



(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)



1-0029734

(51)⁷ A23C 9/13

(13) B

(21) 1-2015-00456

(22) 31/07/2012

(86) PCT/JP2012/069395 31/07/2012

(87) WO 2014/020679 A1 06/02/2014

(45) 25/10/2021 403

(43) 25/05/2015 326A

(73) MEGMILK SNOW BRAND CO., LTD. (JP)

1-1, Naechocho 6-chome, Higashi-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 065-0043 Japan

(72) OHMACHI, Aiko (JP); MATSUYAMA, Hiroaki (JP); MORITA, Yoshikazu (JP);
ISHIDA, Yuko (JP); NARA, Takayuki (JP); KATO, Ken (JP); SERIZAWA, Atsushi
(JP); UENO, Hiroshi (JP); URAZONO, Hiroshi (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) SẢN PHẨM SỮA LÊN MEN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến sản phẩm sữa lên men hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp bằng cách sử dụng hàng ngày. Sản phẩm sữa lên men chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 0,9mg/100g đến 150mg/100g và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,006 đến 1,7. Xương có thể được tăng cường độ bền và các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp có thể được phòng ngừa hoặc điều trị bằng cách sử dụng sản phẩm sữa lên men. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sản xuất sản phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến sản phẩm sữa lên men mới và phương pháp sản xuất sản phẩm này. Sản phẩm sữa lên men này chứa thành phần sữa đặc trung và có thể hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong những năm gần đây, các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng gia tăng trên toàn cầu cùng với sự già hóa trong xã hội và tương tự và trở thành một vấn đề xã hội nghiêm trọng. Nguyên nhân gây ra những căn bệnh này là do sự hấp thu canxi không đầy đủ, suy giảm khả năng hấp thu canxi, mất cân bằng hormone sau khi mãn kinh và tương tự. Xét thấy rằng, gia tăng khối lượng xương cơ thể nhiều nhất có thể bằng cách kích hoạt tạo cốt bào và quá trình hình thành xương từ giai đoạn sớm trong cuộc đời và sự gia tăng khối lượng xương cực đại và độ bền chắc của xương (mật độ xương + chất lượng xương) là hữu hiệu trong việc phòng ngừa các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng. Lưu ý rằng, thuật ngữ “chất lượng xương” dùng để chỉ vì cấu trúc xương, quá trình quay vòng chuyển hóa, gãy xương vi thể và quá trình vôi hóa. Có thể thấy rằng, các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng có thể được phòng ngừa bằng cách ngăn chặn quá trình tiêu xương do hủy cốt bào. Xương được tiêu hủy và hình thành lặp đi lặp lại theo cách cân bằng (quá trình tái tạo xương). Tuy nhiên, các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng có thể xuất hiện khi quá trình tiêu xương vượt trội hơn quá trình tạo xương do sự thay đổi về cân bằng hormone sau khi mãn kinh và tương tự. Do đó, xương có thể được tăng cường củng cố bằng cách ngăn chặn quá trình tiêu xương do hủy cốt bào và duy trì độ bền chắc của xương ở mức độ hằng định.

Theo quan điểm mô tả ở trên, thuốc, thức ăn, đồ uống, thực phẩm hoặc tương tự, trong đó muối canxi như canxi cacbonat, canxi phosphat hoặc canxi

lactat hoặc sản phẩm canxi tự nhiên như canxi trong nước sữa, bột xương bò hoặc vỏ trứng được bổ sung một cách riêng biệt, đã được tiến hành thực hiện nhằm để tăng cường độ bền chắc xương. Thuốc, thức ăn, đồ uống, thực phẩm hoặc tương tự chứa sản phẩm canxi như vậy cùng với chất có tác dụng tăng cường hấp thu canxi như casein phosphopeptit hoặc oligosacarit cũng đã được sử dụng để tăng cường độ bền chắc xương. Tuy nhiên, tốc độ hấp thu canxi bằng 50% hoặc thấp hơn khi sử dụng thức ăn hoặc đồ uống chứa muối canxi hoặc sản phẩm canxi tự nhiên và phần lớn lượng canxi đã dùng có thể được thải ra khỏi cơ thể mà không được hấp thu. Hơn nữa, ngay cả khi canxi được hấp thu vào trong cơ thể, nó không nhất thiết thể hiện tác dụng cải thiện sự chuyển hóa xương hoặc tác dụng tăng cường độ bền chắc xương, vì ái lực đối với xương có thể khác nhau tùy theo dạng xương hoặc loại thành phần dinh dưỡng cùng được sử dụng. Sản phẩm estrogen, sản phẩm vitamin D₃ hoạt tính, sản phẩm vitamin K₂, sản phẩm bisphosphonat, sản phẩm canxitonin và sản phẩm tương tự đã được biết là được chất để điều trị bệnh loãng xương hoặc tăng cường độ bền chắc xương và các thuốc mới như kháng thể kháng RANKL cũng đã được phát triển. Tuy nhiên, các thuốc này có thể có tác dụng phụ như gây ù tai, đau đầu hoặc mất cảm giác ngon miệng. Hơn nữa, hiện tại các chất nêu trên ở trong tình trạng không thể bổ sung được vào thức ăn hoặc đồ uống theo quan điểm về độ an toàn, chi phí và yếu tố tương tự. Do đó, xét theo bản chất của các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng, việc phát triển thức ăn hoặc đồ uống như vậy mà chúng có thể được dùng theo đường miệng trong thời gian dài làm gia tăng độ bền chắc của xương bằng cách thúc đẩy quá trình hình thành xương và ngăn chặn quá trình tiêu xương và có thể được kỳ vọng có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh về xương được mong đợi.

Tài liệu nêu trong phần tình trạng kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP-A-H08-151331

Tài liệu sáng chế 2: JP-A-H10-7585

Tài liệu sáng chế 3: JP-A-2000-281587

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhằm đề xuất sản phẩm sữa lên men có thể hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, mật độ xương có thể được tăng lên một cách hiệu quả bằng cách sử dụng sản phẩm sữa lên men chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và chứa xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin theo tỷ lệ khối lượng cụ thể so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin. Phát hiện này đã dẫn đến việc hoàn thành sáng chế.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến các khía cạnh sau:

(1) Sản phẩm sữa lên men chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 0,9mg/100g đến 150mg/100g và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,006 đến 1,7.

(2) Phương pháp phòng ngừa bệnh về xương bao gồm bước sử dụng sản phẩm sữa lên men theo điểm (1) với lượng 100g/ngày hoặc cao hơn.

(3) Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men theo điểm (1), bao gồm bước bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin vào nguyên liệu thô của sản phẩm sữa lên men, làm tiệt trùng hỗn hợp và làm lên men hỗn hợp tiệt trùng.

(4) Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men theo điểm (1), bao gồm bước bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin vào nguyên liệu thô của sữa tiệt trùng.

Hiệu quả của sáng chế

Sản phẩm sữa lên men theo sáng chế thể hiện tác dụng tăng cường độ bền chắc xương và có thể hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sản phẩm sữa lên men theo sáng chế khác biệt ở chỗ, sản phẩm sữa lên men chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng cụ thể và còn chứa thêm xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin theo tỷ lệ khối lượng cụ thể so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin.

Sản phẩm sữa lên men thường chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 0,2 đến 0,8mg/100g và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với lượng nằm trong khoảng từ 0,4 đến 1,1mg/100g.

Ngược lại, sản phẩm sữa lên men theo sáng chế được bổ sung bằng angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin và sản phẩm sữa lên men chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 0,9mg/100g đến 150mg/100g và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với tỷ lệ so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,006 đến 1,7.

Phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin được điều chế từ sữa của động vật có vú, như người, bò, trâu, dê hoặc cừu, phần chứa xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin được điều chế từ sữa của động vật có vú, như người, bò, trâu, dê hoặc cừu, phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin được tạo ra bằng công nghệ di truyền, phần chứa xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin được tạo ra bằng công nghệ di truyền, angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin được tinh chế từ máu hoặc cơ quan, xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin được tinh chế từ máu hoặc cơ quan hoặc tương tự có thể được sử dụng làm angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản

phẩm thủy phân của xystatin được chứa trong sản phẩm sữa lên men theo sáng chế. Tác nhân phản ứng angiogenin hoặc xystatin tinh chế có sẵn trên thị trường cũng có thể được sử dụng.

Sản phẩm sữa lên men theo sáng chế có thể chứa sản phẩm thủy phân của angiogenin hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin thu được bằng cách phân hủy phần chứa angiogenin, tác nhân phản ứng angiogenin, phần chứa xystatin, tác nhân phản ứng xystatin hoặc tương tự bằng cách sử dụng một hoặc nhiều proteaza.

Sản phẩm sữa lên men theo sáng chế có thể chứa nguyên liệu protein được điều chế bằng cách chiết phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin trực tiếp từ sữa hoặc nguyên liệu thu được từ sữa, như sữa gầy hoặc nước sữa. Ví dụ, nguyên liệu protein như vậy có thể được điều chế như sau. Cụ thể, sữa hoặc nguyên liệu thu được từ sữa được cho tiếp xúc với nhựa trao đổi cation và các protein thu được từ sữa hấp phụ trên nhựa được rửa giải ở nồng độ muối nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2,0M, được khử muối và được cô bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược, màng thẩm tách bằng điện, màng siêu lọc, màng vi lọc hoặc màng tương tự và tùy ý được cho tiến hành phân giải protein tới phân tử lượng bằng 8000 hoặc thấp hơn bằng cách sử dụng proteaza, như trypsin, pancreatin, chymotrypsin, pepsin, papain, kalikrein, cathepsin, thermolysin hoặc V8 proteaza. Khi tiến hành phân giải protein bằng cách sử dụng proteaza, giới hạn dưới của phân tử lượng tốt hơn là bằng 500 hoặc cao hơn. Nguyên liệu protein thu được như vậy có thể được làm khô bằng phương pháp khô lạnh, sấy phun hoặc tương tự và sản phẩm khô có thể được bổ sung vào sản phẩm sữa lên men.

Sản phẩm sữa lên men theo sáng chế được tạo ra bằng cách bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin và nguyên liệu protein chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin hoặc tương tự vào nguyên liệu thô của sản phẩm sữa lên men, sao cho

sản phẩm sữa lên men chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 0,9mg/100g đến 150mg/100g và chứa xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với tỷ lệ so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,006 đến 1,7.

Như được chứng minh trong các ví dụ thử nghiệm mô tả dưới đây, khi sản phẩm sữa lên men chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin như được mô tả ở trên, tác dụng tăng cường độ bền chắc xương có thể đạt được một cách hiệu quả hơn so với trường hợp sử dụng angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin hoặc xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin một cách riêng biệt.

Sản phẩm sữa lên men theo sáng chế có thể được tạo ra theo cách thông thường, miễn là sản phẩm sữa lên men lần lượt chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với lượng cụ thể. Sản phẩm sữa lên men được tạo ra theo sáng chế có thể bao gồm tất cả các sản phẩm sữa lên men, như sản phẩm sữa lên men, đồ uống chứa vi khuẩn sinh axit lactic trong sữa, đồ uống chứa vi khuẩn sinh axit lactic và tương tự. Ví dụ, sản phẩm sữa lên men theo sáng chế được tạo ra bằng cách trộn tùy ý nguyên liệu sữa thô, bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin vào đó, sao cho sản phẩm sữa lên men chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng cụ thể và bổ sung xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin vào hỗn hợp, sao cho sản phẩm sữa lên men chứa xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin nằm trong phạm vi đặc trưng về tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin. Lưu ý rằng, đối với nguyên liệu sữa thô, sữa bò, sữa gầy cô đặc, bột sữa gầy, nước sữa, bơ, kem hoặc tương tự, ngoài đồ uống dựa vào sữa, sữa chế biến, sữa được cải biến thành phần, sữa ít béo, sữa không béo hoặc tương tự mà có thể thu được bằng cách trộn một cách thích hợp hoặc tùy ý các sữa bò, sữa gầy cô đặc, bột sữa gầy, nước sữa, bơ, kem nêu trên hoặc nguyên liệu tương tự, có thể được sử dụng. Sau đó, lượng thích hợp của chế phẩm men khởi động điều chế từ vi khuẩn lên men axit lactic như *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus*

thermophilus, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* hoặc *Lactobacillus kefir* hoặc nấm men như *Kluyveromyces marxianus* hoặc *Saccharomyces unisporus* được bổ sung vào nguyên liệu sữa thô và hỗn hợp tạo ra được lên men theo cách thông thường để điều chế sản phẩm sữa lên men theo sáng chế.

Khi bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin vào nguyên liệu sữa thô, angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin có thể được bổ sung vào nguyên liệu sữa thô chưa tiệt trùng hoặc nguyên liệu sữa thô tiệt trùng. Khi bổ sung vào nguyên liệu sữa thô chưa tiệt trùng, việc tiệt trùng có thể được tiến hành thực hiện sau khi bổ sung. Trong trường hợp này, tốt hơn là tiệt trùng bằng nhiệt. Khi tiệt trùng hỗn hợp sau khi trộn angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với nguyên liệu sữa thô, tốt hơn là tiệt trùng hỗn hợp ở nhiệt độ 130°C trong thời gian 2 giây hoặc ít hơn.

Có thể là, sản phẩm sữa lên men theo sáng chế có thể được bổ sung bằng nguyên liệu thô hoặc nguyên liệu tương tự thông thường được sử dụng trong thức ăn hoặc đồ uống, như sacarit, lipid, protein, vitamin, khoáng chất hoặc hương liệu, ngoài angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin, xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin, ngoài nguyên liệu sữa thô và cũng có thể được bổ sung bằng thành phần tăng cường độ bền chắc xương khác như canxi, vitamin D, vitamin K hoặc isoflavin.

Sản phẩm sữa lên men theo sáng chế có thể tăng cường độ bền chắc xương khi được dùng theo đường miệng với lượng 100g hoặc cao hơn trên mỗi kg thể trọng, như được thể hiện trong các thử nghiệm trên động vật mô tả dưới đây. Vì lượng sử dụng cho trong động vật thử nghiệm tương đương với lượng sử dụng cho người trưởng thành về nồng độ thuốc trong máu (xem trong Mitsuyoshi Nakajima (1993), “*Yakkou Hyoka* Vol. 8”, Hirokawa-Shoten Ltd., pp. 2-18), hy vọng rằng, xương có thể được tăng cường độ bền và đặc biệt là các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm

khớp có thể được phòng ngừa hoặc điều trị bằng cách sử dụng sản phẩm sữa lên men theo sáng chế với lượng 100g/ngày hoặc cao hơn cho mỗi người trưởng thành.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả thêm dưới đây một cách chi tiết hơn thông qua các ví dụ tham khảo, ví dụ và ví dụ thử nghiệm. Lưu ý rằng, các ví dụ sau đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không được xem là làm giới hạn sáng chế.

Ví dụ tham khảo 1

Điều chế (1) phần angiogenin

Cột nạp bằng 30kg nhựa trao đổi cation (Chitopearl sulfonat hóa; do Fuji Spinning Co., Ltd. sản xuất) được rửa kỹ bằng nước khử ion và sau đó, 1000 lít sữa gầy chưa tiệt trùng (pH = 6,7) được đưa lên cột. Sau khi rửa cột hoàn toàn bằng nước khử ion, protein hấp thụ được rửa giải bằng gradien tuyến tính của natri clorua từ 0,1 đến 2,0M. Phần rửa giải chứa angiogenin được cất phân đoạn sử dụng phương pháp sắc ký trao đổi cation S-Sepharosa (do công ty Amersham Bioscientific sản xuất) và phần chứa angiogenin tạo ra được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 10 phút và được ly tâm để loại bỏ chất kết tủa. Phần chứa angiogenin được cho tiến hành thêm sắc ký lọc gel (cột: Superosa 12). Dịch rửa giải tạo ra được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và dịch rửa giải đã khử muối được làm khô lạnh để thu được 16,5g phần angiogenin có độ tinh khiết angiogenin bằng 90%. Các thao tác liên tục này được lặp lại 30 lần.

Ví dụ tham khảo 2

Điều chế (2) phần angiogenin

Cột đã nạp 10kg Heparin Sepharosa (do GE Healthcare sản xuất) được rửa kỹ bằng nước khử ion và sau đó, 500 lít sữa gầy chưa tiệt trùng (pH = 6,7) được đưa lên cột. Sau khi rửa kỹ cột bằng dung dịch natri clorua 0,5M, protein hấp thụ được rửa giải bằng dung dịch natri clorua 1,5M. Dịch rửa giải được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và dịch rửa giải đã khử muối

được làm khô lạnh để thu được 18g phần angiogenin có độ tinh khiết angiogenin bằng 5%. Các thao tác liên tục nêu trên được lặp lại 50 lần.

Ví dụ tham khảo 3

Điều chế phần xystatin

Tiến hành xử lý bằng nhiệt 100.000 lít dung dịch protein nước sữa 5% ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 10 phút và chất kết tủa được loại bỏ bằng cách ly tâm. Cột được nạp chất mang điều chế được bằng cách gắn kết cacboxymetyl hóa papain vào Tresyl-Toyopearl (do Tosoh Corporation sản xuất). Sau khi làm cân bằng bằng dung dịch natri clorua 0,5M, dung dịch protein nước sữa nêu trên được đưa lên cột. Sau đó, cột được rửa lần lượt bằng dung dịch natri clorua 0,5M và dung dịch natri clorua 0,5M chứa Tween 20 (0,1%). Sau đó, phần chứa xystatin được rửa giải bằng axit axetic 20mM - dung dịch natri clorua 0,5M. Phần đã rửa giải được trung hòa ngay bằng dung dịch natri hydroxit 1M. Sau đó, dịch rửa giải được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và dịch rửa giải đã khử muối được làm khô lạnh để thu được 9,6g phần xystatin có độ tinh khiết xystatin bằng 90%. Các thao tác liên tục nêu trên được lặp lại 20 lần.

Xác định angiogenin và xystatin chứa trong sản phẩm sữa lên men

Hàm lượng của angiogenin, sản phẩm thủy phân của angiogenin, xystatin và sản phẩm thủy phân của xystatin trong sản phẩm sữa lên men được xác định theo phương pháp mô tả trong tài liệu JP-A-2008-164511 có cải biến. Cụ thể, 86µl sản phẩm sữa lên men được bổ sung vào 5ml nước siêu tinh khiết và một lượng tương đương 1/1000 của axit formic được bổ sung vào hỗn hợp để điều chế dung dịch mẫu. Lượng 10µl dung dịch mẫu được làm khô và được hòa tan trong 20µl amoni bicarbonat 0,1M chứa 8M ure và tris(cacboxyetyl)phosphin 1mM (TCEP). Dung dịch được gia nhiệt ở nhiệt độ 56°C trong thời gian 30 phút. Sau khi đưa dung dịch trở lại nhiệt độ trong phòng, 5µl dung dịch iodoacetamid 100mM được bổ sung vào dung dịch và hỗn hợp được phản ứng trong thời gian 30 phút trong điều kiện tối. Sau khi bổ sung 54µl nước siêu tinh khiết, 10µl trypsin 0,1µg/ml và 10µl Lysyl Endopeptidaza 0,1µg/ml được bổ sung vào hỗn hợp. Hỗn hợp được phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 16

giờ. Sau đó, phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung 3µl axit formic và được sử dụng làm dung dịch peptit mẫu để xác định. Dung dịch mẫu được pha loãng 6 lần bằng dung dịch peptit nội chuẩn 10fmol/µl chứa axit formic 0,1%, axit trifloaxetic 0,02% (TFA) và axetonitril 2% và 2,5µl dung dịch pha loãng được cho tiến hành phân tích LC/MS/MS.

Peptit được tách riêng bằng dung dịch gradien bằng cách sử dụng hệ HPLC. Cụ thể hơn nữa, peptit được tách riêng bằng cách sử dụng cột (MAGIC C18, 0,2mm (ID) × 50mm) có trang bị dụng cụ thu hồi peptit 5µl trên hệ HPLC MAGIC 2002 với tốc độ dòng bằng 2 µl/phút. Dung dịch A (axetonitril 2% - axit formic 0,05%) và dung dịch B (axetonitril 90% - axit formic 0,05%) được sử dụng làm chất rửa giải của HPLC. Dung dịch gradien được tiến hành trong điều kiện rửa giải nằm trong khoảng từ 2 đến 65% dung dịch B trong thời gian 20 phút.

Đối với các ion đối tượng để xác định xystatin, ion gốc là $\text{NH}_2\text{-QVVS GMNYFLDVELGR-COOH}$ (m/z 914,4) và ion đích MS/MS là $\text{NH}_2\text{-FLDVELGR-COOH}$ (m/z 948,7). Đối với các ion đối tượng để xác định angiogenin, ion gốc là $\text{NH}_2\text{-YIHFLTQH YDAK-COOH}$ (m/z 768,8) và ion đích MS/MS là $\text{NH}_2\text{-FLTQH YDAK-COOH}$ (m/z 1122,8). Liên quan đến peptit nội chuẩn, ion gốc là $\text{NH}_2\text{-ETTVFENLPEK-COOH}$ (trong đó, P được đánh dấu bằng ^{13}C và ^{15}N) (m/z 656,9) và ion đích MS/MS là $\text{NH}_2\text{-FENLPEK-COOH}$ (trong đó, P được đánh dấu bằng ^{13}C và ^{15}N) (m/z 882,4).

Hệ thống “LCQ Advantage” được sử dụng trong MS. Vùng đỉnh điểm của mỗi một protein được tính toán từ sắc phổ tạo ra và nồng độ được tính toán từ tỷ lệ đối với peptit nội chuẩn.

Ví dụ 1

Trộn 166mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1 và 0,5mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 với 100g hỗn hợp điều chế bằng cách bổ sung chế phẩm men khởi động vào bột sữa gầy khử 10% đã được tiệt trùng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 10 phút, hỗn hợp tạo ra được lên men theo cách thông thường để thu được sản phẩm sữa lên men (sản phẩm của ví dụ

1). Sản phẩm sữa lên men thu được chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 150mg/100g và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong sản phẩm sữa lên men là 0,006.

Ví dụ 2

Trộn 13,5mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 2 và 1,2mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 với 100g hỗn hợp được điều chế bằng cách bổ sung chế phẩm men khởi động vào bột sữa gầy khử 10% đã được tiệt trùng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 10 phút và hỗn hợp tạo ra được lên men theo cách thông thường để thu được sản phẩm sữa lên men (sản phẩm của ví dụ 2). Sản phẩm sữa lên men thu được chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 0,9mg/100g và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong sản phẩm sữa lên men là 1,7.

Ví dụ 3

Trộn 13,5mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1 và 1,2mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 với 100g hỗn hợp được điều chế bằng cách bổ sung chế phẩm men khởi động vào bột sữa gầy khử 10% đã được tiệt trùng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 10 phút và hỗn hợp tạo ra được lên men theo cách thông thường để thu được sản phẩm sữa lên men (sản phẩm của ví dụ 3). Sản phẩm sữa lên men thu được chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 12,4mg/100ml và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong sản phẩm sữa lên men là 0,12.

Ví dụ so sánh 1

Trộn 12mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 2 và 2,7mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 với 100g hỗn hợp được điều chế bằng cách bổ sung chế phẩm men khởi động vào bột sữa gầy khử 10% đã được tiệt trùng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 10 phút và hỗn hợp tạo ra được lên men theo cách thông thường để thu được sản phẩm sữa lên men (sản phẩm của

ví dụ so sánh 1). Sản phẩm sữa lên men thu được chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 0,9mg/100g và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong sản phẩm sữa lên men là 3,2.

Ví dụ so sánh 2

Trộn 166mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1 và 0,25mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 với 100g hỗn hợp được điều chế bằng cách bổ sung chế phẩm men khởi động vào bột sữa gầy khử 10% đã được tiệt trùng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 10 phút và hỗn hợp tạo ra được lên men theo cách thông thường để thu được sản phẩm sữa lên men (sản phẩm của ví dụ so sánh 2). Sản phẩm sữa lên men thu được chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 150mg/100ml và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong sản phẩm sữa lên men là 0,0045.

Ví dụ thử nghiệm 1

Tác dụng tăng cường độ bền chắc xương của các sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 được xác định bằng các thử nghiệm trên động vật. Chuột C3H/HeJ (5 tuần tuổi, giới tính đực) được sử dụng cho các thử nghiệm trên động vật. Sau khi làm cho thích nghi trong 1 tuần, chuột được phân thành 6 nhóm (10 chuột/nhóm). Chuột được dùng theo đường miệng mỗi một sản phẩm trong số các sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 với lượng 100g trên 1kg thể trọng chuột mỗi ngày một lần trong thời gian 2 tuần bằng cách sử dụng ống thông. Nhóm đối chứng không được sử dụng bất kỳ sản phẩm nào trong ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2. Sau khi hoàn thành việc sử dụng (tuần thứ hai), mật độ xương của xương ống bên phải của mỗi một chuột được đo bằng cách sử dụng thiết bị chụp vi cắt lớp (do Rigaku Corporation sản xuất). Kết quả được thể hiện trong bảng 1. Như được thể hiện trong bảng 1, các nhóm được dùng sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 theo đường miệng thể hiện sự gia tăng đáng kể về mật độ xương so với nhóm

đối chứng và các nhóm dùng sản phẩm trong ví dụ so sánh được dùng sản phẩm của ví dụ so sánh 1 hoặc 2 theo đường miệng.

Bảng 1

	Mật độ xương (mg/cm ³)
Nhóm đối chứng	1235 ± 9
Sản phẩm của ví dụ 1	1268 ± 12
Sản phẩm của ví dụ 2	1273 ± 13
Sản phẩm của ví dụ 3	1267 ± 11
Sản phẩm của ví dụ so sánh 1	1241 ± 7
Sản phẩm của ví dụ so sánh 2	1240 ± 5

Ví dụ tham khảo 4

Cột (đường kính: 4cm, chiều cao: 30cm) nạp bằng 400g nhựa trao đổi cation (Chitopearl sulfonat hóa; do Fuji Spinning Co., Ltd. sản xuất) được rửa kỹ bằng nước khử ion và 40 lít sữa gầy chưa tiệt trùng (pH = 6,7) được đưa lên cột với tốc độ dòng bằng 25ml/phút. Sau khi rửa sạch cột hoàn toàn bằng nước khử ion, protein hấp phụ trên nhựa được rửa giải bằng cách sử dụng dung dịch đệm cacbonat 0,02M (pH = 7,0) chứa natri clorua 0,78M. Dịch rửa giải được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và dịch rửa giải đã khử muối được làm khô lạnh để thu được 18g nguyên liệu protein dạng bột (sản phẩm của ví dụ tham khảo 4).

Ví dụ tham khảo 5

Hòa tan 4g nguyên liệu protein của sản phẩm của ví dụ tham khảo 4 trong 800ml nước. Sau khi bổ sung trypsin (do Sigma sản xuất) là proteaza ở nồng độ cuối cùng bằng 0,03% khối lượng, hỗn hợp được cho tiến hành xử lý enzym ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 8 giờ. Sau khi bất hoạt proteaza bằng phương thức xử lý nhiệt ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 5 phút, hỗn hợp được làm khô lạnh để thu được 3,0g nguyên liệu protein dạng bột (sản phẩm của ví dụ tham khảo 5).

Ví dụ 4

Trộn 40mg sản phẩm của ví dụ tham khảo 4 với 97g bột sữa gầy khử 10%

và hỗn hợp được tiệt trùng ở nhiệt độ 93°C trong thời gian 6 phút, tiếp theo bằng việc bổ sung 3g chế phẩm men khởi động, hỗn hợp tạo ra được lên men theo cách thông thường để thu được sản phẩm sữa lên men (sản phẩm của ví dụ 4). Sản phẩm sữa lên men thu được chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 2,4mg/100g và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong sản phẩm sữa lên men là 0,39.

Ví dụ 5

Trộn 40mg sản phẩm của ví dụ tham khảo 5 với 97g bột sữa gầy khử 10% và hỗn hợp được tiệt trùng ở nhiệt độ 93°C trong thời gian 6 phút, tiếp theo bằng việc bổ sung 3g chế phẩm men khởi động, hỗn hợp được lên men theo cách thông thường để thu được sản phẩm sữa lên men (sản phẩm của ví dụ 5). Sản phẩm sữa lên men thu được chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 2,3mg/100g và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong sản phẩm sữa lên men là 0,4.

Ví dụ so sánh 3

Trộn 30mg sản phẩm của ví dụ tham khảo 4 và 10mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 với 97g bột sữa gầy khử 10% và hỗn hợp được tiệt trùng ở nhiệt độ 93°C trong thời gian 6 phút, tiếp theo bằng việc bổ sung 3g chế phẩm men khởi động, hỗn hợp tạo ra được lên men theo cách thông thường để thu được sản phẩm sữa lên men (sản phẩm của ví dụ so sánh 3). Sản phẩm sữa lên men thu được chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 1,9mg/100g và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong sản phẩm sữa lên men là 5,2.

Ví dụ thử nghiệm 2

Tác dụng tăng cường độ bền chắc xương của các sản phẩm của ví dụ 4 và 5 và sản phẩm của ví dụ so sánh 3 được xác định bằng các thử nghiệm trên động vật. Sử dụng 40 chuột SD cái (51 tuần tuổi) cho các thử nghiệm trên động vật.

Chuột được phân thành 5 nhóm (8 chuột/nhóm). Tiến hành thủ thuật cắt bỏ buồng trứng trên 4 nhóm và một nhóm còn lại được tiến hành phẫu thuật giả. Sau giai đoạn 4 tuần phục hồi, chuột cắt bỏ buồng trứng được dùng sản phẩm của ví dụ 4 hoặc 5 hoặc sản phẩm của ví dụ so sánh 3 theo đường miệng với lượng 100g trên 1kg thể trọng chuột hàng ngày với liều lượng chia làm 6 lần trong thời gian 16 tuần bằng cách sử dụng ống thông. Nhóm đối chứng không được sử dụng bất kỳ sản phẩm nào trong ví dụ 4 và 5 và sản phẩm của ví dụ so sánh 3. Sau giai đoạn 4 tuần phục hồi, chuột trải qua phẫu thuật giả được nuôi trong thời gian 16 tuần theo cách tương tự như nhóm đối chứng. Sau khi hoàn thành việc sử dụng (tuần thứ 16), mật độ xương của xương ống bên phải của mỗi một chuột được đo bằng cách sử dụng thiết bị chụp vi cắt lớp (do Rigaku Corporation sản xuất).

Kết quả được thể hiện trong bảng 2. Như được thể hiện trong bảng 2, các nhóm được dùng sản phẩm của ví dụ 4 và 5 theo đường miệng thể hiện sự gia tăng đáng kể về mật độ xương khi so sánh với nhóm đối chứng và nhóm sử dụng sản phẩm của ví dụ so sánh 3 theo đường miệng. Ngoài ra, mật độ xương tiệm cận sát mật độ xương của nhóm phẫu thuật giả.

Bảng 2

	Mật độ xương (mg/cm ³)
Nhóm đối chứng	551 ± 9
Nhóm phẫu thuật giả	602 ± 10
Sản phẩm của ví dụ 4	596 ± 11
Sản phẩm của ví dụ 5	598 ± 13
Sản phẩm của ví dụ so sánh 3	556 ± 12

Ví dụ 6

Trộn 50mg sản phẩm của ví dụ tham khảo 4 với 98g bột sữa gầy khử 2,5% đã được tiệt trùng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 10 phút, tiếp theo bằng việc bổ sung 2g chế phẩm men khởi động, hỗn hợp tạo ra được lên men theo cách thông thường, được tiệt trùng ở nhiệt độ 130°C trong thời gian 2 giây và được làm lạnh xuống nhiệt độ 10°C để thu được sản phẩm sữa lên men (sản phẩm của ví dụ 6). Sản phẩm sữa lên men thu được chứa angiogenin và/hoặc sản

phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 2,9mg/100g và tỷ lệ khối lượng của xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong sản phẩm sữa lên men là 0,32.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Sản phẩm sữa lên men chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 0,9mg/100g đến 150mg/100g và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,006 đến 1,7.
2. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước trộn angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với nguyên liệu thô của sản phẩm sữa và làm tiệt trùng hỗn hợp thu được và sau đó làm lên men.
3. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin vào nguyên liệu thô của sản phẩm sữa đã tiệt trùng.