



(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)



1-0034356

(51)⁸ C12P 1/02; A23L 1/105

(13) B

(21) 1-2018-03141

(22) 19/07/2018

(30) 106146655 29/12/2017 TW

(45) 26/12/2022 417

(43) 25/07/2019 376A

(73) KANG JIANN BIOTECH CO., LTD. (TW)

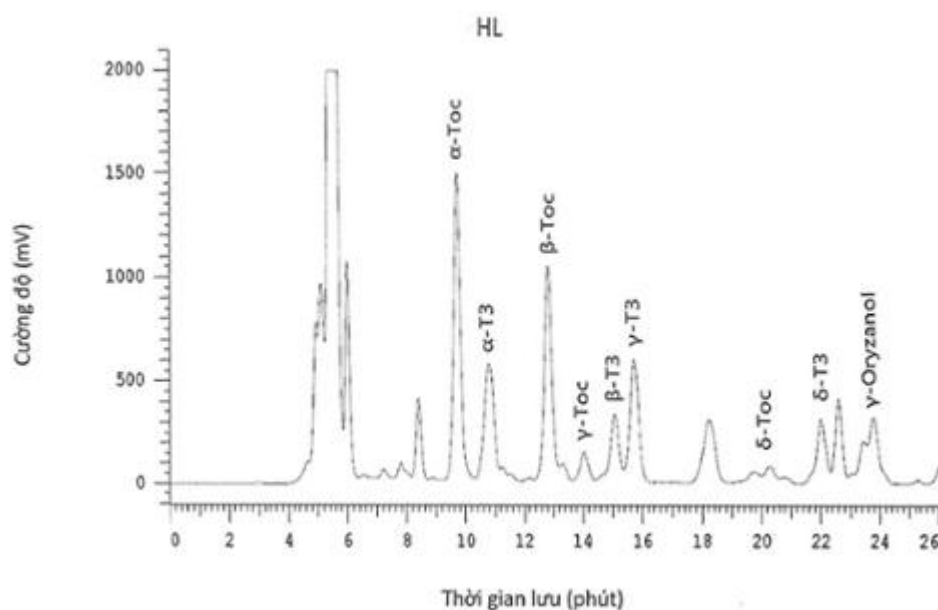
No. 97, Zhongzheng Rd., Caotun Township, Nantou County 54245, Taiwan

(72) Lean-Teik NG (MY); Ming-Nan LAI (TW); Shou-Chou LIU (TW).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT GẠO LỨT ĐÃ ĐƯỢC LÊN MEN VỚI NẤM ANTRODIA CINNAMOMEA VÀ GẠO LỨT ĐƯỢC SẢN XUẤT BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất gạo lứt đã được lên men với nấm *Antrodia cinnamomea* được sản xuất bằng phương pháp này, trong đó gạo lứt khác biệt ở chỗ được tạo ra bằng cách cấy chủng nấm *A. cinnamomea* vào môi trường chứa gạo lứt dưới dạng cơ chất nuôi cấy để lên men. Gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* theo sáng chế chứa các chất dinh dưỡng đặc biệt của gạo lứt và các hoạt chất đặc trưng của nấm *A. cinnamomea*. Gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* có thể được sử dụng trực tiếp để làm nguyên liệu thực phẩm, và để sản xuất các sản phẩm tốt cho sức khỏe từ gạo lứt chẳng hạn như bột gạo lứt, sữa gạo lứt, trà gạo lứt, và các phụ gia dinh dưỡng cho các thực phẩm khác.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến gạo lứt đã được lên men với nấm Ngu hương chi *Antrodia cinnamomea* và phương pháp sản xuất gạo lứt này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến gạo lứt thu được bằng cách lên men nấm *A. cinnamomea* trong môi trường chứa gạo lứt dưới dạng cơ chất được sản xuất bằng phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Dựa vào ghi chép lịch sử, Wu Sha là người tiên phong phát triển thành phố Nghi Lan năm 1773 và ông ấy giao dịch thường xuyên với người dân địa phương sau khi vượt biển đến Đài Loan từ tỉnh Phúc Kiến, Trung Quốc. Ông ấy cũng đã nhận được nấm *A. cinnamomea* từ người dân địa phương và nấu chín để dùng. Cho đến năm 1985, nấm *A. cinnamomea* đã bắt đầu phổ biến rộng rãi dưới dạng nguyên liệu thực phẩm và đã được phát hiện có những hiệu quả chữa bệnh tốt; kết quả là, các trường đại học và viện nghiên cứu công bắt đầu tích cực nghiên cứu mối quan hệ phát sinh loài, các thành phần hóa học, các hoạt tính dược lý và các phương pháp nuôi trồng nhân tạo nấm *A. cinnamomea*. Hiện nay, tiềm năng ứng dụng của nấm *A. cinnamomea* được cộng đồng học thuật đánh giá cao. Nấm *A. cinnamomea* (còn gọi là nấm hương chi (*Antrodia camphorata*) và nấm hương chi Đài Loan (*Taiwanofungus camphoratus*)), là một loại nấm lưu niên, thuộc Bộ nấm (Polyporales), họ nấm lỗ (Polyporaceae), và chi *Antrodia*.

Tên thông thường của loài nấm này là nấm hương chi, nấm hương chi, nấm long não, nấm trong long não, nấm long não mập và nấm long não đỏ, v.v.. Nấm *A. cinnamomea* là loài nấm đặc hữu của Đài Loan và chỉ mọc trong ruột gỗ rỗng của các loài cây thường xanh lá rộng được gọi là *Cinnamomum kanehirai* (cây hương chi) chỉ được tìm thấy ở Đài Loan. Vì sự khan hiếm và giá trị quý giá của nó, do đó nấm *A. cinnamomea* được xem là kho báu của thế giới.

Các hợp chất có trong nấm *A. cinnamomea* có thể được phân loại thành nhiều loại khác nhau chẳng hạn như các polysaccarit, các hợp chất triterpenoit, các diterpen, các sesquiterpen, các sesquiterpen lacton, các benzenoit, các dẫn xuất của benzoquinon,

enzym chống oxi hóa superoxit dismutaza, các polyaxetylen, adenodin, các dẫn xuất của axit maleic và axit succinic, các protein (bao gồm các protein miễn dịch), các hợp chất phenolic, các steroid, các chất dễ bay hơi (mùi thơm của nấm *Antrodia*), v.v.. Nhiều thành phần được phát hiện đầu tiên trong nấm *A. cinnamomea* đã được đặt tên bằng cách bắt đầu bằng tiền tố của *Antrodia*, chẳng hạn như antcin, antrocin, antrodin, antrocamphin, và antroquinonol. Thể quả của nấm *A. cinnamomea* được trồng qua gỗ cây ngưu chương hoặc hệ sợi nấm *A. cinnamomea* được nuôi cấy ở trạng thái rắn và lỏng được phát hiện có hiệu quả chống oxi hóa, chống viêm, bảo vệ gan, chống viêm gan do rượu, chống dị ứng, chống máu nhiễm mỡ, bảo vệ thần kinh và chống ung thư.

Kể từ năm 1991, các nghiên cứu về nấm *A. cinnamomea* đã bắt đầu phát triển và dần nhận được sự quan tâm lớn hơn từ sau năm 2000. Các phương pháp nuôi trồng nhân tạo nấm *A. cinnamomea* bao gồm: (i) nuôi trồng trên gỗ cây ngưu chương, trong đó nấm *A. cinnamomea* thu được có chứa các thành phần tương tự với nấm *A. Cinnamomea* hoang dã; (ii) các phương pháp nuôi cấy lỏng và trạng thái rắn, trong đó phương pháp nuôi cấy trạng thái rắn còn được gọi là phương pháp nuôi cấy túi polypropylen (PP). Trong phương pháp nuôi cấy túi PP, chủng nấm *A. cinnamomea* được cấy và nuôi trồng trong túi PP có chứa chất xơ, đường, ngũ cốc và chất tương tự. Mặc dù nuôi cấy trạng thái rắn nấm *A. cinnamomea* có thể thu được thành phần tương tự với thành phần được tìm thấy trong thể quả của nấm *A. Cinnamomea* hoang dã, việc nuôi cấy trạng thái rắn này mất khoảng sáu tháng và chi phí khá cao. Phương pháp nuôi cấy lỏng sử dụng chất lên men qua quá trình lên men lỏng để thu được hệ sợi nấm *A. cinnamomea*. Mặc dù phương pháp nuôi cấy lỏng có ưu điểm về thời gian nuôi cấy ngắn (khoảng 14 ngày) nhưng không thể thu được các triterpenoid đặc trưng và các thành phần hiếm thường tìm thấy trong thể quả của nấm *A. cinnamomea* hoang dã. Hiện tại, phần lớn các sản phẩm nấm *A. cinnamomea* thương mại có nguồn gốc từ hệ sợi hoặc thể quả được sản xuất bằng các phương pháp lên men lỏng hoặc rắn, như với mục đích không gây ra các vấn đề môi trường liên quan đến việc chặt cây.

Theo các giải pháp kỹ thuật đã có, một số người đã cố gắng thử cấy chủng nấm *A. cinnamomea* vào dưa hấu hoặc củ trái cây để nuôi trồng. Ví dụ, patent Đài Loan số I551683 đã bộc lộ phương pháp bao gồm cấy nấm *A. cinnamomea* vào ruột của chanh leo đã được sử dụng làm cơ chất để làm tăng hàm lượng polysaccarit của nấm *A. cinnamomea*. Patent Đài Loan số I551686 đã bộc lộ phương pháp nuôi cấy nấm *A.*

cinnamomea bao gồm cấy nấm *A. cinnamomea* vào bí ngô, và sau đó ủ ở nhiệt độ 24°C~26°C trong thời gian từ 3 đến 6 tuần sao cho các chất dinh dưỡng có trong bí ngô được sử dụng cho sự sinh trưởng của nấm *A. cinnamomea*. Tuy nhiên, cho đến nay không một tài liệu nào bộc lộ cách sử dụng một loại ngũ cốc, cụ thể là gạo lứt làm cơ chất nuôi cấy nấm *A. cinnamomea*.

Gạo là một trong các thực phẩm chính của hơn một nửa dân số thế giới. Hơn 90% khu vực trồng lúa trên thế giới là ở “châu Á” nơi có nhiều quốc gia sản xuất gạo, và do đó gạo đóng một vai trò quan trọng trong nền kinh tế của các quốc gia này. Gạo lứt là một loại gạo được sản xuất bằng cách xử lý và lột bỏ vỏ trấu đơn giản mà còn giữ lại các phần như lớp ngoài chẳng hạn như vỏ cám, aleuron, và phôi mầm. Có đến 60%-70% vitamin, chất khoáng và axit amin thiết yếu trong gạo tập trung ở lớp ngoài. Gạo lứt chứa lượng chất xơ cao gấp sáu lần so với gạo trắng, và có thể được sử dụng để ngăn chặn và làm giảm táo bón. Do đó, gạo lứt luôn được coi là thực phẩm tốt cho sức khỏe. Thêm nữa, gạo lứt cũng chứa tocopherol (Toc), tocotrienol (T3) và γ -oryzanol phong phú và đặc trưng, và các thành phần chức năng khác chẳng hạn như axit γ -aminobutyric (GABA), vitamin B tổng hợp, các phytosterol, axit ferulic và các polyphenol, những chất đã được biết là có các đặc tính giảm mỡ máu và cholesterol, ngăn ngừa bệnh tim mạch, chống oxi hóa và chống ung thư. Các nghiên cứu dịch tễ học và lâm sàng đã chứng minh rằng các thành phần chức năng này góp phần ở các mức độ khác nhau trong các hiệu quả ngăn ngừa bệnh tật chẳng hạn như cải thiện thể lực, điều hòa chức năng sinh lý, và thúc đẩy sức khỏe tổng thể và khỏe mạnh.

Patent Đài Loan số I331506 đã bộc lộ phương pháp nuôi cấy nhân tạo nấm *A. cinnamomea*, bao gồm cấy nấm *A. cinnamomea* trong môi trường có chứa các loại ngũ cốc chẳng hạn như gạo trắng, kê, cao lương hoặc lúa mì, và nước dừa, rau củ và các loại cacbohydrat khác để thu được thể quả nấm *A. Cinnamomea*, để thay thế gỗ cây ngu chương như nguồn dinh dưỡng để nuôi cấy nấm *A. cinnamomea*. Mặc dù phương pháp theo patent này có thể rút ngắn thời gian nuôi cấy và tiết kiệm chi phí bằng cách sử dụng các nguyên liệu ngũ cốc thông thường làm nguồn dinh dưỡng cho nấm *A. cinnamomea*, nhưng thành phần môi trường nuôi cấy phức tạp và không thể được sử dụng trực tiếp làm thực phẩm; các bất lợi khác của phương pháp này là thời gian nuôi cấy dài (hơn sáu tháng) và không ổn định trong việc tạo ra các thể quả. Sáng chế là nghiên cứu đầu tiên sử dụng gạo lứt làm cơ chất dinh dưỡng để nuôi cấy nấm *A. cinnamomea* để thu được

thể quả của nấm *A. Cinnamomea* hoặc các loại vật liệu tương tự trong một khoảng thời gian ngắn. Bên cạnh việc chứa các thành phần hóa học khác nhau của nấm *A. Cinnamomea*, các loại vật liệu này còn chứa các chất dinh dưỡng có hoạt tính sinh học chính của gạo lứt. Ngoài ra, gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* được tạo ra theo phương pháp theo sáng chế còn có thể được sử dụng trực tiếp như là nguyên liệu thô cho các loại thực phẩm chăm sóc sức khỏe, và là món ăn sau khi nấu chín.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế phát hiện ra rằng cấy chủng nấm *A. cinnamomea* vào môi trường có chứa gạo lứt như là cơ chất dinh dưỡng và trải qua quá trình lên men có thể tạo ra thể quả của nấm *A. cinnamomea*. Gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* duy trì các chất dinh dưỡng của gạo lứt, chẳng hạn như tocopherol, tocotrienols và γ -oryzanol, và còn chứa các thành phần hoạt chất đặc trưng của nấm *A. cinnamomea* bao gồm 1,4-dimethoxy-2,3-metylendioxy-5-metyl-benzen, antcin C, 2,2',5,5'-tetramethoxy-3,4,3',4'-bimetylendioxy-6,6'-dimetyl-biphenyl, antcin H, axit dehydrosulphurenic, antrocamphin C, antcin B, antcin G, antcin A, axit 15-axetyldehydrosulfurenic và axit dehydroeburicoic, v.v., như được chứng minh bằng các phân tích sâu hơn đối với các chế phẩm thu được từ gạo lứt đã được lên men nấm *A. cinnamomea*.

Theo đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea*, khác biệt ở chỗ thu được bằng cách thực hiện lên men chủng nấm *A. cinnamomea* trong môi trường có chứa gạo lứt là cơ chất dinh dưỡng, trong đó gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* bao gồm các chất dinh dưỡng đặc biệt của gạo lứt và các thành phần hoạt chất đặc trưng của nấm *A. cinnamomea*.

Theo phương án nhất định của sáng chế, gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* bao gồm các chất dinh dưỡng đặc biệt của gạo lứt, chẳng hạn như tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol, và các chất tương tự. Theo các phương án nhất định của sáng chế, gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* bao gồm các thành phần hoạt chất của nấm *A. cinnamomea*, chẳng hạn như bao gồm 1,4-dimethoxy-2,3-metylendioxy-5-metyl-benzen, antcin C, 2,2',5,5'-tetra- methoxy-3,4,3',4'-bimetylendioxy-6,6'-dimetyl-biphenyl, antcin H, axit dehydrosulphurenic, antrocamphin C, antcin B, antcin G, antcin A, 15-axit axetyldehydrosulfurenic, axit dehydroeburicoic, và các chất tương tự.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea*, bao gồm cấy chủng nấm *A. cinnamomea* vào cơ chất nuôi cấy gồm có gạo lứt và nước để lên men chủng nấm *A. cinnamomea* trong cơ chất nuôi cấy ở nhiệt độ 21°C~23°C và độ ẩm 65%~70% trong thời gian từ 1 đến 2 tháng hoặc tốt hơn là 40 ngày cho đến khi cơ chất nuôi cấy được phủ kín bởi các thể quả của nấm *A. cinnamomea*, sau đó thu gạo lứt đã được lên men nấm *A. cinnamomea*.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, phương pháp còn bao gồm sấy khô gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* thu được ở nhiệt độ 70°C~80°C trong thời gian 20~30 giờ, tốt hơn là ở nhiệt độ 70°C~80°C trong thời gian 24 giờ, hoặc làm khô lạnh gạo lứt đã được lên men với nấm *A. Cinnamomea* thu được. Theo các phương án khác của sáng chế, phương pháp nêu trên còn bao gồm nghiền gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* đã sấy khô để thu được bột gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea*. Theo một số phương án khác, phương pháp nêu trên còn bao gồm tách chiết gạo lứt đã được lên men nấm *A. cinnamomea* thu được với nước và cồn, sau đó lọc để thu được dịch chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea*. Theo các phương án khác của sáng chế, phương pháp nêu trên còn bao gồm sấy khô và nghiền sản phẩm cô đặc từ dịch chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* để thu được bột chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. Cinnamomea*.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến gạo lứt đã được lên men với nấm *A. Cinnamomea* được sản xuất bằng phương pháp nêu trên.

Chủng nấm *A. cinnamomea* được sử dụng theo sáng chế bao gồm chủng *A. cinnamomea* BCRC 35396 (ATCC 200183), *A. cinnamomea* BCRC 36401 (TARI SL-7), *A. cinnamomea* KJ-HL, và các chủng tương tự.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả phân tích các chất dinh dưỡng đặc biệt của gạo lứt trong gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* thu được từ ví dụ của sáng chế;

Fig.2A thể hiện kết quả phân tích các hoạt chất của nấm *A. cinnamomea* trong gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* thu được từ ví dụ của sáng chế;

Fig.2B thể hiện kết quả phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) đối với mẫu gạo lứt đã được lên men mà không cấy

chủng nấm *A. cinnamomea* (là đối chứng, điều kiện lên men của gạo lứt lên men giống với điều kiện lên men của gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* trên Fig.2A);

Fig.2C thể hiện kết quả phân tích HPLC đối với mẫu gạo lứt được cấy chủng nấm *A. cinnamomea* mà không lên men (là đối chứng, điều kiện lên men của gạo lứt được cấy chủng nấm *A. cinnamomea* gạo lứt đã được lên men giống với điều kiện lên men của gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* trên Fig.2A); và

Fig.2D thể hiện kết quả phân tích HPLC đối với mẫu trắng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “gạo lứt” (còn gọi là Genmi) có nghĩa là hạt gạo có chứa phần cám và phôi mầm còn lại sau khi bóc vỏ trấu. Thuật ngữ “các chất dinh dưỡng đặc biệt của gạo lứt” để chỉ các thành phần chức năng có lợi cho cơ thể có trong gạo lứt, chủ yếu bao gồm các tocopherol (Toc), các tocotrienol (T3), γ -oryzanol, axit γ -aminobutyric (GABA), axit ferulic, các polyphenol, chất xơ ăn kiêng, và các chất tương tự.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “các hoạt chất đặc trưng của nấm *A. Cinnamomea*” để chỉ các thành phần có hoạt tính sinh lý y học đặc trưng có trong nấm *A. cinnamomea*, chủ yếu chứa các polysaccarit, các triterpen, các diterpen, các sesquiterpen, các sesquiterpen lacton, các benzenoit, các dẫn xuất benzoquinon, các enzym chống oxy hóa superoxit dismutaza, các polyaxetylen, adenosin, các dẫn xuất của axit maleic và axit succinic, các protein (bao gồm các protein miễn dịch), các hợp chất phenolic, các steroid, và các vitamin (ví dụ, vitamin B, axit nicotinic, v.v.), các nguyên tố vi lượng (chẳng hạn canxi, phospho, germani, v.v.), các axit nucleic, các axit amin, các lignan, axit γ -aminobutyric (GABA), các chất ổn định huyết áp (chẳng hạn như axit antrodia), và các chất tương tự.

Các đặc tính và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được minh họa và mô tả cụ thể trong các ví dụ sau đây. Các ví dụ được mô tả ở đây chỉ sử dụng để minh họa mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Lên men gạo lứt đã được lên men với nấm *Antrodia cinnamomea*

Môi trường nuôi cấy: gạo lứt được trộn với nước với tỉ lệ 1:1,1 và được đặt trong

bình. Mỗi bình chứa khối lượng môi trường khoảng 100-120 g. Môi trường được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 1 giờ. Cây: chủng *A. cinnamomea* KJ-HL ở dạng khối lập phương 2 mm x 3 mm hoặc dạng lỏng và/hoặc dạng rắn được cấy vào trong môi trường được khử trùng nêu trên. Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ: 21~23°C, độ ẩm: 65~70%, tần số thông gió: 5 phút/12 giờ, nồng độ cacbon đioxit: 1000 đến 2000 ppm (parts per million: phần triệu), nuôi cấy trong điều kiện không có ánh sáng trong thời gian từ 1 đến 2 tháng.

Sau 40 ngày lên men, môi trường được che phủ kín bởi các thể quả màu vàng đỏ nhạt của nấm *A. cinnamomea*. Gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* được thu nhận và sấy khô với không khí nóng ở nhiệt độ 70°C~80°C trong thời gian 24 giờ, hoặc được làm khô lạnh trong thời gian 48 giờ để thu được gạo lứt đã được lên men với nấm *A. Cinnamomea* khô. Gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* khô thu được có thể có thể được sử dụng trực tiếp như là nguyên liệu thực phẩm dùng để nấu nướng, hoặc được chế biến thành các miếng ngũ cốc, hoặc có thể được sử dụng để làm trà Genmi. Gạo lứt đã được lên men khô cũng còn có thể được nghiền thành bột gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* và do đó có thể được bổ sung vào các thành phần khác và đồ uống như là chất hòa tan dinh dưỡng, và được chế biến thành các chế phẩm thực phẩm tốt cho sức khỏe chẳng hạn như sirô gạo lứt, sữa gạo lứt, và bánh gạo lứt, v.v..

Ví dụ 2: Sản xuất sản phẩm cô đặc từ dịch chiết gạo lứt đã được lên men nấm *Antrodia cinnamomea*.

Gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* thu được ở ví dụ 1 được tách chiết với nước và cồn ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 giờ để thu được dịch chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea*. Dịch chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* được lọc trên lưới thép không gỉ (150 mesh (mắt lưới)).

Sau đó dịch chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* đã lọc được chuyển sang máy cô đặc chân không và được cô đặc ở nhiệt độ 52±2°C. Sau khi dịch lọc được cô đặc đến mức nồng độ chuẩn, cao chiết được lấy ra và đặt vào máy sấy tầng sôi để thực hiện sấy phun (nhiệt độ: 62±2°C, tốc độ quay của bơm: 35 vòng/phút, tốc độ quay tua bin gió: 40 vòng/phút). Cao chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* đã được sấy khô được đưa ra, nghiền (sử dụng lưới nghiền có kích thước

mắt lưới: 90 mesh (mắt lưới)) và sàng (sử dụng lưới sàng có kích thước mắt lưới: 60 mesh (mắt lưới)) để thu được bột chiết gạo lứt đã được lên men nấm *A. Cinnamomea*.

Ví dụ 3: Phân tích các chất dinh dưỡng đặc biệt của gạo lứt trong gạo lứt đã được lên men với nấm *Antrodia cinnamomea*.

Để xác định các chất dinh dưỡng đặc biệt của gạo lứt có được giữ lại sau khi lên men với nấm *A. Cinnamomea* hay không, thực hiện phân tích các hoạt chất chẳng hạn như các tocopherol, các tocotrienol và γ -oryzanol trong gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea*.

Chiết tách các hoạt chất

Cân lấy 0,5 g mẫu gạo lứt đã được lên men với nấm *A. Cinnamomea* và trộn với 3 mL n-hexan, hỗn hợp được tách chiết bằng máy lắc tạo xoáy mạnh trong thời gian 20 phút trong bể nước có nhiệt độ 60°C và sau đó quay ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong thời gian 15 phút. Sau khi thu dịch nổi ở trên, phần còn lại được tách chiết thêm hai lần theo cách tương tự. Cuối cùng, phần dịch nổi từ ba lần tách riêng biệt được gộp lại và được lọc qua bộ lọc kích thước 0,45 μ m. Dịch lọc được thu lại để phân tích HPLC (cf. Huang & Ng, Journal of Chromatography A 1218: 4709-4713, 2011).

Phân tích HPLC các hoạt chất trong gạo lứt

Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được sử dụng trong ví dụ này là thiết bị hệ thống Hitachi, bao gồm: bơm sắc ký (Model L-2100/2130), đầu dò quang phổ tử ngoại-khả kiến (Model U-1800), và đầu dò huỳnh quang (Model L-2485). Việc phân tích các hoạt chất của gạo lứt được thực hiện bằng cách sử dụng đầu dò huỳnh quang được thiết lập ở các bước sóng 290 nm (bước sóng kích thích) và 330 nm (bước sóng phát xạ). Các điều kiện phân tích như sau: pha động: chứa n-hexan, isopropanol, etyl axetat, và axit axetic; cột sắc ký: Inertsil SiL 100A, 5 μ m, 4,6 x 250 mm; tốc độ chảy của pha động: 0,7 mL/phút.

Như được thể hiện trên Fig.1, gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* theo sáng chế giữ lại được các chất dinh dưỡng đặc biệt của gạo lứt như được phân tích bằng HPLC sau khi lên men, và tách chiết với n-hexan. Các chất dinh dưỡng đặc biệt bao gồm các tocopherol (α -tocopherol được thể hiện dưới dạng α -Toc, β -tocopherol được thể hiện dưới dạng β -Toc, γ -tocopherol được thể hiện dưới dạng γ -Toc, và δ -

tocopherol được thể hiện dưới dạng δ -Toc trên hình vẽ), các tocotrienol (α -tocotrienol được thể hiện dưới dạng α -T3, β -tocotrienol được thể hiện dưới dạng β -T3, γ -tocotrienol được thể hiện dưới dạng γ -T3, và δ -tocotrienol được thể hiện dưới dạng δ -T3 trên hình vẽ) và γ -oryzanol.

Ví dụ 4: Phân tích các hoạt chất của nấm *Antrodia cinnamomea* trong gạo lứt đã được lên men với nấm *Antrodia cinnamomea*.

Để xác định xem các hoạt chất đặc trưng của nấm *A. cinnamomea* có bao gồm trong gạo lứt đã lên men mới nấm *A. cinnamomea* hay không, thực hiện phân tích HPLC các hoạt chất chẳng hạn như triterpen, các non-triterpenoit như antcin C và các phenol trong gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea*.

Chuẩn bị dịch chiết để phân tích: 20 mg mẫu gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* được cho vào ống nghiệm liền nắp Eppendorf 1,5 mL, sau đó thêm 0,8 mL cồn 95% (tỉ lệ khối lượng/thể tích 1:40) và được trộn đều. Hỗn hợp được lắc trong bể nước siêu âm ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ, và sau đó thực hiện ly tâm ở tốc độ quay 6000 vòng/phút trong thời gian 5 phút. Dịch nổi ở trên được lọc qua bộ lọc kích thước 0,45 μ m vào ống Eppendorf 1,5 mL, và sau đó cho thêm cồn 95% đến thể tích 1 mL. Dịch chiết được bảo quản ở nhiệt độ -20°C đến khi thực hiện phân tích HPLC (cf. Lin et al., Journal of Agricultural and Food Chemistry 59:7626-7635, 2011).

Các đối chứng được sử dụng ở đây gồm có gạo lứt đã được lên men bằng quy trình lên men thông thường thay vì lên men với *A. Cinnamomea*, gạo lứt được cấy với *A. Cinnamomea* nhưng không tiến hành lên men, và mẫu trắng chỉ chứa nước. Điều kiện lên men của gạo lứt đã được lên men là giống với điều kiện lên men của gạo lứt đã được lên men với *A. Cinnamomea* như đã được mô tả ở trên.

Các điều kiện của phân tích HPLC bao gồm cột sắc ký: Luna C18(2) (5 μ m, 4,6 x 250 mm, Phenomenex); bước sóng phát hiện: 254 nm; pha động chứa A: 0,1% axit axetic (H_2O với 0,1% (thể tích/thể tích) axit axetic), B: metanol (MeOH), và C: axetonitril (ACN). Tốc độ chảy của pha động được thể hiện trong bảng sau đây.

Thời gian (phút)	A: H_2O (0,1% axit axetic)	B: MeOH	C: ACN	tốc độ chảy (mL/phút)
0	40	30	30	0,5
5	40	30	30	0,5

95	10	10	80	0,5
95,1				1,0
105	0	0	100	1,0
115	0	0	100	1,0
118	40	30	30	1,0
120	40	30	30	1,0

Các kết quả phân tích được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.2A đến Fig.2D. Trên Fig.2A, a: 1,4-Đimetoxy-2,3-metylendioxy-5-metylbenzen, b: Antcin C, c: 2,2',5,5'-Tetrametoxy-3,4,3',4'-bimetylendioxy-6,6'-đimetylbiphenyl), d: Antcin H, e: axit Dehydrosulphurenic, f: Antrocamphin C, g: Antcin B, h: Antcin G, i: Antcin A, j: 15-axit Axetyldehydrosulfurenic, và k: axit Dehydroeburicoic. Theo đó, gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* theo sáng chế được khẳng định là có chứa các chất chỉ thị hoạt tính hóa học đặc trưng của nấm *A. cinnamomea* bao gồm 1,4-đimetoxy-2,3-metylendioxy-5-metylbenzen, antcin C, 2,2',5,5'-tetrametoxy-3,4,3',4'-bimetylendioxy-6,6'-đimetylbiphenyl, antcin H, axit dehydrosulphurenic, antrocamphin C, antcin B, antcin G, antcin A, 15-axit axetyldehydrosulfurenic và axit dehydroeburicoic. Đối với gạo lứt đã được lên men (là đối chứng, được thể hiện trên Fig.2B) và gạo lứt được cấy nấm *A. cinnamomea* (là đối chứng, được thể hiện trên Fig.2C), kết quả HPLC của các đối chứng này và mẫu trắng (được thể hiện trên Fig.2D) cho thấy không có đỉnh của các hoạt chất đặc trưng của nấm *A. cinnamomea*. Kết quả cho thấy các hoạt chất của nấm *A. cinnamomea* có trong gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* theo sáng chế được tạo ra bằng quy trình lên men bao gồm gạo lứt và nấm *A. cinnamomea*.

Sáng chế lần đầu tiên sử dụng gạo lứt làm cơ chất dinh dưỡng, để thu được chất dinh dưỡng đặc biệt của gạo lứt và các hoạt chất đặc trưng của nấm *A. cinnamomea* thông qua quá trình lên men. Gạo lứt đã được lên men với nấm *A. Cinnamomea* có thể được sử dụng trực tiếp để nấu nướng làm thức phẩm, vì môi trường được sử dụng cho quá trình lên men nấm *A. cinnamomea* chỉ chứa gạo lứt nên gạo lứt sau khi lên men có thành phần đơn giản. Ngoài ra, gạo lứt vốn đã được biết đến là nguyên liệu thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao. Sau khi trải qua quy trình lên men với nấm *A. cinnamomea*, gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* không chỉ giữ lại các chất dinh dưỡng đặc biệt ban đầu trong gạo lứt mà còn có thêm các hoạt chất đặc trưng của nấm *A. cinnamomea*, do đó còn làm tăng giá trị công nghiệp và tiềm năng trong sản xuất các

sản phẩm và thực phẩm chức năng tốt cho sức khỏe.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất gạo lứt đã được lên men với nấm *Antrodia cinnamomea*, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước:

cấy chủng nấm *A. cinnamomea* vào cơ chất nuôi cấy gồm gạo lứt và nước;

lên men chủng nấm *A. cinnamomea* trong cơ chất nuôi cấy ở nhiệt độ 21°C-23°C và độ ẩm 65%-70% trong thời gian từ 1 đến 2 tháng cho đến khi cơ chất nuôi cấy được che phủ hoàn toàn bởi các thể quả của nấm *A. cinnamomea*; và

thu gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea*.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cơ chất nuôi cấy là hỗn hợp chứa gạo lứt và nước với tỉ lệ 1:1,1 và thu được sau khi khử trùng.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chủng nấm *A. cinnamomea* được cấy vào cơ chất môi trường ở dạng khối lập phương khoảng 2 mm x 3 mm, dạng lỏng hoặc dạng rắn.

4. Phương pháp theo điểm 1, 2 hoặc 3, trong đó bước thu gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* được thực hiện sau 40 ngày lên men.

5. Phương pháp theo điểm 1, 2 hoặc 3, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước sấy khô gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* thu được dưới nhiệt độ 70°C-80°C trong thời gian 20-30 giờ hoặc làm khô lạnh gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* thu được để thu gạo lứt đã được lên men với nấm *A. Cinnamomea* khô.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* thu được được sấy khô với khí nóng ở nhiệt độ 70°C-80°C trong thời gian 24 giờ.

7. Phương pháp theo điểm 5, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước nghiền gạo lứt đã được lên men với nấm *Antrodia cinnamomea* sấy khô để thu được bột gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea*.

8. Phương pháp theo điểm 1, 2 hoặc 3, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tách chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* thu được với nước và cồn, sau đó lọc để thu được dịch chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea*.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cô đặc dịch chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* để thu được cao khô của dịch

chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea*.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước sấy phun và nghiền cao khô của dịch chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* để thu được bột chiết gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea*.

11. Gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 1, 2 hoặc 3, trong đó gạo lứt đã được lên men với nấm *A. cinnamomea* chứa các chất dinh dưỡng đặc biệt bao gồm các tocopherol, các tocotrienol, γ -oryzanol và các dạng kết hợp của chúng, các hoạt chất đặc trưng của nấm *A. cinnamomea* bao gồm các polysaccarit, các triterpen, các biguanid, các sesquiterpen, các sesquiterpen lacton, các benzen, các dẫn xuất benzoquinon, enzym chống oxi hóa superoxid dismutaza, các polyaxetylen, adenosin và các dạng kết hợp của chúng.

Fig.1

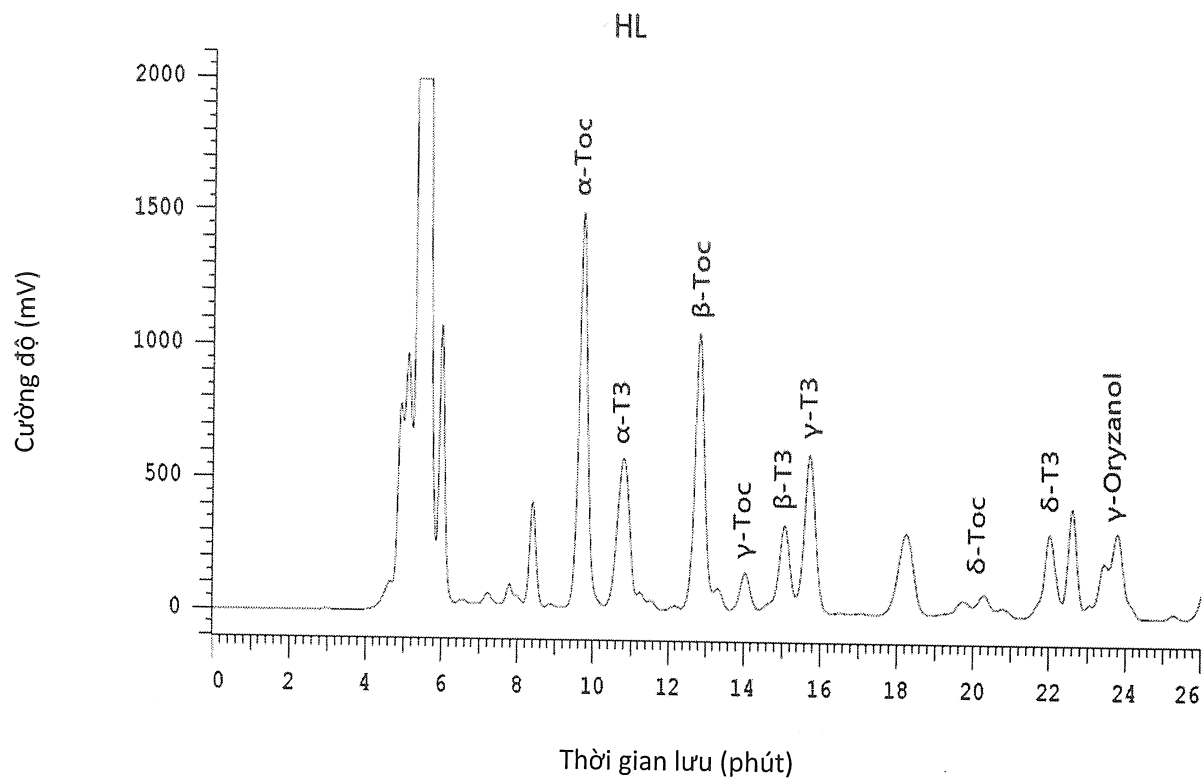


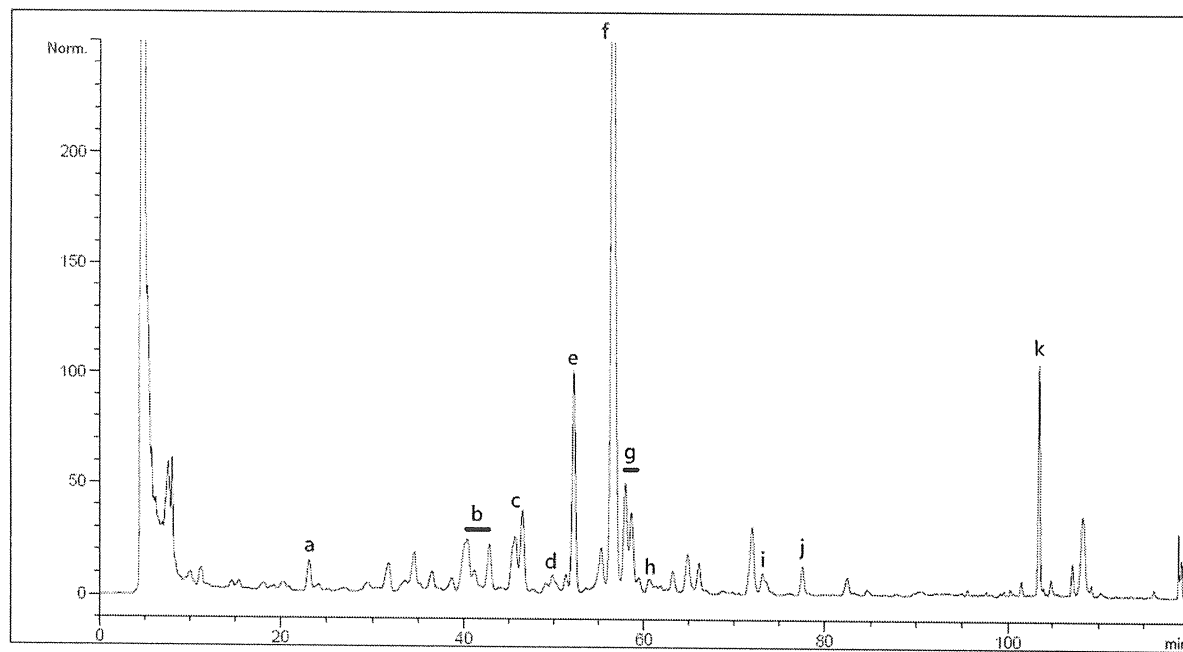
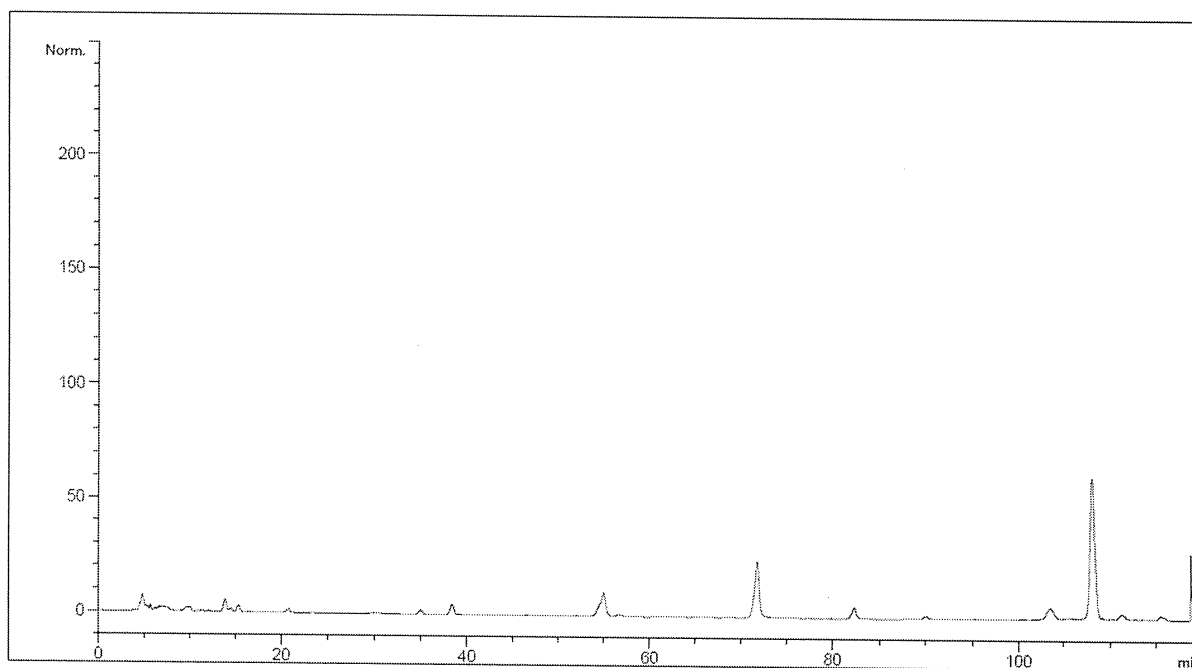
Fig.2A**Fig.2B**

Fig.2C

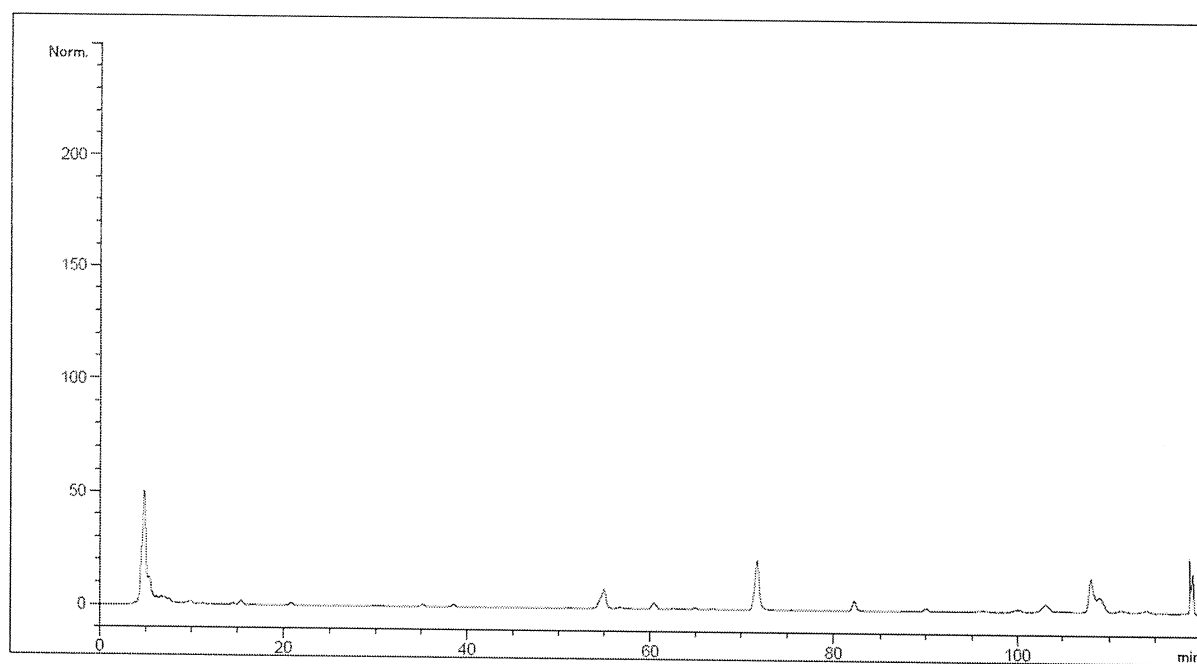


Fig.2D

