



(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)



1-0038404

(51)^{2020.01} A01P 1/00; A01N 27/00

(13) B

(21) 1-2021-02040

(22) 15/04/2021

(45) 25/01/2024 430

(43) 25/10/2022 415

(73) Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ (VN)

18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Nguyễn Tiến Đạt (VN); Nguyễn Quang Trung (VN); Lê Thị Phương Quỳnh (VN);

Dương Thị Thuỷ (VN); Đặng Đình Kim (VN); Phạm Thanh Nga (VN).

(54) CHẾ PHẨM DIỆT TẢO ĐỘC TỪ HỖN HỢP CAO CHIẾT THỰC VẬT

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm có tác dụng diệt tảo độc được kết hợp từ các cao chiết thực vật có tác dụng hiệp đồng diệt tảo độc *Microcystis aeruginosa*. Sự phối hợp các cao chiết cây mần tưới (*Eupatorium fortunei*), keo tai tượng (*Acacia mangium*) và chùm ngây (*Moringa oleifera*) tạo ra chế phẩm có hoạt tính mạnh hơn so với hoạt tính của các cao chiết riêng lẻ. Theo đó, chế phẩm này có thể được sử dụng trong việc ngăn ngừa sự bùng phát tảo độc ở các thủy vực tự nhiên hay đầm hồ nuôi trồng thủy hải sản.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm có tác dụng diệt tảo độc *Microcystis aeruginosa*. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm kết hợp từ các cao chiết thực vật có tác dụng hiệp đồng diệt tảo độc *Microcystis aeruginosa*. Sự phối hợp các cao chiết cây mần tưới (*Eupatorium fortunei*), keo tai tượng (*Acacia mangium*) và chùm ngây (*Moringa oleifera*) tạo ra chế phẩm có hoạt tính mạnh hơn so với hoạt tính của các cao chiết riêng lẻ. Theo đó, chế phẩm này có thể được sử dụng trong việc ngăn ngừa sự bùng phát tảo độc ở các thủy vực tự nhiên hay đầm hồ nuôi trồng thủy hải sản...

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự bùng phát của tảo độc, thường là các vi khuẩn lam trong đó có *Microcystis aeruginosa*, ở các thủy vực đang trở thành một vấn đề lớn về môi trường trên toàn thế giới. Nó ảnh hưởng đáng kể đến việc sử dụng các nguồn nước, làm tắc nghẽn hệ thống cung cấp nước và có khả năng làm giảm đa dạng sinh học. Ngoài ra, sự bùng phát tảo thường gắn liền với việc sản sinh ra các độc tố, do đó các sinh vật thủy sản có thể có nguy cơ bị ngộ độc. Hơn nữa, thông qua chuỗi thức ăn, các độc tố này sẽ đi vào cơ thể người và gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Vì vậy, kiểm soát và loại bỏ hiện tượng nở hoa của vi khuẩn lam đã trở thành vấn đề quan trọng. Các phương pháp xử lý ô nhiễm môi trường nước gây ra bởi vi khuẩn lam độc đã được nghiên cứu và áp dụng từ những phương pháp cơ học đơn giản như hút vớt, che sáng hay pha loãng nước hồ đến các phương pháp lý - hóa như dùng sóng siêu âm, sử dụng ánh sáng cực tím, hoặc sử dụng các hợp chất hóa học diệt tảo, các hợp chất có tính oxi hóa cao, các kim loại và nano kim loại. Những phương pháp này bên cạnh những ưu điểm dễ thấy như hiệu quả tác động nhanh, rõ rệt trong thời gian ngắn nhưng còn tồn tại những hạn chế như tốn kém kinh phí triển khai hoặc gây ra sự ô

nhễm môi trường thứ cấp, tác động không chọn lọc lên các loài sinh vật do đó gây suy giảm đa dạng sinh học đặc biệt sử dụng hóa chất sau một thời gian quan sát thấy hiện tượng nhờn thuốc và vì thế chúng bị hạn chế triển khai ở quy mô thực tế. Hiện nay phương pháp dùng các cao chiết có nguồn gốc thực vật để ức chế sinh trưởng vi khuẩn lam đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu vì tính hiệu quả và thân thiện với môi trường.

Các công bố trước đây phần lớn chỉ tập trung vào đánh giá tác dụng diệt tảo độc của các dịch chiết thực vật riêng lẻ. Năm 2015 Wang đã công bố sáng chế về phương pháp ức chế sự phát triển của vi khuẩn lam bằng cách sử dụng dịch chiết lá cây đào lộn hột. Theo phương pháp này, dịch chiết nước lá đào lộn hột có khả năng ức chế sinh trưởng của *Microcystis aeruginosa* trong vòng 15 ngày [Wang Xiaoxiong và cộng sự. Phương pháp ức chế sự phát triển của vi khuẩn lam bằng cách sử dụng lá cây đào, CN104211146A, 2015]. Dịch chiết ete dầu hỏa và etyl axetat cây thanh hao hoa vàng *Artemisia annua* ở nồng độ 50-200 mg/L cũng có tác dụng ức chế tảo độc [Ni Lixiao và cộng sự. Phương pháp chiết xuất hoạt chất ức chế tảo từ *Artemisia annua* và phương pháp ức chế tảo, CN101731284A, 2010].

Nhóm nghiên cứu chúng tôi đã có những nghiên cứu chứng minh cao chiết cây mần tưới *Eupatorium fortunei* và một số hợp chất nhóm thymol gồm 7,8,9-trihydroxythymol, 8,10-didehydro-7,9-dihydroxythymol, 8,9,10-trihydroxythymol, và 10-acetoxy-8,9-dihydroxythymol phân lập từ cây mần tưới có tác dụng ức chế sinh trưởng *Microcystis aeruginosa* [Phạm Thanh Nga và cộng sự. Anticyanobacterial phenolic constituents from the aerial parts of *Eupatorium fortunei*, Natural Product Research 2019, 33 (9), 1345–1348; Dương Thị Thuỷ và cộng sự. Đánh giá hiệu quả ức chế sinh trưởng của dịch chiết cây mần tưới lên quần xã thực vật phù du Hồ Hoàn Kiếm, Tạp Chí Sinh Học, 2015, 37(2): 164-169]. Ngoài ra nhóm tác giả sáng chế cũng phát hiện ra khi phối trộn cao chiết cây mần tưới với cao chiết của một số thực vật khác gồm keo tai tượng (*Acacia mangium*) và chùm

ngây (*Moringa oleifera*) sẽ tạo ra tác dụng hiệp đồng trong việc ức chế sinh trưởng của tảo độc *Microcystis aeruginosa*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm diệt tảo độc từ sự phối trộn các cao chiết thực vật nhằm tạo ra tác dụng hiệp đồng trong việc diệt tảo độc *Microcystis aeruginosa*. Chế phẩm chứa:

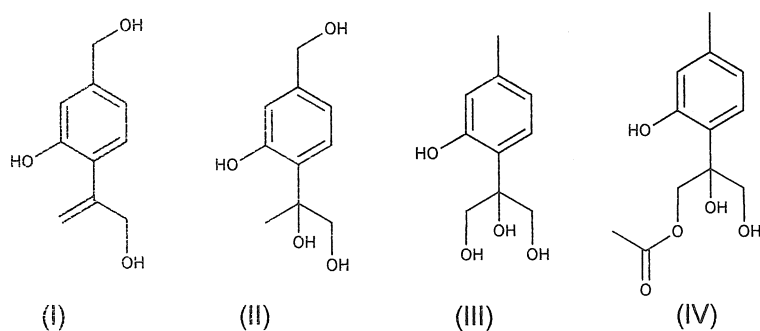
Cao chiết bộ phận trên mặt đất của cây mần tưới (*Eupatorium fortunei*);

Cao chiết lá cây keo tai tượng (*Acacia mangium*);

Cao chiết lá cây chùm ngây (*Moringa oleifera*).

Sự phối trộn các cao chiết này làm tăng hoạt tính ức chế sinh trưởng của tảo độc *Microcystis aeruginosa* so với hoạt tính của từng cao chiết riêng lẻ.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất tỷ lệ phối trộn các cao chiết trong đó cao chiết cây mần tưới là thành phần chính chiếm ít nhất 50% khối lượng của chế phẩm. Chế phẩm theo sáng chế chứa ít nhất 0,05% theo khối lượng nhóm chất thymol gồm 7,8,9-trihydroxythymol (I), 8,10-didehydro-7,9-dihydroxythymol (II), 8,9,10-trihydroxythymol (III), và 10-acetoxy-8,9-dihydroxythymol (IV) với công thức hoá học như sau:



Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Tác dụng tác dụng ức chế sinh trưởng của tảo độc *Microcystis aeruginosa*. Trong đó nồng độ mẫu thử như sau: cao A, cao B, cao C mỗi loại 100 µg/mL; Phối trộn 1: 50 µg/mL cao A + 30 µg/mL cao B + 20 µg/mL cao C; Phối trộn 2: 60 µg/mL cao A + 30 µg/mL cao B + 10 µg/mL cao C; Phối trộn 3: 70 µg/mL cao A + 20 µg/mL cao B + 10 µg/mL cao C.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các cao chiết thực vật theo sáng chế được tạo ra bằng cách chiết hồi lưu mẫu thực vật với dung môi hữu cơ hoặc nước. Đây là kỹ thuật đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này.

Cây mần tưới có tên khoa học là *Eupatorium fortunei* là một loài cây mọc hoang ở Việt Nam và nhiều nơi trên thế giới. Phần trên mặt đất của cây mần tưới được thu hái, rửa sạch bằng nước, cắt nhỏ thành từng đoạn dài 1-2 cm và sấy khô ở nhiệt độ không quá 80 °C, sau đó xay thành bột. Tiến hành chiết hồi lưu phần bột thu được bằng dung môi theo tỷ lệ từ 1/3 đến 1/10 (theo trọng lượng/thể tích) từ 1 đến 3 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 30-120 phút. Dung môi thường được sử dụng là cồn, metanol, hoặc nước. Dung môi được ưu tiên sử dụng là cồn 96%. Sau đó, gộp các phần dịch chiết thu được, cất loại dung môi dưới áp suất giảm, sau đó sấy bằng kỹ thuật sấy phun thu được cao chiết cây mần tưới (cao A).

Cây keo tai tượng có tên khoa học là *Acacia mangium* được trồng rất phổ biến ở Việt Nam để lấy sinh khối gỗ. Lá cây keo tai tượng sau khi thu hái được cắt nhỏ thành từng đoạn dài 1-2 cm, sấy khô ở nhiệt độ không quá 80 °C, sau đó xay thành bột. Tiến hành chiết hồi lưu phần bột thu được bằng dung môi theo tỷ lệ từ 1/3 đến 1/10 (theo trọng lượng/thể tích) từ 1 đến 3 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 30-120 phút. Dung môi thường được sử dụng là cồn, metanol, hoặc nước. Dung môi được ưu tiên sử dụng là cồn 96%. Sau đó, gộp các phần dịch chiết thu được, cất loại

dung môi dưới áp suất giảm, sau đó sấy bằng kỹ thuật sấy phun thu được cao chiết cây keo tai tượng (cao B).

Cây chùm ngây có tên khoa học là *Moringa oleifera* được trồng ở rất nhiều nơi tại Việt Nam và trên thế giới để làm thực phẩm và dược liệu. Lá cây chùm ngây được thu hái, sấy khô ở nhiệt độ không quá 80 °C, sau đó xay thành bột. Tiến hành chiết hồi lưu phần bột thu được bằng dung môi theo tỷ lệ từ 1/3 đến 1/10 (theo trọng lượng/thể tích) từ 1 đến 3 lần, mỗi lần trong khoảng thời gian từ 30-120 phút. Dung môi thường được sử dụng là cồn, metanol, hoặc nước. Dung môi được ưu tiên sử dụng là cồn 96%. Sau đó, gộp các phần dịch chiết thu được, cất loại dung môi dưới áp suất giảm, sau đó sấy bằng kỹ thuật sấy phun thu được cao chiết cây chùm ngây (cao C).

Trong quá trình nghiên cứu dẫn đến sáng chế này, hỗn hợp phối trộn giữa các cao A, cao B và cao C theo một số tỷ lệ khác nhau đã được thử nghiệm về hiệu quả ức chế sinh trưởng của vi khuẩn lam độc *Microcystis aeruginosa*. Tỷ lệ phối trộn các cao chiết theo sáng chế đạt hiệu quả ức chế hiệp đồng tốt nhất là cao A 50%, cao B 30%, cao C 20% (theo khối lượng). Một vài thay đổi về tỷ lệ thành phần các cao chiết vẫn tạo ra tác dụng hiệp đồng. Sự thay đổi này có thể dễ dàng được thực hiện bởi các chuyên gia trong lĩnh vực và vẫn nằm trong phạm vi nội dung của sáng chế và của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được giải thích tiếp bằng các ví dụ và phương án minh họa sau. Tuy nhiên các ví dụ này không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các cải biến sẽ dễ dàng thực hiện bởi các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và chúng sẽ nằm trong phạm vi nội dung của sáng chế và của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Tạo cao chiết cây mần tưới

Phần trên mặt đất của cây mần tưới được thu hái, rửa sạch bằng nước, cắt nhỏ thành từng đoạn dài 1-2 cm và sấy khô ở nhiệt độ 60 °C trong tủ sấy, sau đó xay thành bột. 1 kg bột được chuyển vào bình chiết, thêm 5 lít cồn 96% rồi đun hồi lưu trong khoảng thời gian 60 phút. Gạn lọc dịch chiết, bã chiết sau đó tiếp được được chiết lặp lại thêm 2 lần. Gộp các phần dịch chiết thu được từ 3 lần chiết, cất loại dung môi dưới áp suất giảm, sau đó sấy bằng kỹ thuật sấy phun thu được cao chiết cây mần tưới (cao A).

Ví dụ 2: Tạo cao chiết cây keo tai tượng

Phần lá cây keo tai tượng được thu hái, rửa sạch bằng nước, cắt nhỏ thành từng đoạn dài 1-2 cm và sấy khô ở nhiệt độ 60 °C trong tủ sấy, sau đó xay thành bột. 1 kg bột được chuyển vào bình chiết, thêm 5 lít cồn 96% rồi đun hồi lưu trong khoảng thời gian 60 phút. Gạn lọc dịch chiết, bã chiết sau đó tiếp được được chiết lặp lại thêm 2 lần. Gộp các phần dịch chiết thu được từ 3 lần chiết, cất loại dung môi dưới áp suất giảm, sau đó sấy bằng kỹ thuật sấy phun thu được cao chiết cây keo tai tượng (cao B).

Ví dụ 3: Tạo cao chiết cây chùm ngây

Phần lá cây chùm ngây được thu hái, rửa sạch bằng nước và sấy khô ở nhiệt độ 60 °C trong tủ sấy, sau đó xay thành bột. 1 kg bột được chuyển vào bình chiết, thêm 5 lít cồn 96% rồi đun hồi lưu trong khoảng thời gian 60 phút. Gạn lọc dịch chiết, bã chiết sau đó tiếp được được chiết lặp lại thêm 2 lần. Gộp các phần dịch chiết thu được từ 3 lần chiết, cất loại dung môi dưới áp suất giảm, sau đó sấy bằng kỹ thuật sấy phun thu được cao chiết cây chùm ngây (cao C).

*Ví dụ 4: Thử nghiệm tác dụng ức chế sinh trưởng của tảo độc *Microcystis aeruginosa**

Để nghiên cứu ảnh hưởng của các cao chiết thực vật lên sinh trưởng của *Microcystis aeruginosa*, mẫu cao chiết với các nồng độ khác nhau được bổ sung vào trong bình tam giác có chứa sinh khối của *Microcystis aeruginosa*. Sau đó bình thử nghiệm được duy trì với các điều kiện nuôi cấy như sau: nhiệt độ được thiết lập 25°C, khoảng

thời gian ngày:đêm là 12h sáng : 12h tối và cường độ ánh sáng 1000 lux. Ngoài ra, chất diệt tảo CuSO_4 được sử dụng làm mẫu đối chứng. Các bình nuôi sinh khối không bổ sung mẫu cao chiết và CuSO_4 được sử dụng làm các mẫu đối chứng . Sau 7 ngày nuôi cấy, các bình mẫu được lắc đều rồi hút 200 μL dung dịch chuyển vào phiên 96 giếng. Mật độ quang của các giếng ở bước sóng 679 nm được xác định nhằm đánh giá mức độ tăng trưởng của tảo *Microcystis aeruginosa*.

Tác dụng ức chế sinh trưởng được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = [\text{OD}_{\text{trắng}} - \text{OD}_{\text{mẫu}}] / \text{OD}_{\text{trắng}} \times 100$$

Trong đó: $\text{OD}_{\text{mẫu}}$ là trị số mật độ quang của giếng được ủ với mẫu thử nghiệm.

$\text{OD}_{\text{trắng}}$ là trị số mật độ quang của giếng không ủ với mẫu thử nghiệm.

Kết quả được chỉ ra trong đồ thị nêu trong Hình 1. Kết quả cho thấy các cao chiết A, B và C riêng lẻ ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ chỉ có khả năng ức chế lần lượt là 35,5%, 24,0% và 29,6%. Khi phối trộn ở tỷ lệ 50 $\mu\text{g/mL}$ cao A + 30 $\mu\text{g/mL}$ cao B + 20 $\mu\text{g/mL}$ cao C (tỷ lệ 50%/30%/20%) cho thấy tác dụng hiệp ức chế đồng rõ rệt đến 82,3%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

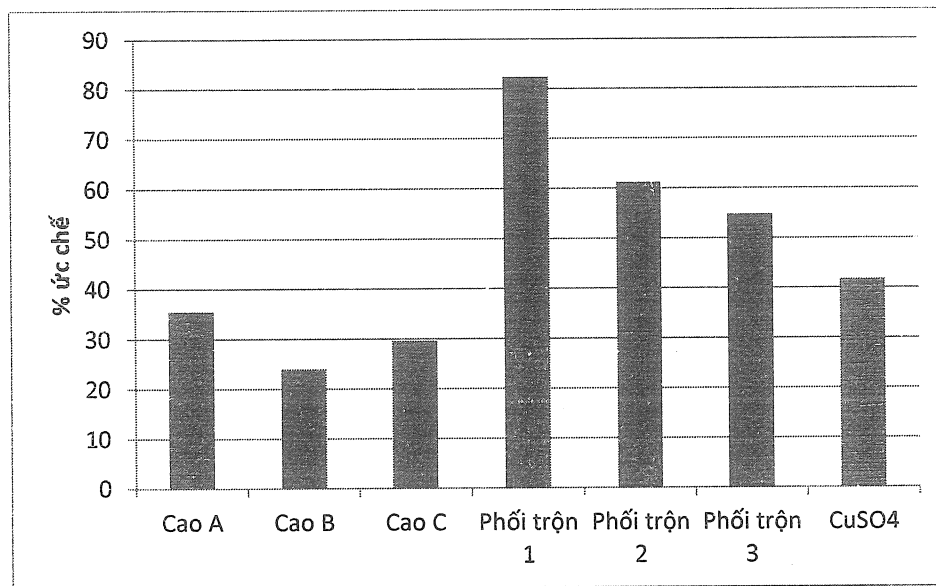
1. Chế phẩm có tác dụng ức chế sinh trưởng của tảo độc *Microcystis aeruginosa* có chứa (tính theo % khối lượng):

50% cao chiết bộ phận trên mặt đất của cây mần tưới *Eupatorium fortune*,

30% cao chiết lá cây keo tai tượng *Acacia mangium*; và

20% cao chiết lá cây chùm ngây *Moringa oleifera*.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chứa ít nhất 0,05% theo khối lượng nhóm chất thymol gồm 7,8,9-trihydroxythymol, 8,10-didehydro-7,9-dihydroxythymol, 8,9,10-trihydroxythymol, và 10-acetoxy-8,9-dihydroxythymol.



Hình 1