



(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)



1-0029735

(51)<sup>7</sup> A23C 19/00

(13) B

(21) 1-2015-00460

(22) 31/07/2012

(86) PCT/JP2012/069399 31/07/2012

(87) WO 2014/020683 A1 06/02/2014

(45) 25/10/2021 403

(43) 25/09/2015 330A

(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) PHO MÁT VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PHO MÁT

(57) Sáng chế đề cập đến pho mát 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. Pho mát chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 6,5mg/100g đến 160mg/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 0,02 đến 1,6. 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 pho mát. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất pho mát này.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến pho mát mới và phương pháp sản xuất pho mát này. Pho mát này chứa thành phần sữa đặc trưng 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 của 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 hoocmon sau khi mãn kinh và tương tự. Xét thấy rằng, sự gia tăng khối lượng xương cơ thể nhiều nhất có thể và sự gia tăng khối lượng xương cực đại và độ bền chắc của xương (mật độ xương và chất lượng xương) bằng cách thúc đẩy sự hình thành xương bởi tạo cốt bào từ giai đoạn sớm trong cuộc đời 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 vi 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. Quá trình tiêu xương và hình thành xương thường được 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 hoocmon 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 dùng 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 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 D<sub>3</sub> hoạt tính, sản phẩm vitamin K<sub>2</sub>, 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 đã được phát triển. Tuy nhiên, các thuốc này có thể có các tác dụng phụ như gây ra ù tai, đau đầu hoặc mất cảm giác ngon miệng. Hơn nữa, hiện tại các chất nêu trên nằm 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 là 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

Sáng chế đề cập đến pho mát mà 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

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 pho mát 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) Pho mát chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 6,5mg/100g và không cao hơn 160mg/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 0,02 đến 1,6.

(2) Phương pháp phòng ngừa bệnh về xương bao gồm bước sử dụng pho mát theo mục (1) với lượng 20g/ngày hoặc cao hơn.

(3) Phương pháp sản xuất pho mát theo mục (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 pho mát nguyên liệu thô và/hoặc cục vón pho mát.

(4) Phương pháp sản xuất pho mát theo mục (1), bao gồm bước trộn pho mát nguyên liệu thô với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin, để thu được hỗn hợp và nhũ tương hóa và làm lạnh hỗn hợp.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Pho mát 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**

Pho mát theo sáng chế khác biệt ở chỗ, pho mát 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.

Pho mát thường chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 1,1 đến 6,3mg/100g và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với lượng nằm trong khoảng từ 2,1 đến 9,3mg/100g.

Ngược lại, pho mát 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 pho mát chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 6,5mg/100g đến 160mg/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 0,02 đến 1,6.

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 pho mát theo sáng chế. Tác nhân phản ứng angiogenin hoặc xystatin tinh chế có sẵn trên thị trường cũng có thể được sử dụng.

Pho mát 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 của 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.

Pho mát 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 kết hợp trong pho mát.

Pho mát theo sáng chế được tạo ra bằng cách trộn angiogenin nêu trên 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 với nguyên liệu thô và/hoặc cục vón pho mát, pho mát nguyên liệu thô hoặc tương tự, sao cho pho mát chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng cao hơn 6,5mg và không cao hơn 160mg/100ml 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 0,02 đến 1,6.

Như được chứng minh trong các ví dụ thử nghiệm mô tả dưới đây, khi pho mát 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 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.

Pho mát theo sáng chế có thể được tạo ra theo cách thông thường, miễn là pho mát chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với lượng cụ thể một cách riêng biệt. Thuật ngữ “pho mát” sử dụng trong bản mô tả bao gồm tất cả các loại pho mát như pho mát tự nhiên, chế phẩm pho mát chế biến là thức ăn sử dụng pho mát chế biến, pho mát chế biến có thể phết được, thực phẩm pho mát chế biến được xác định theo tiêu chuẩn Codex, sữa hoặc tương tự làm nguyên liệu thô chính. Ví dụ, pho mát tự nhiên, như pho mát tươi (chưa ủ chín) như pho mát kem, pho mát mozzarella của Ý, pho mát ricota, pho mát mascarpone và pho mát trắng, pho mát mốc trắng như pho mát Camembert và Brie, pho mát mốc xanh như pho mát Gorgonzola, pho mát Stilton và pho mát Roquefort, pho mát vỏ rửa như pho mát Livarot, pho mát hơi cứng như pho mát Provolone và pho mát Gouda và pho mát cứng như pho mát Grana, pho mát Emmentaler và pho mát cứng, pho mát chế biến được tạo ra sử dụng pho mát tự nhiên, thực phẩm dạng pho mát được tạo ra sử dụng polysacarit dầu và chất béo và tương tự, có thể được sử dụng.

Ví dụ, trong trường hợp pho mát Gouda, sữa được điều chỉnh về hàm lượng chất béo bằng 2,8% được sử dụng làm nguyên liệu thô và angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin được bổ sung vào đó với lượng cụ thể và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin được bổ sung thêm theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong phạm vi cụ thể. Hỗn hợp được vô trùng ở nhiệt độ 77°C trong thời gian 15 giây và được làm lạnh. Chất khởi đầu, enzym đông sữa và tương tự được bổ sung vào đó và được khuấy. Sau đó, hỗn hợp được để yên trong thời gian 30 phút và nước sữa được lấy ra để điều chế cục vón pho mát. Sau khi cục vón pho mát tùy ý được bổ sung bằng muối, pho mát Gouda có thể được tạo ra thông qua việc tạo khuôn cục vón pho mát.

Trong trường hợp pho mát pho mát tươi, kem hoặc tương tự được sử dụng làm nguyên liệu thô, angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin được bổ sung vào đó với lượng cụ thể và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin được bổ sung thêm theo tỷ lệ khối lượng vào angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong phạm vi cụ thể. Hỗn hợp được bổ sung đồng nhất vào cục vón pho mát để có thể để tạo ra pho mát tươi. Ví dụ về nguyên liệu thô được sử dụng để tạo ra pho mát theo sáng chế bao gồm sữa của động vật có vú, như bò, trâu, dê hoặc cừu, sữa của chúng trong đó hàm lượng chất béo được điều chỉnh, kem điều chế từ sữa động vật có vú này và nguyên liệu tương tự.

Pho mát theo sáng chế có thể được tạo ra như mô tả dưới đây. Khi tạo ra pho mát chế biến làm pho mát theo sáng chế, ví dụ, đối với muối nhũ tương hóa, natri xitrat, natri monophosphat, natri polyphosphat hoặc tương tự được bổ sung vào pho mát nguyên liệu thô với lượng khoảng 2%. Sau khi bổ sung nước với lượng khoảng 10%, angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin được bổ sung vào hỗn hợp với lượng cụ thể và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin được bổ sung thêm vào hỗn hợp theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong phạm vi cụ thể. Hỗn hợp được nhũ tương hóa ở nhiệt độ 85°C theo cách thông thường và nhũ tương được đặt vào hộp bìa cứng và được làm lạnh xuống nhiệt độ 5°C để có thể tạo ra pho mát chế biến.

Đối với phương pháp trộn angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng cụ thể và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin theo tỷ lệ khối lượng cụ thể so với pho mát chế biến, có thể sử dụng hỗn hợp pho mát được điều chế trước đó bằng cách bổ sung angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin làm pho mát nguyên liệu thô hoặc trộn các lượng thích hợp của angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin với nguyên liệu thô của pho mát chế biến.

Có thể là, pho mát 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, lipit, 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 thô, cục vón pho mát và pho mát nguyên liệu thô nêu trên 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.

Pho mát theo sáng chế có thể tăng cường độ bền chắc xương khi được dùng theo đường miệng với lượng 20g 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 đưa vào trong động vật thử nghiệm tương đương với lượng đưa vào đối với 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 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 tốt hơn sử dụng pho mát theo sáng chế với lượng 20g/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) phân angiogenin**

Cột đã nạp 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 kỹ cột 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: Superoza 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 Sepharoza (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 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 pho mát

Hàm lượng của angiogenin, sản phẩm thủy phân của angiogenin, xystatin và sản phẩm thủy phân của xystatin trong pho mát được xác định theo phương pháp mô tả trong tài liệu JP-A-2008-164511 có cải biến. Cụ thể, 190mg pho mát được bổ sung vào 65ml 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 10 $\mu$ l dung dịch mẫu được làm khô và được hòa tan trong 20 $\mu$ l amoni bicacbonat 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, 5 $\mu$ l 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 54 $\mu$ l nước siêu tinh khiết, 10 $\mu$ l trypsin 0,1 $\mu$ g/ml và 10 $\mu$ l Lysyl Endopeptidaza 0,1 $\mu$ g/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 3 $\mu$ l 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/ $\mu$ l chứa axit formic 0,1%, axit trifloaxetic 0,02% (TFA) và axetonitril 2% và 2,5 $\mu$ l 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)  $\times$  50mm) có trang bị dụng cụ thu hồi peptit 5 $\mu$ l trên hệ HPLC MAGIC 2002 với tốc độ dòng bằng 2  $\mu$ l/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 NH<sub>2</sub>-QVVS GMNYFLDVELGR-COOH (m/z 914,4) và ion đích MS/MS là NH<sub>2</sub>-FLDVELGR-COOH (m/z 948,7). Đối với các ion đối tượng để xác định angiogenin, ion gốc là NH<sub>2</sub>-YIHFLTQHYDAK-COOH (m/z 768,8) và ion đích MS/MS là NH<sub>2</sub>-FLTQHYDAK-COOH (m/z 1122,8). Liên quan đến peptit nội chuẩn, ion gốc là NH<sub>2</sub>-ETTVFENLPEK-COOH (trong đó, P được đánh dấu

bằng  $^{13}\text{C}$  và  $^{15}\text{N}$ ) ( $m/z$  656,9) và ion đích MS/MS là  $\text{NH}_2\text{-FENLPEK-COOH}$  (trong đó, P được đánh dấu bằng  $^{13}\text{C}$  và  $^{15}\text{N}$ ) ( $m/z$  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 8,8g pho mát Gouda và 8,8g pho mát cứng. Tiếp theo, 0,4g natri xitrat làm muối nhũ tương hóa được bổ sung vào đó và 2g nước, 35mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1 và 0,25mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 được bổ sung thêm vào hỗn hợp. Hỗn hợp được nhũ hóa ở nhiệt độ  $85^\circ\text{C}$  theo cách thông thường. Sau khi hoàn thành bước nhũ hóa, nhũ tương được đặt vào trong hộp bìa cứng và được làm lạnh ở nhiệt độ  $5^\circ\text{C}$  trong thời gian hai ngày đêm để thu được pho mát (sản phẩm của ví dụ 1). Pho mát tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 160mg/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 pho mát là 0,02.

#### Ví dụ 2

Trộn 8,8g pho mát Gouda và 8,8g pho mát cứng. Tiếp theo, 0,4g natri xitrat làm muối nhũ tương hóa được bổ sung vào đó và 2g nước, 20mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 2 và 1,4mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 được trộn vào đó. Hỗn hợp được nhũ hóa ở nhiệt độ  $85^\circ\text{C}$  theo cách thông thường. Sau khi hoàn thành bước nhũ hóa, nhũ tương được đặt vào trong hộp bìa cứng và được làm lạnh ở nhiệt độ  $5^\circ\text{C}$  trong thời gian hai ngày đêm để thu được pho mát (sản phẩm của ví dụ 2). Pho mát tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 6,5mg/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 pho mát là 1,6.

#### Ví dụ 3

Trộn 8,8g pho mát Gouda và 8,8g pho mát cứng. Tiếp theo, 0,4g natri xitrat làm muối nhũ tương hóa được bổ sung vào đó và 2g nước, 20mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1 và 1,4mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 được trộn vào đó. Hỗn hợp được nhũ hóa ở nhiệt độ 85°C theo cách thông thường. Sau khi hoàn thành bước nhũ hóa, nhũ tương được đặt vào trong hộp bìa cứng và được làm lạnh ở nhiệt độ 5°C trong thời gian hai ngày đêm để thu được pho mát (sản phẩm của ví dụ 3). Pho mát tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 90mg/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 pho mát là 0,11.

Ví dụ so sánh 1

Trộn 8,8g pho mát Gouda và 8,8g pho mát cứng. Tiếp theo, 0,4g natri xitrat làm muối nhũ tương hóa được bổ sung vào đó và 2g nước, 18mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 2 và 3,4mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 được trộn vào đó. Hỗn hợp được nhũ hóa ở nhiệt độ 85°C theo cách thông thường. Sau khi hoàn thành bước nhũ hóa, nhũ tương được đặt vào trong hộp bìa cứng và được làm lạnh ở nhiệt độ 5°C trong thời gian hai ngày đêm để thu được pho mát (sản phẩm của ví dụ so sánh 1). Pho mát tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 5,8mg/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 pho mát là 3,3.

Ví dụ so sánh 2

Trộn 8,8g pho mát Gouda và 8,8g pho mát cứng. Tiếp theo, 0,4g natri xitrat làm muối nhũ tương hóa được bổ sung vào đó và 2g nước, 35,2mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1 và 0,05mg phần xystatin thu được trong ví dụ tham khảo 3 được trộn vào đó. Hỗn hợp được nhũ hóa ở nhiệt độ 85°C theo cách thông thường. Sau khi hoàn thành bước nhũ hóa, nhũ tương được đặt vào trong hộp bìa cứng và được làm lạnh ở nhiệt độ 5°C trong thời gian hai ngày đêm để thu được pho mát (sản phẩm của ví dụ so sánh 2). Pho mát tạo

ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 161mg/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 pho mát là 0,14.

#### Ví dụ thử nghiệm 1

Tác dụng tăng cường độ bền chắc xương của mỗi trong số 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. Mỗi một pho mát của các sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 được bổ sung vào nước nóng (60°C) sao cho hàm lượng của pho mát là 20% và hỗn hợp được khuấy đồng đều. 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 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 20g (ở dạng pho mát)/ngày trên 1kg thể trọng chuột hàng ngày chia thành 2 liều lượng 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 tất 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 khi so sánh 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<br>(mg/cm <sup>3</sup> ) |
|------------------------------|---------------------------------------|
| Nhóm đối chứng               | 1236 ± 9                              |
| Sản phẩm của ví dụ 1         | 1268 ± 13                             |
| Sản phẩm của ví dụ 2         | 1271 ± 11                             |
| Sản phẩm của ví dụ 3         | 1269 ± 10                             |
| Sản phẩm của ví dụ so sánh 1 | 1242 ± 7                              |
| Sản phẩm của ví dụ so sánh 2 | 1243 ± 5                              |

## Ví dụ tham khảo 4

Cột (đường kính: 4cm, chiều cao: 30cm) đã nạp 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 kỹ cột 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 để thu được nồng độ cuối 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 3g kem 30%. Hỗn hợp được bổ sung đồng đều vào 17g cục vón pho mát tươi để thu được pho mát (sản phẩm của ví dụ 4). Pho mát tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 11mg/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 pho mát là 0,35.

#### Ví dụ 5

Trộn 40mg sản phẩm của ví dụ tham khảo 5 với 3g kem 30%. Hỗn hợp được bổ sung đồng đều vào 17g cục vón pho mát tươi để thu được pho mát (sản phẩm của ví dụ 5). Pho mát tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 11mg/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 pho mát là 0,36.

#### Ví dụ 6

Bổ sung 40mg sản phẩm của ví dụ tham khảo 4 vào 100ml sữa đã được điều chỉnh về hàm lượng chất béo bằng 2,8% và hỗn hợp được vô trùng ở nhiệt độ 77°C trong thời gian 15 giây. Sau khi làm lạnh, chất khởi đầu, enzym đông sữa và tương tự được bổ sung vào đó và hỗn hợp được để yên trong thời gian 30 phút. Sau đó, nước sữa được lấy ra để điều chế cục vón pho mát. Cục vón pho mát được khử muối và cục vón pho mát khử muối được đặt vào trong khuôn để thu được pho mát (sản phẩm của ví dụ 6). Pho mát tạo ra chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 16mg/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 pho mát là 0,6

#### 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 3g kem 30%. Hỗn hợp được bổ sung đồng đều vào 17g cục vón pho mát tươi để thu được pho mát (sản phẩm của ví dụ so sánh 3). Pho mát thu được chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 8,8mg/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 pho mát là 5,6.

#### Ví dụ thử nghiệm 2

Tác dụng tăng cường độ bền chắc xương của mỗi trong số các sản phẩm

của ví dụ từ 4 đến 6 và sản phẩm của ví dụ so sánh 3 được xác định bằng các thử nghiệm trên động vật. Sử dụng 48 chuột SD cái (51 tuần tuổi) cho các thử nghiệm trên động vật. Mỗi một trong số các sản phẩm của ví dụ từ 4 đến 6 và sản phẩm của ví dụ so sánh 3 được bổ sung vào nước nóng (60°C) sao cho hàm lượng của pho mát là 20% và hỗn hợp được trộn đồng đều và được khuấy. Chuột được phân thành 6 nhóm (8 chuột/nhóm). Tiến hành thủ thuật cắt bỏ buồng trứng trên 5 nhóm và một nhóm còn lại được tiến hành phẫu thuật giả. Sau giai đoạn 4 tuần phục hồi, chuột bị cắt bỏ buồng trứng được dùng theo đường miệng sản phẩm của ví dụ từ 4 đến 6 hoặc sản phẩm của ví dụ so sánh 3 với lượng 20g (ở dạng pho mát) trên 1kg thể trọng chuột hàng ngày với liều lượng chia làm 6 lần bằng cách sử dụng ống thông. Nhóm đối chứng không được sử dụng bất kỳ sản phẩm nào trong ví dụ từ 4 đến 6 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 con 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 từ 4 đến 6 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<br>(mg/cm <sup>3</sup> ) |
|------------------------------|---------------------------------------|
| Nhóm đối chứng               | 550 ± 10                              |
| Nhóm phẫu thuật giả          | 600 ± 8                               |
| Sản phẩm của ví dụ 4         | 597 ± 11                              |
| Sản phẩm của ví dụ 5         | 595 ± 12                              |
| Sản phẩm của ví dụ 6         | 598 ± 14                              |
| Sản phẩm của ví dụ so sánh 3 | 554 ± 11                              |

Ví dụ 7

Bổ sung 50mg sản phẩm của ví dụ tham khảo 4 vào 100ml sữa đã được điều chỉnh về hàm lượng chất béo bằng 3,6% và hỗn hợp được vô trùng ở nhiệt độ 77°C trong thời gian 15 giây. Sau đó, hỗn hợp được làm lạnh. Chất khởi đầu, enzym đông sữa và tương tự được bổ sung vào đó và hỗn hợp được để yên trong thời gian 40 phút. Chất khởi đầu, enzym đông sữa và tương tự được bổ sung vào đó và được khuấy, sau đó hỗn hợp được để yên trong thời gian 40 phút. Sau đó, nước sữa được lấy ra để điều chế cục vón pho mát. Sau khi bổ sung 0,05% mốc xanh (*P. roqueforti*) vào cục vón pho mát ở nồng độ 0,05% so với cục vón, cục vón pho mát được đặt vào trong vành đựng pho mát và được để yên ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 20 giờ. Cục vón pho mát được lấy ra khỏi vành chứa và bề mặt của pho mát được chà sát bằng muối trong thời gian 3 ngày. Sau khi hoàn thành bước chà sát bằng muối, tiến hành chọc lỗ ở phía trên và phía dưới của cục vón pho mát. Sau bước chọc lỗ, bề mặt của pho mát được bọc bằng màng mỏng và sau đó pho mát được làm chín ở nhiệt độ 8°C trong thời gian 60 ngày. Pho mát thu được chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 19mg/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 pho mát là 0,5.

### **YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Pho mát chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 6,5mg/100g đến 160mg/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 0,02 đến 1,6.
2. Phương pháp sản xuất pho mát 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 pho mát nguyên liệu thô và/hoặc cục vón pho mát.
3. Phương pháp sản xuất pho mát theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước trộn pho mát nguyên liệu thô với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và xystatin và/hoặc sản phẩm thủy phân của xystatin và nhũ tương hóa và làm lạnh hỗn hợp.