



(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)



1-0041604

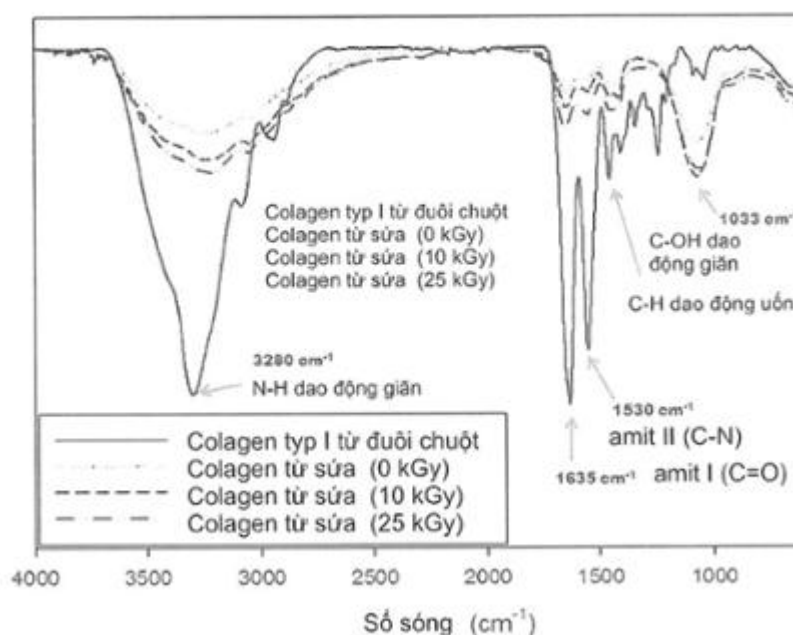
(51)⁷ C07K 14/78; C07K 1/14

(13) B

- (21) 1-2015-03925 (22) 11/03/2014
(86) PCT/KR2014/001986 11/03/2014 (87) WO/2014/157854 02/10/2014
(30) 10-2013-0034745 29/03/2013 KR; 10-2014-0028149 11/03/2014 KR
(45) 25/11/2024 440 (43) 25/01/2016 334A
(73) KOREA ATOMIC ENERGY RESEARCH INSTITUTE (KR)
1045 Daedeokdaero Yuseong-gu Daejeon 305-353, Republic of Korea
(72) LIM, Youn-Mook (KR); JEONG, Sung In (KR); GWON, Hui-Jeong (KR); PARK,
Jong Seok (KR); NHO, Young-Chang (KR); KANG, Phil-Hyun (KR); KIM, Young-
Jin (KR).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP TÁCH COLAGEN TỪ SỮA BẰNG CÁCH SỬ DỤNG KỸ
THUẬT CHIẾU XẠ

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp tách collagen từ sữa bằng cách sử dụng kỹ thuật chiếu xạ. Chính xác hơn, collagen tan trong axit và atelocollagen được điều chế theo sáng chế bằng phương pháp kết hợp kỹ thuật chiếu xạ và xử lý hóa học. Phương pháp này theo sáng chế được cho là có thể dùng để tách collagen từ sữa với chi phí thấp nhưng hiệu suất cao.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết collagen từ sữa bằng cách sử dụng kỹ thuật chiếu xạ. Chính xác hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp tách collagen từ sữa với chi phí thấp nhưng hiệu suất cao bằng phương pháp kết hợp kỹ thuật chiếu xạ và xử lý hóa học.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Collagen là thành phần chủ yếu của chất nền ngoại bào, được phân bố trong da, xương và sụn. Collagen là một protein dạng sợi có trọng lượng phân tử cao, có cấu trúc chuỗi xoắn ba. Đường kính của collagen nằm trong khoảng từ 14 đến 15 μm và chiều dài của nó bằng 2800 μm . Trọng lượng phân tử của collagen là khoảng 300000Da. Độ ổn định vật lý và sinh học của cấu trúc collagen là do liên kết ngang giữa các phân tử tropocollagen là các phân tử cơ bản của protein dạng sợi. Nói chung, cấu trúc peptit của collagen bao gồm (Gly-X-Y) $_n$, trong đó X là prolin và Y là hydroxyprolin, các axit amin này chiếm tới 1/3 cấu trúc và 2/3 cấu trúc còn lại là các axit amin khác.

Collagen là chất chức năng được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp bao gồm lĩnh vực thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm, và nuôi cấy tế bào, v.v.. Trong ngành thực phẩm, collagen được sử dụng làm lớp vỏ ăn được hoặc chất mang hoặc chất phụ gia để làm tăng vị của thực phẩm như xúc xích hoặc giảm bông. Gần đây, nhu cầu về collagen tăng lên do collagen có chức năng cố định sự dính kết tế bào, cảm ứng quá trình phân chia và biệt hóa tế bào, cảm ứng quá trình làm tan huyết khối, làm tăng khả năng nhớ, làm liền vết thương, và bảo vệ niêm mạc dạ dày, v.v.. Các thử nghiệm đối với collagen có nguồn gốc sinh vật biển đã được thực hiện với collagen tan trong axit được chiết từ sữa và da cá và xương cá con và cá trưởng thành. Collagen có nguồn gốc sinh vật biển được so sánh với collagen có nguồn gốc động vật về thành phần axit amin, nhiệt độ biến tính, và độ tan, v.v.. Do đó, collagen có nguồn

gốc sinh vật biển được khẳng định là có cấu trúc tương tự với collagen có nguồn gốc động vật. Cụ thể, collagen từ sữa được khẳng định là hiệu quả trong việc làm tăng độ đàn hồi của da, trong việc điều hòa sự tuần hoàn máu, và trong việc điều trị bệnh viêm khớp, bệnh tăng huyết áp, bệnh viêm phế quản, và bệnh hen. Ngoài ra, collagen từ sữa có tiềm năng sử dụng cao trong công nghiệp trong các lĩnh vực thực phẩm ăn kiêng có hàm lượng protein cao, mỹ phẩm, và y học.

Đồng thời, sự phát triển ồ ạt của sữa do hiện tượng ấm lên toàn cầu có ảnh hưởng xấu đến hệ sinh thái và việc hạn chế lượng sữa quá nhiều này cũng là một vấn đề. Cho đến nay, sữa chỉ được sử dụng hạn chế ở dạng thực phẩm chế biến đơn giản. Để chiết collagen từ sữa, phương pháp thông thường dựa vào việc xử lý hóa học đơn giản bằng axit, kiềm, và muối. Tuy nhiên, phương pháp dựa vào việc xử lý hóa học này có vấn đề đi kèm với sự ô nhiễm môi trường và hiệu suất thấp, điều này là không có lợi khi đưa ra thị trường.

Để khắc phục các vấn đề trên, các tác giả sáng chế đã tập trung vào việc phát triển phương pháp mới hiệu quả hơn để tách collagen từ sữa. Theo đó, các tác giả sáng chế đã khẳng định rằng phương pháp kết hợp kỹ thuật chiếu xạ và xử lý hóa học đối với sữa có thể có lợi trong việc làm giảm chi phí nhưng làm tăng hiệu suất và hiệu quả tách collagen, dẫn đến việc hoàn thành sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp tách collagen tan trong axit từ sữa.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế atelocollagen bao gồm bước xử lý collagen tan trong axit thu được bằng phương pháp nêu trên bằng proteaza và sấy sản phẩm thu được.

Để đạt được các mục đích này, sáng chế đề xuất phương pháp tách collagen tan trong axit từ sữa bao gồm các bước sau:

- 1) rửa và nghiền sữa thành bột;

- 2) ngâm bột sữa thu được trong bước 1) trong dung dịch axit;
- 3) chiếu xạ dung dịch thu được trong bước 2), sau đó khuấy; và
- 4) lọc dung dịch đã khuấy thu được trong bước 3) và sấy sản phẩm.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Phương pháp kết hợp kỹ thuật chiếu xạ và xử lý hóa học đối với sữa là có lợi để sản xuất collagen với chi phí thấp nhưng hiệu suất cao. So với phương pháp thông thường chỉ dựa vào việc xử lý hóa học, phương pháp theo sáng chế làm giảm chi phí nhưng làm tăng hiệu suất ngoài việc ngăn ngừa sự ô nhiễm môi trường, và có tác dụng loại bỏ lượng sữa có hại quá nhiều. Ngoài ra, phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng hiệu quả dưới dạng kỹ thuật tách có thể dùng để điều chế nguyên liệu collagen và vật liệu sinh học từ sữa, đây là kỹ thuật cơ bản cần thiết đối với lĩnh vực công nghệ mô.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Việc áp dụng các phương án được ưu tiên của sáng chế được hiểu rõ nhất dựa vào các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 là sơ đồ công nghệ thể hiện phương pháp tách collagen từ sữa theo sáng chế.

Fig.2 là ảnh chụp thể hiện collagen chiết được từ sữa theo liều chiếu tia gama.

Fig.3 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi trọng lượng của sữa đã rửa.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi cỡ hạt của sữa theo thời gian nghiền.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện hiệu suất chiết collagen tan trong axit từ sữa theo thời gian khuấy sau khi chiếu tia gama.

Fig.6 là biểu đồ thể hiện hiệu suất chiết collagen tan trong axit từ sữa theo liều chiếu tia gama.

Fig.7 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ chiết atelocollagen thu được từ sữa theo liều chiếu tia gama.

Fig.8 là đồ thị thể hiện đặc tính hóa học của collagen tan trong axit chiết được từ sữa theo liều chiếu tia gama.

Fig.9 là đồ thị thể hiện các đặc tính nhiệt của atelocolagen thu được từ sữa theo liều chiếu tia gama.

Fig.10 ảnh chụp thể hiện các thành phần của atelocolagen thu được từ sữa theo liều chiếu tia gama.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết.

Sáng chế đề xuất phương pháp tách collagen tan trong axit từ sữa bao gồm các bước sau:

- 1) rửa và nghiền sữa thành bột;
- 2) ngâm bột sữa thu được trong bước 1) trong dung dịch axit;
- 3) chiếu xạ dung dịch thu được trong bước 2), sau đó khuấy; và
- 4) lọc dung dịch đã khuấy thu được trong bước 3) và sấy sản phẩm.

Theo phương pháp của sáng chế, bước 1) là bước rửa và nghiền sữa.

Theo phương pháp của sáng chế, tốt hơn nếu quá trình rửa và nghiền sữa thành bột trong bước 1) được thực hiện theo các bước sau, nhưng không chỉ giới hạn ở các bước này:

- I) nghiền sữa đã rửa thành bột;
- II) sấy khô nhiệt độ thấp bột sữa thu được trong bước I); và
- III) nghiền sữa đã sấy khô nhiệt độ thấp thu được trong bước II).

Tốt hơn nếu sữa đã sấy khô nhiệt độ thấp được nghiền tới cỡ hạt nằm trong khoảng từ 100 đến 3000 μ m, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Theo phương pháp của sáng chế, bước 2) là bước ngâm sữa đã nghiền trong dung dịch axit:

Tốt hơn nếu dung dịch axit ở đây được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch axit axetic, dung dịch axit xitric, và dung dịch axit formic, và tốt hơn nữa là dung dịch axit axetic, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Nồng độ của dung dịch axit ở đây là 0,01M đến 2,0M, tốt hơn là 0,1M đến 1,5M, tốt hơn nữa là 0,3M đến 1,0M, và tốt nhất là 0,5M, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Theo phương pháp của sáng chế, bước 3) là bước chiếu xạ dung dịch và khuấy dung dịch này.

Tốt hơn nếu nguồn chiếu xạ được sử dụng ở đây là chùm tia gama hoặc chùm electron, và tốt hơn nữa là tia gama, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Liều chiếu xạ ở đây nằm trong khoảng từ 5kGy đến 200kGy, tốt hơn là 5kGy đến 100kGy, tốt hơn nữa là 5kGy đến 50kGy, tốt hơn nữa là 5kGy đến 25kGy, và tốt nhất là 10kGy, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Nếu liều chiếu xạ nằm ngoài khoảng nêu trên, ví dụ liều chiếu xạ thấp hơn 5kGy sẽ không có tác dụng chiết collagen bằng cách chiếu xạ và nếu liều chiếu xạ cao hơn 200kGy, collagen sẽ bị phân hủy hoặc biến tính.

Theo phương pháp của sáng chế, bước 4) là bước lọc dung dịch đã khuấy và sấy sản phẩm theo các bước sau, nhưng không chỉ giới hạn ở đó:

i) thu hồi chất kết tủa từ nước lọc còn lại sau khi lọc dung dịch đã khuấy;

ii) thu hồi dịch nổi bề mặt sau khi hòa tan chất kết tủa thu được trong bước i) trong dung dịch axit;

iii) thu hồi chất kết tủa bằng cách bổ sung muối vào dịch nổi bề mặt thu được trong bước ii); và

iv) hòa tan chất kết tủa thu được trong bước iii) trong dung dịch axit, sau đó pha loãng và sấy khô nhiệt độ thấp.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế atelocolagen bao gồm bước xử lý collagen tan trong axit thu được bằng phương pháp nêu trên bằng proteaza và sấy sản phẩm thu được.

Ở đây, tốt hơn nếu proteaza là pepsin hoặc trypsin, và tốt hơn nữa là pepsin, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Tốt hơn nếu nồng độ proteaza nằm trong khoảng từ 1 đến 10% trọng lượng, và tốt hơn nữa là 3 đến 6% trọng lượng, và tốt nhất là 5% trọng lượng, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Proteaza được sử dụng để loại bỏ peptit cuối của collagen. Việc loại bỏ cấu trúc chuỗi xoắn ở đầu của phân tử collagen dẫn đến làm mất tính kháng nguyên, gợi ý rằng phân tử collagen có thể được sử dụng để dàng làm phân tử sinh học.

Quá trình sấy ở đây được thực hiện bằng cách sấy khô nhiệt độ thấp ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -178 đến -70°C, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế atelocollagen từ sữa bao gồm các bước sau:

a) hòa tan collagen tan trong axit trong dung dịch hỗn hợp axit/pepsin, sau đó khuấy;

b) hòa tan chất kết tủa thu được từ hỗn hợp đã khuấy trong bước a) trong axit, bổ sung muối vào dung dịch này để kết tủa collagen; và

c) hòa tan collagen kết tủa thu được trong bước b) trong axit, sau đó pha loãng và sấy khô nhiệt độ thấp.

Theo sáng chế, phương pháp tách collagen từ sữa bằng cách sử dụng kỹ thuật chiếu xạ khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước rửa sữa và nghiền sữa; ngâm sữa đã nghiền trong dung dịch axit, sau đó chiếu xạ; chiết collagen tan trong axit; và xử lý collagen chiết được bằng pepsin, sau đó sấy khô nhiệt độ thấp. Bằng phương pháp này, có thể điều chế thành công atelocollagen.

Cụ thể, như được thể hiện trên Fig.1 và Fig.2, trước hết sữa được rửa và nghiền thành bột. Bột sữa được ngâm trong dung dịch axit, dung dịch này được chiếu xạ và khuấy. Dung dịch đã khuấy được lọc để thu được chất kết tủa. Chất kết tủa này được hòa tan trong axit. Dịch nổi bề mặt được thu hồi từ đó, muối được bổ sung vào dịch nổi này để thu được chất kết tủa. Chất kết tủa này được hòa tan trong axit, sau đó pha loãng và sấy khô nhiệt độ thấp để chiết collagen tan trong axit. Collagen tan trong axit này được hòa tan dung

dịch hỗn hợp của axit và pepsin. Hỗn hợp này được khuấy và chất kết tủa lại được thu hồi từ dung dịch đã khuấy. Chất kết tủa này được hòa tan trong axit, muối được bổ sung vào đó để kết tủa collagen. Collagen được hòa tan trong axit và pha loãng, sau đó sấy khô nhiệt độ thấp. Theo đó, atelocollagen được điều chế.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, sữa (*Nemopilema nomuri Kishinouye*) được rửa bằng nước cất, sau đó nghiền thành bột. Sữa đã nghiền được ngâm trong axit axetic, sau đó chiếu tia gama. Dung dịch axit chứa sữa đã chiếu xạ này được khuấy và lọc. Nước lọc được pha loãng và chất kết tủa được thu hồi. Chất kết tủa này được hòa tan trong axit axetic và dịch nổi bề mặt được thu hồi từ đó. Natri clorua được bổ sung vào dịch nổi bề mặt, và chất kết tủa được thu hồi. Chất kết tủa này được hòa tan lại trong axit axetic, sau đó sấy khô nhiệt độ thấp. Do đó, collagen tan trong axit được thu hồi. Collagen tan trong axit này được hòa tan trong hỗn hợp pepsin/axit axetic, sau đó khuấy. Chất kết tủa được thu hồi từ dung dịch đã khuấy, chất này được hòa tan trong axit. Muối được bổ sung vào dung dịch thu được để kết tủa collagen. Collagen kết tủa được hòa tan trong axit, pha loãng, và sấy khô nhiệt độ thấp. Do đó, atelocollagen được điều chế (xem Fig.1 và Fig.2).

Trọng lượng và cỡ hạt của sữa đã nghiền được nghiên cứu. Nếu sữa được nghiền trước khi sấy khô nhiệt độ thấp, trọng lượng sữa giảm 25%, và thời gian nghiền càng dài cỡ hạt của sữa đã sấy khô nhiệt độ thấp càng nhỏ. Cụ thể, nếu sữa được nghiền trong 60 giây, cỡ hạt của nó là khoảng 128µm (xem Fig.3 và Fig.4, và bảng 1 và 2).

Trong ví dụ thử nghiệm theo sáng chế, hiệu suất chiết collagen tan trong axit theo thời gian chiết được nghiên cứu. Nếu collagen được chiết sau khi khuấy hỗn hợp phản ứng trong 3 hoặc 5 ngày, hiệu suất chiết tăng đáng kể (xem Fig.5).

Trong ví dụ thử nghiệm theo sáng chế, quá trình chiết collagen tan trong axit phụ thuộc liều chiếu xạ được nghiên cứu. Khi liều chiếu xạ tăng lên, hiệu suất chiết collagen tăng lên, và cụ thể là ở liều chiếu xạ 10kGy và 25kGy,

hiệu suất chiết collagen tăng lên đáng kể. Tuy nhiên, ở liều chiếu xạ 100kGy, màu của collagen chuyển thành màu vàng nhạt (xem Fig.6).

Trong ví dụ thử nghiệm theo sáng chế, quá trình chiết atelocollagen phụ thuộc liều chiếu xạ được nghiên cứu. Do đó, khi liều chiếu xạ tăng lên, mức độ thay đổi trọng lượng của atelocollagen giảm đi (xem Fig.7).

Trong ví dụ thử nghiệm theo sáng chế, đặc tính hóa học và nhiệt phụ thuộc liều chiếu xạ của collagen được nghiên cứu. Do đó, collagen được chiết từ sữa chiếu xạ theo sáng chế được khẳng định là có dạng phổ giống với collagen có nguồn gốc động vật, cho thấy rằng việc chiếu xạ không ảnh hưởng đến đặc tính hóa học hoặc nhiệt của collagen (xem Fig.8 và Fig.9).

Trong ví dụ thử nghiệm theo sáng chế, sự thay đổi thành phần của atelocollagen phụ thuộc liều chiếu xạ được nghiên cứu. Atelocollagen được chiết từ sữa được chiếu tia gama ở liều 10kGy có thành phần giống với collagen từ động vật (xem Fig.10 và Bảng 3).

Do đó, phương pháp tách collagen tan trong axit từ sữa và phương pháp điều chế atelocollagen theo sáng chế có ưu điểm là hiệu suất chiết collagen cao so với phương pháp thông thường dựa vào việc xử lý hóa học, và tiết kiệm chi phí do giảm lượng hóa chất, và ngăn ngừa sự ô nhiễm môi trường do chúng có thể tận dụng lượng sữa rất lớn gây hại hệ sinh thái.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các phương án thực tế và được ưu tiên của sáng chế được minh họa như thể hiện trong các Ví dụ sau.

Tuy nhiên, cần hiểu rằng khi xem xét bản mô tả này chuyên gia trong lĩnh vực này có thể cải biến và cải tiến trong phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Rửa và nghiền sữa thành bột

Nemopilema nomuri Kishinouye là sản phẩm của National Fisheries Research & Development Institute, Hàn quốc và vận chuyển trong hộp nước đá từ cảng Biheung (Gunsan, Hàn quốc). Sữa đã ướp muối này được rửa bằng

nước cất ở 4°C trong 3 ngày. Sữa đã rửa được nghiền trong thiết bị trộn, và nước được loại bỏ bằng cách lọc bằng lưới lọc. Sau đó, sữa được sấy khô nhiệt độ thấp và nghiền trong thiết bị trộn.

Ví dụ 2: Ngâm sữa trong dung dịch axit và chiếu xạ

Sữa đã nghiền thu được trong Ví dụ 1 được ngâm trong dung dịch axit axetic 0,5M (loại axit băng, Merck, Darmstadt, Đức), sữa này được chiếu tia gamma (^{60}Co , kiểu chùm, MDS Nordion, Canada) ở liều 10kGy/giờ, tổng cộng 10 ~ 100kGy, sau đó khuấy ở nhiệt độ 4°C trong 2 tuần.

Ví dụ 3: Chiết collagen tan trong axit từ sữa

Dung dịch đã khuấy thu được trong Ví dụ 2 được lọc và nước lọc được pha loãng bằng dung dịch Na_2HPO_4 0,02M (Sigma, St. Luis MO, Mỹ) ở tỷ lệ 1:3 (theo thể tích), sau đó thẩm tách. Chất kết tủa được thu hồi bằng cách ly tâm (2000 vòng/phút, 6 phút). Chất kết tủa này được hòa tan trong dung dịch axit axetic 0,5M, sau đó ly tâm (2000 vòng/phút, 6 phút) để thu được dịch nổi bề mặt. Natri clorua (NaCl , Sigma) được bổ sung vào dịch nổi bề mặt này ở nồng độ 0,9M và chất kết tủa này được hòa tan trong dung dịch axit axetic 0,5M. Dung dịch này được pha loãng cho đến khi nồng độ axit axetic đạt 0,1M, sau đó sấy khô nhiệt độ thấp. Do đó, collagen tan trong axit được thu hồi.

Ví dụ 4: Điều chế atelocollagen

Collagen tan trong axit tách được trong Ví dụ 3 được hòa tan trong dung dịch hỗn hợp chứa dung dịch axit axetic 0,5M và 5% trọng lượng pepsin (EC 3.4.23.1, 2 lần kết tinh, Tokyo chemical industry, Nhật bản), sau đó khuấy ở nhiệt độ 4°C trong 24 giờ. Dung dịch đã khuấy được pha loãng bằng dinatri hydro phosphat 0,02M (Na_2HPO_4). chất kết tủa được thu hồi bằng cách ly tâm. Chất kết tủa này được hòa tan trong dung dịch axit axetic 0,5M. Natri clorua được bổ sung vào ở nồng độ 0,9M để kết tủa collagen. Collagen kết tủa

được hòa tan lại trong dung dịch axit axetic 0,5M, và pha loãng cho đến khi nồng độ axit axetic đạt 0,1M, sau đó sấy khô nhiệt độ thấp. Theo đó, atelocolagen được điều chế.

Ví dụ thử nghiệm 1: Nghiên cứu trọng lượng của sữa khi nghiền thành bột

Nemopilema nomuri Kishinouye là sữa khổng lồ chứa 90% là nước. Do đó, thể tích sữa cần được giảm trước khi sấy khô nhiệt độ thấp. Để nghiên cứu trọng lượng của sữa khi nghiền thành bột, sữa được rửa bằng cách tương tự như được mô tả trong Ví dụ 1 được nghiền trong thiết bị trộn. Tiếp đó, trọng lượng được xác định.

Do đó, như được thể hiện trên Fig.3 và bảng 1, trọng lượng của sữa giảm đi 25% sau khi nghiền thành bột (Fig.3 và Bảng 1).

Bảng 1

	Mức giảm trọng lượng sau khi nghiền thành bột (%)
Mức giảm trọng lượng trung bình	25,50138
Sai số tiêu chuẩn	1,101062

Ví dụ thử nghiệm 2: Nghiên cứu cỡ hạt của sữa theo thời gian nghiền thành bột

Để nghiên cứu cỡ hạt của sữa theo thời gian nghiền thành bột, sữa đã sấy khô nhiệt độ thấp thu được bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1 được nghiền trong 0, 15, 30, 45, và 60 giây, sau đó quan sát dưới kính hiển vi điện tử để xác định cỡ hạt của sữa đã nghiền.

Kết quả là như được thể hiện trên Fig.4 và bảng 2, cỡ hạt của sữa giảm đi theo thời gian nghiền thành bột và cụ thể là khi sữa đã sấy khô nhiệt độ thấp được nghiền trong 60 giây, cỡ hạt giảm 17 lần so với cỡ hạt thu được khi nghiền trong 15 giây (Fig.4 và bảng 2).

Bảng 2

Thời gian nghiền thành bột (giây)	15	30	45	60
-----------------------------------	----	----	----	----

Cỡ hạt trung bình(μm)	2841,98	1214,30	472,02	128,69
Sai số tiêu chuẩn	322,41	211,87	116,60	22,87

Ví dụ thử nghiệm 3: Phân tích hiệu suất chiết collagen tan trong axit theo thời gian chiết

Để nghiên cứu hiệu suất chiết collagen tan trong axit theo thời gian chiết, sữa đã nghiền trong Ví dụ 1 được ngâm trong dung dịch axit axetic 0,5M (loại axit băng, Merck, Darmstadt, Đức), sữa này được chiếu tia gama ở liều 10kGy và 25kGy, sau đó khuấy ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 1, 3, và 5 ngày. Collagen được chiết bằng cách tương tự như được mô tả trong Ví dụ 3. Collagen thu được được cân, và hiệu suất được tính bằng công thức toán học 1 dưới đây (Fig.5).

Công thức toán học 1

Hiệu suất (%) = (trọng lượng của collagen tan trong axit chiết được ở liều x kGy / trọng lượng của collagen tan trong axit chiết được ở liều 0 kGy) X 100

Kết quả là như được thể hiện trên Fig.5, hiệu suất collagen tăng lên khi số ngày khuấy tăng lên. Ví dụ, hiệu suất sau 3 hoặc 5 ngày khuấy lớn hơn hiệu suất sau 1 ngày khuấy. Liên quan đến việc chiếu xạ, hiệu suất tăng lên khi sữa được chiếu tia gama ở liều 25kGy so với khi sữa được chiếu tia gama ở liều 10kGy (Fig.5).

Ví dụ thử nghiệm 4: Phân tích hiệu suất chiết collagen tan trong axit theo liều chiếu xạ

Để nghiên cứu hiệu suất chiết collagen tan trong axit theo liều chiếu xạ, sữa đã nghiền trong Ví dụ 1 được ngâm trong dung dịch axit axetic 0,5 và 1M, sau đó chiếu tia gama ở liều 0, 10, 25, 50, và 100kGy, sau đó khuấy ở nhiệt độ 4°C trong 2 tuần. Collagen được chiết bằng cách tương tự như được

mô tả trong Ví dụ 3. Collagen thu được được cân, và hiệu suất được tính bằng công thức toán học 1 (Fig.6).

Kết quả là như được thể hiện trên Fig.6, hiệu suất ở liều 0kGy được cho là 100%. Khi liều chiếu xạ tăng lên, hiệu suất collagen tăng lên. Cụ thể, hiệu suất collagen tăng đáng kể tới mức $421,20 \pm 67,66\%$ ở liều 25kGy (Fig.6).

Ví dụ thử nghiệm 5: phân tích hiệu suất chiết atelocollagen theo liều chiếu xạ

Để nghiên cứu hiệu suất chiết atelocollagen theo liều chiếu xạ, sửa đã nghiên cứu trong Ví dụ 1 được ngâm trong dung dịch axit axetic 0,5 và 1M, sau đó chiếu tia gama ở liều 0, 10, 25, 50, và 100kGy, sau đó khuấy ở nhiệt độ 4°C trong 2 tuần. Collagen tan trong axit được chiết bằng cách tương tự như được mô tả trong Ví dụ 3. Tiếp đó, collagen tan trong axit đã tách này được ngâm trong dung dịch hỗn hợp bao gồm dung dịch axit axetic 0,5M và 5% trọng lượng pepsin (EC 3.4.23.1, kết tinh hai lần, Tokyo chemical industry, Nhật bản), sau đó khuấy ở nhiệt độ 4°C trong 24 giờ. Atelocollagen được chiết bằng cách tương tự như được mô tả trong Ví dụ 4. Atelocollagen thu được được cân, và hiệu suất được tính bằng công thức toán học 2 sau đây.

Công thức toán học 2

Hiệu suất (%) = (trọng lượng atelocollagen sau khi xử lý bằng pepsin / trọng lượng collagen tan trong axit) x 100

Do đó, như được thể hiện trên Fig.7, trọng lượng atelocollagen thu được sau khi xử lý bằng pepsin giảm đi nhưng mức độ thay đổi trọng lượng giảm đi khi atelocollagen được chiếu tia gama ở liều cao. Nếu collagen được chiết sau khi chiếu xạ, hiệu suất chiết có thể tăng lên (Fig.7).

Ví dụ thử nghiệm 6: Nghiên cứu đặc tính hóa học của collagen theo liều chiếu xạ

Đặc tính hóa học của collagen tan trong axit được nghiên cứu bằng cách sử dụng phổ quang kế ATR-FTIR.

Cụ thể, sữa đã nghiền thu được bằng cách tương tự như được mô tả trong Ví dụ thử nghiệm 4 được chiếu tia gama ở liều 0, 10, và 25kGy, sau đó chiết collagen. Collagen chiết được và collagen có nguồn gốc động vật 'collagen typ I từ đuôi chuột' được phân tích bằng cách sử dụng phổ quang kế ATR-FTIR (Bruker TEMSOR 37, Bruker AXS. Inc., Đức). Điều kiện phân tích là như sau; khoảng phổ: $500\text{-}4000\text{cm}^{-1}$, kiểu ATR, số lần quét: 64, và hiệu suất phân giải: 4 cm^{-1} .

Theo đó, đặc tính hóa học của collagen tan trong axit được khẳng định như được thể hiện trên Fig.8. Collagen có nguồn gốc sinh vật biển có dạng phổ giống collagen của động vật. Các vùng amit A, I và II có liên quan trực tiếp đến dạng phổ của polypeptit. Vùng amit A ($3400\text{-}3440\text{ cm}^{-1}$) liên quan đến dao động giãn của nhóm N-H và vùng amit I ($1600\text{-}1660\text{cm}^{-1}$) liên quan đến dao động giãn của nhóm carbonyl và có thể dùng để nghiên cứu cấu trúc bậc hai của protein. Vùng amit II (1550cm^{-1}) liên quan đến dao động uốn của nhóm NH và dao động giãn của nhóm CN, và cũng liên quan đến cấu trúc chuỗi xoắn ba của collagen. Collagen từ sữa được xác định với các đỉnh tương ứng với vùng amit I, amit II, và amit A lần lượt ở 1635 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} , và 3280 cm^{-1} (Fig.8).

Ví dụ thử nghiệm 7: Nghiên cứu đặc tính nhiệt của collagen theo liều chiếu xạ

Đặc tính nhiệt của collagen tan trong axit được nghiên cứu bằng cách sử dụng thiết bị đo nhiệt lượng bằng tia quét vi phân.

Cụ thể, sữa đã nghiền thu được bằng cách tương tự như được mô tả trong Ví dụ thử nghiệm 4 được chiếu tia gama ở liều 0, 10, và 25kGy, sau đó chiết collagen. Collagen chiết được này và collagen typ I từ đuôi chuột được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị đo nhiệt lượng bằng tia quét vi phân (TA Q100, TA instruments, Mỹ). Các mẫu được đo trong môi trường nitơ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 300°C với tốc độ gia nhiệt $10^{\circ}\text{C}/\text{phút}$.

Kết quả là như được thể hiện trên Fig.9, collagen tan trong axit chiết được sau khi được chiếu tia gama ở liều 10kGy và 25kGy có nhiệt độ theo sự thay đổi nhiệt độ giống với collagen chiết được từ sữa không được chiếu tia gama. Cụ thể, collagen tan trong axit chiết được từ sữa sau khi được chiếu xạ ở liều 10kGy có nhiệt độ gần giống với collagen chiết được từ sữa không được chiếu tia gama. Do đó, đã khẳng định được rằng việc xử lý chiếu xạ để làm tăng hiệu suất collagen từ sữa không ảnh hưởng đến các đặc tính nhiệt của collagen (Fig.9).

Ví dụ thử nghiệm 8: điện di atelocolagen trên gel SDS-PAGE theo liều chiếu xạ

Sự thay đổi thành phần của atelocolagen theo liều chiếu xạ được phân tích bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE.

Cụ thể, quá trình điện di được thực hiện bằng cách sử dụng Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) theo phương pháp của Laemmli (1970). Gel polyacrylamit được điều chế chứa 5% gel gom và 5% gel tách. Như đã giải thích trong Ví dụ thử nghiệm 5, sữa được ngâm trong dung dịch axit axetic 0,5M và được chiếu tia gama ở liều 0, 10, và 25kGy, nhờ đó atelocolagen được chiết. Nồng độ của mẫu atelocolagen được điều chỉnh bằng nước cất tới 20mg/ml, mẫu này được trộn với Tris-HCl 0,25M (độ pH=6,8) chứa 10% SDS, 20% glyxerol, 5% 2-mercaptoetanol, và 0,1% thuốc nhuộm xanh da trời bromophenol. Hỗn hợp này được gia nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 3 phút. Collagen typ I từ đuôi chuột được điều chế bằng cách tương tự như cách sử dụng để điều chế collagen từ sữa nêu trên và tiếp đó được dùng làm protein đối chứng để phân tích đối chiếu. Mẫu collagen từ sữa và collagen typ I từ đuôi chuột được cho lên gel polyacrylamit, sau đó điện di ở dòng điện 20 mA/gel. Khi điện di xong, gel được nhuộm bằng 0,25% (trọng lượng/thể tích) thuốc nhuộm xanh da trời Coomassie R250, sau đó làm mất màu bằng hỗn hợp metanol/axit axetic. Tiếp đó, collagen từ sữa và collagen typ I từ đuôi chuột được so sánh.

Kết quả là như được thể hiện trên Fig.10, collagen typ I từ đuôi chuột bao gồm hai mạch $\alpha 1$, mạch $\alpha 2$ và thành phần β (dime có liên kết ngang là mạch α). Đồng thời, mạch $\alpha 1$ và mạch $\alpha 2$ của collagen có nguồn gốc từ sữa có độ linh động giống nhau nhưng thành phần β có độ linh động yếu (Fig.10).

Ví dụ thử nghiệm 9: Phân tích axit amin của atelocollagen theo liều chiếu xạ

Các axit amin của atelocollagen chiết được từ sữa đã được ngâm trong dung dịch axit axetic 0,5M và chiếu tia gama theo cách giống như được mô tả trong Ví dụ thử nghiệm 5 và collagen typ I từ đuôi chuột được phân tích.

Kết quả là như thể hiện trong bảng 3, cả collagen từ sữa và collagen typ I từ đuôi chuột đều chứa nhiều glyxin, alanin, và prolin, đây là đặc trưng thông thường của collagen. Cụ thể, thành phần axit amin của atelocollagen chưa được chiếu tia gama không khác với thành phần axit amin của atelocollagen được chiếu tia gama ở liều 10kGy. Lượng hydroxyprolin trong collagen từ sữa theo sáng chế là thấp hơn so với lượng hydroxyprolin trong collagen có nguồn gốc động vật là collagen typ I từ đuôi chuột (bảng 3).

Bảng 3

Axit amin (đơn vị: %mol)	Atelocollagen (Liều chiếu xạ, kGy)		Collagen typ I từ đuôi chuột
	0	10	
Xystein và xystin	0,75	0,64	0,16
Asparagin và axit aspartic	2,25	3,04	4,70
Glutamin và axit glutamic	9,06	9,30	7,57
Hydroxyprolin	0,40	1,08	9,38
Serin	6,00	6,23	3,20
Glyxin	10,05	10,62	32,90
Histidin	1,14	1,07	0,43
Arginin	3,37	3,96	5,29
Threonin	6,67	6,24	1,80
Alanin	9,73	10,02	11,48
Prolin	12,21	9,42	12,80
Tyrosin	2,83	2,12	0,19
Valin	6,88	8,14	2,41
Methionin	2,03	1,30	0,59

Isoleuxin	6,44	7,29	1,23
Leuxin	8,66	8,90	2,32
Phenylalanin	4,68	3,17	1,25
Tryptophan	1,46	0,68	0,17
Lysin	5,10	6,78	2,12
Tổng cộng	100 (%)	100 (%)	100 (%)

Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng các khái niệm và các phương án cụ thể được bộc lộ trong phần mô tả trên đây có thể dễ dàng được sử dụng làm cơ sở để cải biến hoặc thiết kế các phương án khác để thực hiện mục đích tương tự theo sáng chế. Chuyên gia trong lĩnh vực này cũng sẽ hiểu được rằng các phương án tương đương này không đi chệch khỏi phạm vi sáng chế như nêu trong Yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tách collagen tan trong axit từ sữa bao gồm các bước sau:

- 1) rửa và nghiền sữa thành bột;
- 2) ngâm bột sữa thu được ở bước 1) trong dung dịch axit;
- 3) chiếu tia gamma ở liều lượng 5 kGy ~ 100 kGy dung dịch thu được ở bước 2), sau đó khuấy; và
- 4) lọc dung dịch đã khuấy thu được ở bước 3) và sấy sản phẩm.

2. Phương pháp tách collagen tan trong axit từ sữa theo điểm 1, trong đó bước

1) được thực hiện theo các bước sau:

- I) nghiền sữa đã rửa thành bột;
- II) đông khô bột sữa thu được ở bước I); và
- III) nghiền sữa đã đông khô thu được ở bước II).

3. Phương pháp tách collagen tan trong axit từ sữa theo điểm 2, trong đó sữa đã đông khô được nghiền tới cỡ hạt nằm trong khoảng từ 100 đến 3000 μ m ở bước III).

4. Phương pháp tách collagen tan trong axit từ sữa theo điểm 1, trong đó dung dịch axit ở bước 2) được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch axit axetic, dung dịch axit xitric, và dung dịch axit formic.

5. Phương pháp tách collagen tan trong axit từ sữa theo điểm 1, trong đó nồng độ của dung dịch axit ở bước 2) nằm trong khoảng từ 0,01M đến 2,0M.

6. Phương pháp tách collagen tan trong axit từ sữa theo điểm 1, trong đó bước 4) được thực hiện theo các bước sau:

- i) thu hồi chất kết tủa từ nước lọc còn lại sau khi lọc dung dịch đã khuấy;

ii) thu hồi dịch nổi bề mặt sau khi hòa tan chất kết tủa thu được ở bước i) trong dung dịch axit;

iii) thu hồi chất kết tủa này bằng cách bổ sung muối vào dịch nổi bề mặt thu được ở bước ii); và

iv) hòa tan chất kết tủa thu được ở bước iii) trong dung dịch axit, sau đó pha loãng và đông khô.

7. Phương pháp điều chế atelocolagen bao gồm bước xử lý collagen tan trong axit thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 bằng proteaza và sấy sản phẩm thu được.

8. Phương pháp điều chế atelocolagen theo điểm 6, trong đó proteaza là pepsin hoặc trypsin.

9. Phương pháp điều chế atelocolagen theo điểm 6, trong đó proteaza được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 10% trọng lượng.

10. Phương pháp điều chế atelocolagen theo điểm 6, trong đó proteaza có tác dụng loại bỏ peptit cuối của collagen.

11. Phương pháp điều chế atelocolagen theo điểm 6, trong đó quá trình sấy được thực hiện bằng cách làm đông khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -178 đến -70°C.

12. Phương pháp điều chế atelocolagen theo điểm 6, trong đó phương pháp này được thực hiện theo các bước sau:

a) hòa tan collagen tan trong axit trong dung dịch hòa lẫn axit/pepsin, sau đó khuấy;

b) hòa tan kết tủa thu được từ hỗn hợp đã khuấy ở bước a) trong axit, để muối này kết tủa collagen, và

c) hòa tan collagen đã kết tủa ở bước b) trong axit, sau đó pha loãng và đông khô.

1/7

Fig. 1

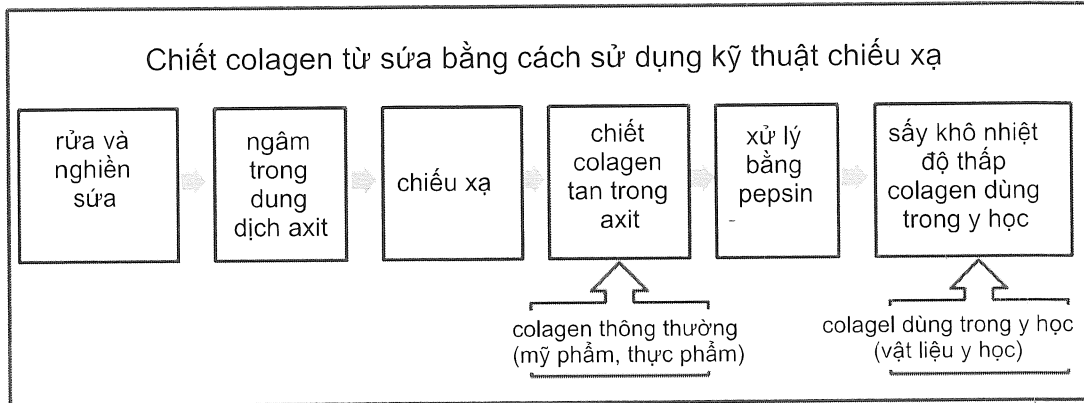
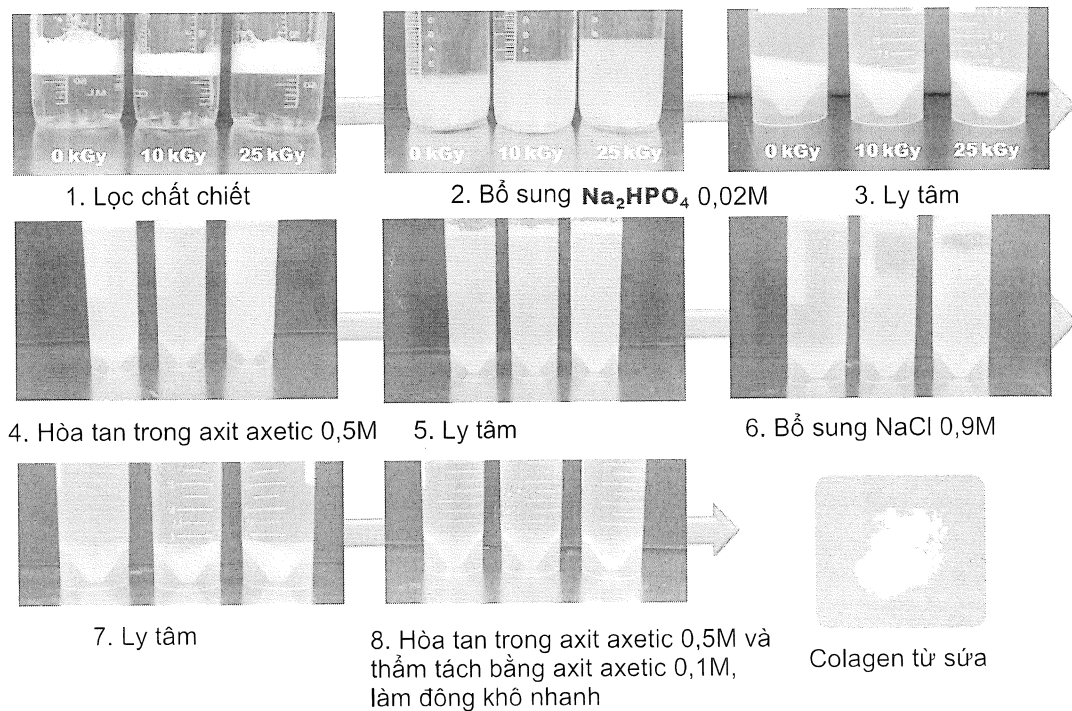


Fig. 2



2/7

Fig. 3

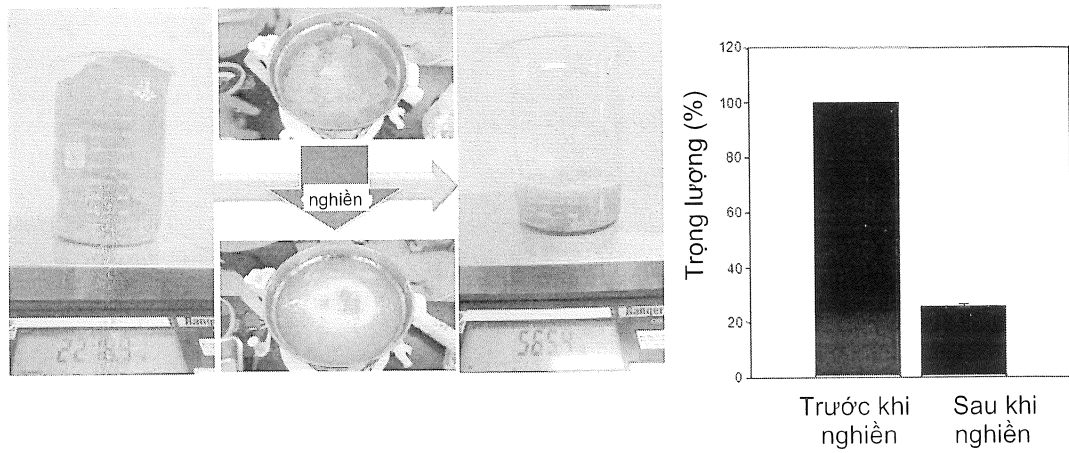
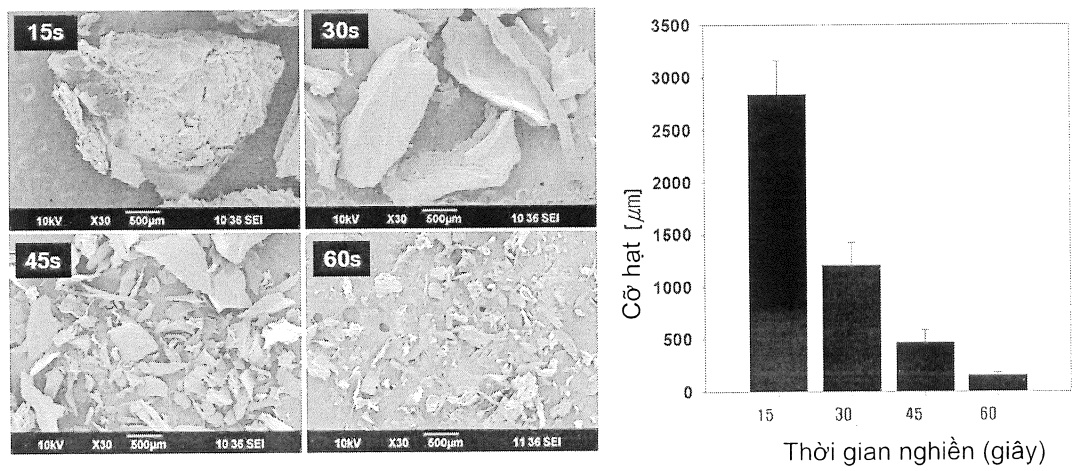
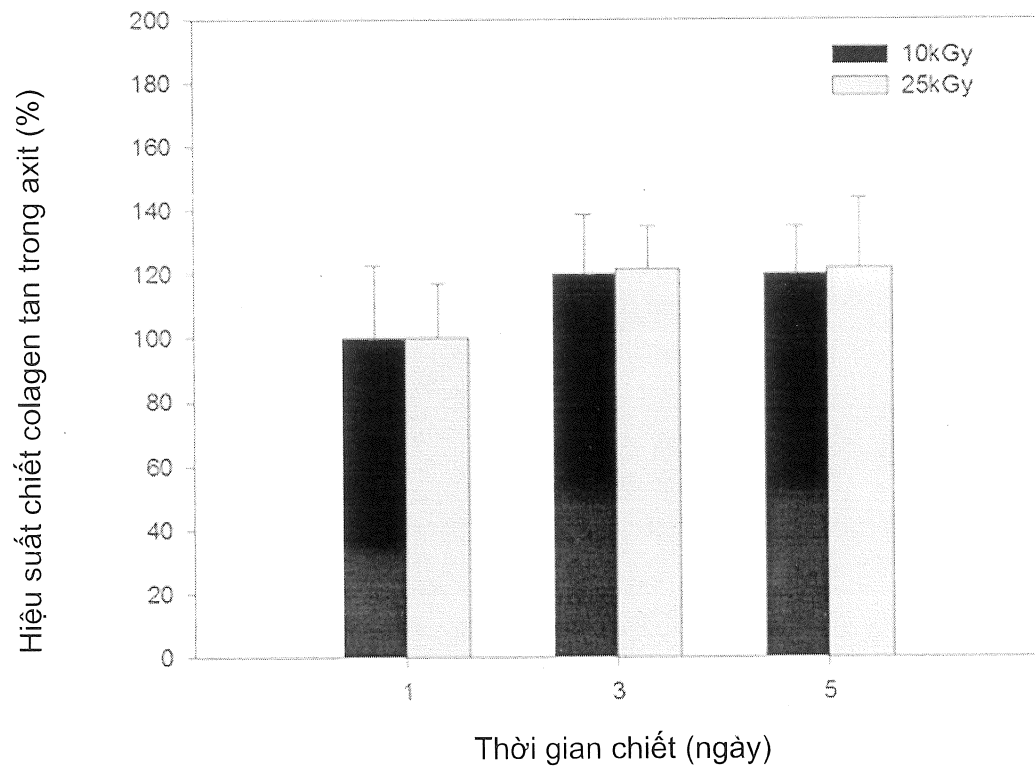


Fig. 4



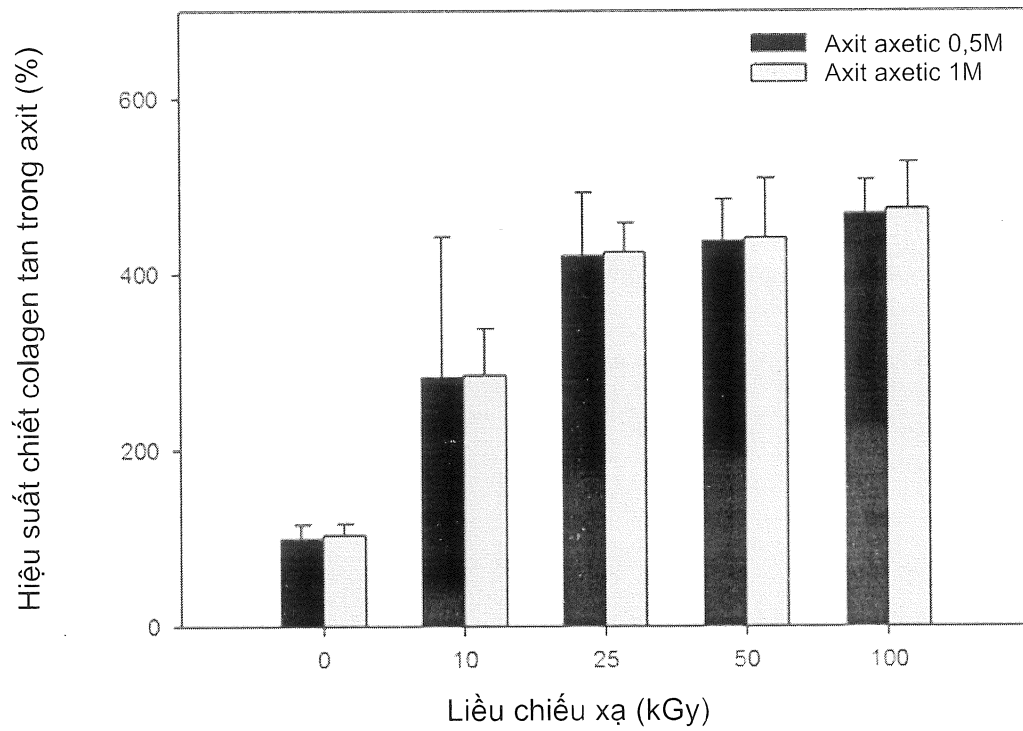
3/7

Fig.5



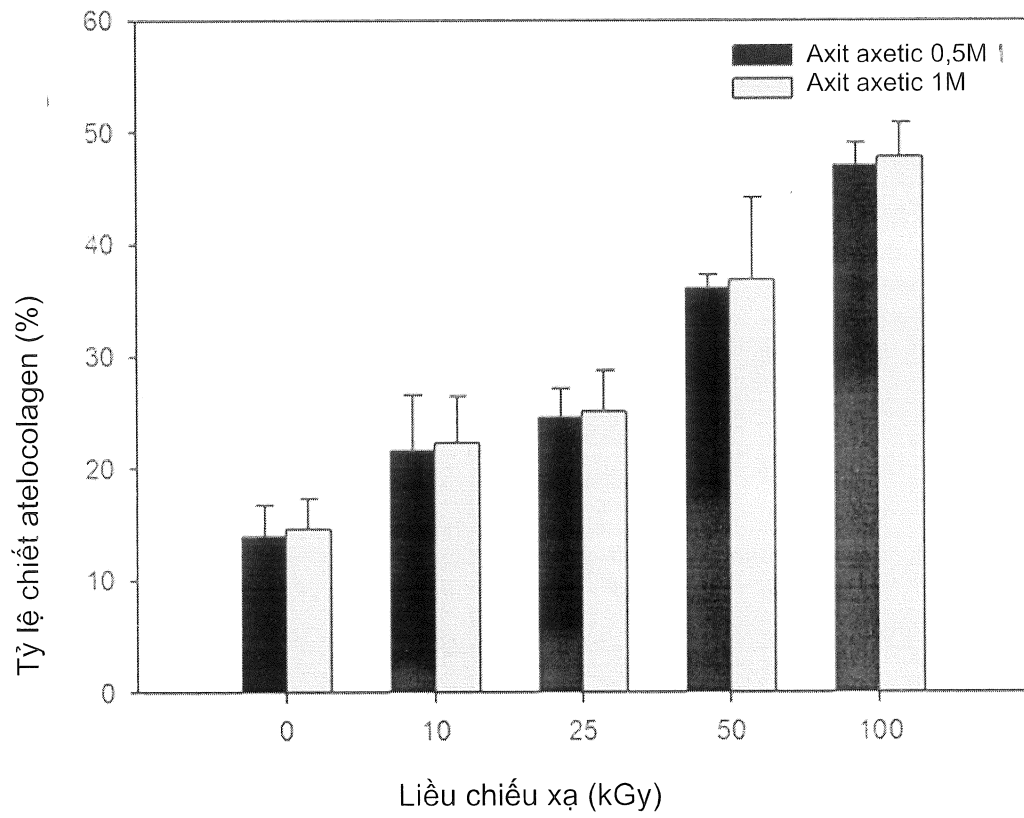
4/7

Fig. 6



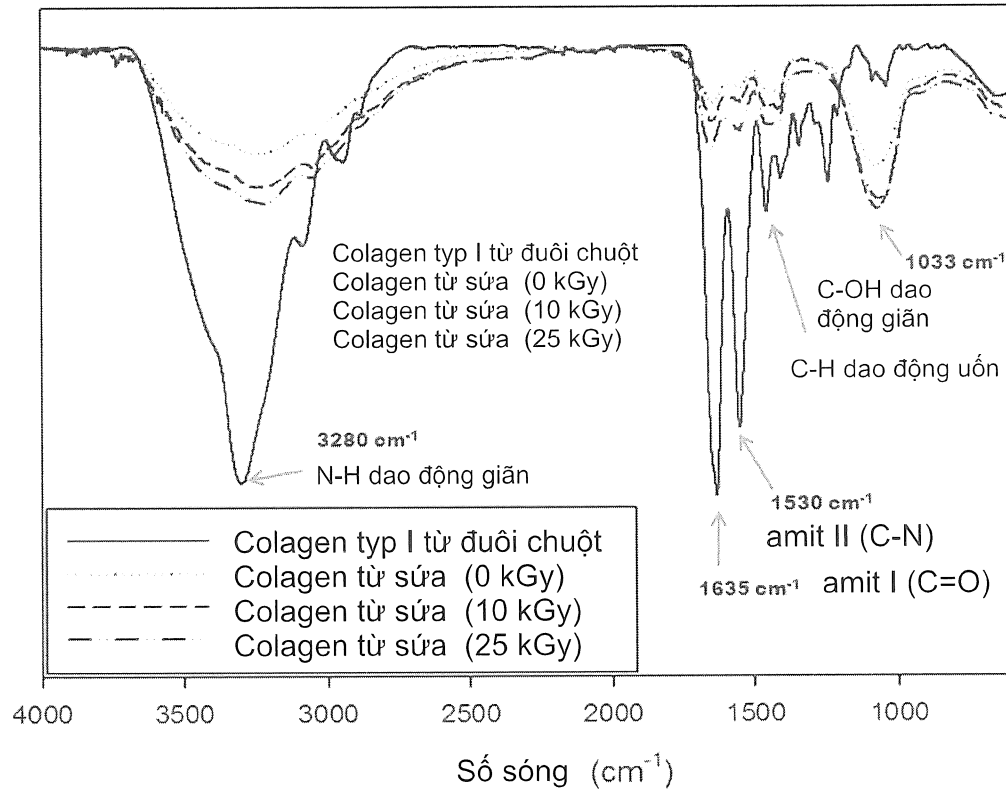
5/7

Fig. 7



6/7

Fig. 8



7/7

Fig. 9

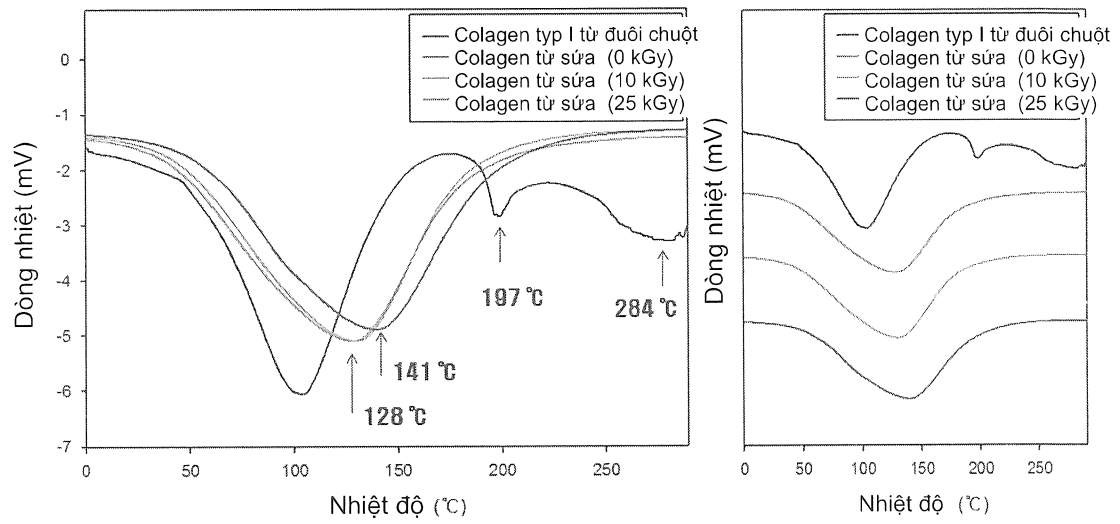


Fig. 10

