



(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) (11)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**



**2-0002466**

(51) **A61K 36/064; C08B 37/00 (13) Y**  
2020.01

- 
- (21) 2-2020-00262 (22) 15/12/2017  
(67) 1-2017-05077  
(45) 25/11/2020 392 (43) 26/03/2018 360A  
(73) 1. Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)  
02 Hùng Vương, phường Lộc Thọ, thành phố Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa  
2. Nguyễn Duy Nhứt (VN)  
56° Hồ Xuân Hương - phường Phước Hòa, thành phố Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa  
(72) Nguyễn Duy Nhứt (VN).
- 

(54) **QUY TRÌNH SULFAT HÓA TRỰC TIẾP MEN BÁNH MÌ ĐỂ ĐIỀU CHẾ GLUCAN SULFAT**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sulfat hóa trực tiếp men bánh mì để điều chế glucan sulfat bao gồm các bước : (i) sulfat hóa glucan bằng cách hòa tan men bánh mì và  $K_2S_2O_7$  vào DMSO và đun nóng; và (ii) thu glucan sulfat. Quy trình này được thực hiện bằng cách sulfat hóa trực tiếp men bánh mì và không có bước tách chiết và tinh chế glucan.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực hóa học, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sulfat hóa trực tiếp men bánh mì để điều chế glucan sulfat .

### Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Glucan là các polyme của glucoza và có nguồn gốc từ nấm men, vi khuẩn, nấm và thực vật.  $\beta$ -(1-3)-glucan có mạch chính gồm các glucopyranoza liên kết với nhau tại vị trí C1 của vòng đường này và C3 của vòng đường khác,  $\beta$ -glucan từ lúa mạch có rất ít hoặc không có hoạt tính,  $\beta$ -glucan từ yến mạch có thể giảm nguy cơ bệnh tim,  $\beta$ -glucan trong nấm lớn có phân nhánh với chỉ một phân tử glucoza và chỉ tăng cường miễn dịch đến một mức nào đó.

$\beta$ -glucan khối lượng phân tử thấp bị tiết ra ngoài qua lọc cầu thận, không có tương tác với cơ thể,  $\beta$ -glucan khối lượng phân tử cao được giữ lại trong gan và lá lách sau đó dần dần tạo thành các chất chuyển hóa thứ cấp trong khoảng 5 tuần. Tài liệu John A. Bohn et al., “(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships, Carbohydrate Polymers Volume 28, Issue 1, 1995, Pages 3-14” bộc lộ các  $\beta$ -glucan khối lượng phân tử thấp dễ tan, có thể có hoạt tính kháng u *in vivo* do kích hoạt miễn dịch, tuy nhiên hoạt tính gây độc tế bào ung thư không rõ ràng, kích thước nhỏ như laminaran thì hoạt tính gây độc tế bào không có.

Chuyển hóa glucan thành chất tan được trong nước, đồng thời tăng cường hoạt tính cũng như kháng được tế bào ung thư sống được nhiều nhà khoa học quan tâm. Chen-feng Ji và cộng sự trong công bố năm 2013 “Sulfated modification and anti-tumor activity of laminarin, Experimental And Therapeutic Medicine 6: 1259-1264” đã chứng minh được, sau khi sulfat hóa, sulfat laminaran kháng ung thư ruột kết ở người. Từ đó cho thấy, sulfat hóa là yêu cầu thực sự cần thiết để tăng cường hoạt tính kháng u, tạo ra hoạt tính gây độc tế bào ung thư cho  $\beta$ -glucan.

Đồng thời một công bố quan trọng của nhóm nghiên cứu Lin Y1, “Molecular mass and antitumor activities of sulfated derivatives of alpha-glucan from *Poria cocos*

mycelia. *Int J Biol Macromol.* 2004 Oct;34(5):289-94” cho thấy không chỉ  $\beta$ -glucan mà cả  $\alpha$ -glucan sau khi được sulfat hóa cũng tăng mạnh hoạt tính kháng ung thư kể cả *in vitro* và *in vivo* so với glucan tự nhiên chưa sulfat hóa.

HongHui BAO và các cộng sự trong nghiên cứu “Effect of Sulfated Modification on the Molecular Characteristics and Biological Activities of Polysaccharides from *Hypsizigus marmoreus*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74 (7), 1408–1414, 2010” đã rút ra kết luận: sulfat hóa là con đường có tác dụng nhất trong việc chuyển đổi cấu trúc làm tăng cường hoạt tính sinh học của polysacarit.

$\beta$ -glucan sau khi sulfat hóa, khác với  $\beta$ -glucan, có khả năng tương tác trực tiếp gây độc tế bào ung thư được mô tả trong các tài liệu Yifeng Wang et al., “Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a  $\beta$ -glucan from *Poria cocos sclerotium*, *Carbohydrate Research* Volume 339, Issue 15, 20 October 2004, Pages 2567–2574”; và Yongzhen Tao et al., “Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides, *Carbohydrate Research*, Volume 341, Issue 13, September 2006, Pages 2261-2269”.

Như vậy, men bánh mì chứa  $\beta$ -glucan và một phần nhỏ là  $\alpha$ -glucan, cần được sulfat hóa để trở thành chất tan và có hoạt tính kháng tế bào ung thư, làm tăng cao giá trị của loại men phổ biến này.

#### Sản xuất glucan sulfat từ men bánh mì

Tài liệu patent US 5314872 A bộc lộ quy trình sulfat hóa beta-glucan đã được tách chiết từ men bánh mì.

Hua Zhang và các đồng tác giả trong nghiên cứu “Chemical Synthesis of Sulfated Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Glucans and Their In Vivo Antioxidant Activity” mô tả quy trình điều chế glucan sulfat theo 2 bước: (1) tách chiết và tinh chế glucan từ men bánh mì *Saccharomyces cerevisiae* bằng axit và kiềm; và (2) sulfat hóa bằng  $\text{HClSO}_3/\text{DMF}$  ( $\text{DMF-SO}_3$ ).

Mi Wang và các đồng tác giả trong nghiên cứu “Improvement of immune responses to influenza vaccine (H5N1) by sulfated yeast beta-glucan” mô tả quy trình điều chế glucan sulfat bằng  $\text{urea}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}$ , trong đó nguyên liệu đầu vào là

glucan được tách chiết và tinh chế từ men bánh mì *Saccharomyces cerevisiae* trước, sau đó sulfat hóa glucan.

Na Lei và các đồng tác giả trong nghiên cứu “Effects of Low Molecular Weight Yeast  $\beta$ -Glucan on Antioxidant and Immunological Activities in Mice” mô tả quy trình điều chế glucan sulfat theo 2 bước: (1) tách chiết và tinh chế glucan từ men bánh mì *Saccharomyces cerevisiae* bằng kiềm và axit, và (2) sulfat hóa bằng urea/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/DMSO.

Nhược điểm của các quy trình nêu trên là chưa bỏ qua được giai đoạn tách chiết và tinh chế glucan nhằm tiết kiệm chi phí và giảm giá thành.

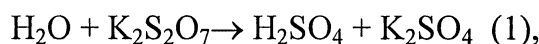
Như vậy, cho đến nay chưa có quy trình sản xuất glucan sulfat trực tiếp từ men bánh mì.

### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

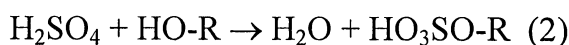
Mục đích của giải pháp hữu ích là nhằm tiết kiệm chi phí và giảm giá thành sản xuất glucan sulfat. Để đạt được mục đích này, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sulfat hóa trực tiếp men bánh mì để điều chế glucan sulfat mà không có bước tách chiết và tinh chế glucan.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sulfat hóa trực tiếp men bánh mì để điều chế glucan sulfat, trong đó quy trình này không có bước tách chiết và tinh chế glucan, và quy trình này bao gồm các bước:

(i) sulfat hóa glucan bằng cách hòa tan men bánh mì, nước và K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (kali pyrosulfat) vào DMSO theo tỷ lệ khối lượng men bánh mì/thể tích nước/khối lượng K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/thể tích DMSO là 5/1/5/100, và đun nóng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 75<sup>0</sup>C đến 80<sup>0</sup>C, axit sulfuric được sinh ra theo phản ứng:



glucan và mannoprotein là 2 thành phần chính của màng tế bào men bánh mì, mannoprotein bị phá hủy, glucan sẽ tan vào DMSO tham gia phản ứng tạo este với sulfat tại vị trí nhóm hydroxyl của các gốc đường:



thu được hỗn hợp A chứa K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub> và glucan sulfat; và

(ii) thu glucan sulfat bằng cách bổ sung nước vào hỗn hợp A để hòa tan  $K_2S_2O_7$  theo tỷ lệ khối lượng men bánh mì/thể tích nước là 1/10, glucan sulfat không tan trong DMSO sẽ tách ra dưới dạng kết tủa, gạn kết tủa ra khỏi hỗn hợp phản ứng, tiếp theo rửa kết tủa bằng DMSO để loại bỏ các thành phần khác, và rửa sạch DMSO ra khỏi sản phẩm bằng cồn với khối lượng bằng hai lần khối lượng kết tủa, sấy khô kết tủa thu được glucan sulfat.

### **Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích**

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết giải pháp hữu ích, chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Các thành phần, hóa chất hoặc thiết bị sử dụng trong quy trình theo giải pháp hữu ích có thể tìm thấy hoặc mua được trên thị trường.

Thành phần màng tế bào nấm men bánh mì chứa khoảng 60% glucan và khoảng 40% mannoprotein, chitin không đáng kể (xem tài liệu JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Aug. 1998, p. 3735–3740 Vol. 180, No. 15, Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges, PETER N. LIPKE). Trong mannoprotein, cacbohydrat chiếm khoảng 70%, mannoza chiếm 60% của cacbohydrat.

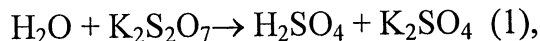
Từ đó, có thể thấy hàm lượng glucan lớn gấp 3 lần mannoza. Nếu mannoza không bị axit sulfuric phá hủy thành monome hoặc thành đoạn mạch rất ngắn không thể tạo thành kết tủa tách khỏi DMSO, thì sau khi tham gia phản ứng và tạo thành mannan sulfat thì glucan sulfat vẫn đạt được hàm lượng trên 80%.

Men bánh mì là men ở dạng bột khô chứa thành phần chính là chủng vi khuẩn *Saccharomyces cerevisiae* và chất nhũ hóa E491. Theo một phương án, men bánh mì được sử dụng trong quy trình theo sáng chế là men bánh mì được bán trên thị trường với tên thương mại là Saf-Viet®.

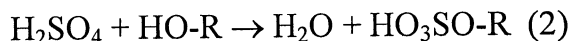
Theo một phương án, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sulfat hóa trực tiếp men bánh mì để điều chế glucan sulfat, trong đó quy trình này không có bước tách chiết và tinh chế glucan, và quy trình này bao gồm các bước :

(i) sulfat hóa glucan bằng cách hòa tan men bánh mì, nước và  $K_2S_2O_7$  vào DMSO theo tỷ lệ khối lượng men bánh mì/thể tích nước/khối lượng  $K_2S_2O_7$ /thể tích

DMSO là 5/1/5/100, và đun nóng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 75<sup>0</sup>C đến 80<sup>0</sup>C, axit sulfuric được sinh ra theo phản ứng:



glucan và mannoprotein là 2 thành phần chính của màng tế bào men bánh mì, mannoprotein bị phá hủy, glucan sẽ tan vào DMSO tham gia phản ứng tạo este với sulfat tại vị trí nhóm hydroxyl của các gốc đường:



thu được hỗn hợp A chứa K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub> và glucan sulfat;

K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub> sẽ phản ứng với nước để tạo thành H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, trong quá trình este hóa nhóm OH của glucan, tại mỗi vị trí nhóm sulfat tạo liên kết sẽ sinh ra một phân tử nước. Phân tử nước sẽ mất lập tức do tác dụng với K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub> để sinh ra H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mới, đẩy mạnh phản ứng theo chiều tạo este, glucan sulfat không tan được trong DMSO sẽ bị tách ra khỏi hỗn hợp phản ứng, trộn lẫn vào K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub> chưa tan hết. Đồng thời trong quá trình này, các chất khác trong màng tế bào nấm men đã tan trong DMSO chủ yếu là protein sẽ bị H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cắt đứt các liên kết peptit tạo thành các sản phẩm mạch ngắn hơn, dễ tan trong DMSO hơn nữa.

Trong điều kiện kali pyrosulfat dư nhiều so với nước, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc sinh ra phá hủy cấu trúc màng tế bào nấm men, các thành phần nấm men tan vào DMSO khi đun nóng đến 80<sup>0</sup>C. Mannoprotein bị phá hủy đến các đoạn mạch rất ngắn hoặc thành monome.

Phản ứng (2) sẽ xảy ra thuận lợi về phía tạo thành glucan sulfat khi tăng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và tách nước. Trong quy trình này, khác với cho axit sulfuric đậm đặc trực tiếp vào, nước tạo thành sẽ phản ứng tiếp tục với kali pyrosulfat để sinh ra thêm H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nước mất đi, theo định luật Le chatelier, chiều phản ứng sẽ chuyển sang tạo thành glucan sulfat.

(ii) thu glucan sulfat bằng cách bổ sung nước vào hỗn hợp A để hòa tan K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub> theo tỷ lệ khối lượng men bánh mì/thể tích nước là 1/10, glucan sulfat không tan trong DMSO sẽ tách ra dưới dạng kết tủa, gạn kết tủa ra khỏi hỗn hợp phản ứng, tiếp theo rửa kết tủa bằng DMSO để loại bỏ các thành phần khác, và rửa sạch DMSO ra khỏi sản phẩm bằng cồn với khối lượng bằng hai lần khối lượng kết tủa, sấy khô kết tủa thu được glucan sulfat.

**Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích**

Quy trình sulfat hóa trực tiếp men bánh mì để điều chế khoảng 1g glucan sulfat:

Cho 5g men bánh mì khô Saf-Viet® vào bình nón 250ml, bổ sung thêm 1ml nước, 5g  $K_2S_2O_7$  và 100ml DMSO. Đun bình nón trên máy khuấy từ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ  $75^{\circ}C$  đến  $80^{\circ}C$  trong thời gian 8 giờ, vừa đun nóng vừa khuấy liên tục. Sau đó, dừng đun nóng và tiếp tục khuấy đến khi nguội, bổ sung thêm 50ml nước để hòa tan hết phần  $K_2S_2O_7$  còn lại. Glucan sulfat tách ra dưới dạng kết tủa. Gạn rửa kết tủa bằng 3ml DMSO, tiếp theo rửa sạch DMSO ra khỏi sản phẩm bằng cồn với khối lượng bằng hai lần khối lượng kết tủa, dịch rửa được đem đi chưng cất thu hồi cồn và DMSO, sấy khô kết tủa thu được 1g glucan sulfat.

Glucan sulfat thu được có hàm lượng trên 80%.

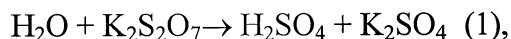
**Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Men bánh mì là nguồn cung cấp glucan hàm lượng rất lớn đồng thời có thể nuôi cấy tăng sinh khối để thu được khối lượng nguyên liệu nhiều hơn. Điều chế glucan sulfat từ men bánh mì bằng quy trình theo sáng chế đơn giản, không trải qua công đoạn tách chiết và tinh chế glucan nên tiết kiệm chi phí và giảm giá thành sản phẩm. Ngoài ra, glucan sulfat thu được từ quy trình này có hiệu suất cao (80%).

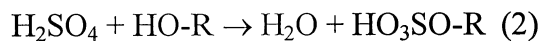
## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sulfat hóa trực tiếp men bánh mì để điều chế glucan sulfat, trong đó quy trình này không có bước tách chiết và tinh chế glucan, và quy trình này bao gồm các bước:

(i) sulfat hóa glucan bằng cách hòa tan men bánh mì, nước và  $K_2S_2O_7$  vào DMSO theo tỷ lệ khối lượng men bánh mì/thể tích nước/khối lượng  $K_2S_2O_7$ /thể tích DMSO là 5/1/5/100, và đun nóng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ  $75^{\circ}C$  đến  $80^{\circ}C$ , axit sulfuric được sinh ra theo phản ứng:



glucan và mannoprotein là 2 thành phần chính của màng tế bào men bánh mì, mannoprotein bị phá hủy, glucan sẽ tan vào DMSO tham gia phản ứng tạo este với sulfat tại vị trí nhóm hydroxyl của các gốc đường:



thu được hỗn hợp A chứa  $K_2S_2O_7$  và glucan sulfat; và

(ii) thu glucan sulfat bằng cách bổ sung nước vào hỗn hợp A để hòa tan  $K_2S_2O_7$  theo tỷ lệ khối lượng men bánh mì/thể tích nước là 1/10, glucan sulfat không tan trong DMSO sẽ tách ra dưới dạng kết tủa, gạn kết tủa ra khỏi hỗn hợp phản ứng, tiếp theo rửa kết tủa bằng DMSO để loại bỏ các thành phần khác, và rửa sạch DMSO ra khỏi sản phẩm bằng cồn với khối lượng bằng hai lần khối lượng kết tủa, sấy khô kết tủa thu được glucan sulfat.