



(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)



2-0003783

(51) **A01G 18/00; A01G 18/40; A01G 18/20**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00001

(22) 05/01/2022

(45) 25/11/2024 440

(43) 25/07/2022 412

(73) **VIỆN ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ (VN)**

25 Lê Thánh Tông, Phường Phan Chu Trinh, Quận Hoàn Kiếm, Thành phố Hà Nội

(72) **HOÀNG QUỐC CHÍNH (VN); Vũ Xuân Tạo (VN); Trần Bảo Trâm (VN); Trương Thị Chiên (VN).**

(74) **Công ty TNHH Dịch thuật sáng chế PROINVEN (PROINVEN CO.,LTD.)**

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CORDYCEPIN NGOẠI BÀO BẰNG PHƯƠNG PHÁP
LÊN MEN TĨNH**

(57) **Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất Cordycepin ngoại bào bằng phương pháp lên men tĩnh.**

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất Cordycepin ngoại bào bằng phương pháp lên men tĩnh.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cordycepin, một hoạt chất đặc trưng của nấm *Cordyceps militaris* (*C.militaris*), sở hữu nhiều đặc tính dược lý quan trọng có giá trị trên thị trường toàn cầu và được dự báo đạt trên 1 tỷ đô la Mỹ vào năm 2026.

Các công trình nghiên cứu trên toàn thế giới đã chỉ ra rằng hoạt chất Cordycepin có nhiều tác dụng dược lý khác nhau, như tính kháng ung thư, kháng vi sinh vật, ức chế quá trình di căn của các tế bào ung thư, nâng cao khả năng miễn dịch cho cơ thể, tăng cường sức khỏe cho những bệnh nhân đang điều trị ung thư. Ngoài ra, hoạt chất Cordycepin còn có tác dụng tăng cường chức năng gan, hỗ trợ chữa trị bệnh viêm gan virus, viêm gan B, C và ung thư gan.

Hoạt chất Cordycepin được tạo bởi nhân purin liên kết với đường ribofuranoza bằng liên kết β – N9 – glycosit, với công thức phân tử là $C_{10}H_{13}N_5O_3$.

Hiện nay trên thị trường, Cordycepin được sản xuất chủ yếu bằng phương pháp tách chiết từ quả thể của nấm *C.militaris*. Tuy nhiên, do hàm lượng Cordycepin trong quả thể của nấm *C. militaris* thấp (<1% trọng lượng khô) và quy trình tách chiết phức tạp, nên chi phí sản xuất cao. Chi phí sản xuất ra 1 g Cordycepin từ quả thể nấm *C.militaris* nằm trong khoảng từ 5 – 15 triệu đồng tùy thuộc vào độ tinh sạch của Cordycepin.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để tăng hiệu suất kinh tế và sản lượng Cordycepin, mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình sản xuất Cordycepin ngoại bào bằng phương pháp lên men tĩnh. Quy trình này bao gồm hai bước sau:

- làm tăng hàm lượng Cordycepin ngoại bào bằng cách bổ sung mỳ chính (mononatri glutamat) vào môi trường lên men nấm *C.militaris*; và
- tách Cordycepin từ môi trường lên men bằng phương pháp tinh thể hóa.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất Cordycepin ngoại bào bằng phương pháp lên men tĩnh. Sau đây, quy trình theo giải pháp hữu ích sẽ được mô tả một cách chi tiết.

Quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm hai bước sau:

- làm tăng hàm lượng Cordycepin ngoại bào bằng cách bổ sung mỳ chính (mononatri glutamat) vào môi trường lên men nấm *C.militaris* bao gồm các bước:
 - + nuôi cấy giống nấm *C.militaris* trên môi trường thạch khoai tây dextroza (potato dextrose agar- PDA) trong đĩa tròn 9 cm², ở nhiệt độ 25°C trong 7 ngày, trong bóng tối;
 - + thu bào tử bằng cách bổ sung 2 ml nước cất vào đĩa nấm, dùng que cấy gạt nhẹ trên bề mặt nấm để thu bào tử;
 - + chuyển 2 ml dung dịch chứa bào tử nấm vào bình tam giác 500 ml có chứa 200 ml môi trường nhân giống bao gồm: glucoza 60g/l; trypton 17g/l; K₂HPO₄.3H₂O 1,1g/l, MgSO₄ 0,9 g/l, sau đó giữ bình tam giác ở 25°C, lắc ở tốc độ 110 vòng/phút trong 3 ngày, trong bóng tối;
 - + chuyển 30 ml giống nấm vào bình tròn 500 ml có chứa 270 ml môi trường sản xuất Cordycepin bao gồm: glucoza 60g/l; trypton 17g/l; mononatri

glutamat 1g/l; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1,1g/l, $MgSO_4$ 0,9 g/l; $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 0,7g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g/l, giữ bình nuôi cấy ở 25°C trong 24 ngày, trong tối;

+ sau 24 ngày, thu dịch lên men, đo nồng độ Cordycepin bằng phương pháp sắc ký lỏng HPLC; và

- tách Cordycepin từ môi trường lên men bằng phương pháp tinh thể hóa bao gồm các bước:

- + lọc môi trường lên men nấm để thu dịch lên men;
- + cô đặc dịch nuôi cấy ở 80°C;
- + bổ sung nước cất (độ pH = 3) vào dịch cô đặc theo tỷ lệ (1 g mẫu : 10 ml nước), giữ ở 60°C trong 6 tiếng;
- + lọc hoặc ly tâm để thu dịch lỏng;
- + bổ sung than hoạt tính theo tỷ lệ (200 g/l) vào dịch lọc, và giữ ở 80°C trong 6 tiếng;
- + lọc hoặc ly tâm để thu dịch lỏng;
- + điều chỉnh độ pH của dịch lỏng bằng khoảng 5;
- + cô dịch lọc ở 80°C để thu được phần cặn;
- + hòa tan phần cặn thu được trong cồn tuyệt đối theo tỷ lệ 1 g cặn : 4 ml cồn;
- + giữ dung dịch thu được ở 70°C trong 1 giờ;
- + để nguội, sau đó giữ ở -4°C qua đêm hoặc đến khi nhìn thấy tinh thể xuất hiện;
- + lọc qua giấy lọc số 2 để thu được tinh thể;
- + cho phép tinh thể tự khô ở nhiệt độ phòng, bảo quản tinh thể Cordycepin ở 4°C.

Quy trình tăng hàm lượng Cordycepin bằng phương pháp lên men tĩnh có chi phí sản xuất thấp hơn so với quy trình nuôi quả thể do chi phí nguyên vật liệu đầu vào và thời gian nuôi trồng chỉ bằng $\frac{1}{2}$ thời gian nuôi quả thể. Thêm vào đó, quy trình tách Cordycepin từ dung dịch lên men tĩnh không đòi hỏi thao tác phá vỡ màng tế bào như trong tách chiết Cordycepin từ quả thể, do đó rút ngắn được thời gian tách chiết và tăng hiệu suất thu hồi Cordycepin. Những lợi thế trong quy trình sản xuất Cordycepin bằng phương pháp lên men tĩnh, vì vậy, có thể giảm giá thành sản xuất Cordycepin xuống còn bằng $\frac{1}{3}$ so với quy trình tách Cordycepin từ quả thể nấm *C.militaris* thông thường. Thêm vào đó, nồng độ Cordycepin trong môi trường chứa mononatri glutamat cao hơn 1,65 lần so với môi trường không có mononatri glutamat. Do đó, làm tăng hiệu suất kinh tế của quá trình sản xuất Cordycepin bằng phương pháp lên men tĩnh.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Làm tăng hàm lượng Cordycepin và tách Cordycepin từ môi trường lên men trong bình 500 ml:

- làm tăng hàm lượng Cordycepin ngoại bào bằng cách bổ sung mỳ chính (mononatri glutamat) vào môi trường lên men nấm *C.militaris* bao gồm các bước:

+ nuôi cấy giống nấm *C.militaris* trên một đĩa (9 cm^2) thạch khoai tây dextroza (potato dextrose agar- PDA), ở nhiệt độ 25°C trong 7 ngày, trong bóng tối;

+ thu bào tử bằng cách bổ sung 2 ml nước cất vào đĩa nấm, dùng que cấy gạt nhẹ trên bề mặt nấm để thu bào tử;

+ chuyển 2 ml nước chứa bào tử nấm vào bình tam giác 500 ml có chứa 200 ml môi trường nhân giống bao gồm: glucoza 60g/l; trypton 17g/l; $\text{K}_2\text{HPO}_4.3\text{H}_2\text{O}$ 1,1g/l, MgSO_4 0,9 g/l, sau đó giữ bình tam giác ở 25°C , lắc ở tốc độ 110 vòng/phút trong 3 ngày, trong bóng tối;

+ chuyển 30 ml giống nấm vào bình tròn 500 ml có chứa 270 ml môi trường sản xuất Cordycepin bao gồm: glucoza 60g/l; trypton 17g/l; mononatri glutamat 1g/l; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1,1g/l, $MgSO_4$ 0,9 g/l; $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 0,7g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g/l, giữ bình nuôi cấy ở 25°C trong 24 ngày, trong tối;

+ sau 24 ngày, thu dịch lên men, đo nồng độ Cordycepin bằng phương pháp sắc ký lỏng HPLC; và

- tách Cordycepin từ môi trường lên men bằng phương pháp tinh thể hóa bao gồm các bước:

- + lọc môi trường lên men nấm để thu dịch lên men;
- + cô đặc dịch nuôi cấy ở 80°C;
- + bổ sung nước cất (độ pH = 3) vào dịch cô đặc theo tỷ lệ (1 g mẫu : 10 ml nước), giữ ở 60°C trong 6 tiếng;
- + lọc hoặc ly tâm để thu dịch lỏng;
- + bổ sung than hoạt tính theo tỷ lệ (200 g/l) vào dịch lọc, và giữ ở 80°C trong 6 tiếng;
- + lọc hoặc ly tâm để thu dịch lỏng;
- + điều chỉnh độ pH của dịch lỏng bằng khoảng 5;
- + cô dịch lọc ở 80°C để thu được phần cặn;
- + hòa tan phần cặn thu được trong cồn tuyệt đối theo tỷ lệ 1 g cặn : 4 ml cồn;
- + giữ dung dịch thu được ở 70°C trong 1 giờ;
- + để nguội, sau đó giữ ở -4°C qua đêm hoặc đến khi nhìn thấy tinh thể xuất hiện;
- + lọc qua giấy lọc số 2 để thu được tinh thể;

+ cho phép tinh thể tự khô ở nhiệt độ phòng, bảo quản tinh thể Cordycepin ở 4°C.

Ví dụ 2: Làm tăng hàm lượng Cordycepin và tách Cordycepin từ môi trường lên men trong bình 1000 ml:

- làm tăng hàm lượng Cordycepin ngoại bào bằng cách bổ sung mỳ chính (mononatri glutamat) vào môi trường lên men nấm *C.militaris* bao gồm các bước:

+ nuôi cấy giống nấm *C.militaris* trên một đĩa (9 cm²) thạch khoai tây dextroza (potato dextrose agar- PDA), ở nhiệt độ 25°C trong 7 ngày, trong bóng tối;

+ thu bào tử bằng cách bổ sung 2 ml nước cất vào mỗi đĩa nấm, dùng que cấy gạt nhẹ trên bề mặt nấm để thu bào tử;

+ chuyển 2 ml dịch chứa bào tử nấm vào bình tam giác 500 ml có chứa 200 ml môi trường nhân giống bao gồm: glucoza 60g/l; trypton 17g/l; K₂HPO₄.3H₂O 1,1g/l, MgSO₄ 0,9 g/l, sau đó giữ bình tam giác ở 25°C, lắc ở tốc độ 110 vòng/phút trong 3 ngày, trong bóng tối;

+ chuyển 60 ml giống nấm vào bình tròn 1000 ml có chứa 540 ml môi trường sản xuất Cordycepin bao gồm: glucoza 60g/l; trypton 17g/l; mononatri glutamat 1g/l; K₂HPO₄.3H₂O 1,1g/l, MgSO₄ 0,9 g/l; KH₂PO₄.7H₂O 0,7g/l; FeSO₄.7H₂O 0,1 g/l, giữ bình nuôi cấy ở 25°C trong 24 ngày, trong tối;

+ sau 24 ngày, thu dịch lên men, đo nồng độ Cordycepin bằng phương pháp sắc ký lỏng HPLC; và

- tách Cordycepin từ môi trường lên men bằng phương pháp tinh thể hóa bao gồm các bước:

+ lọc môi trường lên men nấm để thu dịch lên men;

+ cô đặc dịch nuôi cấy ở 80°C;

- + bổ sung nước cất (độ pH = 3) vào dịch cô đặc theo tỷ lệ (1 g mẫu : 10 ml nước), giữ ở 60°C trong 6 tiếng;
- + lọc hoặc ly tâm để thu dịch lỏng;
- + bổ sung than hoạt tính theo tỷ lệ (200 g/l) vào dịch lọc, và giữ ở 80°C trong 6 tiếng;
- + lọc hoặc ly tâm để thu dịch lỏng;
- + điều chỉnh độ pH của dịch lỏng bằng khoảng 5;
- + cô dịch lọc ở 80°C để thu được phần cặn;
- + hòa tan phần cặn thu được trong cồn tuyệt đối theo tỷ lệ 1 g cặn : 4 ml cồn;
- + giữ dung dịch thu được ở 70°C trong 1 giờ;
- + để nguội, sau đó giữ ở -4°C qua đêm hoặc đến khi nhìn thấy tinh thể xuất hiện;
- + lọc qua giấy lọc số 2 để thu được tinh thể;
- + cho phép tinh thể tự khô ở nhiệt độ phòng, bảo quản tinh thể Cordycepin ở 4°C.

Ví dụ 3: Làm tăng hàm lượng Cordycepin và tách Cordycepin từ môi trường lên men trong bình 5000 ml:

- làm tăng hàm lượng Cordycepin ngoại bào bằng cách bổ sung mỳ chính (mononatri glutamat) vào môi trường lên men nấm *C.militaris* bao gồm các bước:

- + nuôi cấy giống nấm *C.militaris* trên hai đĩa (9 cm²) thạch khoai tây dextroza (potato dextrose agar- PDA), ở nhiệt độ 25°C trong 7 ngày, trong bóng tối;
- + thu bào tử bằng cách bổ sung 2 ml nước cất vào mỗi đĩa nấm, dùng que cấy gạt nhẹ trên bề mặt nấm để thu bào tử;

+ chuyển 4 ml nước chứa bào tử nấm vào bình tam giác 1000 ml có chứa 400 ml môi trường nhân giống bao gồm: glucoza 60g/l; trypton 17g/l; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1,1g/l, $MgSO_4$ 0,9 g/l, sau đó giữ bình tam giác ở 25°C, lắc ở tốc độ 110 vòng/phút trong 3 ngày, trong bóng tối;

+ chuyển 300 ml giống nấm vào bình tròn 5,000 ml có chứa 2,700 ml môi trường sản xuất Cordycepin bao gồm: glucoza 60 g/l; trypton 17 g/l; mononatri glutamat 1 g/l; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1,1 g/l, $MgSO_4$ 0,9 g/l; $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 0,7 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g/l, giữ bình nuôi cấy ở 25°C trong 24 ngày, trong tối;

+ sau 24 ngày, thu dịch lên men, đo nồng độ Cordycepin bằng phương pháp sắc ký lỏng HPLC; và

- tách Cordycepin từ môi trường lên men bằng phương pháp tinh thể hóa bao gồm các bước:

- + lọc môi trường lên men nấm để thu dịch lên men;
- + cô đặc dịch nuôi cấy ở 80°C;
- + bổ sung nước cất (độ pH = 3) vào dịch cô đặc theo tỷ lệ (1 g mẫu : 10 ml nước), giữ ở 60°C trong 6 tiếng;
- + lọc hoặc ly tâm để thu dịch lỏng;
- + bổ sung than hoạt tính theo tỷ lệ (200 g/l) vào dịch lọc, và giữ ở 80°C trong 6 tiếng;
- + lọc hoặc ly tâm để thu dịch lỏng;
- + điều chỉnh độ pH của dịch lỏng bằng khoảng 5;
- + cô dịch lọc ở 80°C để thu được phần cặn;
- + hòa tan phần cặn thu được trong cồn tuyệt đối theo tỷ lệ 1 g cặn : 4 ml cồn;
- + giữ dung dịch thu được ở 70°C trong 1 giờ;

- + để nguội, sau đó giữ ở -4°C qua đêm hoặc đến khi nhìn thấy tinh thể xuất hiện;
- + lọc qua giấy lọc số 2 để thu được tinh thể;
- + cho phép tinh thể tự khô ở nhiệt độ phòng, bảo quản tinh thể Cordycepin ở 4°C .

Hiệu quả có thể đạt được của giải pháp hữu ích

Việc bổ sung mononatri glutamat vào môi trường lên men tảo nấm *C.militaris* làm tăng nồng độ trung bình của Cordycepin lên đến 1,3 mg/ml. Nồng độ này cao hơn 1,65 so với môi trường không có mononatri glutamat (khoảng 0,7 mg/ml), do đó hạ giá thành sản xuất Cordycepin xuống còn khoảng 2/3 giá thành sản xuất bằng phương pháp lên men tảo thông thường.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất Cordycepin ngoại bào bằng phương pháp lên men tĩnh, trong đó quy trình này bao gồm hai bước sau:

- làm tăng hàm lượng Cordycepin ngoại bào bằng cách bổ sung mỳ chính (mononatri glutamat) vào môi trường lên men nấm *C.militaris* bao gồm các bước:

+ nuôi cấy giống nấm *C.militaris* trên môi trường thạch khoai tây dextroza (potato dextrose agar - PDA) trong đĩa tròn 9 cm², ở nhiệt độ 25°C trong 7 ngày, trong bóng tối;

+ thu bào tử bằng cách bổ sung 2 ml nước cất vào đĩa nấm, dùng que cấy gạt nhẹ trên bề mặt nấm để thu bào tử;

+ chuyển 2 ml nước chứa bào tử nấm vào bình tam giác 500 ml có chứa 200 ml môi trường nhân giống bao gồm: glucoza 60 g/l; trypton 17 g/l; K₂HPO₄.3H₂O 1,1 g/l, MgSO₄ 0,9 g/l, sau đó giữ bình tam giác ở 25°C, lắc ở tốc độ 110 vòng/phút trong 3 ngày, trong bóng tối;

+ chuyển 30 ml giống nấm vào bình tròn 500 ml có chứa 270 ml môi trường sản xuất Cordycepin bao gồm: glucoza 60 g/l; trypton 17 g/l; mononatri glutamat 1 g/l; K₂HPO₄.3H₂O 1,1 g/l, MgSO₄ 0,9 g/l; KH₂PO₄.7H₂O 0,7 g/l; FeSO₄.7H₂O 0,1 g/l, giữ bình nuôi cấy ở 25°C trong 24 ngày, trong tối;

+ sau 24 ngày, thu dịch lên men, đo nồng độ Cordycepin bằng phương pháp sắc ký lỏng HPLC; và

- tách Cordycepin từ môi trường lên men bằng phương pháp tinh thể hóa bao gồm các bước:

+ lọc môi trường lên men nấm để thu dịch lên men;

+ cô đặc dịch nuôi cấy ở 80°C;

+ bổ sung nước cất (độ pH = 3) vào dịch cô đặc theo tỷ lệ (1 g mẫu : 10 ml nước), giữ ở 60°C trong 6 tiếng;

- + lọc hoặc ly tâm để thu dịch lỏng;
- + bổ sung than hoạt tính theo tỷ lệ (200 g/l) vào dịch lọc, và giữ ở 80°C trong 6 tiếng;
- + lọc hoặc ly tâm để thu dịch lỏng;
- + điều chỉnh độ pH của dịch lỏng bằng khoảng 5;
- + cô dịch lọc ở 80°C để thu được phần cặn;
- + hòa tan phần cặn thu được trong cồn tuyệt đối theo tỷ lệ 1 g cặn : 4 ml cồn;
- + giữ dung dịch thu được ở 70°C trong 1 giờ;
- + để nguội, sau đó giữ ở -4°C qua đêm hoặc đến khi nhìn thấy tinh thể xuất hiện;
- + lọc qua giấy lọc số 2 để thu được tinh thể;
- + cho phép tinh thể tự khô ở nhiệt độ phòng, bảo quản tinh thể Cordycepin ở 4°C.