



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003427

(51)⁷ **G01N 15/00**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00136

(22) 26/04/2019

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/09/2019 378A

(73) Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Đỗ Thị Tuyên (VN); Nguyễn Thị Trung (VN); Nguyễn Đặng Nhật Minh (VN);
Nguyễn Đức Thịnh (VN).

(54) QUY TRÌNH TÍNH SẠCH HOẠT CHẤT ỨC CHẾ A-GLUCOSIDAZA TẠO SẢN PHẨM
HỖ TRỢ ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TYP 2

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tinh sạch hoạt chất ức chế α -glucosidaza tạo sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường typ 2. Cụ thể là quy trình chế tạo chế phẩm 1-deoxynojirimycin từ chủng *B. subtilis* EBL1 phân lập tại Việt Nam, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) lên men sinh tổng hợp hoạt chất; b) tinh sạch sơ bộ hoạt chất DNJ; c) tinh sạch thu hoạt chất DNJ và d) tạo sản phẩm bằng cách kết tủa trong cồn tuyệt đối.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình tinh sạch hoạt chất ức chế α -glucosidaza tạo sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường typ 2.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Enzym α -glucosidaza (EC 3.2.1.20) (α -glucoside hydrolaza, α -1,4- glucosidaza, glucohydrolaza α -D-glucoside) là một enzym thủy phân carbonhydrat ngoại phân tử (exo-typ carbohydraza) giải phóng glucosơ ở đầu không khử của cơ chất. Đây là enzym liên kết màng và có mặt ở vi sinh vật, thực vật và mô động vật. Enzym α -glucosidaza ở người nằm trong đường viền của búi ruột non có khả năng phân giải các liên kết α (1 $\rightarrow$ 4) glucosit. Enzym α -glucosidaza có thể phân giải tinh bột và disacarit thành glucosơ (Chiba., 1997). Các thuốc điều trị đái tháo đường typ 2 chủ yếu tập chung và nhóm chất có hoạt tính ức chế α -glucosidaza như: acarboza, miglitol, vogliboza, 1-deoxynojimycin.

Hoạt chất 1-deoxynojirimycin (DNJ) là hợp chất hydrocacbon có công thức cấu tạo là $C_6H_{13}NO_4$, ức chế cạnh tranh, thuận nghịch của enzym α -glucosidaza trong ruột, do tác dụng của thuốc, glucosơ ở ruột sẽ được hấp thu chậm hơn, rải rộng ra nên tránh được hiện tượng tăng đường huyết sau khi ăn. Hoạt chất DNJ có khả năng kìm hãm mạnh các men oligo-sacaridaza, disacaridaza (Schmidt et al. 1979), trehalaza (Murao and Miyata 1980) ở ruột của động vật có vú. DNJ giống như một piperidin alkanoid có khả năng ức chế men α -glucosidaza, có hiệu quả chống lại sự tăng đường huyết, ngăn cản quá trình tân tạo glucosơ tại thành ruột và gan từ đó giảm lượng glucosơ đi vào máu (Murao and Miyata 1980). Chất này được miêu tả như moranolin (1,5-dideoxy-1,5 imino glucitol), là tiền chất quan trọng để tổng hợp miglitol (Matusumuka et al. 1979).

Vào những năm 1970, các chất ức chế α -glucosidaza có nguồn gốc thực vật được nghiên cứu và thử nghiệm hoạt tính ức chế enzym này ở động vật. Tuy nhiên kết quả đạt được không khả quan do các chất ức chế phân lập từ thực vật không thể hiện hoạt tính khi đưa vào cơ thể động vật (Puls and Keup 1973; Puls et al. 1977). Năm 1983, nhóm nghiên cứu của Taylor và Barker đã phân lập được một số chủng vi sinh vật từ chi *Actinomyces* có khả năng sinh nhóm chất ức chế amylaza động vật, một

trong những chất được quan tâm nhất khi đó là tendamistat (Taylor and Barker 1983; Wiegand et al. 1995). Chất này sau đó đã được sản xuất thành thuốc nhưng không được phổ biến vì những tác dụng phụ của nó. Cùng thời điểm khoảng những năm 1970, xuất hiện những công bố đầu tiên về nhóm C7-cyclitol bao gồm yếu tố ức chế α -glucosidaza là validamycin, validoxylamin từ chủng *Streptomyces hygroscopicus* ssp. *Limoneus* (Asano et al. 1990; Iwasa et al. 1970).

Trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu về hoạt chất DNJ nhưng mới chỉ tập trung vào các nghiên cứu cơ bản trong phòng thí nghiệm như phân lập, tối ưu các điều kiện nuôi cấy, thử nghiệm sinh học đối với dịch nuôi của chúng. Như nghiên cứu của Stein và cộng sự (1984) cho rằng chủng *Bacillus subtilis* DSM704 sinh tổng hợp DNJ, ức chế sucraza và α -glucosidaza trong ruột của người. Hàm lượng DNJ tổng hợp phụ thuộc mạnh vào nguồn carbon, chuyển hóa nguồn carbon thông qua con đường glycolysis để lấy năng lượng cho sinh trưởng (Stein và cộng sự, 1984). Cho và cộng sự (2008) công bố chủng *B. subtilis* S10 trên môi trường lỏng, dịch nuôi cấy đã loại bỏ tế bào thử trên chuột bạch bị tiểu đường bởi streptozotocin. Dịch nuôi cấy có tác dụng làm giảm glucosơ trong máu như tác dụng của acarboza 59% (208,6 mg/dL), trong khi đó ở lô đối chứng âm là (510 mg/dL).

Cho đến nay, DNJ và các dẫn xuất có nó đã được biết đến ở cả thực vật và vi sinh vật (Kim and al. 2011), trong các loài thực vật thì cây dâu tằm chứa hàm lượng DNJ cao nhất (Kimura và cộng sự, 2007; Yatsunami và cộng sự 2008; Hao và cộng sự 2010). Ở Trung quốc, cây dâu tằm là loại thuốc bắc dùng cho bệnh nhân tiểu đường từ lâu. Bên cạnh đó DNJ cũng được tách từ con tằm *Bombyx mori* (Kong và cộng sự 2008), từ lá dâu tằm *Morus alba* L. (Kim et al. 2003); Yoshikaki and Hivonu 1976; Murai và cộng sự 1977). Nhộng tằm, tằm *Bombyx mori* chứa hàm lượng DNJ khác nhau. Nhộng tằm đực chứa hàm lượng DNJ cao hơn nhộng tằm cái. Hàm lượng DNJ thay đổi theo giai đoạn phát triển của nhộng tằm, và khác nhau giữa các loài tằm. Kim và cộng sự (2003) cho thấy bột tằm đông khô có tác dụng làm giảm lượng đường trong máu ở những bệnh nhân TĐ, và được dùng phổ biến như liệu pháp phụ trợ chữa bệnh TĐ ở Trung quốc, Nhật bản và Hàn quốc. Lee và cộng sự (2013) đã tách chiết được hoạt chất DNJ từ chủng *Bacillus subtilis* MORI có thể tăng cường mức độ adiponectin và các thụ thể của nó trong các tế bào mỡ 3T3-L1 khác biệt, DNJ được chứng minh là có hiệu quả trong việc làm giảm mức độ glucosơ trong máu. DNJ không độc đối với các tế bào mỡ 3T3-L1 biệt hóa với nồng độ lên tới 5 mM (Lee et al. 2013).

Bên cạnh những nghiên cứu cơ bản về hoạt chất DNJ từ thực vật, động vật và

vi sinh vật, hiện nay một số nghiên cứu về tinh sạch hoạt chất DNJ đã được công bố. Như một nghiên cứu trên chủng *Bacillus lentimorbus* đã được chứng minh là có khả năng ức chế α - và β -glucosidaza khi nuôi trong môi trường chứa 0,25% natri glutamat và 0,5% glucozo, pH 8,0 ở 30°C, 48 giờ. Hoạt chất ức chế α -glucosidaza này được xác định là tan trong nước, không tan trong dung môi hữu cơ và bền nhiệt. Ngoài chất ức chế α -glucosidaza, chủng này cũng tạo ra chất ức chế β -glucosidaza trong cùng môi trường nuôi cấy và chất ức chế này cho thấy hoạt tính chống vi khuẩn chống lại *Botrytis cinerea*. Trong khi việc sản xuất chất ức chế α -glucosidaza bị giảm bởi nồng độ glucozo cao hơn 1%, việc sản xuất chất ức chế β -glucosidaza không bị ảnh hưởng bởi nồng độ glucozo cao hơn 20%. Chất ức chế α -glucosidaza từ dịch lọc nuôi cấy của chủng này được tách ra khỏi chất ức chế β -glucosidaza thông qua sắc ký cột Sephadex G-100 (Kyoung-Ja et al. 2002).

Zhu và cộng sự (2010) đã tinh sạch được một chất ức chế alpha-glucosidaza từ okara (bột đậu nành) được lên men bởi *B. subtilis* B2 và đã xác định cấu trúc hóa học của hoạt chất. Các phương pháp tinh sạch như thẩm tích, cột than hoạt tính, sắc ký CM-Sepharose và sắc ký lớp mỏng đã được sử dụng trong quá trình tinh chế, trong khi phép đo phổ khối MS và quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được sử dụng trong nhận dạng các hoạt chất. Dữ liệu MS và NMR cho thấy chất ức chế alpha-glucosidaza tinh khiết là DNJ với trọng lượng phân tử là 163 Da. Lên men Okara với *B. subtilis* B2 có thể được sử dụng để sản xuất một sản phẩm DNJ có nguồn gốc thực phẩm như một loại thực phẩm chức năng cho bệnh nhân tiểu đường (Zhu et al. 2010). Như vậy việc tinh sạch hoạt chất DNJ sử dụng các cột tinh sạch như sắc ký lọc gel, sắc ký trao đổi ion, sắc ký lỏng cao áp HPLC, hệ thống khối phổ như GC-MS, MS và phổ cộng hưởng từ hạt nhân còn khá tốn kém, tốn nhiều thời gian và không đặc hiệu nên việc tách chiết phải qua nhiều bước, nên hiệu suất tinh sạch còn thấp.

Ở Việt Nam, lĩnh vực nghiên cứu các chủng *Bacillus* sp. để sản xuất DNJ đang vẫn còn mới mẻ, Quyền Đình Thi và cộng sự đã tuyển chọn được bộ chủng *Bacillus* spp. sinh tổng hợp các chất ức chế α -glucosidaza. Trong nghiên cứu này nhóm tác giả mới chỉ tuyển chọn được các chủng sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidaza (Quyền Đình Thi và cộng sự, 2011). Vũ Thu Hằng và cộng sự 2012 cũng đã bước đầu nghiên cứu tinh sạch chất ức chế α -glucosidaza bằng cột sephadex G75, tuy nhiên hiệu suất còn thấp, mới chỉ ở mức độ tinh sạch sơ bộ. Hoạt chất này khá bền nhiệt và có khả năng ức chế hoạt tính của các enzym maltaza, sucraza, amylaza và glucosidaza (Vũ Thu Hằng và cộng sự, 2012).

Như vậy có thể thấy rằng các nghiên cứu về DNJ hoạt chất ức chế α -glucosidaza còn khá ít, đặc biệt là những nghiên cứu về tinh sạch và đánh giá khả năng giảm đường huyết của hoạt chất này còn chưa được nghiên cứu.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục các thiếu sót nêu trên. Để đạt được mục đích đó, giải pháp hữu ích đề xuất đến quy trình tinh sạch hoạt chất ức chế α -glucosidaza tạo sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường typ 2. Cụ thể là quy trình tinh sạch thu nhận hoạt chất DNJ từ chủng *B. subtilis* EBL1 tự nhiên phân lập tại mẫu đất ở Việt Nam, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Lên men sinh tổng hợp hoạt chất: chủng *B. subtilis* EBL1 sau khi được hoạt hóa -80°C trong môi trường YS (g/L) (2 cao nấm men; 10 tinh bột; 3 cao thịt; pH 7,3) được nuôi cấy trong môi trường lên men bao gồm (% khối lượng/thể tích): 1% tinh ngô bột; 0,5% bột đậu nành; 0,5% cao nấm men; 0,05% KH_2PO_4 ; 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; độ pH 7,5; trong 4 ngày, tốc độ 200 vòng/phút, 37°C . Dịch sau lên men được ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch, bỏ tủa.

b) Tinh sạch sơ bộ hoạt chất DNJ bằng cách đông khô lạnh mẫu với tỷ lệ 10:1. Mẫu được giữ ở -20°C . Mẫu đông khô được hòa tan trong nước với tỷ lệ 1:2 (mẫu:nước). Dịch này được tua trong cón với tỷ lệ 1:4 theo thể tích nhằm loại bỏ các polysacarit và protein. Dịch tinh sạch sơ bộ này được đưa qua màng thẩm tích có kích thước màng 100 Da và 1000 Da (MWCO).

c) Tinh sạch thu hoạt chất DNJ sạch: dịch sau khi qua màng (MWCO) đưa lên cột than hoạt tính (kích thước cột: 2,6x 60 cm, tốc độ dòng chảy 1,5 ml/phút) và sử dụng etanol 5-30% để thu các phân đoạn có chứa DNJ.

d) Tạo sản phẩm bằng cách kết tủa trong cón tuyệt đối: Các phân đoạn chứa hoạt chất DNJ sạch được tập trung lại và kiểm tra TLC, thử hoạt tính ức chế α -glucosidaza. Dịch tinh sạch được tua 2 lần trong cón tuyệt đối nhằm kết tinh, hút chân không thu tinh thể DNJ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Là hình ảnh thể hiện sắc ký lớp mỏng TLC các mẫu chứa DNJ được sinh tổng hợp từ chủng *B. subtilis* EBL1 với hệ dung môi isopropanol: axit axetic: nước (4:1:1) (v/v) (1: dịch nổi chủng *B. subtilis* EBL1; 2-4: mẫu DNJ tinh sạch sơ bộ; C: DNJ chuẩn (Sigma)).

Hình 2 thể hiện phổ HPLC của hoạt chất DNJ sạch (A: DNJ chuẩn (Sigma); B: mẫu DNJ được tinh sạch từ chủng *B. subtilis* EBL1).

Hình 3A thể hiện phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C -NMR của hoạt chất DNJ sạch.

Hình 3B thể hiện phổ proton ^1H -NMR của hoạt chất DNJ tinh sạch.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết các phương án cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết sáng chế, chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế. Việc tinh chế tạo chế phẩm DNJ là hoàn toàn chủ động với các bước đơn giản, cùng nguồn nguyên liệu thiên nhiên dồi dào, môi trường nuôi cấy chi phí thấp, không thải ra bên ngoài các chất độc hại.

Theo khía cạnh giải pháp hữu đề xuất quy trình tinh sạch hoạt chất ức chế α -glucosidaza tạo sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường typ 2. Cụ thể là tinh sạch hoạt chất DNJ từ chủng *B. subtilis* EBL1 tự nhiên phân lập tại mẫu đất ở Việt Nam, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- a) Lên men sinh tổng hợp hoạt chất: chủng *B. subtilis* EBL1 sau khi được hoạt hóa - 80°C trong môi trường YS (g/L) (2 cao nấm men; 10 tinh bột; 3 cao thịt; pH 7,3) được nuôi cấy trong môi trường lên men bao gồm (% khối lượng/thể tích): 1% tinh ngô bột; 0,5% bột đậu nành; 0,5% cao nấm men; 0,05% KH_2PO_4 ; 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; độ pH 7,5; trong 4 ngày, tốc độ 200 vòng/phút, nhiệt độ 37°C . Dịch sau lên men được ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch, bỏ tủa.
- b) Tinh sạch sơ bộ hoạt chất DNJ bằng cách đông khô lạnh mẫu với tỷ lệ 10:1. Mẫu được giữ ở -20°C . Mẫu đông khô được hòa tan trong nước với tỷ lệ 1:2 (mẫu: nước). Dịch này được rửa trong cồn với tỷ lệ 1:4 theo thể tích nhằm loại bỏ các polysacarit và protein. Dịch tinh sạch sơ bộ này được đưa qua màng thẩm tích có kích thước màng 100 Da và 1000 Da (MWCO).
- c) Tinh sạch thu hoạt chất DNJ sạch: dịch sau khi qua màng (MWCO) đưa lên cột than hoạt tính (kích thước cột: 2,6x 60 cm, tốc độ dòng chảy 1,5 ml/phút) và sử dụng etanol 5-30% để thu các phân đoạn có chứa DNJ.
- d) Tạo sản phẩm bằng cách kết tủa trong cồn tuyệt đối (2 lần): Các phân đoạn chứa hoạt chất DNJ sạch được tập trung lại và kiểm tra TLC, thử hoạt tính ức chế α -glucosidaza. Dịch tinh sạch được rửa 2 lần trong cồn tuyệt đối nhằm kết tinh, hút chân không thu tinh thể DNJ.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1. Kiểm tra khả năng sinh tổng hợp hoạt chất DNJ từ chủng *B. subtilis* EBL1

Dịch lên men chủng *B. subtilis* EBL1 được ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ cặn, thu dịch trên. Dịch thu được tủa cồn 96° với tỷ lệ 1 thể tích dịch nuôi cấy: 4 thể tích cồn 96°. Sau 30 phút tủa cồn ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút, loại tủa, thu hoạt chất DNJ và kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng TLC. Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng silica gel Merck 60 F254, dày 0,25mm, với hệ dung môi (V/V): isopropanol: axit axetic: nước (4:1:1). Bản TLC sau khi chạy xong được sấy khô dung môi sau đó hiện màu bằng thuốc iot. Kết quả cho thấy đã xuất hiện các băng ngang chuẩn DNJ (sigma) với hệ số Rf 0,34, chứng tỏ chủng *B. subtilis* EBL1 có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất DNJ (Hình 1).

Ví dụ 2. Kiểm tra độ sạch hoạt chất DNJ bằng HPLC

Sản phẩm DNJ sạch sau khi được đông khô được đưa lên cột HPLC với hệ dung môi acetonitril và H₂O tỷ lệ 81: 19 (v/v) chứa 6,5 mM ammonium acetat pH 5,5, tốc độ dòng chảy 1ml/phút. Hoạt chất DNJ sạch được hòa vào hỗn hợp acetonitril và H₂O với tỷ lệ 50:50, có chứa 6,5 mM ammonium acetat và 20µl mẫu được đưa lên hệ thống HPLC. Phổ HPLC cho thấy khi chạy so sánh với hoạt chất DNJ chuẩn, trên sắc ký đồ của mẫu ngoại trừ đỉnh 1 là đỉnh dung môi với thời gian lưu là 5,5 phút và đỉnh 2 nhỏ với thời gian lưu giữ của 10 phút, thời gian lưu của đỉnh 3 là đỉnh chính có thời gian lưu là 17,2 phút, đỉnh này tương tự với đỉnh 2 của mẫu chuẩn DNJ cũng có thời gian lưu là 17,2 phút (Hình 2). Chứng tỏ trong mẫu chúng tôi đã tinh sạch được hoạt chất DNJ với hiệu suất cao (Bảng 1)

Bảng 1 Tóm tắt quá trình tinh sạch hoạt chất ức chế DNJ

Các bước tinh sạch	Khối lượng (g)	DNJ (g)	Hiệu suất thu hồi (%)
Dịch nổi sau đông khô (dạng bột)	1000	0,73	100
Màng MWCO 100 da và 1000 da	134	0,52	71,2
Than hoạt tính	70	0,41	56,1

Hiệu suất tinh sạch DNJ từ chủng *B. subtilis* EBL1 đạt 56%. Điều này chứng tỏ có thể ứng dụng sản xuất hoạt chất DNJ bằng chủng *B. subtilis* EBL1 được phân lập tại Việt Nam làm thực phẩm chức năng điều trị bệnh đái tháo đường type 2.

Ví dụ 3. Xác định cấu trúc của hoạt chất DNJ

Cấu trúc phân tử DNJ được xác định theo phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR). Dựa trên nguyên tắc spin hạt nhân dưới tác dụng của từ trường ngoài. NMR hoạt hóa spin hạt nhân khi nguyên tố có số proton hoặc neutron lẻ. Như vậy, ^1H và ^{13}C sẽ cho ta tín hiệu NMR. Trong phân tử tùy theo cấu trúc mà tần số cộng hưởng của proton (hay ^{13}C) khác nhau. Tổng số các mũi cộng hưởng đó tạo thành phổ NMR của phân tử. Kết hợp với các số liệu thu được từ máy đo khối phổ sẽ cho phép xác định cấu trúc hóa học của chất cần nghiên cứu.

Cấu trúc hóa học của hợp chất DNJ tinh sạch được xác định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên (Hình 3). Hợp chất DNJ thu được có đặc điểm như sau: chất bột màu trắng, khối lượng phân tử 163,113, công thức cấu tạo là $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4$. Sắc ký lớp mỏng cho một vết duy nhất có hệ số $R_f = 0,34$ trong hệ dung môi isopropanol: acetic acid: nước (4:1:1).

Ví dụ 4. Chỉ số glucozơ máu khi đói của các nhóm chuột trước khi uống DNJ

Chỉ số glucozơ máu khi đói được tiến hành xác định trên các nhóm chuột vào các thời điểm trước khi điều trị và sau khi điều trị 4 tuần một lần. Vào ngày làm thí nghiệm, các nhóm chuột sẽ được cho nhịn đói 6 giờ, sau đó sẽ được lấy máu tĩnh mạch đuôi để định lượng glucozơ bằng phương pháp enzym glucozơ oxidaza bằng máy tự động và que thử Accu – chek Active (Roche Diagnosti và cộng sự).

Bảng 2. Chỉ số glucozơ máu khi đói của các nhóm chuột trước khi điều trị

Nhóm chuột	Nồng độ glucozơ (mg/dL)
Đối chứng (1)	80 ± 13
Đối chứng bệnh (2)	281 ± 23
Uống DNJ (3)	266 ± 34
Uống Glucobay (4)	272 ± 26
p (1)- (2), (3), (4)	<0,01
p (2) – (3), (4)	>0,05

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy trước khi điều trị, nồng độ glucosơ máu khi đói ở cả 4 nhóm chuột được gây đái tháo đường đều tăng trên 200 mg/dL trong khi chỉ số này ở nhóm chuột không gây bệnh chỉ ở mức 80 mg/dL. Sự khác biệt về chỉ số glucosơ máu khi đói giữa các nhóm bệnh và nhóm không gây bệnh là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) trong khi sự dao động về chỉ số này ở cả 2 nhóm gây bệnh đều không có ý nghĩa thống kê.

Ví dụ 5. Chỉ số glucosơ máu khi đói của các nhóm chuột sau khi uống DNJ

Bảng 2. Chỉ số glucosơ máu khi đói của các nhóm chuột sau khi điều trị 5 tuần

Nhóm chuột	Nồng độ glucosơ (mg/dL)
Đối chứng (1)	75 ± 15
Đối chứng bệnh (2)	279 ± 12
Uống DNJ (3)	$95,4 \pm 16,9$
Uống Glucobay (4)	$86,2 \pm 9,6$
p (1)- (3), (4)	$>0,05$
p (2) –(3), (4)	$<0,01$

Kết quả cho thấy từ sau 5 tuần điều trị, nồng độ glucosơ máu khi đói ở cả 3 nhóm chuột bị đái tháo đường được điều trị bằng các dược phẩm khác nhau đã giảm xuống gần mức bình thường. Sự khác biệt của chỉ số glucosơ máu khi đói ở cả 2 nhóm chuột được điều trị so với nhóm chuột không được điều trị đều có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) trong khi sự khác biệt so với nhóm chuột bình thường thì không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

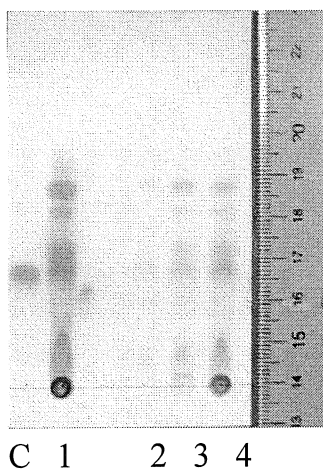
Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản và dễ thực hiện. Chế phẩm DNJ thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích làm giảm glucosơ máu trên mô hình chuột đái tháo đường typ 2. Quy trình tạo sản phẩm DNJ đáp ứng được yêu cầu đặt ra là đơn giản, kinh tế, sử dụng các dung môi ít độc hại có thể ứng dụng trong sản xuất ở quy mô pilot.

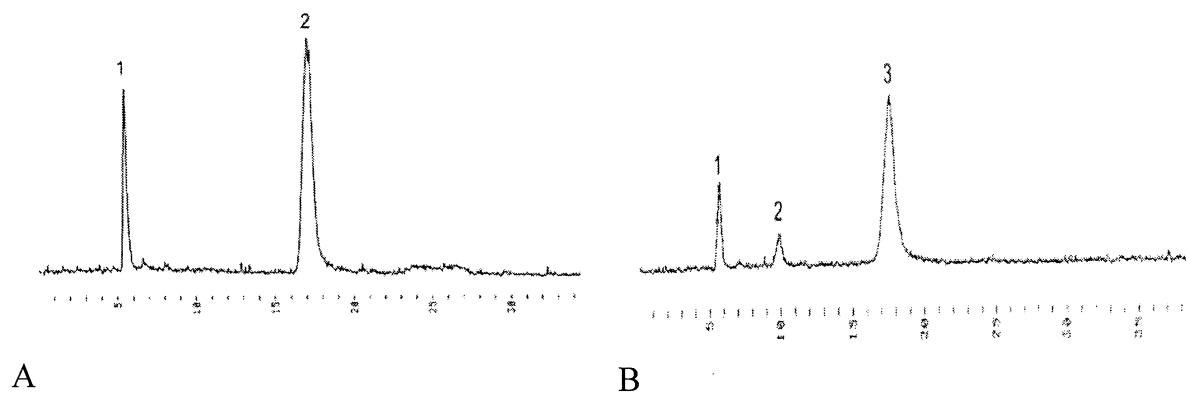
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tinh sạch hoạt chất ức chế α - glucosidaza tạo sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường typ 2, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- a) lên men sinh tổng hợp hoạt chất: lên men chủng *B. subtilis* EBL1 trong môi trường lên men bao gồm (% khối lượng/thể tích) 1% tinh ngô bột; 0,5% bột đậu nành; 0,5% cao nấm men; 0,05% KH_2PO_4 ; 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; độ pH 7,5; trong 4 ngày, tốc độ 200 vòng/phút, nhiệt độ 37°C, ly tâm dịch sau lên men ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch, bỏ tủa;
- b) tinh sạch sơ bộ hoạt chất DNJ: đông khô lạnh mẫu với tỷ lệ 10:1, mẫu được giữ ở nhiệt độ -20°C, hòa tan mẫu đông khô trong nước với tỷ lệ 1:2 (mẫu:nước); tủa dịch này trong cồn với tỷ lệ 1:4 (theo thể tích) nhằm loại bỏ các polysacarit và protein sau đó đưa qua màng thẩm tích có kích thước màng 100 Da và 1000 Da (MWCO).
- c) tinh sạch thu hoạt chất DNJ: đưa dịch thu được ở bước b) lên cột than hoạt tính, sử dụng etanol 5-30% để thu các phân đoạn có chứa DNJ.
- d) tạo sản phẩm bằng cách kết tủa trong cồn tuyệt đối: kết tủa 2 lần các phân đoạn chứa hoạt chất DNJ sạch trong cồn tuyệt đối nhằm kết tinh, hút chân không thu tinh thể DNJ.



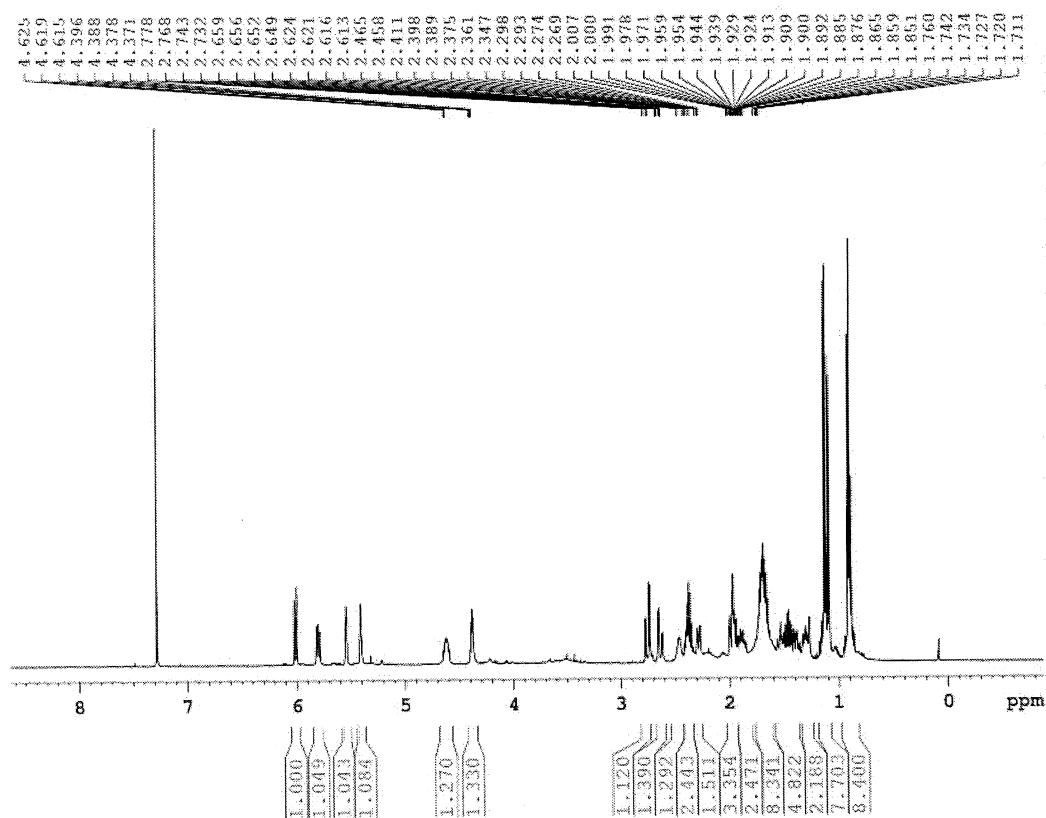
Hình 1. Sắc ký lớp mỏng TLC các mẫu chứa DNJ được sinh tổng hợp từ chủng *B. subtilis* EBL1 với hệ dung môi isopropanol: axit axetic: nước (4:1:1) (v/v) (1: dịch nổi chủng *B. subtilis* EBL1; 2-4: mẫu DNJ tinh sạch sơ bộ; C: DNJ chuẩn (Sima))



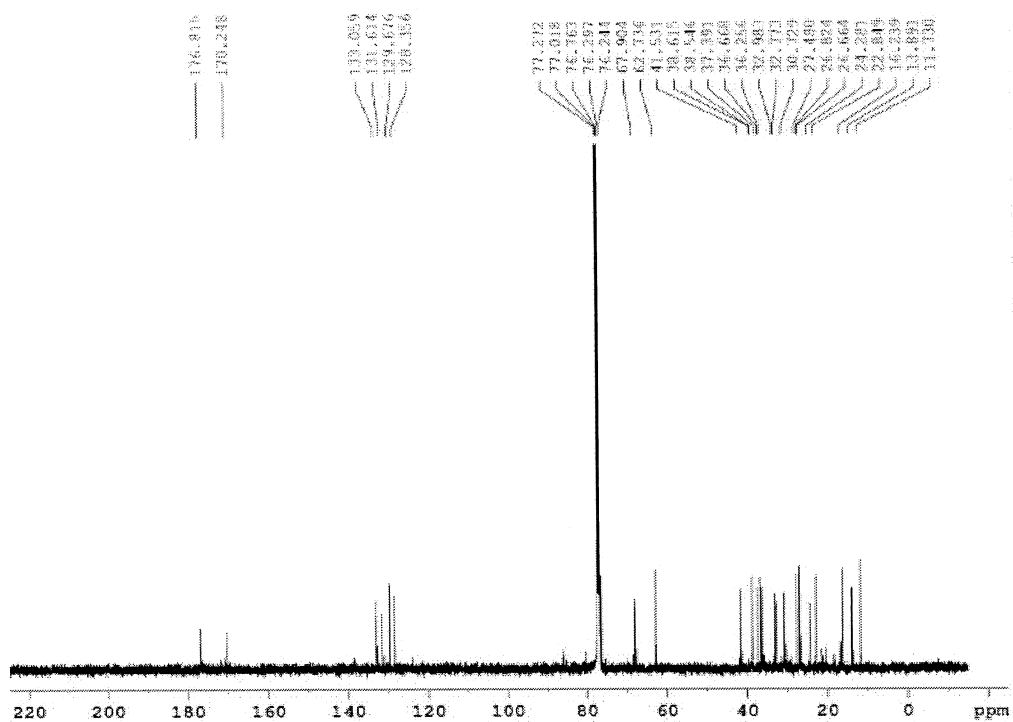
Hình 2 Phổ HPLC của hoạt chất DNJ sạch

A: DNJ chuẩn (Sigma);

B: mẫu DNJ được tinh sạch từ chủng *B. subtilis* EBL1



Hình 3A. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹³C-NMR của hoạt chất DNJ sạch



Hình 3B. Phổ proton ¹H-NMR của hoạt chất DNJ tinh sạch