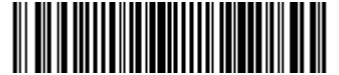




(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002449

(51)⁷ C12P 19/02; C12P 19/14; C12P 19/12

(13) **Y**

(21) 2-2018-00170

(22) 17/05/2018

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/07/2018 364A

(73) 1. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên (VN)

334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

2. Công ty cổ phần ANABIO Research & Development (VN)

Số 7 Liên kè 22, Khu đô thị Văn Khê, La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Vân Anh (VN); Phan Tuấn Nghĩa (VN); Trần Thị Mỹ (VN); Nguyễn Hòa Anh (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT ARABINOXYLAN TỪ CÁM GẠO

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất arabinoxylan có tác dụng tăng cường miễn dịch từ cám gạo bao gồm các bước: a) thủy phân loại bỏ tinh bột trong cám gạo; b) thủy phân loại bỏ protein trong cám gạo; c) thủy phân arabinoxylan từ cám gạo; d) cô đặc arabinoxylan kích thước đa phân tử; và e) sấy phun thành phẩm bột chứa arabinoxylan.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình thủy phân và tách chiết arabinoxylan từ nguyên liệu cám gạo bằng công nghệ enzym kết hợp với cột lọc phân tử với mục đích sản xuất thực phẩm chức năng arabinoxylan dạng polyme hòa tan trong nước có tác dụng tăng cường hệ miễn dịch tự nhiên.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Các phương pháp tách chiết arabinoxylan (AX) từ các nguyên liệu như cám gạo, bột mỳ, lõi ngô, bã mía, v.v. bằng các phương pháp hóa học, tự thủy phân (autohydrolysis), hóa học kết hợp với enzym, thủy phân bằng enzym là đã được biết đến trên thế giới.

Tài liệu “Enzymic degradation of cereal hemicelluloses. II. Pattern of pentosan degradation” của Preece IA và McDougall M (1958) đã tiến hành tách chiết arabinoxylan bằng nước theo cơ chế tự thủy phân AX bằng enzym nội tại trong bột mỳ. Tuy nhiên, phương pháp này không đề cập đến việc tinh sạch sản phẩm, kích thước sản phẩm và hiệu suất tách chiết.

Tài liệu “Barium hydroxide as a tool to extract pure arabinoxylans from water-insoluble cell wall material of wheat flour” của Gruppen H và các đồng tác giả (1991) đã sử dụng kiềm $\text{Ba}(\text{OH})_2$ để tách chiết arabinoxylan từ bột mỳ, yến mạch. Tuy nhiên, tài liệu này không đề cập đến kích thước của arabinoxylan tinh khiết, cũng như hiệu suất tách chiết. Việc sử dụng kiềm để tách chiết arabinoxylan cũng không thân thiện với môi trường cũng như người sử dụng nếu còn dư lượng kiềm trong sản phẩm.

Patent Mỹ số US 5560914 đã đề cập đến việc sử dụng môi trường nuôi cấy nấm *Asperigus oryzae* hoặc *Lentinus edodes* sau 10-14 ngày chứa endoxylanaza để thủy phân arabinoxylan từ cám gạo. Arabinoxylan thu được có kích thước 6-600 kDa, độ tinh khiết đạt 76%, hiệu suất tách đạt 0,3-0,6%. Tuy nhiên, phương pháp này có hiệu suất tách chiết thấp, thời gian sản xuất lâu, cũng như không đề cập đến phương pháp làm tinh sạch sản phẩm.

Tài liệu “Xây dựng quy trình tách chiết arabinoxylan từ cám gạo” của Nguyễn Thị Vân Anh và các đồng tác giả (2012) đã đề cập đến quy trình tách chiết arabinoxylan từ cám gạo ở quy mô pilot bằng cách sử dụng các enzym và cột lọc phân tử kích thước 5 kDa và 300 kDa để tinh sạch arabinoxylan. Kết quả thu được arabinoxylan kích thước 30-50 kDa, độ tinh khiết đạt 34%, và hiệu suất tách chiết 18%. Tuy nhiên, quy trình này cần đến nhiều bước như sấy cám, loại chất béo bằng cồn, thủy phân bằng xenlulaza, và bước tinh sạch phải dùng tới cột lọc phân tử 300 kDa nên đã loại bỏ nhiều AX mạch dài >300 kDa có tác dụng tăng cường miễn dịch. Do vậy, thời gian sản xuất lâu, hiệu suất chưa cao và chi phí giá thành sản xuất khá lớn.

Do đó, vẫn có nhu cầu tìm kiếm một quy trình sản xuất arabinoxylan từ nguyên liệu cám gạo nhằm khắc phục được nhược điểm của các giải pháp đã biết nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình sản xuất arabinoxylan (AX) từ nguyên liệu cám gạo với các tiêu chí sử dụng các enzym thân thiện với môi trường, quy trình tinh sạch đơn giản cho phép tách chiết được AX dạng polyme cao phân tử hòa tan trong nước với hiệu suất tách chiết cao.

Để đạt được mục đích này, quy trình sản xuất arabinoxylan từ cám gạo theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

a) Thủy phân loại bỏ tinh bột trong cám gạo: trộn cám gạo với dung dịch đệm phosphat có độ pH = 6,0-7,5, nồng độ 10 mM-50 mM theo tỷ lệ từ 1:5 đến 1:7 (w/v), bổ sung amylaza hoạt độ 100 U/ml với tỷ lệ enzym/cơ chất từ 0,1% đến 0,3% (v/w) và ủ trong khoảng thời gian từ 20 đến 60 phút ở khoảng nhiệt độ từ 70°C đến 90°C, tốc độ khuấy từ 50 đến 150 vòng/phút;

b) Thủy phân loại bỏ protein trong cám gạo: bổ sung proteaza hoạt độ 0,63 U/ml với tỷ lệ enzym/cơ chất từ 2% đến 8% (v/w) trong khoảng thời gian từ 20 đến 60 phút ở khoảng nhiệt độ từ 37°C đến 45°C, tốc độ khuấy từ 50 đến 150 vòng/phút, sau đó gia nhiệt bất hoạt các enzym đã bổ sung và ly tâm thu bã cám ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 30 phút để loại bỏ các đường đơn, protein và axit amin hoà tan;

c) Thủy phân arabinoxylan từ cám gạo: trộn bã cám thu được ở bước b) với dung dịch đệm axetat có độ pH = 4,5-6,0, nồng độ từ 10 mM đến 50 mM theo tỷ lệ từ 1:4 đến

1:7 (w/v), bổ sung endo-xylanaza nồng độ 30 U/ml với tỷ lệ enzym/cơ chất từ 2% đến 6% (v/w) trong khoảng thời gian từ 12 giờ đến 24 giờ ở nhiệt độ từ 50°C đến 60°C, tốc độ khuấy từ 50 đến 150 vòng/phút, sau đó ly tâm loại bỏ bã cám ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 30 phút để thu dịch chiết chứa arabinoxylan thô;

d) Cô đặc bằng màng lọc phân tử: cô đặc dịch chiết chứa arabinoxylan qua màng lọc phân tử kích thước 10 kDa với công suất lọc 500 L/h để đạt độ khô 7°Bx và loại bỏ các phân tử có kích thước nhỏ hơn 10 kDa;

e) Sấy phun thành phẩm: bổ sung maltoza dextrin vào dung dịch đến độ khô 12°Bx, sau đó sấy dung dịch arabinoxylan thành dạng bột bằng máy sấy phun với công suất máy 50L/h, nhiệt độ hơi nóng đầu vào khoảng từ 130°C đến 150°C, nhiệt độ hơi nóng đầu ra khoảng từ 80°C đến 100°C để thu được sản phẩm bột arabinoxylan có hàm lượng arabinoxylan >30%, kích thước phân tử lớn hơn 10 kDa. Bột thu được được đóng trong túi chân không thành từng gói từ 1 kg đến 10 kg bằng máy hút chân không.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ quy trình thiết bị sản xuất arabinoxylan quy mô 120 kg cám gạo/mẻ, bao gồm: 1. bình đựng cám gạo; 2. bình pha enzym; 3, 6, 12. nồi hai vỏ có cánh khuấy; 5. thiết bị ly tâm rô; 8-10. cột lọc phân tử 10 kDa; 4, 7, 9, 11, 13. bơm; 14. máy sấy phun; 15. thiết bị bao gói.

Hình 2 là ảnh thể hiện thành phần xyloza và arabinoza của arabinoxylan trước và sau khi thủy phân với axit; đường chạy 1: đường đơn chuẩn D-xyloza; đường chạy 2: đường đơn chuẩn L-arabinoza; đường chạy 3: arabinoxylan chuẩn 100-300 kDa đã thủy phân với axit; đường chạy 4 và 5: sản phẩm arabinoxylan đã thủy phân với axit; đường chạy 6: arabinoxylan chuẩn 100-300 kDa chưa thủy phân; đường chạy 7-8: sản phẩm arabinoxylan chưa thủy phân.

Hình 3 là sắc ký đồ của arabinoxylan qua cột sắc ký lọc gel Sephadex G-100: đỉnh 1 (các phân đoạn 34-37), đỉnh 2 (các phân đoạn 40-42). Trên cơ sở giá trị V_e của các đỉnh này và dựa vào đồ thị chuẩn, kích thước phân tử của arabinoxylan thu được là 179 kDa và 115 kDa.

Hình 4 là ảnh (a) và biểu đồ (b) thể hiện hoạt tính tăng cường đại thực bào của arabinoxylan được thử nghiệm trên chuột, trong đó: A. lô đối chứng sinh học uống

nước (ĐCSH); B. lô đối chứng dương uống sản phẩm Lentin Plus 1000 của hãng Daiwa-Nhật bản (kí hiệu Lentin Plus, LP) nồng độ 100 mg/kg thể trọng; C. lô thí nghiệm uống sản phẩm arabinoxylan nồng độ 100 mg/kg thể trọng (ký hiệu IMMU).

Hình 5 là biểu đồ thể hiện nồng độ interefron-gama (TNF-GAMMA) ở các lô chuột được uống sản phẩm tăng cường miễn dịch (Lentin Plus là sản phẩm thương mại của hãng Daiwa-Nhật Bản, IMMU là sản phẩm arabinoxylan thu được theo giải pháp hữu ích) cùng ở nồng độ 100 mg/kg thể trọng, so với lô chuột đối chứng uống nước (ĐCSH).

Hình 6 là ảnh phân tích quần thể tế bào ung thư bị chết và biểu đồ thể hiện tỷ lệ chết của tế bào ung thư Sarcoma tăng lên ở các lô chuột được uống sản phẩm tăng cường miễn dịch so với lô chuột đối chứng, trong đó A. lô đối chứng sinh học uống nước; B. lô đối chứng dương uống Lentin Plus 1000 (kí hiệu LP) nồng độ 100 mg/kg thể trọng; C. lô thí nghiệm uống sản phẩm arabinoxylan nồng độ 100 mg/kg thể trọng.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Nguyên liệu và hóa chất sử dụng: cám gạo được sử dụng cần đảm bảo các tiêu chuẩn an toàn vệ sinh thực phẩm và có hàm lượng arabinoxylan >8%. Các hóa chất để pha dung dịch đệm và enzym để tách chiết arabinoxylan từ cám gạo đều đạt tiêu chuẩn sử dụng trong sản xuất thực phẩm, bao gồm amylaza (tên thương mại Termamyl SC), proteaza (tên thương mại Neutrase), endo-xylanaza (tên thương mại Ultraflo L) do hãng Novozyme cung cấp. Các hóa chất dùng cho kiểm nghiệm arabinoxylan do hãng Megazyme cung cấp, bao gồm chất chuẩn đường đơn D-xyloza, đường đơn L-arabinoza, đường arabinoxylan kích thước trong khoảng 100-300 kDa, kit Arabinan đo nồng độ L-arabinoza, kit D-xyloza đo nồng độ D-xyloza. Các hoá chất còn lại bao gồm axit clohydric, dinatri hydro phosphat, kali dihydro phosphat, natri cloric, v.v. đều đạt mức tinh khiết dùng cho nghiên cứu hoá sinh enzym. Gel sephadex G-100 dùng cho sắc ký lọc gel do hãng GE Healthcare cung cấp. Các chất chuẩn (protein) có khối lượng phân tử đã biết là Ovalbumin (45 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) và Cytochrom C (12,4 kDa) do hãng Sigma cung cấp.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất arabinoxylan có tác dụng tăng cường miễn dịch từ nguyên liệu cám gạo bằng enzym, bao gồm các bước sau đây:

a) Thủy phân loại bỏ tinh bột trong cám gạo:

Trộn cám đạt các tiêu chuẩn an toàn vệ sinh thực phẩm và có hàm lượng arabinoxylan >8% với dung dịch đệm phosphat có độ pH = 6,0-7,5, nồng độ từ 10 mM đến 50 mM theo tỷ lệ từ 1:5 đến 1:7 (w/v). Sau đó, bổ sung amylaza hoạt độ 100 U/ml với tỷ lệ enzym/cơ chất từ 0,1% đến 0,3% (v/w) vào và tiến hành ủ trong khoảng thời gian từ 20 đến 60 phút ở khoảng nhiệt độ từ 70°C đến 90°C, tốc độ khuấy từ 50 đến 150 vòng/phút;

b) Thủy phân loại bỏ protein trong cám gạo:

Tiếp tục bổ sung proteaza hoạt độ 0,63 U/ml vào cám gạo đã được xử lý ở bước a) với tỷ lệ enzym/cơ chất từ 2% đến 8% (v/w) trong khoảng thời gian từ 20 đến 60 phút ở khoảng nhiệt độ từ 37°C đến 45°C, tốc độ khuấy từ 50 đến 150 vòng/phút. Sau đó, tiến hành gia nhiệt bất hoạt các enzym đã bổ sung và ly tâm thu bã cám ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 30 phút để loại bỏ các đường đơn, protein và axit amin hoà tan;

c) Thủy phân arabinoxylan từ cám gạo:

Trộn bã cám giàu arabinoxylan thu được ở bước b) với dung dịch đệm axetat có độ pH = 4,5-6,0 nồng độ từ 10 mM đến 50 mM theo tỷ lệ từ 1:4 đến 1:7 (w/v). Bổ sung tiếp endo-xylanaza nồng độ 30 U/ml với tỷ lệ enzym/cơ chất từ 2% đến 6% (v/w) trong khoảng thời gian từ 12 giờ đến 24 giờ ở nhiệt độ từ 50°C đến 60°C, tốc độ khuấy từ 50 đến 150 vòng/phút. Sau đó, tiến hành ly tâm loại bỏ bã cám ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 30 phút để thu dịch chiết chứa arabinoxylan thô;

d) Cô đặc bằng màng lọc phân tử:

Cô đặc dịch chiết chứa arabinoxylan thu được ở bước c) qua màng lọc phân tử kích thước 10 kDa với công suất lọc 500 L/h để đạt độ khô 7°Bx và loại bỏ các phân tử có kích thước nhỏ hơn 10 kDa;

e) Sấy phun thành phẩm:

Bổ sung maltoza dextrin vào dung dịch đã cô đặc thu được ở bước d) đến độ khô 12°Bx. Sau đó sấy dung dịch arabinoxylan thành dạng bột bằng máy sấy phun với công suất máy 50 L/h, nhiệt độ hơi nóng đầu vào khoảng từ 130°C đến 150°C, nhiệt độ hơi nóng đầu ra khoảng từ 80°C đến 100°C để thu được bột arabinoxylan có hàm lượng arabinoxylan >30%, kích thước phân tử lớn hơn 10 kDa. Bột thu được được đóng trong túi chân không thành từng gói từ 1 kg đến 10 kg bằng máy hút chân không.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Sản xuất arabinoxylan ở quy mô 120 kg cám gạo/mẻ.

- a) Thủy phân loại bỏ tinh bột trong cám gạo: Trộn 120 kg cám với 820 lit dung dịch đệm phosphat độ pH = 7,0 nồng độ 30 mM trong nồi ủ 2 vỏ, điều khiển được nhiệt độ, có cánh khuấy, và dung tích 1200 Lit. Bổ sung 240 ml amylaza (tên thương mại Termamyl SC) hoạt độ 100 U/ml và ủ trong 30 phút ở 90°C, tốc độ khuấy 100 vòng/phút;
- b) Thủy phân loại bỏ protein trong cám gạo: Tiếp tục bổ sung 4,8 lit proteaza (tên thương mại Neutrase) hoạt độ 0,63 U/ml trong 30 phút ở nhiệt độ 42°C, tốc độ khuấy 100 vòng/phút. Sau đó gia nhiệt bất hoạt các enzym đã bổ sung và ly tâm thu bã cám trong máy ly tâm rô ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 30 phút để loại bỏ các đường đơn, protein và axit amin hoà tan;
- c) Thủy phân arabinoxylan từ cám gạo: Trộn bã cám giàu arabinoxylan với 600 lit dung dịch đệm axetat độ pH = 5,0, nồng độ 30 mM. Bổ sung 4,8 lit endo xylanaza (tên thương mại Ultraflo L) nồng độ 30 U/ml và ủ trong 21 giờ ở nhiệt độ 56°C, tốc độ khuấy 100 vòng /phút. Sau đó ly tâm loại bỏ bã cám bằng máy ly tâm rô ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 30 phút để thu dịch chiết chứa arabinoxylan thô;
- d) Cô đặc bằng màng lọc phân tử: Cô đặc dịch chiết chứa arabinoxylan qua 6 cột lọc phân tử mắc nối tiếp nhau với kích thước màng lọc 10 kDa, công suất lọc 500 L/h. Dịch lọc sẽ đạt độ khô 7°Bx và loại bỏ được các phân tử có kích thước nhỏ hơn 10 kDa sau khi lọc;
- e) Sấy phun thành phẩm: Bổ sung maltoza dextrin vào dung dịch lọc đến độ khô 12°Bx. Sấy dung dịch arabinoxylan thành dạng bột bằng máy sấy phun với công suất máy 50L/h, nhiệt độ hơi nóng đầu vào khoảng từ 130°C đến 150°C. Nhiệt độ hơi nóng đầu ra khoảng từ 80°C đến 100°C để thu được bột arabinoxylan có hàm lượng arabinoxylan >30%, kích thước phân tử lớn hơn 10 kDa. Đóng gói bột trong túi chân không thành từng gói 1 kg bằng máy hút chân không ZF-300;

Ví dụ 2: Định tính thành phần D-xyloza và L-arabinoza trong arabinoxylan

Tiến hành chấm 15-20 µl mẫu (nồng độ 10 mg/ml) và các chất chuẩn (D-xyloza, L-arabinoza, arabinoxylan 100-300 kDa) trên bản sắc ký silica gel 60 F254 (Merck,

Đức). Đặt nhẹ nhàng bản sắc ký trong bình sắc ký chứa hệ dung môi n-butanol: axit axetic: nước với tỷ lệ thể tích 3:1:1, đậy kín nắp bình và để khoảng 70 phút để mẫu được phân tách. Sau đó, để bản sắc ký khô tự nhiên rồi nhuộm màu đường bằng anilin phthalat, hiện màu bản sắc ký ở 100°C trong 5 phút.

Kết quả kiểm tra chất lượng của sản phẩm thể hiện trên Hình 2 cho thấy arabinoxylan thu được bằng quy trình theo giải pháp hữu ích cho 2 băng rõ nét, tương ứng với vị trí của D-xyloza và L-arabinoza chuẩn và tương tự như mẫu AX chuẩn (Megazyme) đã được thủy phân (Hình 2, giếng 4). Ngoài ra, kết quả sắc ký lớp mỏng cũng cho thấy sản phẩm arabinoxylan có khả năng là một polyme cao phân tử giống như chất chuẩn arabinoxylan kích thước 100-300 kDa vì phát hiện thấy một tỷ lệ rất thấp đường đơn trong mẫu khi chưa thủy phân với axit (Hình 2, giếng 6).

Ví dụ 3: Định lượng arabinoxylan trong mẫu bột

Tiến hành định lượng hàm lượng arabinoxylan bằng cách đo hàm lượng từng thành phần D-xyloza và L-arabinoza theo hướng dẫn sử dụng của kit D-xyloza và kit L-arabinan của hãng Megazyme

Kit D-xyloza: https://secure.megazyme.com/files/booklet/k-xylose_data.pdf

Kit L-arabinan: https://secure.megazyme.com/files/booklet/k-arab_data.pdf

Sau đó, tính hàm lượng arabinoxylan có trong mẫu theo công thức $C_{\text{arabinoxylan}} = (C_{\text{xyloza}} + C_{\text{arabinoza}}) \times 0,9$.

Kết quả từ 120 kg cám gạo, thu được 15,84 kg bột có hàm lượng arabinoxylan là 49%.

Với tỷ lệ arabinoxylan ban đầu có trong cám gạo là 8,7% (tương đương với 10,4 kg arabinoxylan trong 120 kg cám gạo), hiệu suất của quá trình sản xuất arabinoxylan từ cám gạo là: $49\% \times 15,84 / 10,4 \times 100\% = 79\%$.

Ví dụ 4: Xác định khối lượng phân tử AX bằng sắc ký lọc gel

Nhồi gel đã trương nở vào cột kích thước 1 x 60 cm. Cân bằng cột gel với nước cất với thể tích tối thiểu bằng 2 lần thể tích cột gel để tạo môi trường gel sắc ký đồng nhất trong toàn bộ cột gel. Sử dụng Dextran xanh (2.000 kDa) để tính thể tích trống V_0 của cột. Sau đó, nạp từng chất chuẩn protein gồm Ovalbumin (45 kDa),

Chymotrypsinogen A (25 kDa) và Cytochrom C (12,4 kDa) ở nồng độ 4 mg/ml lần lượt lên cột. Sau đó cho đệm chảy qua liên tục với tốc độ khoảng 20 ml/giờ, thu các phân đoạn 0,5 ml vào các ống riêng. Xác định hàm lượng protein trong mỗi phân đoạn bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm để tính V_e của từng protein chuẩn với cách tính giống như tính V_o . Tính toán các giá trị $\log M_w$ và V_e/V_o của các chất chuẩn. Sau đó lập đồ thị tương quan giữa $\log M_w$ và V_e/V_o với trục tung là giá trị $\log M_w$ và trục hoành là tỷ lệ V_e/V_o . Cuối cùng, tiến hành nạp mẫu (nồng độ 10 mg/ml arabinoxylan) lên cột với thể tích khoảng 1 ml với cách thức tiến hành tương tự như đối với protein chuẩn. Khi bắt đầu cho mẫu lên cột thì cũng bắt đầu tính thể tích mẫu chảy qua cột bằng cách tiến hành thu các phân đoạn vào từng ống riêng. Xác định hàm lượng arabinoxylan thông qua hàm lượng xyloza và arabinosa như nêu trong Ví dụ 2. Biểu đồ của quá trình phân tách qua sắc ký lọc gel được thiết lập với trục tung là giá trị độ hấp thụ ở bước sóng 340 nm và trục hoành là các phân đoạn/thể tích rửa chiết.

Kết quả sắc ký đồ sản phẩm arabinoxylan sản xuất theo quy trình trong sáng chế khi qua cột gel Sephadex G-100 (Hình 3a) cho thấy chế phẩm có 2 đỉnh sắc ký: đỉnh 1 (các phân đoạn 34-37), đỉnh 2 (các phân đoạn 40-42). Trên cơ sở giá trị V_e của các đỉnh này và dựa vào đồ thị chuẩn đã được thiết lập (Hình 3b), có thể tính được khối lượng phân tử của các arabinoxylan trong sản phẩm tương ứng là 179,3 kDa và 115,3 kDa.

Ví dụ 5: Đánh giá hoạt tính tăng cường miễn dịch của arabinoxylan trên mô hình chuột

Nguyên liệu bao gồm: (i) bột sấy phun arabinoxylan (viết tắt là IMMU); (ii) Chế phẩm Lentin plus 1000 (Nhật Bản): là arabinoxylan thương phẩm đã được bán trên thị trường (LP), được dùng làm đối chứng dương. Kit đánh giá nồng độ IFN-gama có tên Duoset ELISA kit mouse IFN-gamma, (hãng R & D System, Mỹ), đĩa ELISA 96 giếng, pipet nhựa, đầu tip, đĩa nuôi cấy tế bào (corning), buồng đếm tế bào, các hóa chất đều đạt tiêu chuẩn trong nuôi cấy tế bào như PBS, FBS của Invitrogen. Chuột nhắt trắng trưởng thành dòng Swiss (Mus musculus) (Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp).

Thử nghiệm trên chuột khỏe mạnh, có trọng lượng trung bình 18-20 gram được phân lô một cách ngẫu nhiên thành 5 lô (mỗi lô 10 con):

+ Lô 1: đối chứng sinh học: nuôi bình thường (kí hiệu ĐCSH)

+ Lô 2: đối chứng dương: (Lentin Plus 1000 kí hiệu LP) với liều 100mg/kg/ngày.

+ Lô 3: uống IMMU với liều 100mg/kg/ngày.

Dùng kim tiêm đầu tròn hút dung dịch tương ứng (Nước cất, dung dịch IMMU và dung dịch Lentin plus 1000) với thể tích dung dịch là như nhau cho cho tất cả các lô (mỗi ngày uống 0,3 ml). Nhẹ nhàng đưa mũi kim vào sâu trong họng chuột, lưu ý lựa đầu kim để tránh làm tổn thương vùng họng. Bơm từ từ dung dịch đảm bảo dung dịch không trào ngược ra. Chuột được cho uống chế phẩm hàng ngày, vào cùng một thời điểm. Cân cách nhật trọng lượng từng lô và theo dõi trong 40 ngày theo bảng phân lô và theo dõi như ở bảng dưới đây.

Sau 40 ngày uống chế phẩm, tiến hành mổ chuột lấy máu thu huyết tương, tách đại thực bào, hạch bạch huyết để phục vụ cho thí nghiệm đánh giá hoạt động của đại thực bào bằng phương pháp ủ tế bào với bào tử gắn huỳnh quang và quan sát sự thực bào dưới kính hiển vi huỳnh quang và đếm % tế bào thực bào bằng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy. Song song, tiến hành đánh giá sự biểu hiện xytokin trong huyết thanh chuột bằng ELISA kit đặc hiệu với INF-gama, đánh giá khả năng diệt tế bào ung thư Sarcoma 180 bằng cách ủ với tế bào lympho tách từ máu chuột và sử dụng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy.

Kết quả đánh giá hoạt tính đại thực bào được thể hiện ở Hình 4. Sau khi ủ với hạt bào tử khoảng 15 phút, đại thực bào bắt đầu hoạt động, chúng co tế bào lại và hình thành các chân giả để vơ vét các hạt (vật lạ với tế bào) vào bên trong tế bào được thể hiện ở Hình 4a. Trong đó lô đối chứng sinh học nuôi ăn thức ăn bình thường (A) có khả năng thực bào kém hơn lô cho uống Lentin Plus 1000 thương mại (B) và arabinoxylan sản xuất theo quy trình trong sáng chế (C). Ở hai lô cho ăn sản phẩm có chứa arabinoxylan, sau khoảng 30 phút tế bào đã thu được rất nhiều hạt vào bên trong. Màu sắc của tế bào thay đổi theo thời gian ủ với hạt nano, thời gian ủ càng lâu thì tế bào càng trở nên sẫm màu hơn so với nhóm tế bào đối chứng. Hình 4b thể hiện khả năng ăn bào tử gắn huỳnh quang của đại thực bào cho thấy tỷ lệ % các đại thực bào ăn bào tử của lô chuột cho uống arabinoxylan thương mại và sản xuất theo quy trình của sáng chế lớn hơn rõ rệt so với đại thực bào tách từ lô chuột đối chứng sinh học.

Kết quả tương tự cũng thu được với nồng độ INF-gama trong huyết thanh chuột (Hình 5) và tỷ lệ tế bào ung thư bị chết khi ủ với tế bào lympho giết tự nhiên (Hình 6) tách ở lô chuột cho ăn arabinoxylan thương mại và sản xuất theo quy trình trong sáng chế, cao hơn đáng kể (gấp 1,5 đến 2 lần) so với lô đối chứng. Trong đó, vùng P2 của Hình 6a là vùng thể hiện tỷ lệ chết của tế bào Sarcoma trong tổng số tế bào Sarcoma ủ với tế bào lympho.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất arabinoxylan từ cám gạo theo giải pháp hữu ích cho phép tạo ra sản phẩm arabinoxylan có kích thước đa phân tử khoảng vài chục đến vài trăm kDa có hoạt tính kích thích miễn dịch. Quy trình cũng sử dụng các enzym và bước lọc phân tử rất thân thiện với môi trường và không độc hại đối với người sản xuất. Quy trình có hiệu suất tách chiết arabinoxylan cao, lên tới $\geq 70\%$ vì sử dụng phối hợp các enzym amylaza và proteaza cho phép loại bỏ các thành phần tinh bột và protein ở nồng độ và điều kiện tối ưu để bóc lộ cơ chất arabinoxylan trong cám gạo, sử dụng endo-xylanaza ở nồng độ và điều kiện tối ưu cho phép cắt hạn chế arabinoxylan từ cám gạo thành dạng kích thước đa phân tử hoà tan trong nước mà không phải là dạng đường đơn. Với quy trình đơn giản như vậy, sản phẩm thu được vẫn có hiệu quả tăng cường miễn dịch tương đương với sản phẩm thương mại Lentin Plus 1000 của hãng Daiwa Nhật bản thông qua hoạt tính đại thực bào, tổng hợp INF-gama của lympho B và diệt tế bào ung thư của tế bào giết tự nhiên. Sản phẩm có giá thành thấp hơn 25 lần (4000/gói hàm lượng 1,4 g arabinoxylan) so với giá thương mại 100.000/gói Lentin Plus, phù hợp với khả năng kinh tế của những bệnh nhân suy giảm miễn dịch như bệnh nhân HIV/AIDS, viêm gan và ung thư ở Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất arabinoxylan từ cám gạo bao gồm các bước:

a) Thủy phân loại bỏ tinh bột trong cám gạo: trộn cám gạo với dung dịch đệm phosphat có độ pH = 6,0-7,5 đến nồng độ 10 mM-50 mM theo tỷ lệ từ 1:5 đến 1:7 (w/v), bổ sung amylaza hoạt độ 100 U/ml với tỷ lệ enzym/cơ chất từ 0,1% đến 0,3% (v/w) và ủ trong khoảng thời gian từ 20 đến 60 phút ở khoảng nhiệt độ từ 70°C đến 90°C, tốc độ khuấy từ 50 đến 150 vòng/phút;

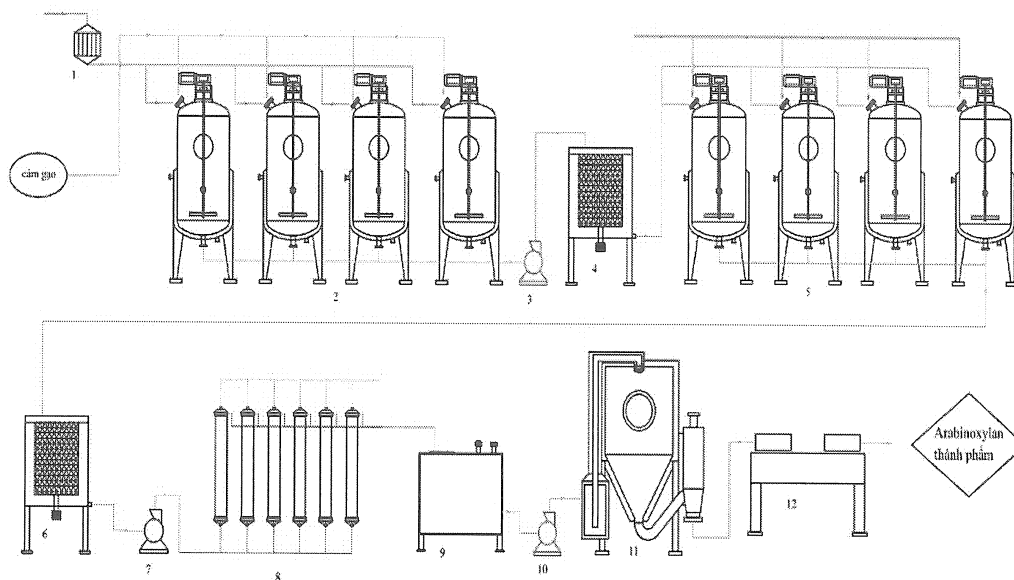
b) Thủy phân loại bỏ protein trong cám gạo: bổ sung proteaza hoạt độ 0,63 U/ml với tỷ lệ enzym/cơ chất từ 2% đến 8% (v/w) trong khoảng thời gian từ 20 đến 60 phút ở khoảng nhiệt độ từ 37°C đến 45°C, tốc độ khuấy từ 50 đến 150 vòng/phút, sau đó gia nhiệt bất hoạt các enzym đã bổ sung và ly tâm thu bã cám ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 30 phút để loại bỏ các đường đơn, protein và axit amin hoà tan;

c) Thủy phân arabinoxylan từ cám gạo: trộn bã cám thu được ở bước b) với dung dịch đệm axetat có độ pH = 4,5-6,0, nồng độ từ 10 mM đến 50 mM theo tỷ lệ từ 1:4 đến 1:7 (w/v), bổ sung endo-xylanaza nồng độ 30 U/ml với tỷ lệ enzym/cơ chất từ 2% đến 6% (v/w) trong khoảng thời gian từ 12 giờ đến 24 giờ ở nhiệt độ từ 50°C đến 60°C, tốc độ khuấy từ 50 đến 150 vòng/phút, sau đó ly tâm loại bỏ bã cám ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 30 phút để thu dịch chiết chứa arabinoxylan thô;

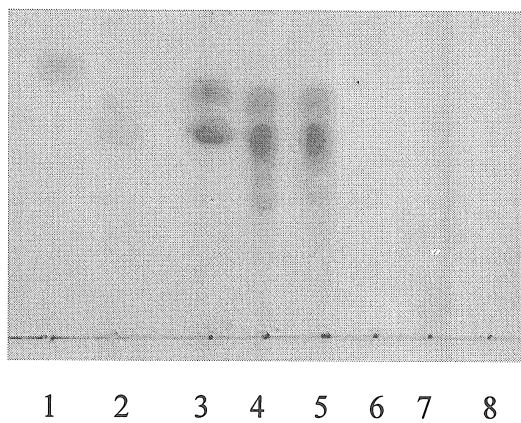
d) Cô đặc bằng màng lọc phân tử: cô đặc dịch chiết chứa arabinoxylan qua màng lọc phân tử kích thước 10 kDa với công suất lọc 500 L/h để đạt độ khô 7°Bx và loại bỏ các phân tử có kích thước nhỏ hơn 10 kDa;

e) Sấy phun thành phẩm: bổ sung maltoza dextrin vào dung dịch đến độ khô 12°Bx, sau đó sấy dung dịch arabinoxylan thành dạng bột bằng máy sấy phun với công suất máy 50L/h, nhiệt độ hơi nóng đầu vào khoảng từ 130°C đến 150°C, nhiệt độ hơi nóng đầu ra khoảng từ 80°C đến 100°C để thu được sản phẩm bột arabinoxylan có hàm lượng arabinoxylan >30%, kích thước phân tử lớn hơn 10 kDa.

Hình 1

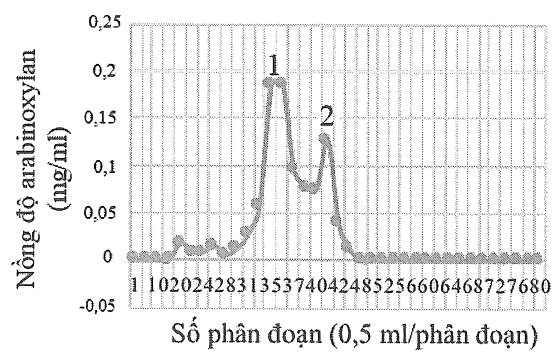


Hình 2

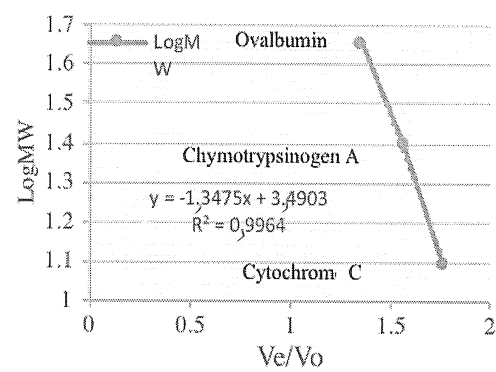


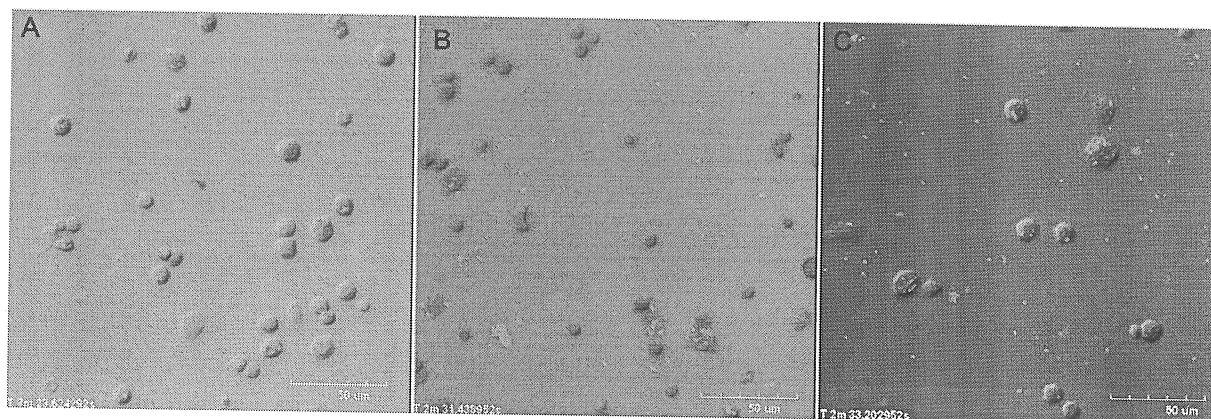
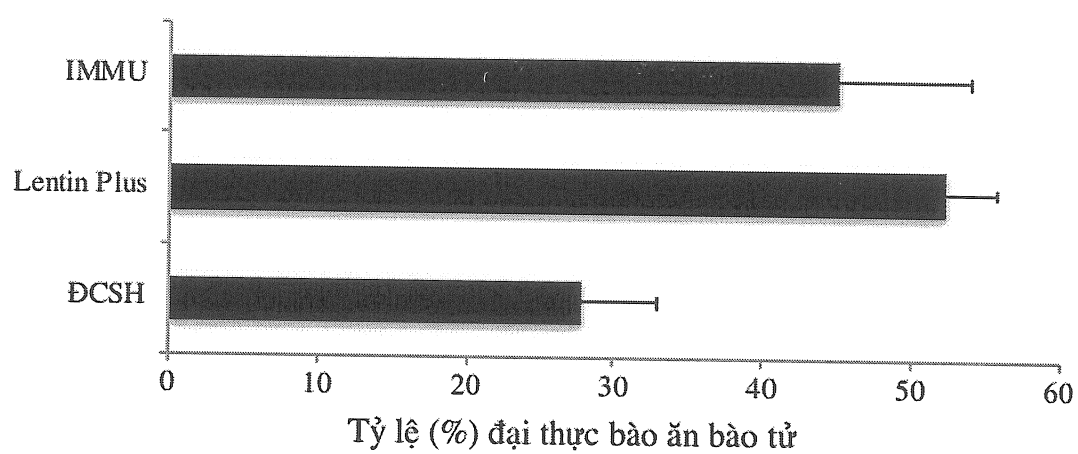
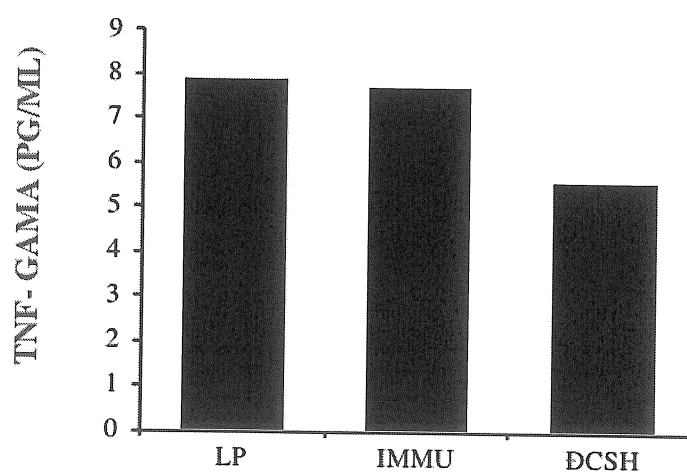
Hình 3

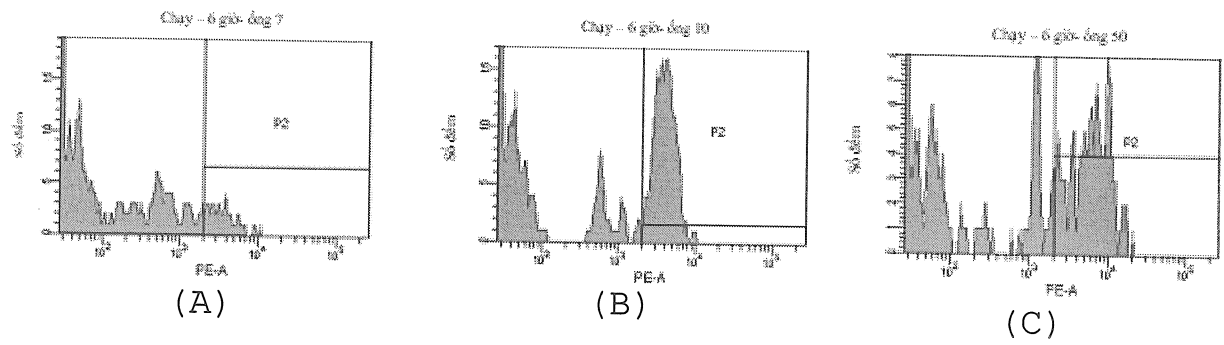
a.



b.



Hình 4**a.****b.****Hình 5**

Hình 6**a****b**