử dụng hoặc điểm số được chọn không cần là từ 1 đến 10, mà thang điểm bất kỳ khác có thể được chọn một cách tùy ý, chẳng hạn như thang điểm A đến F.

Các thử nghiệm MAO được sử dụng để đo phần trăm ức chế chấp nhận các mẫu với nồng độ etanol cao. Phương pháp thử nghiệm theo sáng chế là cần thiết để đo chính xác mức độ ức chế hoạt tính MAO và phải chịu được các mẫu có nồng độ etanol lớn hơn 40%, etanol là thành phần chính của các mẫu cần được phân loại.

Nồng độ cồn thường gặp phải với các rượu thừa được chưng cất là 6% đối với pulque đến khoảng 60% đối với một số loại tequila và mescal, nhưng các mẫu thường gặp phải hơn sẽ có nồng độ cồn là 40% (80 proof (nồng độ rượu cất)). Do tính dễ bay hơi của một số (nhưng không phải tất cả) chất ức chế MAO thu được từ các đồ uống từ cây thừa nên đặc biệt quan trọng là không bay hơi etanol ra khỏi mẫu trong điều kiện áp suất giảm hoặc bằng cách chưng cất ở áp suất khí quyển.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng làm sản phẩm bổ sung cho thực phẩm và/hoặc được đưa vào trong thực phẩm hoặc thuốc, hoặc được sử dụng để điều trị bệnh trầm cảm, bệnh Parkinson hoặc tình trạng khó ở nói chung. Chế phẩm này có thể còn được sử dụng làm chất phụ gia hoặc chất thay thế cho cà phê hoặc sử dụng trong các sản phẩm đã tách cafein. Các chế phẩm này có thể được trộn với hai hoặc nhiều chất mang, tá dược và/hoặc chất pha loãng mà chấp nhận được về mặt dược lý hoặc về mặt dinh dưỡng. Do đó, nói chung, các chế phẩm theo sáng chế có thể được đưa vào trong nước ép hoặc các đồ uống không cồn khác như nước cola hoặc nước xô-đa hương hoa quả, hoặc có thể được tiêu dùng trực tiếp. Các chế phẩm này cũng có thể được đưa vào trong thực phẩm như các chất lỏng không nấu, ví dụ dầu giấm, và được tiêu dùng cùng với các thành phần rắn của món xalát. Lượng chế phẩm được tiêu dùng hoặc được dùng cho đối tượng phụ thuộc nhiều vào bản chất tình trạng bệnh lý cần được điều trị cũng như nồng độ của các chất ức chế MAO xác định được có trong chính chế phẩm đó. Mức chất ức chế MAO hữu dụng đối với các tình trạng bệnh lý khác nhau là đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể tuân theo các hướng dẫn này. Việc sử dụng làm sản phẩm bổ sung cho thực phẩm là đối tượng thuộc phán quyết của các nhà dinh dưỡng hoặc người hành nghề khác.

Do đó, sáng chế gồm các loại thực phẩm và các loại đồ uống mà chứa chế phẩm theo sáng chế với lượng hữu hiệu để có tác dụng sinh lý mong muốn.

Một phương pháp loại bỏ thành công etanol ra khỏi nguyên liệu đồ uống ban đầu là phương pháp thẩm thấu ngược (reverse osmosis: RO). Màng RO với giới hạn trọng lượng phân tử là 100 Dalton tách etanol ra khỏi các chất ức chế MAO được tạo thành nhờ các vi sinh vật hoặc được tạo thành trong quá trình chưng cất hoặc các chất ức chế mà có thể vốn có trong nguyên liệu ban đầu. Việc tách các chất ức chế

MAO được thực hiện mà không sử dụng phương pháp chân không hoặc chưng cất. Do đó, các chế phẩm theo sáng chế có thể được điều chế ví dụ, bằng cách pha loãng với nước cất 0,75 lít tequila (hoặc đồ uống chưng cất từ cây thùa khác) đến thể tích 7,5 đến 75 lít, tùy theo nồng độ etanol cuối cùng mong muốn. Ví dụ, 0,75 lít tequila ở nồng độ rượu 80 proof (nồng độ cồn là 40% theo thể tích) được pha loãng đến 7,5 lít, tại điểm này nguyên liệu đã pha loãng có nồng độ cồn là 4% theo thể tích. Tequila đã pha loãng được tuần hoàn trong hệ thống thẩm thấu ngược được lắp màng có giới hạn trọng lượng phân tử ~100 Dalton (Tangent Membranes, Inc., RO MINI) trong đó nguyên liệu pha loãng này được cô trở lại đến thể tích 0,75 lít. Việc giảm tiếp etanol đạt được bằng cách pha loãng nguyên liệu lại lần nữa đến 7,5 lít hoặc nhiều hơn và tiếp tục tuần hoàn qua hệ thống RO. Để tạo ra chế phẩm như nước tăng lực theo sáng chế, việc pha loãng và tuần hoàn tiếp có thể được tiếp tục cho đến khi sản phẩm được xem như là không cồn. Sau đó, các chất ức chế MAO hoạt tính được chứa trong phần không cồn, đặc và sau đó có thể được bổ sung các vitamin, các chất khoáng, các axit amin, protein hoặc cafein, nếu muốn, và có thể được đưa vào chế phẩm thực phẩm hoặc chế phẩm đồ uống khác như nêu trên.

Khía cạnh quan trọng trong việc tạo ra các chế phẩm theo sáng chế là ở chỗ một số trong số các chất ức chế MAO là các hợp chất dễ bay hơi và nếu chế phẩm này được tạo ra bằng cách bay hơi etanol thông qua, ví dụ, việc chưng cất bằng nhiệt hoặc trong điều kiện áp suất giảm, thì sự tổn thất các chất ức chế MAO cần thiết sẽ xảy ra.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được đưa ra để minh họa, nhưng không nhằm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1

Thử nghiệm đối với các loại tequila khác nhau sử dụng các hệ thử nghiệm có bán trên thị trường

Kit hoạt tính MAO có bán trên thị trường được sử dụng để kiểm tra các mẫu tequila khác nhau có bán trên thị trường hoặc mezcal, S1, S1 DW, S2 và S3. Kit này

được mua từ Sigma-Aldrich (kit hoạt tính monoamine oxidaza Cat. No. MAK136), chứa các hợp chất ức chế MAO đã biết, clorgylin và pargylin, làm đối chứng và tyramin làm cơ chất enzym. Peroxidaza từ cây cải ngựa cũng được đưa vào kit này để tương tác với hydro peroxit được tạo ra từ việc oxy hóa tyramin để phản ứng với chất đánh dấu được chứa trong đó, đồ Amplex®. Tác dụng của MAO A và/hoặc B tạo ra chuỗi các sự kiện dẫn đến sự phát xạ huỳnh quang. S1 và S3 là các loại tequila, trong đó S1 là dạng tàng trữ lâu năm của S3 và S1 DW là mẫu được hoàn nguyên với nước cất của S1 sau khi làm khô trong dòng khí argon. S2 là mẫu mezcal, được làm từ các loại cây thù không phải cây thù xanh. DW là nước cất (distilled water). Dữ liệu huỳnh quang được tính đối với phần trăm ức chế so với đối chứng dung dịch đệm (không có chất ức chế). Chất ức chế đã biết đối với MAO A, clorgylin, và chất ức chế đã biết đối với MAO B, pargylin, được đưa vào làm đối chứng. Như được thể hiện trên Fig.1, tùy thuộc vào mẫu, sự ức chế chọn lọc đối với MAO A hoặc B có thể đạt được.

Ví dụ 2

Kiểm tra các loại tequila khác nhau sử dụng thử nghiệm chỉ với kynuramin

Thử nghiệm khác trong đó chỉ có kynuramin là cơ chất và chất đánh dấu thử nghiệm được sử dụng trong ví dụ này. Thử nghiệm này sử dụng kynuramin làm cơ chất MAO và nó là cơ chất cho cả MAO A và B. Đây là phương pháp mong muốn hơn vì tác dụng đối với peroxidaza hoặc sự nhiễu phổ được loại trừ. Sự oxy hóa kynuramin dẫn đến sự thay đổi OD ở bước sóng 360nm và 320nm. Sản phẩm cũng phát huỳnh quang và có thể được phát hiện bằng mức gia tăng cường độ phát xạ ở chế độ chạy 400 với bước sóng kích thích ở 320nm.

Thử nghiệm này được thực hiện trong các đĩa 96 lỗ làm bằng polystyren trong theo phương thức sau: Bỏ sung dung dịch đệm phosphat (205µl / 100mM / độ pH bằng 7,2) vào các lỗ sau đó là 20µl mỗi mẫu chiết và chất ức chế đối chứng clorgylin (đối với MAO A) và pargylin (đối với MAO B) ở nồng độ 10µM. MAO A và MAO B tái tổ hợp của người (nồng độ 0,5mg/ml protein) được mua từ Corning® và mỗi thử nghiệm được cung cấp 3µg protein này. Một số thử nghiệm được chạy với protein vô hiệu làm đối chứng cũng được cung cấp bởi Corning®. (Các) chất ức

chế, dung dịch đệm và protein được để ủ sơ bộ trong máy đọc đĩa đọc mật độ quang PowerWave™ được đặt ở 37°C trong 10 phút. Sau đó cơ chất kynuramin được bổ sung vào mỗi lỗ và đĩa này được ủ tiếp ở 37°C trong 30 phút. Đĩa này được đọc ở OD 360nm và mức thay đổi độ hấp thụ từ thời điểm không đến 30 phút được tính và chuyển thành % ức chế. Các mẫu S40, S41, S42 lần lượt là blanco, reposado và añejo, và là các loại tequila từ cùng một nhà sản xuất ở các giai đoạn tàng trữ 0, 1 và 2. S1, S3 là các tequila như trong ví dụ 1 và S2 là mezcal. Phần trăm ức chế được tính từ mức thay đổi mật độ quang ở 360nm từ thời điểm 0 đến 30 phút.

Kết quả được thể hiện trên Fig.2.

(Một loại tequila được sử dụng làm mẫu (DJ1942) chứa 40% etanol được kiểm tra về tác động gây nhiễu đối với thử nghiệm không có alcohol-dehydrogenaza và NAD và mức gây nhiễu được thể hiện).

Ví dụ 3

Tác dụng của việc tàng trữ

Thử nghiệm kynuramin được sử dụng để kiểm tra ba mức độ tàng trữ khác nhau của tequila, S40, S41, S42 và so sánh các phần chiết bằng nước và metylen clorua của các mẫu này. Các tequila có thời gian tàng trữ lâu hơn thể hiện hoạt tính ức chế MAO gia tăng so với các phần cất có thời gian tàng trữ ngắn hơn, như được thể hiện trên Fig.3.

Ví dụ 4

Phân đoạn hoạt tính ức chế MAO

Tequila (1750ml) được pha loãng đến 5000ml bằng nước khử ion và được chia thành ba phần, và mỗi phần được chiết bằng diclometan (4 x 100ml). Các phần chiết được gom lại, rửa bằng nước khử ion (2 x 100ml) và làm khô bằng natri sulfat khan. Giảm thể tích mẫu xuống 10ml bằng cách bay hơi dung môi sử dụng thiết bị bay hơi kiểu quay sau đó bổ sung silic oxit khô vào và loại bỏ dung môi ở nhiệt độ trong phòng. Silic oxit đã hấp thụ mẫu được nạp khô lên cột silic oxit với thể tích giá thể 50ml và cột này được chạy với gradien từng bước sử dụng hexan:etyl axetat (100% hexan, 90: 10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 100%

ethyl axetat). Trong quá trình chạy cột, các phân đoạn 7ml được thu gom. Các mẫu được thử nghiệm như sau:

Các thử nghiệm MAO đối với A và B được thực hiện trên các đĩa 96 lỗ màu đen Thermo Scientific™ (#7205), mỗi thử nghiệm chứa 1µl mẫu được hòa tan trong DMSO, 87µl dung dịch đệm kali phosphat 100mM, độ pH bằng 7,4, 3µl dung dịch gốc kynuramin 0,75mM. Tập hợp các dung dịch đối chứng với một mình DMSO (0 chất ức chế), 1µl clorgylin 50µM trong DMSO làm đối chứng ức chế MAO A và 1µl pargylin 50µM trong DMSO làm đối chứng ức chế MAO B được bổ sung mỗi đĩa. Khi tối ưu hóa thử nghiệm, tập hợp không protein đôi khi được đưa vào các đĩa này.

MAO A và MAO B tái tổ hợp của người (Corning®, SUPERSOMES™) được bổ sung vào các lỗ đối với mỗi thử nghiệm tương ứng ở nồng độ 750ng protein trong 9µl dung dịch đệm.

Đĩa được ủ ở 37°C trong 30 phút và sau đó bổ sung 100µl dung dịch NaOH 2N vào mỗi lỗ. Đĩa được đọc trong quang phổ kế huỳnh quang ở bước sóng kích thích 310 và bước sóng phát xạ 405.

Để nhận diện hoạt tính ức chế trong các phân đoạn cột, 25µl của mỗi phân đoạn được cho vào các ống siêu ly tâm dung tích 1,5ml và bay hơi đến khô trong thiết bị Savant™ SpeedVac™. DMSO (5µl) được bổ sung vào mỗi ống và 1µl được thử nghiệm hoạt tính ức chế đối với MAO A và B theo phương pháp nêu trên. Fig.4 thể hiện hoạt tính ức chế MAO A và B trên các phân đoạn được thu gom.

Sự ức chế MAO đáng kể được thấy trên các phân đoạn 6 đến 13.

Ví dụ 5

Điều chế các dầu chứa chất ức chế MAO

Pha loãng tequila (100ml) đến 200ml bằng nước khử ion và chiết bằng diclometan (3 x 50 ml). Các phần chiết được gom lại và cho qua cột natri sulfat khan. Dung môi được bay hơi bằng cách sử dụng thiết bị bay hơi kiểu quay và thu được 30mg dầu. Các mẫu dầu này ức chế MAO A khoảng 75% và MAO B khoảng 87%.

Pha loãng tequila (100ml) đến 200ml bằng nước khử ion và chiết bằng diclometan (3 x 50 ml). Các phần chiết được gom lại và cho qua cột natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách bay hơi trong thiết bị Kuderna Danish được làm ấm bằng bồn nước nóng ở 70°C, thu được 17mg dầu. Các mẫu dầu này thể hiện mức ức chế MAO A 55% và mức ức chế MAO B 88%.

Ví dụ 6

Thử nghiệm đối với các mẫu tequila thực chất khác nhau

Như được bàn luận trên đây, các mẫu có hoạt tính ức chế MAO phải không được bay hơi trong điều kiện áp suất giảm nếu không các hợp chất sẽ bay hơi đồng thời với etanol. Do đó, các mẫu nên được thử nghiệm mà không bay hơi etanol để loại bỏ sự mất mát các hợp chất ức chế MAO và để phân loại chính xác hoạt tính ức chế MAO của sản phẩm được phân tích. Các thử nghiệm được thực hiện trong các đĩa 96 lỗ màu đen Thermo Scientific™ (#7205) như sau:

Mỗi thử nghiệm gồm 5µl mẫu, 0,975µg kynuramin dihydrobromua, 0,75 µmol nicotinamid adenin dinucleotit (NAD) trong tổng thể tích 93µl với nước muối đệm phosphat 100mM, độ pH bằng 7,4.

Alcohol-dehydrogenaza được pha loãng đến 0,25 đơn vị/ml và bổ sung 3µl vào các lỗ. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 25°C đến 37°C trong 15 phút.

MAO A và B tái tổ hợp của người (Corning) được cung cấp ở nồng độ 5mg/ml được chia vào trong các lọ với lượng 20µl mỗi lọ và được pha loãng cho thử nghiệm bằng 246µl dung dịch đệm, sau đó 4µl của mỗi MAO được bổ sung vào các lỗ tương ứng của nó.

Các đĩa được ủ ở 37°C trong 30 phút và bổ sung dung dịch NaOH 2N (100µl) vào và các đĩa được đọc ở bước sóng kích thích 310 và bước sóng phát xạ 405.

Sử dụng thử nghiệm này, các mẫu tequila khác nhau được kiểm tra với kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1

Điểm số của các đồ uống khác nhau thu được từ cây thù

Nhãn hàng	% Ức chế MAO A	% Ức chế MAO B
Suerte Blanco	5	6
Suerte Reposado	7	12
Suerte Anejo	14	19
Qui blanco	33	7
Don Julio 70 th Anniversary	12	6
Grand Patron Piedra	32	49
Don Julio Blanco	9	8
Don Julio Repesado	18	22
Don Julio Anejo	10	26
Don Julio 1942	18	35
Patron Silver Roca	39	11
Patron Roca Anejo	21	40
Patron Grand Platinum	38	9
Esperanto	36	4
Avion Silver	31	7
1800 silver	11	11
Cuervo Silver	-1	4
Cuervo Gold	4	40
“Cheap” Mezcal	43	2
“Expensive” Mezcal	40	8
Ketel One Vodka	-2	-2
Jaegermeister	49	55
Tres Generacion	15	41
Clorgylin/Parglyin (đối chứng dương)	97	82
DMSO (đối chứng âm)	2	1
DMSO (đối chứng âm)	-2	-1
Inhib (đối chứng dương)	98	96
Inhib (đối chứng dương)	98	95

Ví dụ 7

Ảnh hưởng của thẩm thấu ngược (RO)

Thiết bị RO Mini từ Tangent Membranes, Inc. được lắp màng lọc giới hạn trọng lượng phân tử ~100 được sử dụng để tách etanol ra khỏi tequila trong khi vẫn giữ lại các hợp chất ức chế MAO. Ở đây, 1,5 lít tequila añejo (DJA) được pha loãng đến 15 lít bằng nước cất và được tuần hoàn trong thiết bị RO Mini cho đến khi thể tích được giảm trở lại còn 1,5 lít. Hoạt tính ức chế MAO của 10, 20, 30 và 40µl mẫu đặc và dịch lọc được đánh giá. (Fig.5).

Như được thể hiện trên Fig.5, mẫu đặc vẫn giữ các chất ức chế MAO A và B trong khi các chất ức chế MAO không có mặt trong dịch lọc, dịch lọc này chỉ chứa etanol và nước từ mẫu pha loãng.

Bảng 2 thể hiện kết quả đối với các đồ uống khác nhau cũng như nguyên liệu ban đầu tequila được pha loãng (được dán nhãn đối chứng RO được pha loãng), Phần cô RO thứ nhất, Phần cô RO thứ hai, Phần lọc RO thứ nhất và Phần lọc RO thứ hai. Các phần lọc được thể hiện trong thử nghiệm ức chế MAO là có ít hoạt tính ức chế, trong khi hầu hết hoạt tính vẫn còn lại trong phần cô.

Bảng 2

Mẫu	% Ức chế MAO A	% Ức chế MAO B
Kirkland Anejo (Costco brand)	23	32
Milagro Anejo	26	23
Don Julio Anejo	17	32
Don Julio 1942	19	35
Pulque	14	26
SotoI	71	58
Milagro Barrel Res Anejo	27	15
Đối chứng RO được pha loãng	17	35
Phần cô RO thứ nhất	23	52
Phần cô RO thứ hai	34	49
Phần lọc RO thứ nhất	10	7
Phần lọc RO thứ hai	3	8
Clorgylin/Parglyin	97	83
DMSO	1	1

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa các hợp chất ức chế monoamin oxidaza (MAO), chế phẩm này được điều chế bằng cách loại bỏ etanol ra khỏi đồ uống có cồn được chưng cất thu được từ cây thù, việc loại bỏ etanol này xảy ra bằng một quy trình mà giữ lại các hợp chất dễ bay hơi khác ngoài etanol, quy trình này là quy trình thẩm thấu ngược hoặc cột hình nón quay.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó đồ uống có cồn được chưng cất là sản phẩm chưng cất được sản xuất bằng cách:
 - a) gia nhiệt thân cây thù (agave cactus) để thủy phân các đường phức;
 - b) cắt nhỏ và ép thân cây đã gia nhiệt để chiết ra sirô;
 - c) pha loãng sirô này bằng nước đến nồng độ 12 đến 14°Brix và cấy giống nấm men;
 - d) lên men sirô pha loãng đã được cấy giống này để thu được sản phẩm lên men; và
 - e) chưng cất sản phẩm lên men để thu được sản phẩm chưng cất.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó bước a) được thực hiện bằng cách hấp.
4. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó bước b) được thực hiện trong máy xay cắt và máy ép.
5. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó quy trình ở bước d) bao gồm lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ nhiệt độ trong phòng đến 30°C với sự có mặt của *S. cerevisiae* và *K. africana*.
6. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó bước e) được thực hiện cho đến khi sản phẩm chưng cất đạt đến nồng độ etanol ít nhất là 38%-40% thể tích/thể tích.
7. Thực phẩm hoặc đồ uống chứa chế phẩm theo điểm 1 hoặc điểm 2.

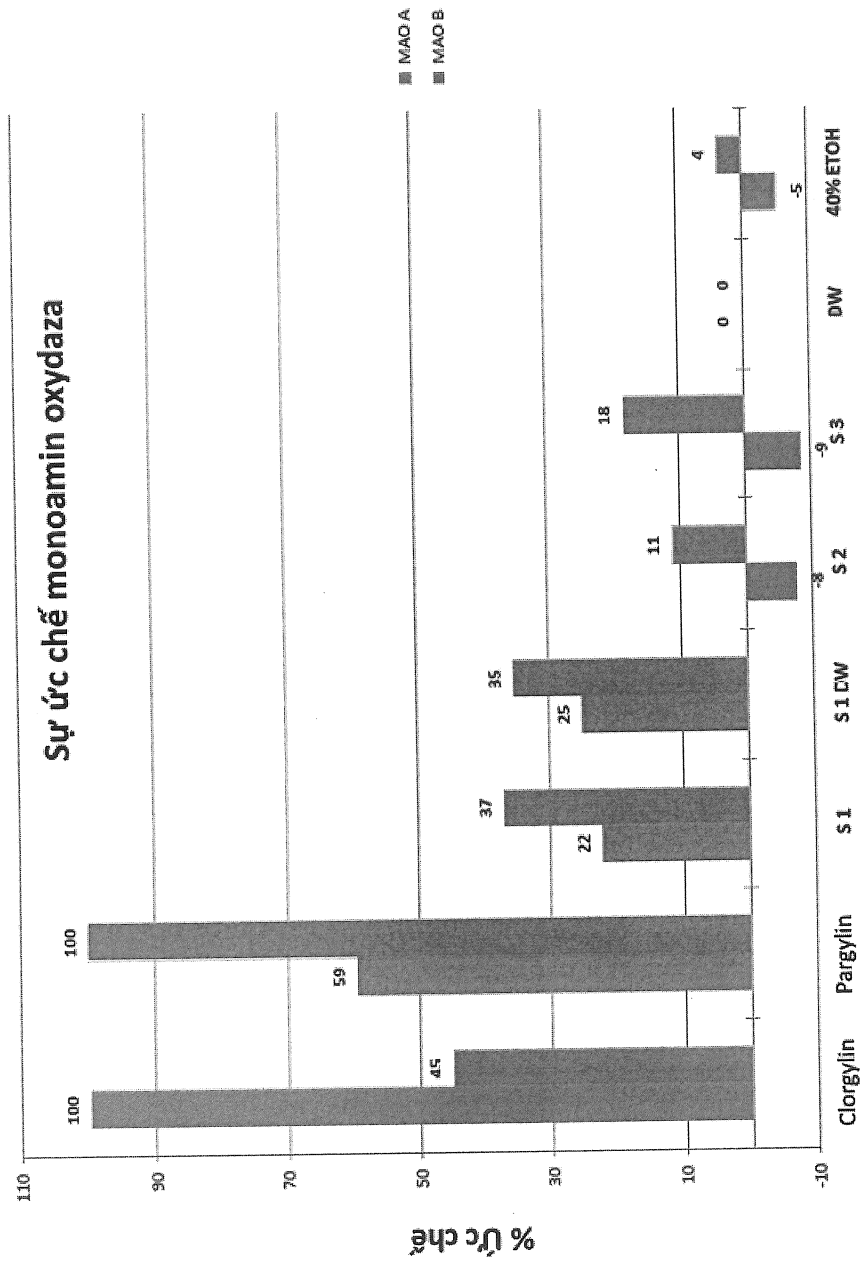


Fig. 1

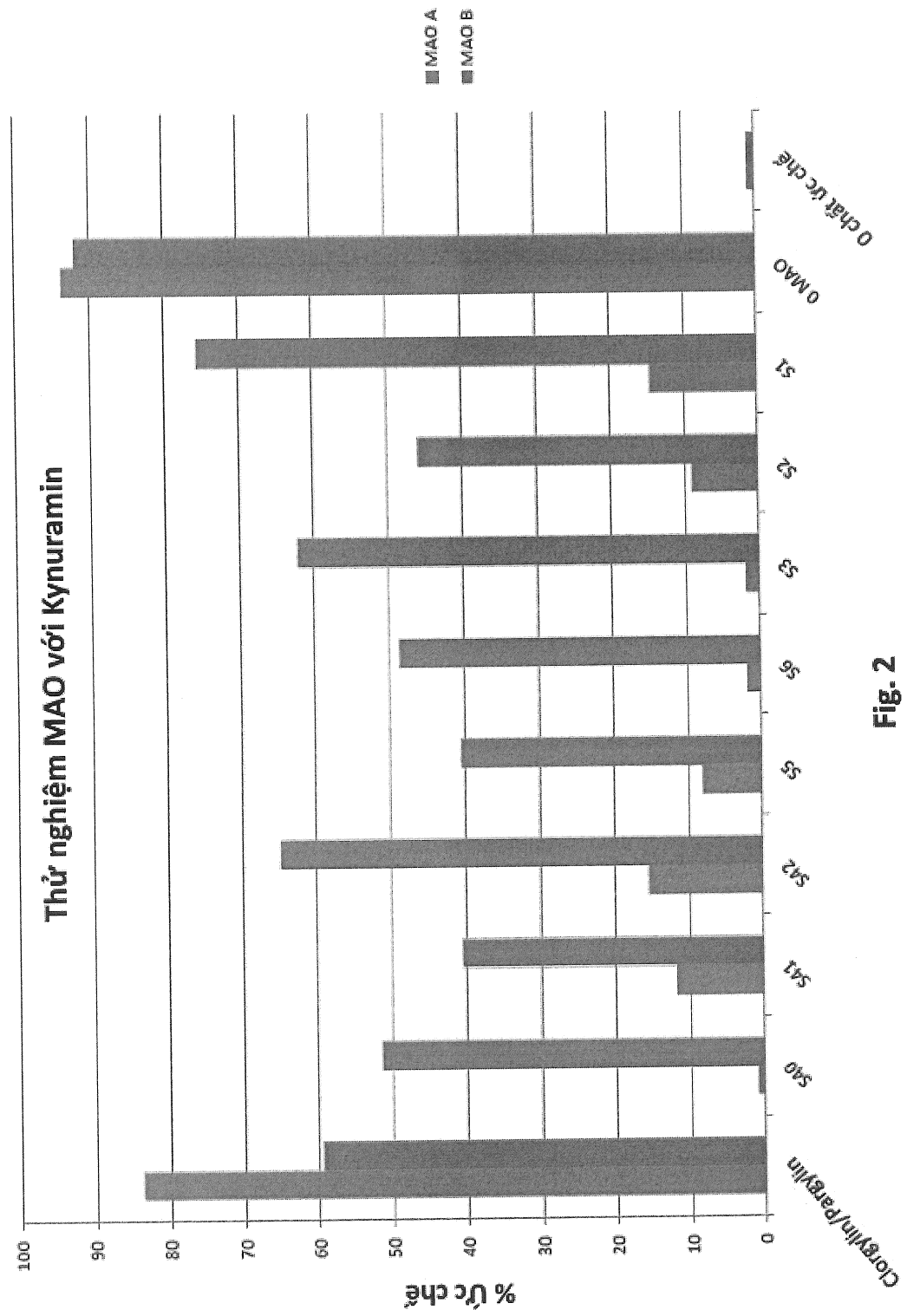


Fig. 2

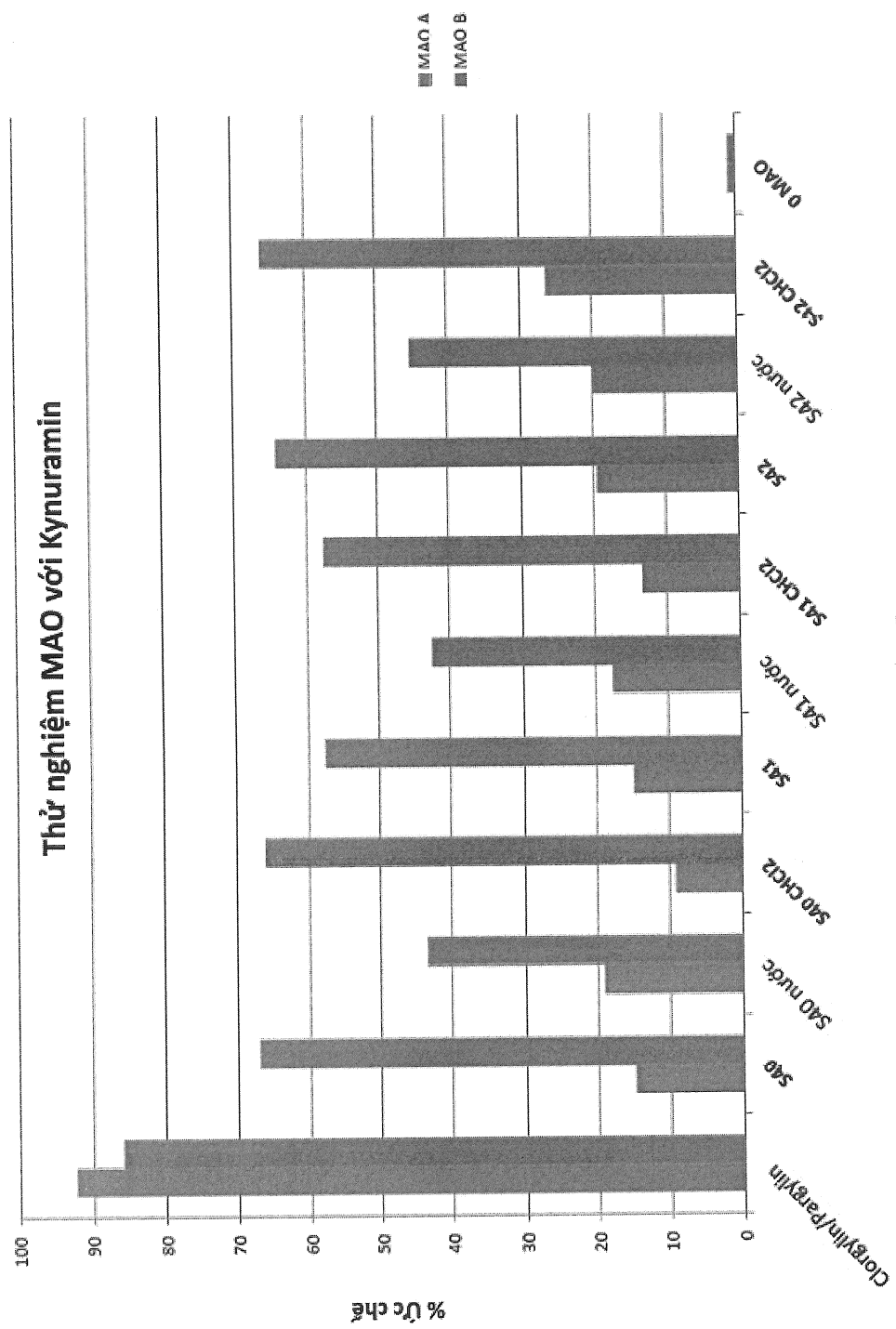


Fig. 3

Thử nghiệm Kynuramin với các phân đoạn cột

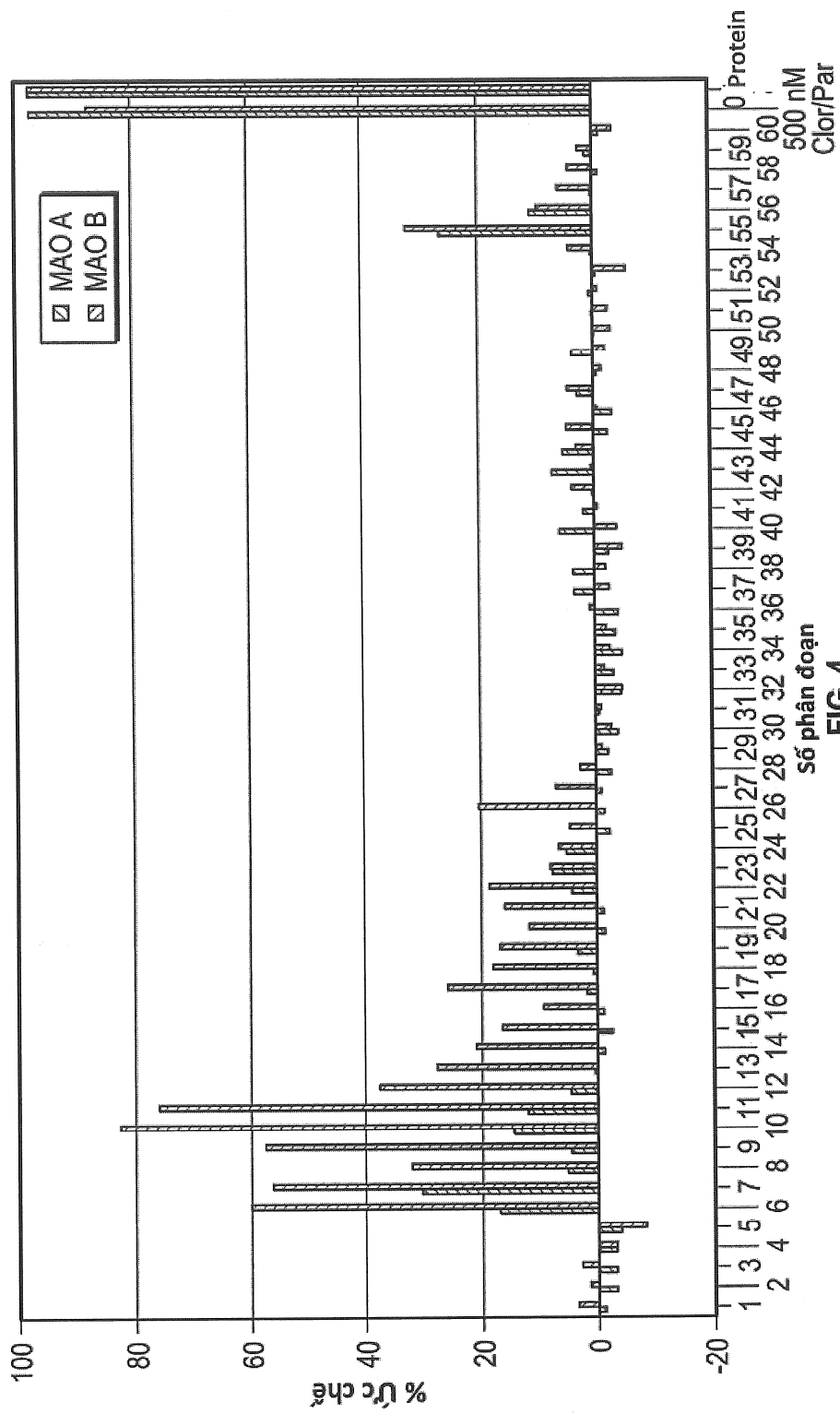


FIG. 4

Hoạt tính ức chế MAO từ RO

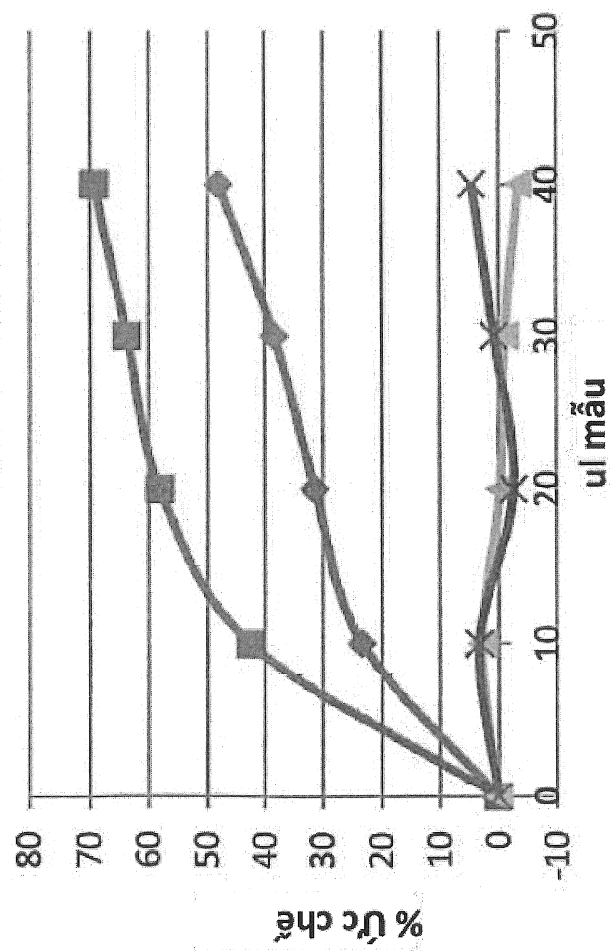


Fig. 5