



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0036178

(51)⁷ A23L 33/105; A61P 37/04; A61K 8/97; (13) B
A23K 20/163; A61K 36/899

(21) 1-2018-00108

(22) 13/06/2016

(86) PCT/JP2016/067571 13/06/2016

(87) WO 2016/204120 A1 22/12/2016

(30) 2015-120180 15/06/2015 JP

(45) 25/07/2023 424

(43) 26/03/2018 360A

(76) TAMAI, Osamu (JP)

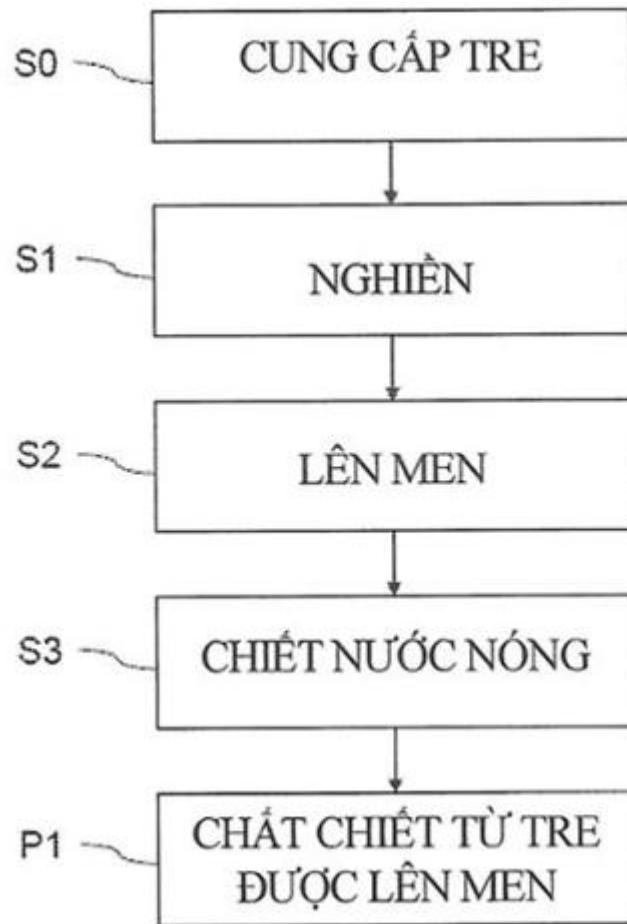
West River Shinkita 501, 10-18 Shinkitamachi, Takamatsu-shi, Kagawa 7600001, Japan

(74) Công ty TNHH Lê & Lê (LE & LE)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẤT CHIẾT TỪ TRE ĐƯỢC LÊN MEN, THỰC PHẨM ĐỂ KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH VÀ CHẤT ĐỂ KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH CHỨA CHẤT CHIẾT TỪ TRE ĐƯỢC LÊN MEN

(57) Sáng chế đề cập đến ứng dụng của tre dựa trên các chức năng mới. Phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men bao gồm bước nghiền là nghiền tre để thu được bột tre, bước lên men là lên men bột tre với vi khuẩn axit lactic để thu được sản phẩm tre đã lên men, và bước chiết là cho sản phẩm tre đã lên men vào quá trình chiết nước nóng để thu được chất chiết.

Sáng chế còn đề cập đến thực phẩm để kích thích miễn dịch và chất kích thích miễn dịch chứa chất chiết từ tre được lên men thu được bởi phương pháp nêu trên.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men, ở đây sản phẩm từ tre được lên men là kết quả của sự lên men lactic tre thu được bằng cách chiết, và chất kích thích miễn dịch và chế phẩm thực phẩm để kích thích miễn dịch chứa chất chiết từ tre được lên men dưới dạng thành phần hoạt tính.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tre là loài thực vật họ hòa thảo được thấy chủ yếu ở các vùng châu Á bao gồm Nhật Bản. Tre phát triển nhanh và có thể được cắt ra một cách dễ dàng, do đó tre đã được sử dụng rộng rãi từ thời xa xưa để làm nguyên liệu xây dựng, và nguyên liệu cho các sản phẩm thủ công và đồ dùng hằng ngày. Tuy nhiên, sự ra đời của các nguyên liệu hóa học chẳng hạn nhựa tổng hợp làm giảm việc sử dụng nguyên liệu tre và gây ra vấn đề là các rừng tre không bị cắt rời làm phong hóa những vùng đồi, đồng ruộng và đất nông nghiệp. Hơn nữa, thậm chí những vườn tre được quản lý còn có nhiều vấn đề trong chi phí xử lý chất thải tồn kém bởi vì không ai lấy tre đã cắt.

Theo đó, để sử dụng tre một cách hiệu quả, việc nghiên cứu và phát triển được thực hiện trên các ứng dụng mới của tre. Ví dụ, tài liệu patent 1 mô tả rằng phần lớp cutin của nguyên liệu tre có tính chất kháng khuẩn, và bột tre mịn thu được từ phần lớp cutin của nguyên liệu tre được sử dụng làm nguyên liệu kháng khuẩn khử mùi. Hơn nữa, tài liệu patent 2 đến tài liệu patent 4 được viết bởi tác giả sáng chế mô tả bột tre được lên men lactic thu được bằng quá trình lên men lactic bột tre từ việc nghiền nhỏ nguyên liệu tre, và cũng mô tả rằng bột tre được lên men lactic có thể được áp dụng cho thức ăn chăn nuôi, phân bón thực vật, chất điều hòa đất, sản phẩm khử mùi, các sản phẩm kháng khuẩn và các sản phẩm tương tự. Hơn nữa, tài liệu patent 5 bộc lộ rằng tre lên men có thể được sử dụng như một chất điều hòa tăng trưởng thực vật có chứa phytohormon, axit amin và như một chất xua đuổi có chứa các thành phần xua đuổi côn trùng độc hại. Tài liệu patent 6 bộc lộ phương

pháp để điều chế bột tre được lên men bằng axit lactic thích hợp để sử dụng trong thức ăn chăn nuôi và phân bón, bao gồm một loại enzym thực vật và bột than tre trộn với nguyên liệu thô bột tre được lên men bằng axit lactic làm nguyên liệu chính. Tài liệu patent 7 bộc lộ phương pháp sản xuất chiết xuất tre được sử dụng làm chất chống vi khuẩn và chất chống oxy hóa. Tài liệu patent 8 bộc lộ chất phụ gia thức ăn chống vi khuẩn bao gồm tre hoặc thành phần chiết xuất của cỏ tre Salsa.

Danh sách liệt kê

Tài liệu patent

Tài liệu patent 1: Patent Nhật Bản số 2524944

Tài liệu patent 2: Patent Nhật Bản số 5357459

Tài liệu patent 3: Công bố sáng chế Nhật số 2014-64564

Tài liệu patent 4: Công bố sáng chế Nhật số 2014-64565

Tài liệu patent 5: Công bố sáng chế Nhật số 2007-161604

Tài liệu patent 6: Công bố sáng chế Nhật số 2010-029110

Tài liệu patent 7: Công bố sáng chế Nhật số 2006-116433

Tài liệu patent 8: Công bố sáng chế Nhật số 2005-151928

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Nhiều ứng dụng mới của tre như được mô tả ở trên đã được đề xuất, và các ứng dụng dựa trên các chức năng mới mà nâng cao giá trị của cây tre được mong đợi, để nâng cao hơn nữa việc sử dụng của cây tre.

Sáng chế đã được hình thành theo quan điểm của các điểm trên, và mục đích của nó là đề xuất một ứng dụng mới của tre dựa trên các chức năng mới.

Hơn nữa, mục đích khác của sáng chế là đề xuất một ứng dụng mới của tre dựa trên công nghệ liên quan đến bột tre được lên men lactic, đã được đề xuất bởi tác giả sáng chế.

Giải quyết vấn đề

Tác giả sáng chế đã khám phá ra rằng chất chiết có hoạt tính kích thích miễn dịch có thể thu được bằng cách cho sản phẩm tre đã lên men thu được bằng cách lên men tre với vi khuẩn axit lactic vào quá trình chiết nước nóng, và vì vậy hoàn thành sáng chế. Do đó, phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men của sáng chế, mà giải quyết được những vấn đề nêu trên, bao gồm bước nghiền là nghiền tre để thu được bột tre, bước lên men là lên men bột tre với vi khuẩn axit lactic để thu được sản phẩm tre được lên men, và bước chiết là cho sản phẩm tre đã lên men vào quá trình chiết nước nóng để thu được chất chiết. Với phương pháp này, chất chiết từ tre được lên men có hoạt tính kích thích miễn dịch có thể thu được dễ dàng. Bột tre thu được bằng cách nghiền tre được sử dụng làm nguyên liệu thô cho quá trình lên men, để cho diện tích bề mặt mà vi sinh vật đến tiếp xúc tăng lên, cũng như là các sacarit, các axit amin, các vitamin và các chất tương tự chứa bên trong các tế bào được rửa giải vào trong bột tre là kết quả của quá trình nghiền, vi khuẩn axit lactic cư trú trong nhu mô giống như cấu trúc hình tổ ong và các nhu mô tương tự cũng được phân tán trong bột tre, và do đó vi khuẩn axit lactic phát triển hiệu quả để thúc đẩy quá trình lên men. Hơn nữa, chất chiết từ tre được lên men có hoạt tính kích thích miễn dịch thu được bằng cách cho sản phẩm tre đã lên men vào quá trình chiết nước nóng, để cho chất chiết có mức độ an toàn cao và có thể áp dụng được mà không lo lắng về thực phẩm, đồ uống, mỹ phẩm và dược phẩm, cũng như là các sản phẩm khác bao gồm, ví dụ thức ăn chăn nuôi, phụ gia nuôi trồng thủy sản hoặc các chế phẩm nông nghiệp.

Ngoài ra, phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men của sáng chế tốt hơn còn bao gồm bước tạo thành kết tủa bằng cách bổ sung rượu vào chất chiết hoặc dung dịch cô đặc của nó để thu được kết tủa. Theo đó, thu được chất chiết từ tre được lên men có hoạt tính kích thích miễn dịch được cải thiện.

Hơn nữa, trong bước tạo thành kết tủa ở trên, rượu tốt hơn là được bổ sung sao cho rượu có nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 60% khối lượng đến 80% khối lượng. Do

đó, nồng độ thích hợp của rượu bổ sung vào để tạo thành kết tủa được lựa chọn.

Ngoài ra, trong bước chiết nêu trên, quá trình chiết nước nóng tốt hơn là được thực hiện trên sản phẩm tre đã lên men dưới điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 130°C và áp suất nằm trong khoảng từ 0,1 MPa đến 0,3 MPa. Do đó, điều kiện nhiệt độ và áp suất thích hợp được lựa chọn cho quá trình chiết nước nóng theo điểm 1 yêu cầu bảo hộ.

Hơn nữa, tre trong phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế tốt hơn là thân tre. Việc sử dụng một mình thân tre làm các vật liệu lên men dẫn đến sự tăng trưởng của vi sinh vật hoạt động và quá trình lên men nhanh. Việc sử dụng thân tre cũng tạo thuận lợi để kiểm soát độ ẩm cho quá trình lên men, và do đó ổn định trạng thái lên men.

Ngoài ra, thực phẩm để kích thích miễn dịch theo sáng chế chứa chất chiết từ tre được lên men thu được từ các bước nêu trên là thành phần hoạt chất. Thực phẩm để kích thích miễn dịch theo sáng chế có hoạt động kích hoạt các chức năng miễn dịch đặc biệt bẩm sinh, và do đó có thể hoạt hóa và tăng cường chức năng miễn dịch bẩm sinh, cụ thể là các hoạt động như bảo vệ nhanh chóng chống lại sự nhiễm vi rút, vi khuẩn hoặc các loại tương tự và tấn công chống lại các khối u ác tính thông qua cơ chế miễn dịch ở ruột, thông qua việc tiêu hóa nó như là một loại thực phẩm.

Hơn nữa, chất kích thích miễn dịch theo sáng chế chứa thành phần hoạt chất là chất chiết từ tre được lên men thu được qua các bước, theo thứ tự, bước nghiền là nghiền tre để thu được bột tre, bước lên men là lên men bột tre với vi khuẩn axit lactic để thu được sản phẩm tre đã được lên men, bước chiết là cho sản phẩm tre đã lên men vào quá trình chiết nước nóng để thu được chất chiết, và bước tạo thành kết tủa là bổ sung rượu vào chất chiết hoặc dung dịch cô đặc của nó để thu được chất kết tủa. Chất kích thích miễn dịch theo sáng chế có hoạt tính kích hoạt, đặc biệt các chức năng miễn dịch bẩm sinh. Do đó, chất kích thích miễn dịch có thể hoạt hóa và tăng cường chức năng miễn dịch bẩm sinh của cơ thể, cụ thể là các hoạt tính chẳng hạn như bảo vệ nhanh chóng chống lại sự nhiễm vi rút, vi khuẩn hoặc các loại tương tự và tấn công chống lại các khối u ác tính.

Ngoài ra, phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế tốt hơn

là bao gồm, trong bước lên men nêu trên, bước bổ sung sản phẩm nuôi cấy chứa ít nhất vi khuẩn axit lactic chủng *Weissella*. Do đó, các loài vi khuẩn thích hợp để thu được chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế được bổ sung làm chất khởi đầu, để bước lên men đòi hỏi ít thời gian hơn.

Hơn nữa, phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế bao gồm, trước bước lên men nêu trên, bước cung cấp vi khuẩn khởi đầu để thu được sản phẩm tre được lên men bằng cách lên men bột tre với vi khuẩn axit lactic, trong đó trong bước lên men này, cũng ưu tiên bổ sung sản phẩm tre được lên men thu được trong bước cung cấp vi khuẩn khởi đầu. Do đó, một vi sinh vật lên men mà đã được làm quen với quá trình lên men bột tre được bổ sung làm chất khởi đầu, để bước lên men đòi hỏi ít thời gian hơn.

Tác dụng có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, phương pháp để sản xuất chất chiết từ tre được lên men, chất kích thích miễn dịch, và thực phẩm để kích thích miễn dịch, có các tác dụng có lợi sau đây, có thể được cung cấp.

(1) Chất chiết từ tre được lên men, chất kích thích miễn dịch và thực phẩm theo sáng chế có hoạt tính kích thích miễn dịch, đặc biệt là hoạt tính kích hoạt chức năng miễn dịch bẩm sinh. Chúng cũng có hoạt tính gây ra sự sản sinh IL-12 và IFN- γ , để chúng cũng có, ví dụ, tác dụng phòng ngừa chống lại sự nhiễm vi rút hoặc vi khuẩn, tác dụng cải thiện chức năng miễn dịch bị suy giảm, và tác dụng chống lại khối u.

(2) Nguyên liệu thô được sử dụng là tre, và quá trình chiết được thực hiện bằng cách sử dụng nước hoặc rượu, để cho chất chiết từ tre được lên men, chất kích thích miễn dịch và thực phẩm theo sáng chế có mức độ an toàn cao, và do đó có thể áp dụng mà không phải lo lắng về các sản phẩm khác chẳng hạn như thực phẩm, thực phẩm chức năng, đồ uống, mỹ phẩm, dược phẩm, thức ăn chăn nuôi, phụ gia nuôi trồng thủy sản hoặc các chế phẩm nông nghiệp.

(3) Chất chiết từ tre được lên men, chất kích thích miễn dịch và thực phẩm theo sáng chế có thể thu được bằng cách lên men tre với vi khuẩn axit lactic, tiếp theo là quá trình chiết nước nóng, và do đó có thể được sản xuất tương đối đơn giản.

(4) Chất chiết từ tre được lên men, chất kích thích miễn dịch và thực phẩm theo sáng chế có thể góp phần vào việc sử dụng hiệu quả nguyên liệu tre.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: biểu đồ dòng chảy thể hiện phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men theo phương án thứ nhất của sáng chế.

Fig. 2: biểu đồ dòng chảy thể hiện phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men theo phương án thứ hai của sáng chế.

Fig. 3: biểu đồ thể hiện kết quả đo hoạt tính chức năng miễn dịch của chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế trong ví dụ 5.

Fig. 4: biểu đồ thể hiện kết quả đo hoạt tính chức năng miễn dịch của dung dịch tre được lên men lactic trong ví dụ so sánh 1.

Fig. 5: biểu đồ thể hiện kết quả đo hoạt tính chức năng miễn dịch của chất chiết từ tre được lên men trong ví dụ 8.

Fig. 6: biểu đồ thể hiện kết quả gây ra sự sản sinh IL-12 với việc sử dụng chất chiết từ tre được lên men trong ví dụ 10.

Fig. 7: biểu đồ thể hiện kết quả gây ra sự sản sinh IFN- γ với việc sử dụng chất chiết từ tre được lên men trong ví dụ 10.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Đầu tiên, phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men theo phương án thứ nhất của sáng chế được giải thích bằng cách tham khảo Fig. 1.

Như được thể hiện trong Fig. 1, phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men P1 theo sáng chế bao gồm, một cách tóm tắt, bước S0 là cung cấp tre dưới dạng nguyên liệu thô, bước nghiền S1 là nghiền tre để thu được bột tre, bước lên men S2 là lên men bột tre để thu được sản phẩm tre đã lên men, và bước chiết nước nóng S3 là cho sản phẩm tre đã lên

men vào quá trình chiết nước nóng.

Cung cấp tre

Đầu tiên, bước S0 cung cấp tre được chỉ ra trong Fig. 1 được giải thích. Các ví dụ về tre được sử dụng làm nguyên liệu thô cho chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế bao gồm phạm vi rộng các cây họ hòa thảo thường được gọi là tre và cỏ tre. Các ví dụ cụ thể bao gồm, nhưng không giới hạn đặc biệt bởi, tre moso (*Phyllostachys heterocycla* f. *pubescence*), tre có môi nổi dài (*Phyllostachys bambusoides*), tre henon (*Phyllostachys nigra*), tre thân vuông (*Tetragonocalamus quadrangularis*), tre simon (*Pleioblastus Simonii*), tre lá hình mũi tên (*Pseudosasa japonica*) và cỏ tre kuma (*Sasa veitchii*). Tre moso là loại thích hợp để sử dụng. Tre có thể được sử dụng nguyên vẹn làm tre thô, sao cho tre được cắt có thể được sử dụng trực tiếp để sản xuất chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế mà không cần bước xử lý trước bất kỳ và các bước tương tự khác, ngoại trừ việc rửa trôi đất và các chất tương tự bám trên thân tre. Tre thô được nghiền thành bột hoặc cắt thành lát mỏng, để cho vi khuẩn axit lactic tồn tại bên trong thân tre đặc biệt là bên trong các nhu mô hình tổ ong mịn được tiếp xúc và phân tán, và sau đó quá trình lên men được thực hiện bởi vi khuẩn axit lactic bắt nguồn từ tre. Lá chẳng hạn lá của cỏ tre trong số các cây tre rất giàu các chất kháng khuẩn, và rất có thể ức chế quá trình lên men nhờ vi khuẩn axit lactic trong bước lên men S2 được mô tả sau đây. Vì vậy, tốt hơn là được cắt ra và chỉ thân cây được sử dụng trong các bước tiếp theo.

Nghiền

Tiếp theo, bước nghiền S1 là nghiền tre. Phương pháp để nghiền tre có thể là phương pháp bất kỳ, miễn là tre có thể được nghiền nhỏ và không giới hạn đặc biệt. Ví dụ, máy nghiền tre được cung cấp một lưỡi dao quay được kích hoạt khi mặt cuối của (các) ống tre thô tiếp xúc với lưỡi dao có thể được sử dụng. Với máy nghiền tre loại này, ống tre thô được cắt liên tục theo hướng gần như song song với mặt cuối của ống tre thô để nghiền tre thô theo cách đó thành bột tre ở kích cỡ được xác định trước. Tre được nghiền theo cách sao cho các mặt cuối ống tre thô được cạo gọt bằng lưỡi dao quay, để cho rất nhiều vi khuẩn axit lactic tồn tại trong nhu mô hoặc các vỏ thớ của thân tre được tiếp xúc để thúc đẩy quá trình

lên men trong bước lên men S2 sau đây. Hơn nữa, tre được nghiền, để cho các vách tế bào bị phá vỡ và các sacarit chẳng hạn glucoza, các axit amin, và các vitamin chứa trong các tế bào cũng được phân tán bên trong bột, và do đó nhu cầu dinh dưỡng của vi khuẩn axit lactic được đáp ứng và quá trình lên men được thực hiện hiệu quả trong bước lên men S2.

Kích thước hạt của bột tre không bị giới hạn đặc biệt. Vì kích thước hạt quá nhỏ khiến cho khó xử lý, và kích thước hạt quá lớn làm giảm tốc độ lên men, kích thước hạt tốt hơn nằm trong khoảng từ 50 μ m đến 1mm, và tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 200 μ m đến 600 μ m. Hơn nữa, bột tre thu được bởi quá trình nghiền tốt hơn là được đưa vào trong một thiết bị loại bỏ kim loại để loại bỏ bằng cách hấp phụ vật chất lạ sinh ra từ lưới dao quay với cạnh mép của máy nghiền tre, ví dụ. Hơn nữa, bột tre thu được bằng quá trình nghiền có thể được đưa vào thiết bị sàng, theo cách đó làm cho phạm vi kích thước hạt của bột tre thu được bằng nhau, để loại bỏ các mảnh không được cạo gọt đến không được nghiền trong bước nghiền S1.

Lên men

Tiếp theo, bước lên men S2 được giải thích. Bột tre được lên men bởi vi khuẩn axit lactic bắt nguồn từ tre. Cụ thể, ví dụ, bột tre thu được bằng bước nghiền S1 nêu trên được bao gói trong một bình lên men, chẳng hạn túi lên men (ví dụ, túi nhựa trong suốt) với một lượng được xác định trước, không khí bên trong túi lên men được loại bỏ nhiều nhất có thể, miệng túi lên men được bịt kín để cho phép môi trường bên trong túi ở trạng thái gần như kỵ khí. Túi lên men được bao phủ bằng một tấm không lọt sáng chẳng hạn một tấm thảm, và sau đó để yên trong khoảng 5 đến 20 ngày dưới môi trường nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 30°C, để cho sản phẩm bột tre được lên men lactic có thể thu được. Trạng thái lên men có thể được biết dựa trên độ pH của bột tre. Cụ thể, axit lactic được sinh ra trong bột tre do quá trình lên men lactic, và sau đó bột tre có độ pH axit. Sau khi bột tre (40g) được bổ sung vào 100mL nước đã tinh chế, dung dịch được khuấy trong 5 phút và sau đó để yên trong 2 phút. Khi độ pH của dịch lọc thu được nhờ quá trình lọc bằng giấy lọc đạt 4,3 hoặc nhỏ hơn, điều này được xác định để chỉ ra quá trình lên men đầy đủ, và do đó bước lên men S2 có thể được hoàn tất.

Sản phẩm tre được lên men trong bước lên men S2 được phân tích vi sinh bằng phương pháp điện di gel gradient biến tính (phương pháp DGGE). Kết quả là, đã khẳng định được rằng ở trạng thái lên men ban đầu, vi khuẩn axit lactic của chủng *Leuconostoc* và chủng *Weissella* được quan sát thấy chủ yếu, và, trong trường hợp sản phẩm tre được lên men sau khi hoàn tất quá trình lên men, vi khuẩn axit lactic của chủng *Weissella* đã chiếm ưu thế hơn các vi sinh vật. Dựa vào kết quả này, sản phẩm nuôi cấy chứa vi khuẩn axit lactic của chủng *Weissella* được ưu tiên sử dụng làm chất khởi đầu trong bước lên men S2. Theo đó, vi khuẩn axit lactic của chủng *Weissella* được sử dụng làm các loài vi sinh vật chiếm ưu thế trong bột tre để thúc đẩy nhanh quá trình lên men, để cho số ngày lên men trong bước lên men S2 có thể giảm xuống bằng khoảng 30% đến khoảng 3 đến 15 ngày. Hơn nữa, sự thay đổi số lượng vi sinh vật hoặc vi khuẩn phụ thuộc vào sự dao động nhiệt độ, và hàm lượng nước, loại tre và các loại tương tự như tre, tuy nhiên, một sản phẩm tre được lên men ổn định có thể thu được quanh năm nhờ việc sử dụng chất khởi đầu này. Về chất khởi đầu, chất khởi đầu chứa vi khuẩn axit lactic của chủng *Weissella* được nuôi cấy riêng biệt trong môi trường chất lỏng được ưu tiên bổ sung ở nồng độ 0,5mL đến 5mL trên mỗi kg bột tre.

Ngoài ra, trong bước lên men S2, sản phẩm tre được lên men thu được bằng cách lên men bột tre trước cũng được ưu tiên sử dụng làm chất khởi đầu. Như đã mô tả ở trên, bước cung cấp vi khuẩn khởi đầu được cung cấp trước, và sau đó thu được sản phẩm tre lên men được sử dụng làm chất khởi đầu, để cho chủng *Weissella* là các loài chiếm ưu thế chứa trong sản phẩm tre được lên men thúc đẩy quá trình lên men của bột tre mới ngay sau bước nghiền S1, và số ngày để lên men trong bước lên men S2 có thể giảm xuống bằng khoảng 30% đến khoảng 3 đến 15 ngày. Hơn nữa, việc sử dụng chất khởi đầu này cho phép thu được sản phẩm tre được lên men bền không phụ thuộc vào điều kiện khí hậu và loại tre. Khi sản phẩm tre lên men được cung cấp ở trên được sử dụng làm chất khởi đầu theo cách này, sản phẩm này tốt hơn là được bổ sung ở nồng độ 5g đến 20g trên mỗi kg bột tre mới. Hơn nữa, cũng hiệu quả khi sử dụng một phần của sản phẩm tre lên men thu được trong bước lên men S2 này làm chất khởi đầu cho bước lên men tiếp theo.

Ngoài ra, quá trình lên men trong bước lên men S2 tốt hơn là được thực hiện dưới điều kiện chân không thấp hoặc trung bình, hoặc dưới khí quyển trơ chẳng hạn khí nitơ.

Điều này ức chế sự phát triển của men chẳng hạn Hansenula hoặc Pichia trong bột tre, cho phép ngăn ngừa sự tạo thành etyl axetat từ axit axetic và etanol được sinh ra bởi men.

Quá trình chiết nước nóng

Tiếp theo, bước chiết nước nóng S3 được giải thích. Trong bước chiết nước nóng S3, sản phẩm tre lên men thu được trong bước lên men S2 được đưa vào chiết nước nóng để thu được chất chiết từ tre được lên men P1. Ví dụ về phương pháp chiết nước nóng bao gồm chiết nóng bằng dòng hồi lưu và chiết nước nóng tăng áp bằng cách sử dụng thiết bị nồi hấp hoặc phương pháp tương tự. Cụ thể, ví dụ, sản phẩm tre lên men và nước được bổ sung vào bình phản ứng, và sau đó đưa vào để đun nóng dưới dòng hồi lưu hoặc tương tự trong một thời gian được xác định trước để chiết chất chiết từ tre được lên men. Nước thường được bổ sung với một lượng nằm trong khoảng từ 4 đến 15 lít và tốt hơn nữa là từ 4 đến 10 lít trên mỗi kg sản phẩm tre lên men. Nước được sử dụng làm dung môi chiết, và thành phần khác có thể cũng được chứa trong đó, miễn là nó không cản trở hiệu quả chiết, và không làm ảnh hưởng đến hoạt tính của chất chiết từ tre được lên men thu được từ đó. Nhiệt độ chiết tốt hơn là 80°C hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 80°C đến 130°C, và đặc biệt tốt hơn là trong khoảng từ 100°C đến 121°C. Việc chiết được thực hiện dưới áp suất khí quyển hoặc dưới sự điều áp. Áp suất của điều kiện điều áp tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 MPa đến 0,5 MPa, và tốt hơn nữa là từ 0,1 MPa đến 0,3 MPa. Thời gian chiết tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 phút đến 5 giờ, và tốt hơn nữa là trong khoảng từ 20 phút đến 2 giờ. Sau khi chiết nước nóng, chất chiết từ tre được lên men P1 thu được bằng cách loại bỏ chất cặn. Ví dụ về chất chiết từ tre được lên men P1 theo sáng chế bao gồm, chính chất chiết từ tre được lên men P1 trong bước chiết nước nóng S3, dung dịch cô đặc thu được bằng cách cô đặc chất chiết từ tre được lên men P1 bởi quá trình cô đặc chân không hoặc tương tự, và sản phẩm rắn và/hoặc dạng bột thu được bằng cách cho chất chiết từ tre được lên men P1 vào xử lý sấy khô chẳng hạn sấy khô lạnh.

Tiếp theo, phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men theo phương án thứ hai của sáng chế được giải thích bằng cách tham khảo Fig. 2.

Như được chỉ ra trong Fig. 2, phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men P2

theo sáng chế bao gồm, một cách vắn tắt, bước S0 là cung cấp tre dưới dạng nguyên liệu thô, bước nghiền S1 là nghiền tre để thu được bột tre, bước lên men S2 là lên men bột tre để thu được sản phẩm tre lên men, bước chiết S3 là cho bột tre lên men vào quá trình chiết nước nóng, và bước tạo thành kết tủa S4 là thu được chất kết tủa từ việc chiết nước nóng. Trong các bước từ S0 đến S4 này, bước cung cấp tre S0, bước nghiền S1, bước lên men S2 và bước chiết nước nóng S3 tương tự với các bước từ S0 đến S3 trong phương án đầu tiên ở trên, tương ứng, và hoạt động và hiệu quả của nó là như nhau. Do đó, phần giải thích các bước này được bỏ qua.

Tạo kết tủa

Bước tạo kết tủa S4 được giải thích. Bước tạo kết tủa S4 bao gồm việc bổ sung rượu vào chất chiết thu được trong bước chiết nước nóng S3 để tạo thành chất kết tủa, và sau đó thu hồi chất kết tủa để thu được chất chiết từ tre được lên men P2. Ví dụ về rượu được sử dụng ở đây bao gồm etanol và isopropanol, và etanol được ưu tiên trên quan điểm về độ an toàn tốt. Rượu có thể được bổ sung với lượng và nồng độ sao cho tạo thành chất kết tủa không tan trong dịch chiết. Để tăng tốc hiệu quả sự tạo thành chất kết tủa, cụ thể, rượu được bổ sung sao cho rượu có nồng độ cuối cùng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50% khối lượng đến 85% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 60% khối lượng đến 80% khối lượng, và đặc biệt tốt hơn là từ 65% khối lượng đến 75% khối lượng trong dung dịch hỗn hợp của chất chiết và rượu. Hơn nữa, theo quan điểm về khả năng làm giảm lượng rượu bổ sung vào chất chiết, tốt hơn là chất chiết được cô đặc chân không hoặc tương tự trước khi bổ sung rượu để thu được một dung dịch cô đặc. Trong trường hợp này, yếu tố nồng độ đối với chất chiết khác nhau phụ thuộc vào lượng nước được bổ sung vào sản phẩm tre lên men trong bước chiết nước nóng S3, và chất chiết tốt hơn được cô đặc từ 3 đến 20 lần, và tốt hơn nữa là được cô đặc từ 5 đến 15 lần. Rượu được bổ sung với một lượng được xác định trước vào chất chiết nước nóng hoặc dung dịch cô đặc của nó, để cho thành phần có hoạt tính kích thích miễn dịch chứa trong chất chiết tạo thành chất kết tủa một cách chọn lọc, các thành phần không sử dụng được loại bỏ, và sau đó thu được chất chiết từ tre được lên men P2 được tinh chế. Chất kết tủa thu được là chất chiết từ tre được lên men P2 được thu hồi bằng cách tách lỏng-rắn chẳng hạn lọc hoặc quay ly tâm. Chất chiết từ tre được lên men P2 tiếp theo được sấy khô và

sau đó được bảo quản dưới dạng sản phẩm rắn và/hoặc dạng bột.

Chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế có hoạt tính kích thích miễn dịch. Khái niệm "hoạt tính kích thích miễn dịch" trong sáng chế đề cập đến hoạt tính cải thiện cả hai chức năng, miễn dịch tự nhiên và miễn dịch thu nhận được. Chất kích thích miễn dịch chứa chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế như là thành phần hoạt tính đặc biệt có hoạt tính kích hoạt chức năng miễn dịch bẩm sinh, và có hoạt tính làm giảm sự sản sinh IL-12 và IFN- γ . Do đó, chức năng miễn dịch bẩm sinh, các tác động cụ thể chẳng hạn bảo vệ nhanh chóng chống lại sự lây nhiễm các tác nhân gây bệnh và tấn công chống lại các khối u ác tính có thể được kích hoạt và tăng cường. Hơn nữa, chất kích thích miễn dịch cũng có hoạt tính kích hoạt phản ứng miễn dịch khi chức năng miễn dịch bị giảm do các nguyên nhân chẳng hạn sự lão hóa, căng thẳng và mệt mỏi, hoặc hoạt tính duy trì ổn định chức năng miễn dịch ngay cả khi tiếp xúc với các nguyên nhân chẳng hạn sự lão hóa, căng thẳng và mệt mỏi. Hơn nữa, chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế có hoạt tính làm giảm sự sản sinh IL-12 và IFN- γ , và do đó chất chiết được mong đợi là có hoạt tính không chỉ kích hoạt các tế bào Th1 để tăng cường sự miễn dịch qua trung gian tế bào, mà còn ức chế sự miễn dịch thể dịch thông qua sự miễn dịch qua trung gian tế bào được tăng cường để ngăn chặn phản ứng dị ứng.

Chất kích thích miễn dịch theo sáng chế có thể được sử dụng làm thực phẩm, đồ uống, mỹ phẩm, dược mỹ phẩm và dược phẩm, cũng như là các sản phẩm khác bao gồm thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia trong nuôi trồng thủy sản hoặc các chế phẩm nông nghiệp, ví dụ. Chất chiết từ tre được lên men dùng như một thành phần hoạt tính kết quả từ việc khám phá các chức năng mới của tre như măng non đã được sử dụng làm thực phẩm, có độ an toàn cao và có thể hấp thụ hàng ngày. Do đó, chất chiết từ tre được lên men tốt hơn là được sử dụng như một thành phần của thực phẩm hoặc đồ uống. Thực phẩm để kích thích miễn dịch chứa chất chiết từ tre được lên men là thành phần hoạt tính có thể được sử dụng ở tất cả các dạng bao gồm các dạng chất bổ sung chẳng hạn như viên nén, công thức đóng gói, hạt và si-rô, đồ uống, đồ ngọt, bánh mì, cháo, ngũ cốc, mì sợi, thạch, súp, các sản phẩm từ sữa, chất tạo hương, và dầu có thể ăn được. Ngoài ra, khi được sử dụng làm thực phẩm, các thành phần hoạt tính khác, các vitamin, và các chất dinh dưỡng chẳng hạn chất khoáng hoặc axit amin có thể cũng được sử dụng trong các hỗn hợp khác nhau, miễn là chúng không ảnh hưởng

đến hiệu quả của thành phần hoạt tính theo sáng chế. Ví dụ về thực phẩm được phát triển từ chế phẩm theo sáng chế bao gồm các chất bổ sung, thực phẩm cho sức khỏe, thực phẩm chức năng, và các loại thực phẩm dùng cho các mục đích y tế cụ thể. Thành phần thực phẩm có thể cũng được sử dụng cho động vật không phải người (ví dụ, thú cưng, vật nuôi và động vật thủy sản), và trong trường hợp này có thể được sử dụng ở dạng thức ăn chăn nuôi, thực phẩm cho thú cưng, chất bổ sung cho động vật, đồ uống cho động vật hoặc tương tự.

Khi chất kích thích miễn dịch theo sáng chế được sử dụng làm dược phẩm hoặc dược mỹ phẩm, tác nhân có thể được điều chế thành các dạng khác nhau bằng các phương pháp sử dụng thông thường. Trong trường hợp này, chất kích thích miễn dịch có thể được tạo thành công thức bằng cách sử dụng chất mang dược dụng, chất pha loãng, chất làm trơn, chất phân tán, chất chống ăn mòn, chất đệm, dung môi, chất kéo dài, chất bảo quản, chất tạo hương, chất ổn định hóa hoặc các chất tương tự cho các công thức chung, và một tá dược chấp nhận được như là tá dược cho các sản phẩm dược. Hơn nữa, để cải thiện tính sinh khả dụng và tính ổn định, một hệ thống phân phối thuốc liên quan đến kỹ thuật chế tạo chẳng hạn bao gồm việc sử dụng nôi con capxon, công thức liposom, nghiền thành bột mịn, xyclodextrin hoặc tương tự cũng có thể được sử dụng. Ví dụ về dạng liều lượng có thể bao gồm, nhưng không giới hạn đặc biệt bởi, viên nén, hạt, công thức đóng gói và si rô.

Về dược phẩm, thực phẩm hoặc dạng tương tự chứa chất kích thích miễn dịch theo sáng chế, lượng hấp thu hàng ngày của chất chiết từ tre được lên men tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1mg đến 10g, và tốt hơn nữa là từ 1mg đến 1g theo khối lượng khô.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ theo sáng chế được mô tả dưới đây, nhưng sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1

Sản xuất chất chiết từ tre được lên men (1)

Tre moso với chiều cao thân khoảng 4m được cắt ra, lá được cắt bỏ bằng một chiếc

riều nhỏ để lại một mình thân cây, và sau đó thân cây được rửa bằng nước để loại bỏ đất, bụi bẩn và các chất tương tự. Các thân tre moso này với chiều dài khoảng 4m được nghiền nhỏ bằng cách sử dụng máy nghiền tre (sản phẩm của Marudai Ironworks Co., Ltd., model: PA-Z), theo cách đó thu được khoảng 10kg bột tre với kích cỡ 500 μ m hoặc nhỏ hơn. Tiếp theo, 10kg bột tre đã nghiền nhỏ được bổ sung vào một túi nhựa với dung tích 15kg, cạnh bên ngoài của túi nhựa được ấn để loại bỏ không khí bên trong túi càng nhiều càng tốt, và sau đó miệng túi được đóng kín. Túi nhựa được phủ bằng một tấm không lọt sáng, và sau đó để yên dưới điều kiện môi trường ở 25°C trong 14 ngày. Sau 14 ngày, một phần sản phẩm tre lên men được lấy ra và sau đó đưa qua phân tích vi sinh bằng phương pháp điện di gel gradient biến tính (phương pháp DGGE). Vi khuẩn axit lactic của chủng *Weissella* (*Weissella cibaria* hoặc *confusa*) được xác định là để thống trị hệ vi sinh vật. Do đó sản phẩm tre lên men thu được (1kg) được bổ sung vào bình phản ứng để đun nóng hồi lưu, 5L nước được rót vào, và sau đó quá trình chiết nước nóng được thực hiện bằng cách đun nóng dưới dòng hồi lưu. Thời gian phản ứng được thiết lập đến 60 phút. Sau khi hoàn thành phản ứng, hỗn hợp bên trong bình phản ứng được lọc để thu hồi phần nước lọc (khoảng 4,5L) là chất chiết xuất. Dung dịch nước etanol 15% (6L) được bổ sung vào 4,5L chất chiết xuất, thành phần không tan thu được được kết tủa, và do đó chất kết tủa được thu hồi. Chất kết tủa thu được được sấy khô lạnh, để thu được khoảng 30g chất chiết từ tre được lên men (1).

Ví dụ 2

Sản xuất chất chiết từ tre được lên men (2)

Tre moso với chiều cao thân khoảng 4m được cắt ra, lá được cắt bỏ bằng một chiếc rìu nhỏ để lại một mình thân cây, và sau đó thân cây được rửa bằng nước để loại bỏ đất, bụi bẩn và các chất tương tự. Các thân tre moso này với chiều dài khoảng 4m được nghiền nhỏ bằng cách sử dụng máy nghiền tre (sản phẩm của Marudai Ironworks Co., Ltd., model: PA-Z), theo cách đó thu được khoảng 10kg bột tre với kích cỡ 500 μ m hoặc nhỏ hơn. Sản phẩm tre lên men (100g) thu được trong ví dụ 1 được bổ sung vào và được trộn lẫn với 10kg bột tre. Tiếp theo, bột tre được bổ sung vào một túi nhựa với dung tích 15kg, cạnh bên ngoài của túi nhựa được ấn để loại bỏ không khí bên trong túi càng nhiều càng tốt, và sau đó miệng túi

được đóng kín. Túi nhựa được phủ bằng một tấm không lọt sáng, và sau đó để yên dưới điều kiện môi trường ở 25°C trong 9 ngày. Do đó sản phẩm tre lên men thu được (1kg) được bổ sung vào bình phản ứng để đun nóng hồi lưu, 5L nước được rót vào, và sau đó quá trình chiết nước nóng được thực hiện bằng cách đun nóng dưới dòng hồi lưu. Thời gian phản ứng được thiết lập đến 60 phút. Sau khi hoàn thành phản ứng, hỗn hợp bên trong bình phản ứng được lọc để thu hồi phần nước lọc (khoảng 4,5L) là chất chiết xuất. Dung dịch nước etanol 15% (6L) được bổ sung vào 4,5L chất chiết xuất, thành phần không tan thu được được kết tủa, và do đó chất kết tủa được thu hồi. Chất kết tủa thu được được sấy khô lạnh, để thu được khoảng 30 g chất chiết từ tre được lên men (2).

Ví dụ 3

Sản xuất chất chiết từ tre được lên men (3) cho thử nghiệm hoạt tính chức năng miễn dịch

Sản phẩm tre lên men thu được trong ví dụ 1 được tạo huyền phù trong dung dịch nước muối sinh lý vô trùng (NaCl 0,9%) để tạo ra nồng độ mẫu bằng 100 mg/mL. Chất huyền phù được xử lý trong một nồi hấp ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút để thực hiện quá trình chiết nước nóng sản phẩm tre lên men. Dịch chiết nước nóng được quay ly tâm để thu hồi chất nổi trên bề mặt, theo cách đó thu được chất chiết từ tre được lên men (3). Chất nổi trên bề mặt này được sử dụng để thử nghiệm sự kích thích miễn dịch. Hơn nữa, 1mL chất nổi trên bề mặt thu thập được được làm bay hơi đến khô bằng cách sử dụng một thiết bị bay hơi ly tâm, và sau đó nồng độ của chất chiết từ tre được lên men (3) trong chất nổi trên bề mặt được tính toán dựa trên khối lượng khô thu được.

Ví dụ 4

Sản xuất chất chiết từ tre được lên men (4) để thử nghiệm hoạt tính chức năng miễn dịch

Sản phẩm tre lên men thu được trong ví dụ 2 được tạo huyền phù trong dung dịch nước muối sinh lý vô trùng (NaCl 0,9%) để tạo ra nồng độ mẫu bằng 100 mg/mL. Chất huyền phù được xử lý trong một nồi hấp ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút để thực hiện quá trình chiết nước nóng sản phẩm tre lên men. Dịch chiết nước nóng được quay ly tâm để thu hồi chất nổi trên bề mặt, theo cách đó thu được chất chiết từ tre được lên men (4). Chất nổi

trên bề mặt này được sử dụng để thử nghiệm sự kích thích miễn dịch. Hơn nữa, 1mL chất nổi trên bề mặt thu thập được được làm bay hơi đến khô bằng cách sử dụng một thiết bị bay hơi ly tâm, và sau đó nồng độ của chất chiết từ tre được lên men (4) trong chất nổi trên bề mặt được tính toán dựa trên khối lượng khô thu được.

Ví dụ 5

Thử nghiệm hoạt tính chức năng miễn dịch

Về thử nghiệm hoạt tính chức năng miễn dịch, thử nghiệm hoạt tính thúc đẩy miễn dịch tự nhiên được thực hiện bằng cách sử dụng sự co cơ của con tằm như một vật chỉ thị. Cụ thể, phương pháp thử nghiệm này dựa trên những khám phá sao cho khi mẫu thử nghiệm được dùng cho ấu trùng holometabola chẳng hạn con tằm, sự co cơ đột ngột xảy ra nếu một chất dẫn truyền thần kinh có mặt trong mẫu thử, tuy nhiên, một chất có hoạt tính kích hoạt chức năng miễn dịch bẩm sinh được dùng cho ấu trùng holometabola, sự co cơ chậm (sự co cơ tiến triển chậm) mất khoảng 10 phút để hoàn thành quá trình diễn ra. Thử nghiệm được thực hiện như sau bằng cách sử dụng chất chiết từ tre được lên men (3) thu được trong ví dụ 3 và chất chiết từ tre được lên men (4) thu được trong ví dụ 4 làm mẫu thử nghiệm.

Sự co cơ tiến triển chậm của con tằm được đo như sau (xem Hamamoto H., Kamimura M., Sekimizu K., J. Biol. Chem., 2008, 283(4), pp,2185-91). Mẫu thử nghiệm (50 μ L) được tiêm theo đường thể khoang vào một mẫu cơ đã bị cắt rời đầu của con tằm 5 ngày tuổi, chiều dài cơ thể của con tằm được đo, và sau đó giá trị lớn nhất của giá trị co cơ ($\text{Giá trị co, giá trị } C = ([\text{chiều dài trước khi co (trước khi tiêm)}] - [\text{chiều dài sau khi co (sau khi tiêm)}]) / [\text{chiều dài trước khi co}]$) (khoảng 10 phút sau đó) được tìm thấy. Các mẫu thử được pha loãng bằng cách pha loãng theo chuỗi nối tiếp đến các nồng độ được xác định trước bằng nước muối sinh lý 0,9% như được thể hiện trong bảng 1 dưới đây. Giá trị C được đo đối với mỗi chất pha loãng. Hoạt tính co cơ tiến triển chậm trong trường hợp giá trị $C = 0,15$ được xác định là 1 đơn vị, lượng mỗi mẫu thử mà cho giá trị $C = 0,15$ được tìm thấy từ đường cong đáp ứng liều lượng thu được, và do đó hoạt độ trên mỗi mg của mẫu thử được tính toán. Hơn nữa, 50 μ L nước muối sinh lý được sử dụng làm đối chứng âm, và 0,2mL không khí được sử dụng làm đối chứng dương. Kết quả được chỉ ra trong bảng 1 dưới đây

và Fig. 2. Fig. 3(a) thể hiện kết quả của chất chiết từ tre được lên men (3), và Fig. 3(b) thể hiện kết quả của chất chiết từ tre được lên men (4).

Bảng 1

Mẫu thử nghiệm (Ví dụ)	Tỉ lệ pha loãng	Trị số cơ cơ (trị số C)	Lượng mẫu thử nghiệm (μg)
Đối chứng âm (NaCl 0,9%)	-	0,00	-
Đối chứng dương (không khí)	-	0,41	-
Chất chiết từ tre được lên men (3) (nồng độ: 15 mg/mL)	1/1	0,21	750
	1/4	0,03	190
	1/16	0,00	47
	1/64	0,00	12
Chất chiết từ tre được lên men (4) (nồng độ: 11 mg/mL)	1/1	0,17	550
	1/2	0,11	280
	1/4	0,09	140
	1/16	0,00	34

Ví dụ so sánh 1

Sản xuất dung dịch tre lên men lactic để thử nghiệm hoạt tính chức năng miễn dịch

Sản phẩm tre lên men (1kg) thu được trong ví dụ 1 được bổ sung vào một thùng nhựa có dung tích 10L, 20g bột than tre và 6g enzym papain được bổ sung và sau đó hỗn hợp được trộn lẫn. Hơn nữa, 8L nước được rót vào, một cái nắp được đậy trên thùng, và sau đó sản phẩm được để yên dưới môi trường ở nhiệt độ 25°C trong 14 ngày. Sau 14 ngày, hỗn hợp bên trong thùng được lọc để thu hồi dịch lọc (khoảng 8L) là dung dịch tre lên men lactic. Mười (10) mL dung dịch tre lên men lactic được lấy ra, pH được đo bằng giấy thử pH và sau đó được trung hòa bằng dung dịch NaOH. Hơn nữa, 1mL dung dịch tre lên men lactic được làm bay hơi đến khô bằng cách sử dụng thiết bị bay hơi ly tâm, và sau đó nồng độ của thành phần thu được trong dung dịch tre lên men lactic được tính toán dựa trên khối lượng khô.

Thử nghiệm hoạt tính chức năng miễn dịch tương tự với thử nghiệm trong ví dụ 5 được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch tre lên men lactic làm mẫu thử. Kết quả được chỉ ra trong Bảng 2 dưới đây và Fig. 4.

Bảng 2

Mẫu thử nghiệm (Ví dụ so sánh)	Tỉ lệ pha loãng	Trị số cơ cơ (trị số C)	Lượng mẫu thử (μg)
Đối chứng âm (NaCl 0,9%)	-	0,00	-
Đối chứng dương (không khí)	-	0,41	-
Dung dịch tre lên men lactic (nồng độ: 16 mg/mL)	1/1	0,01	800
	1/4	0,00	200
	1/16	0,04	50

Như được thể hiện trong Bảng 1, nồng độ của chất chiết từ tre được lên men (3) là 15 mg/mL, và nồng độ của chất chiết từ tre được lên men (4) là 11 mg/mL. Hơn nữa, hoạt tính chức năng miễn dịch của các chất chiết xuất này được đo. Các đường cong đáp ứng liều lượng quan sát thấy như thể hiện trong Fig. 3, tiết lộ rằng các chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế có hoạt tính thúc đẩy miễn dịch tự nhiên. Hoạt độ riêng của chất chiết từ tre được lên men (3) là 2,1 đơn vị/mg, và hoạt độ riêng của chất chiết từ tre được lên men (4) là 2,7 đơn vị/mg. Mặt khác, trong trường hợp của dung dịch tre lên men lactic được mô tả trong ví dụ so sánh, không quan sát thấy đường cong đáp ứng liều lượng như thể hiện trong Fig. 4, và không quan sát thấy hoạt tính thúc đẩy miễn dịch tự nhiên. Những kết quả này đã tiết lộ rằng chất chiết từ tre được lên men thu được bằng cách cho sản phẩm tre lên men vào quá trình chiết nước nóng có hoạt tính kích thích miễn dịch.

Ví dụ 6

Sản xuất chất chiết từ tre được lên men (5)

Sản phẩm tre lên men (10g) thu được trong ví dụ 1 được tạo huyền phù trong 100mL

nước muối sinh lý vô trùng (NaCl 0,9%). Chất huyền phù được xử lý trong một nồi hấp ở nhiệt độ 121°C dưới áp suất khí quyển trong thời gian từ 2 đến 20 phút để thực hiện quá trình chiết nước nóng sản phẩm tre lên men. Dịch chiết nước nóng được quay ly tâm để thu hồi chất nổi trên bề mặt và sau đó được làm bay hơi đến khô bằng cách sử dụng một thiết bị bay hơi ly tâm, để thu được 440mg chất chiết từ tre được lên men (5) dạng bột. Hơn nữa, lượng sacarit trong chất chiết từ tre được lên men (5) thu được được định lượng bằng phương pháp phenol axit sulfuric. Vì vậy, lượng sacarit được tìm thấy chiếm 7% khối lượng của chất chiết từ tre được lên men (5) (xem Bảng 4).

Ví dụ 7

Sản xuất chất chiết từ tre được lên men (6)

Sản phẩm tre lên men (10g) thu được trong ví dụ 1 được tạo huyền phù trong 100mL nước muối sinh lý vô trùng (NaCl 0,9%). Chất huyền phù được xử lý trong một nồi hấp ở nhiệt độ 121°C dưới áp suất khí quyển trong thời gian từ 2 đến 20 phút để thực hiện quá trình chiết nước nóng sản phẩm tre lên men. Dịch chiết nước nóng được quay ly tâm để thu hồi chất nổi trên bề mặt. Để thu hồi chất nổi trên bề mặt, 95% etanol được bổ sung. Etanol được bổ sung cho đến khi etanol đạt đến nồng độ cuối cùng là 68%. Chất kết tủa tạo ra được thu hồi và sau đó được sấy khô, theo cách đó thu được 27mg chất chiết từ tre được lên men dạng bột (6). Hơn nữa, lượng sacarit thu được trong chất chiết từ tre được lên men (6) được định lượng bằng phương pháp phenol axit sulfuric. Vì vậy, lượng sacarit được tìm thấy chiếm 52% khối lượng của chất chiết từ tre được lên men (6) (xem Bảng 4).

Ví dụ 8

Thử nghiệm hoạt tính chức năng miễn dịch đối với các chất chiết từ tre được lên men (5) và (6)

Thử nghiệm hoạt tính chức năng được thực hiện bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ 5 sử dụng chất chiết từ tre được lên men (5) và chất chiết từ tre được lên men (6) thu được trong ví dụ 7 và ví dụ 8 làm mẫu thử. Kết quả được chỉ ra trong Bảng 3 dưới đây và Fig. 5. Fig. 5(a) thể hiện kết quả của chất chiết từ tre được lên men (5) và Fig. 5(b) thể

hiện kết quả của chất chiết từ tre được lên men (6).

Bảng 3

Mẫu thử nghiệm (Ví dụ)	Tỉ lệ pha loãng	Giá trị cơ cơ (giá trị C)
Đối chứng âm (NaCl 0,9%)	-	0,00
Đối chứng dương (không khí)	-	0,35
Chất chiết từ tre được lên men (5) (chiết nước nóng nhờ nồi hấp)	1/1	0,26
	1/4	0,08
	1/16	0,07
	1/64	0,00
Chất chiết từ tre được lên men (6) (chiết nước nóng + kết tủa bằng etanol)	1/4	0,32
	1/16	0,23
	1/64	0,36
	1/256	0,07
	1/1024	0,04
	1/4096	0,07

Hoạt tính chức năng miễn dịch của các chất chiết từ tre được lên men thu được trong ví dụ 6 và ví dụ 7 được đo. Các đường cong đáp ứng liều lượng thể hiện trong Fig. 5 đã được quan sát thấy, bộc lộ rằng các chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế có hoạt tính thúc đẩy miễn dịch tự nhiên. Về giá trị hoạt độ riêng được tìm thấy từ các đường cong đáp ứng liều lượng này, giá trị của chất chiết từ tre được lên men (5) là 7,3 đơn vị/mg, và giá trị của chất chiết từ tre được lên men (6) mà đã trải qua bước tạo thành chất kết tủa bằng etanol là 230 đơn vị/mg (xem bảng 4). Các kết quả này thể hiện rằng các chất chiết từ tre được lên men thu được bằng cách cho các sản phẩm tre lên men vào chiết nước nóng có hoạt tính kích thích miễn dịch, thành phần có hoạt tính kích thích miễn dịch được cô đặc bởi sự hình thành kết quả bằng etanol hoặc có thể thu được theo cách chọn lọc, và chất chiết từ tre được lên men (6) trải qua bước tạo thành kết tủa tạo ra hoạt tính kích thích miễn dịch ở mức độ

cao hơn. Hơn nữa, như được thể hiện trong bảng 4 dưới đây, hàm lượng sacarit của chất chiết từ tre được lên men (6) tăng lên đến 52% khối lượng. Như đã mô tả ở trên, hoạt độ riêng tăng lên, vì hàm lượng sacarit tăng lên. Theo đó, polysacarit chứa trong chất chiết từ tre được lên men được coi là một trong những thành phần hoạt tính có hoạt tính kích thích miễn dịch.

Bảng 4

Mẫu thử nghiệm	Tổng khối lượng (mg)	Khối lượng sacarit (mg)	Phần trăm sacarit (%)	Tổng hoạt tính (đơn vị)	Hoạt độ riêng (đơn vị/mg)
Chất chiết từ tre được lên men (5) (chiết nước nóng nhờ nồi hấp)	440	31	7	3200	7,3
Chất chiết từ tre được lên men (6) (chiết nước nóng + kết tủa bằng etanol)	27	14	52	6200	230

Ví dụ 9

Sản xuất chất chiết từ tre được lên men (7)

Sản phẩm tre lên men (1kg) thu được trong ví dụ 1 được bổ sung vào bình phản ứng để đun nóng hồi lưu, 10L nước được rót vào, và sau đó quá trình chiết nước nóng được thực hiện ở nhiệt độ 100°C bằng cách gia nhiệt dưới dòng hồi lưu. Thời gian phản ứng được cài đặt đến 120 phút. Sau khi hoàn thành phản ứng, hỗn hợp trong bình phản ứng được lọc để thu hồi khoảng 9L dịch lọc. Dịch lọc được cô đặc khoảng 10 lần, để tạo ra dung dịch cô đặc. Bổ sung etanol 95% được bổ sung vào dung dịch cô đặc. Etanol được bổ sung cho đến khi etanol đạt được nồng độ cuối cùng bằng 70%. Dung dịch hỗn hợp được lọc. Do đó chất kết tủa tạo thành được thu hồi và sau đó được sấy khô, theo cách đó thu được chất chiết từ tre được lên men dạng bột (7).

Ví dụ 10

Thử nghiệm đáp ứng miễn dịch bằng cách sử dụng các tế bào lá lách ở chuột

Các tế bào lá lách được thu hồi từ chuột C57B6, và sau đó được điều chỉnh sao cho các tế bào lá lách có mặt trong môi trường chất lỏng RPMI-1640 ở nồng độ 5×10^6 tế bào/mL. Chất chiết từ tre được lên men (7) được tạo ra trong ví dụ 9 được sử dụng làm mẫu thử. Hơn nữa, vì chất chiết xuất bắt nguồn từ sản phẩm tự nhiên thường chứa LPS, có hay không sự sản sinh xytokin bởi chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế là do LPS được xác định bằng cách sử dụng lipopolysaccharit (LPS) làm mẫu để so sánh. Chất chiết từ tre được lên men (7) được bổ sung vào các tế bào lá lách ở chuột C57B6 (5×10^6 tế bào/mL) theo cách để đưa nồng độ cuối cùng bằng 2 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ và 10 $\mu\text{g/mL}$, và sau đó các tế bào được nuôi cấy trong vòng 48 giờ. Tương tự, LPS được bổ sung vào các tế bào lá lách ở chuột C57B6 (5×10^6 tế bào/mL) theo cách để đưa nồng độ cuối cùng bằng 0,1 $\mu\text{g/mL}$, và sau đó các tế bào được nuôi cấy trong vòng 48 giờ. Sau 48 giờ nuôi cấy, số lượng IL-12 (p70) và IFN- γ sản sinh ra trong môi trường được đo bằng phương pháp ELISA. Kết quả về số lượng IL-12 (p70) đã sinh ra được thể hiện trong Fig. 6, và kết quả về số lượng IFN- γ đã sinh ra được thể hiện trong Fig. 7. Như đã thể hiện trong Fig. 6 và Fig. 7, chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế được tiết lộ là gây ra sự sản sinh IL-12 và IFN- γ . Hơn nữa, các tế bào lá lách mà LPS được bổ sung vào đó được quan sát thấy là không sản sinh ra cả IL-12 và IFN- γ , gợi ý rằng sự sản sinh xytokin được gây ra bởi chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế không phải là do LPS, mà do sự hoạt động của các thành phần khác ngoài LPS có chứa trong chất chiết từ tre được lên men.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Chất chiết từ tre được lên men theo sáng chế được sử dụng làm thức ăn và đồ uống, và dược phẩm, cũng như là trong lĩnh vực thức ăn chăn nuôi hoặc nuôi trồng thủy sản.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men, bao gồm:
bước nghiền là nghiền tre để thu được bột tre,
bước lên men là lên men bột tre với vi khuẩn axit lactic để thu được sản phẩm tre đã lên men,
và
bước chiết là cho sản phẩm tre đã lên men vào quá trình chiết nước nóng, khác biệt ở chỗ quá trình chiết nước nóng được thực hiện dưới điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 130°C và áp suất nằm trong khoảng từ 0,1 MPa đến 0,3 MPa để thu được chất chiết.
2. Phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men theo điểm 1, còn bao gồm bước tạo kết tủa bằng cách bổ sung rượu vào chất chiết hoặc dung dịch cô đặc của nó để thu được chất kết tủa.
3. Phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men theo điểm 2, trong đó trong bước tạo kết tủa, rượu được bổ sung sao cho rượu nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 60% khối lượng đến 80% khối lượng.
4. Phương pháp sản xuất chất chiết từ tre được lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó tre là thân tre.
5. Thực phẩm để kích thích miễn dịch, chứa thành phần hoạt chất là chất chiết từ tre được lên men có thể thu được qua các bước, theo thứ tự, bước nghiền là nghiền tre để thu được bột tre, bước lên men là lên men bột tre với vi khuẩn axit lactic để thu được sản phẩm tre đã được lên men, và bước chiết là cho sản phẩm tre đã lên men vào quá trình chiết nước nóng, khác biệt ở chỗ quá trình chiết nước nóng được thực hiện dưới điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 130°C và áp suất nằm trong khoảng từ 0,1 MPa đến 0,3 MPa để thu được chất chiết.
6. Thực phẩm để kích thích miễn dịch theo điểm 5, chứa thành phần hoạt chất là chất chiết từ tre được lên men có thể thu được qua các bước như được xác định theo điểm 1, và ngoài ra bước tạo kết tủa là bổ sung rượu vào chất chiết hoặc dung dịch cô đặc của nó để thu được chất kết tủa.

7. Chất để kích thích miễn dịch, chứa thành phần hoạt chất là chất chiết từ tre được lên men có thể thu được qua các bước, theo thứ tự, bước nghiền là nghiền tre để thu được bột tre, bước lên men là lên men bột tre với vi khuẩn axit lactic để thu được sản phẩm tre đã được lên men, bước chiết là cho sản phẩm tre đã lên men vào quá trình chiết nước nóng để thu được chất chiết, và bước tạo kết tủa là bổ sung rượu vào chất chiết hoặc dung dịch cô đặc của nó để thu được chất kết tủa, khác biệt ở chỗ quá trình chiết nước nóng được thực hiện dưới điều kiện nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 130°C và áp suất nằm trong khoảng từ 0,1 MPa đến 0,3 MPa.

1/5

Fig. 1

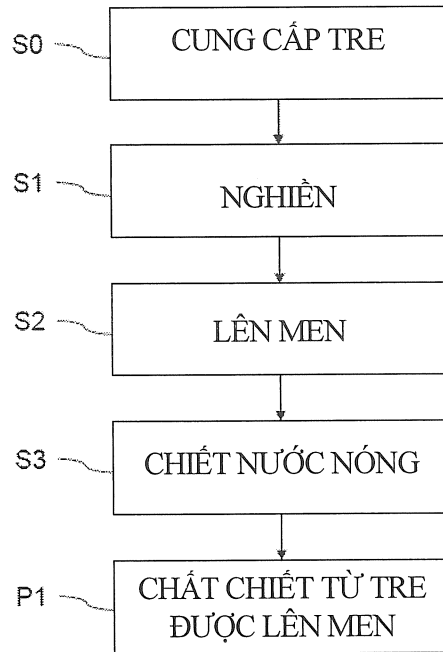


Fig. 2

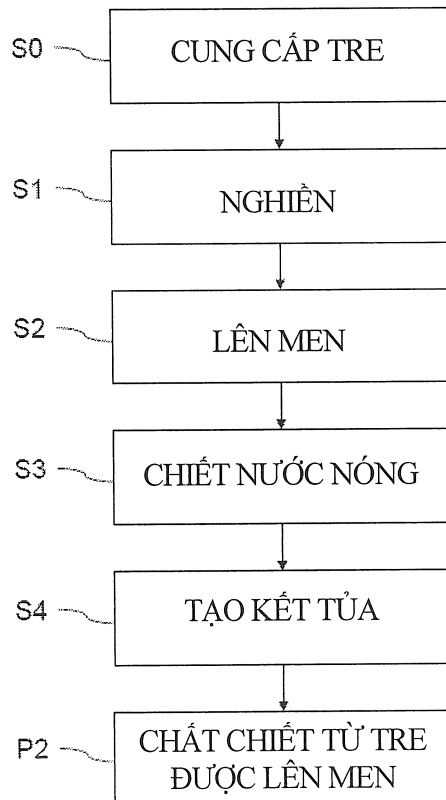
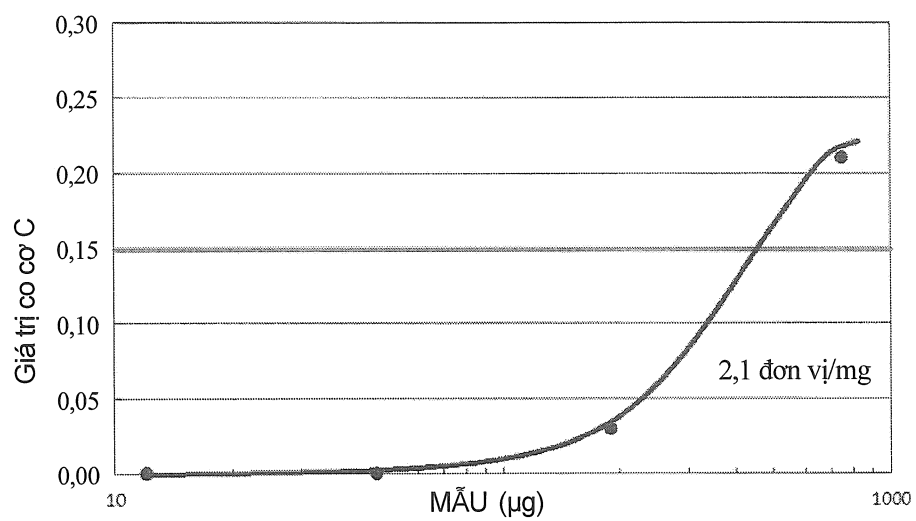


Fig. 3

(a)



(b)

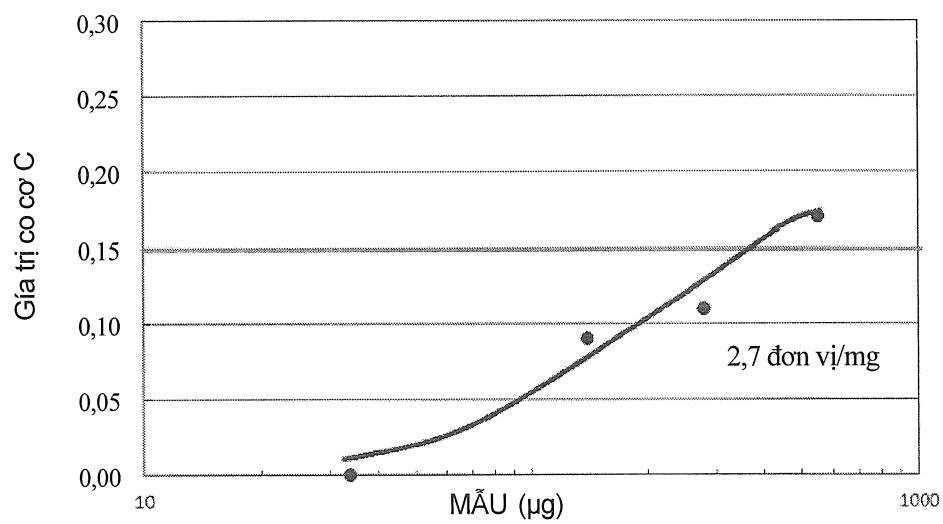


Fig. 4

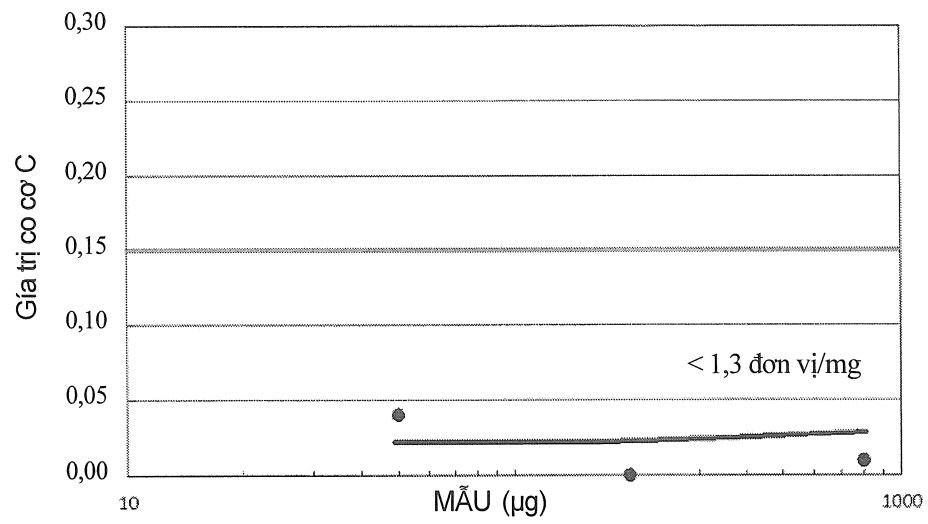
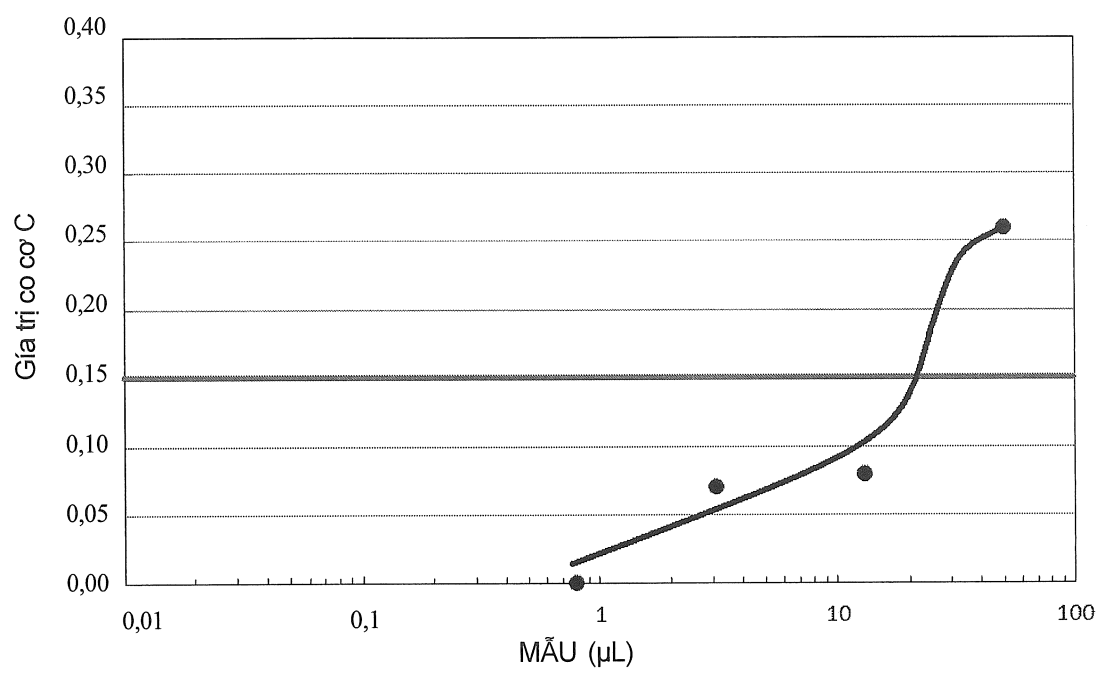


Fig. 5

(a)



(b)

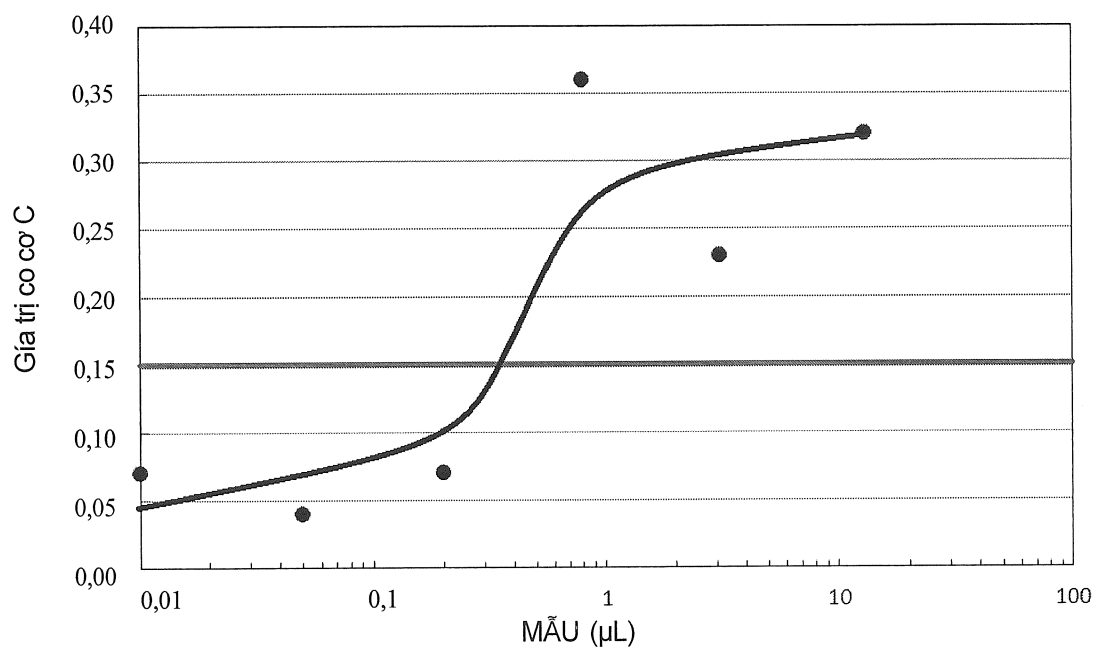


Fig. 6

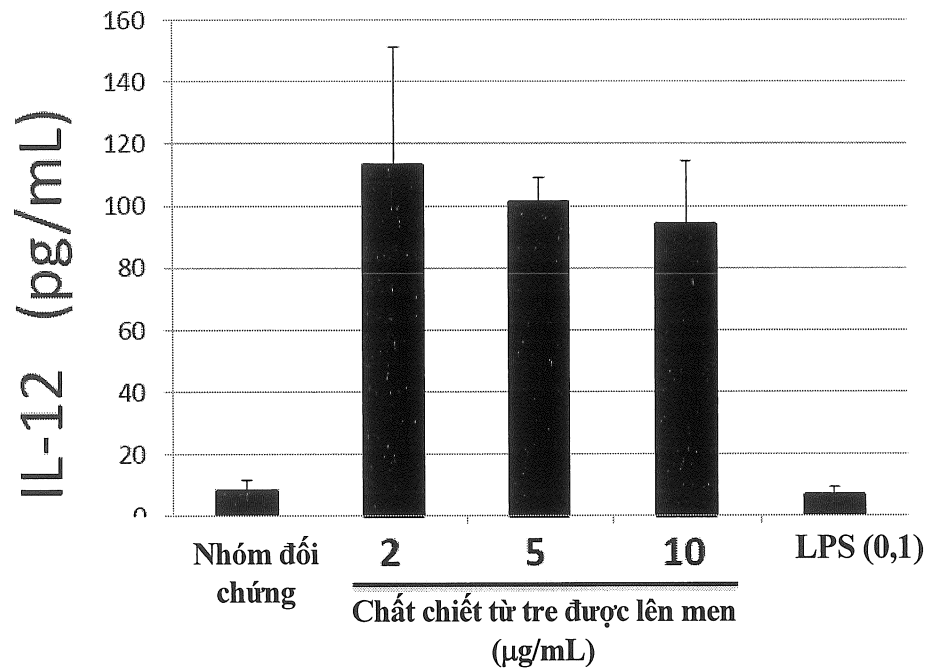


Fig. 7

