



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0045353

(51)^{2020.01} A23J 3/08; A23J 1/20

(13) B

(21) 1-2020-05180

(22) 08/01/2019

(86) PCT/JP2019/000245 08/01/2019

(87) WO2019/176246 A1 19/09/2019

(30) 2018-044770 12/03/2018 JP

(45) 26/05/2025 446

(43) 25/12/2020 393A

(71) MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. (JP)

33-1, Shiba 5-chome, Minato-ku, Tokyo 1088384 Japan

(72) IKEDA Masayuki (JP); HASHIMOTO Junichi (JP); SHINODA Ichizou (JP);
IWAMOTO Hiroshi (JP); TAKEDA Yasuhiro (JP).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT DUNG DỊCH NƯỚC CHỨA LACTOFERIN

(21) 1-2020-05180

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp tiệt trùng lactoferin ở nhiệt độ cao trong thời gian ngắn mà vẫn duy trì được hoạt tính của lactoferin. Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất dung dịch nước chứa lactoferin, phương pháp này bao gồm bước tiệt trùng để tiệt trùng bằng nhiệt dung dịch nước chứa lactoferin, ở nhiệt độ là 100°C hoặc cao hơn, trong đó tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin là 1/12 hoặc nhỏ hơn hàm lượng theo khối lượng lactoferin. Sáng chế cũng đề cập đến dung dịch nước chứa lactoferin trong đó tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin là 1/12 hoặc nhỏ hơn hàm lượng theo khối lượng lactoferin, và dung dịch này không chứa vi khuẩn sống.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất dung dịch nước chứa lactoferin, và cụ thể hơn là đề cập đến phương pháp sản xuất dung dịch nước chứa lactoferin, bao gồm bước tiệt trùng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Quá trình tiệt trùng sản phẩm thực phẩm được thực hiện để đảm bảo khả năng bảo quản và sự an toàn của sản phẩm thực phẩm. Đối với nhiều sản phẩm thực phẩm, việc tiêu diệt vi sinh vật bằng cách gia nhiệt được thực hiện để tiệt trùng. Cũng như với lactoferin, là nguyên liệu thực phẩm mà đang được sử dụng phổ biến gần đây, thì một số phương pháp đã được đề xuất để tiệt trùng bằng nhiệt lactoferin trong khi vẫn giữ được hoạt tính của nó.

Ví dụ, tài liệu sáng chế 1 được trích dẫn dưới đây bộc lộ phương pháp liên quan đến việc tiệt trùng bằng nhiệt dung dịch nước chứa lactoferin sau khi điều chỉnh cường độ ion của dung dịch nước sao cho nó thỏa mãn công thức đã định trước. Tài liệu sáng chế 2 được trích dẫn dưới đây bộc lộ phương pháp liên quan đến việc điều chỉnh độ pH của chất lỏng chứa lactoferin là 1,0 hoặc cao hơn và 6,5 hoặc nhỏ hơn, và gia nhiệt chất lỏng này ở nhiệt độ là 60°C hoặc cao hơn.

Tài liệu sáng chế 3 được trích dẫn dưới đây bộc lộ chế phẩm lactoferin ổn định nhiệt bao gồm lactoferin và ít nhất một chất ổn định được chọn từ este của glyxerin và axit béo, natri casein, và lexithin. Tài liệu sáng chế 3 bộc lộ chế phẩm có thể được gia nhiệt ở nhiệt độ là 90°C hoặc cao hơn mà không làm bất hoạt lactoferin. Tài liệu sáng chế 4 được trích dẫn dưới đây bộc lộ chế phẩm protein ổn định nhiệt bao gồm phần protein cơ bản từ sữa và ít nhất một

chất ổn định được chọn từ polysacarit đậu nành, gồm xanthan, pectin, gồm arabic, gồm ghatti, caragenan, gồm bồ mễ hữu cơ, natri casein, lexithin, và carboxymetyl xenluloza. Tài liệu sáng chế 4 bộc lộ chế phẩm có thể được gia nhiệt ở nhiệt độ là 90°C hoặc cao hơn mà không làm bất hoạt phần protein cơ bản từ sữa.

Danh sách tài liệu trích dẫn:

Tài liệu sáng chế:

Tài liệu sáng chế 1: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số H2-108629

Tài liệu sáng chế 2: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số H3-215500

Tài liệu sáng chế 3: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2010-180219

Tài liệu sáng chế 4: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2014-193125

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết:

Một số vi khuẩn cần tiệt trùng là rất khó tiêu diệt. Ví dụ, vi khuẩn sinh bào tử là khó tiêu diệt. Để tiệt trùng vi khuẩn khó tiêu diệt, đôi khi cần sử dụng nhiệt độ tiệt trùng cao trong quá trình tiệt trùng vi khuẩn bằng nhiệt. Phương pháp tiệt trùng bằng nhiệt này có thể bao gồm phương pháp xử lý nhiệt ở nhiệt độ cực cao (UHT) (xử lý nhiệt ở 120 đến 150°C trong 1 đến 5 giây) và phương pháp tiệt trùng trong thời gian ngắn ở nhiệt độ cao (HTST) (xử lý nhiệt ở 72 đến 75°C trong 15 giây). Khi không thể áp dụng nhiệt độ tiệt trùng cao, phương pháp có thể áp dụng là sử dụng, ví dụ, nhiệt độ thấp và thời gian gia nhiệt kéo dài. Ví dụ về phương pháp tiệt trùng bằng nhiệt độ thấp này có thể là phương pháp tiệt trùng trong thời gian dài ở nhiệt độ thấp (LTLT) (xử lý nhiệt ở 62 đến 65°C trong 30 phút).

Điều kiện tiệt trùng được áp dụng có thể khác nhau phụ thuộc vào loại sản phẩm thực phẩm. Việc tiệt trùng ở nhiệt độ đặc biệt cao được yêu cầu khi sản xuất sản phẩm thực phẩm có khả năng bảo quản trong thời gian dài và

được phân phối ở nhiệt độ phòng. Ví dụ, để tiêu diệt bào tử *Clostridium botulinum* mà được biết đến là vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm, thì điều kiện tiệt trùng của nhiệt độ gia nhiệt là 120°C và thời gian gia nhiệt là 4 phút hoặc lâu hơn là cần thiết trong quá trình tiệt trùng sản phẩm thực phẩm chung cất mà có khả năng bảo quản trong thời gian dài. Phương pháp UHT là công nghệ chính trong quá trình tiệt trùng bằng nhiệt các sản phẩm thực phẩm dạng lỏng như đồ uống nhẹ, đồ uống sữa, hoặc nước khoáng.

Cũng rất hữu ích để sử dụng lactoferin làm nguyên liệu thực phẩm nếu lactoferin có thể được tiệt trùng ở nhiệt độ cao trong thời gian ngắn trong khi vẫn giữ được hoạt tính của lactoferin.

Như được mô tả nêu trên, có một số phương pháp được bộc lộ để tiệt trùng lactoferin. Tuy nhiên, để áp dụng nhiệt độ tiệt trùng 120°C hoặc cao hơn trong phương pháp được mô tả trong tài liệu sáng chế 1 được trích dẫn ở trên, về mặt lý thuyết thì cần thiết phải tạo cường độ ion ở $0,1\mu\text{M}$ hoặc nhỏ hơn bằng muối. Khi phương pháp được mô tả trong tài liệu sáng chế 2 được trích dẫn ở trên được sử dụng, không thể duy trì hoạt tính của lactoferin nếu nó được tiệt trùng ở nhiệt độ cao 120°C hoặc cao hơn. Mỗi trong số các chế phẩm trong tài liệu sáng chế 3 và 4 được trích dẫn ở trên đều bao gồm chất ổn định. Chất ổn định làm thay đổi hương vị và/hoặc các đặc tính vật lý và, ngoài ra, có thể làm phát sinh chi phí.

Do đó, phát sinh nhu cầu về phương pháp mới để tiệt trùng lactoferin ở nhiệt độ cao trong thời gian ngắn mà vẫn duy trì được hoạt tính của lactoferin. Cách thức giải quyết vấn đề:

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra phương pháp mới để tiệt trùng lactoferin ở nhiệt độ cao trong thời gian ngắn mà vẫn giữ được hoạt tính của lactoferin.

Do đó, sáng chế đề xuất các mục dưới đây.

[1] Phương pháp sản xuất dung dịch nước chứa lactoferin, bao gồm bước tiệt trùng để tiệt trùng dung dịch nước chứa lactoferin bằng nhiệt, trong đó tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin là nhỏ hơn hoặc bằng 1/12 hàm lượng theo khối lượng lactoferin, ở nhiệt độ 100°C hoặc cao hơn.

[2] Phương pháp theo mục [1], trong đó nồng độ muối của dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng là 5mM hoặc nhỏ hơn.

[3] Phương pháp theo mục [1] hoặc [2], trong đó nồng độ lactoferin của dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng là 400mg/ml hoặc nhỏ hơn.

[4] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó nhiệt độ tiệt trùng bằng nhiệt trong bước tiệt trùng là 120°C hoặc cao hơn.

[5] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], trong đó nhiệt độ và thời gian tiệt trùng bằng nhiệt trong bước tiệt trùng lần lượt là 120°C hoặc cao hơn và 4 phút hoặc lâu hơn.

[6] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5], trong đó dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng không chứa chất ổn định.

[7] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6], trong đó hoạt tính ức chế COMT của lactoferin trong dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng được duy trì ở mức 80% hoặc cao hơn sau bước tiệt trùng.

Sáng chế cũng đề xuất như sau.

[8] Dung dịch nước chứa lactoferin trong đó tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin là nhỏ hơn hoặc bằng 1/12 hàm lượng theo khối lượng lactoferin, và dung dịch này không chứa vi khuẩn sống.

[9] Dung dịch nước chứa lactoferin theo mục [8], có nồng độ muối là

5mM hoặc nhỏ hơn.

[10] Dung dịch nước chứa lactoferin theo mục [8] hoặc [9], có nồng độ lactoferin là 400mg/ml hoặc nhỏ hơn.

[11] Dung dịch nước chứa lactoferin theo mục bất kỳ trong số các mục từ [8] đến [10], không chứa chất ổn định.

Hiệu quả của sáng chế:

Theo sáng chế, có thể tiết trùng lactoferin ở nhiệt độ cao trong thời gian ngắn mà vẫn duy trì được hoạt tính của lactoferin.

Hiệu quả của sáng chế không bị giới hạn ở hiệu quả này, và có thể cũng bao gồm những hiệu quả như được mô tả trong bản mô tả này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 là biểu đồ thể hiện kết quả đo độ vẩn đục của dung dịch nước chứa lactoferin sau khi hấp tiệt trùng.

FIG.2 là biểu đồ thể hiện kết quả đo độ vẩn đục của dung dịch nước chứa lactoferin sau khi hấp tiệt trùng.

FIG.3 là biểu đồ thể hiện kết quả đo độ vẩn đục của dung dịch nước chứa lactoferin sau khi hấp tiệt trùng.

FIG.4 là biểu đồ thể hiện mối tương quan giữa hoạt tính ức chế COMT và độ đục của dung dịch nước chứa lactoferin.

FIG.5 là biểu đồ thể hiện kết quả phân tích HPLC của dung dịch nước chứa lactoferin.

FIG.6 là biểu đồ thể hiện kết quả đo hoạt tính ức chế COMT của dung dịch nước chứa lactoferin.

FIG.7 là biểu đồ thể hiện kết quả đo hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nước chứa lactoferin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án được ưu tiên theo sáng chế được mô tả. Sáng chế

không nhằm mục đích giới hạn các phương án được ưu tiên, và có thể tùy ý biến đổi trong phạm vi của sáng chế.

1. Phương pháp sản xuất dung dịch nước chứa lactoferin

(1) Bước tiệt trùng

Phương pháp sản xuất theo sáng chế bao gồm bước tiệt trùng để tiệt trùng dung dịch nước chứa lactoferin bằng nhiệt, trong đó tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin là nhỏ hơn hoặc bằng 1/12 hàm lượng theo khối lượng lactoferin, ở nhiệt độ 100°C hoặc cao hơn. Bước tiệt trùng có thể tiệt trùng lactoferin ở nhiệt độ cao trong thời gian ngắn mà vẫn duy trì được hoạt tính của lactoferin.

Lactoferin là glycoprotein liên kết sắt mà tồn tại trong chất lỏng trong cơ thể như sữa, nước mắt, nước bọt và máu. Lactoferin có trong sữa động vật có vú như cừu, dê, lợn, chuột, trâu, lạc đà, bò Tây Tạng, ngựa, lừa, lạc đà không bướu, bò hoặc người.

Lactoferin để sử dụng theo sáng chế có thể là một loại có nguồn gốc từ sữa của động vật có vú. Xét về tính khả dụng và hàm lượng lactoferin, ví dụ, sữa bò hoặc sữa của người được ưu tiên làm nguồn thu lactoferin, và sữa bò được đặc biệt ưu tiên làm nguồn thu lactoferin. Do đó, lactoferin có nguồn gốc từ, ví dụ sữa bò hoặc sữa của người, tốt hơn là từ sữa bò, có thể được sử dụng theo sáng chế. Bất kỳ trong số sữa non, sữa chuyển tiếp, sữa thông thường và sữa vắt giai đoạn cuối có thể được sử dụng. Lactoferin có sẵn trên thị trường có thể được sử dụng theo sáng chế.

Lactoferin để sử dụng theo sáng chế có thể là một loại mà được tách bằng phương pháp thông thường (ví dụ sắc ký ion) từ sữa ít béo hoặc nước sữa thu được bằng cách xử lý sữa của động vật có vú.

Lactoferin để sử dụng theo sáng chế có thể hoặc là được glycosyl hóa hoặc không được glycosyl hóa.

Lactoferrin thường được sử dụng trong lĩnh vực thực phẩm và đồ uống là lactoferrin có nguồn gốc từ sữa (cụ thể là có nguồn gốc từ sữa bò). Trong nhiều trường hợp, lactoferrin có nguồn gốc từ sữa thu được từ nước sữa. Lactoferrin có nguồn gốc từ sữa, thu được theo cách thức này, chứa protein không phải lactoferrin. Do đó, chế phẩm thường được sử dụng làm lactoferrin trong lĩnh vực thực phẩm và đồ uống là chế phẩm bao gồm lactoferrin và protein không phải lactoferrin.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng lactoferrin có thể được tiệt trùng ở nhiệt độ cao trong thời gian ngắn mà vẫn duy trì được hoạt tính của lactoferrin bằng cách làm giảm hàm lượng protein không phải lactoferrin trong dung dịch nước chứa lactoferrin được đưa vào tiệt trùng bằng nhiệt.

Dường như việc sử dụng nhiệt độ 100°C hoặc cao hơn là không được dự tính trong tài liệu sáng chế 1 và 2 được trích dẫn ở trên mà mô tả các phương pháp tiệt trùng lactoferrin được mô tả ở trên. Kỹ thuật được mô tả trong tài liệu sáng chế 3 và 4 được trích dẫn ở trên, mà dự tính việc sử dụng ở nhiệt độ 100°C hoặc cao hơn, đưa ra giả thiết về việc sử dụng chất ổn định để tăng cường khả năng chịu nhiệt của lactoferrin. Theo sáng chế, ngay cả khi không sử dụng chất ổn định, vẫn có thể sử dụng nhiệt độ cao ở 100°C hoặc cao hơn, đặc biệt là nhiệt độ cao ở 120°C hoặc cao hơn, trong quá trình tiệt trùng lactoferrin bằng cách giảm hàm lượng protein lẫn tạp chất không phải lactoferrin trong dung dịch nước chứa lactoferrin.

Tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferrin là nhỏ hơn hoặc bằng 1/12 hàm lượng theo khối lượng lactoferrin trong dung dịch nước chứa lactoferrin được đưa vào bước tiệt trùng. Theo đó, bằng cách điều chỉnh tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferrin, lactoferrin không tạo ra chất kết tủa và có thể duy trì hoạt tính mặc dù nó được gia nhiệt ở nhiệt độ 100°C hoặc cao hơn.

Theo sáng chế, protein có thể bao gồm protein có nguồn gốc từ sữa như casein và nước sữa, vi sinh vật mà gây ô nhiễm lactoferin trong quá trình tinh chế lactoferin, các tạp chất protein bay trong không khí, protein từ máu bò, v.v.. Khi lactoferin là một loại được sản xuất dưới dạng protein tái tổ hợp bởi *Escherichia coli*, các protein không phải lactoferin có thể bao gồm (các) protein từ thành phần môi trường nuôi cấy.

Trong dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng, tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin là 1/12 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 1/14 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 1/16 hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 1/18 hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt tốt hơn là 1/20 hoặc nhỏ hơn hàm lượng theo khối lượng lactoferin. Do đó, bằng cách giảm thêm nữa tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin, việc tạo thành chất kết tủa ít có khả năng xảy ra và hoạt tính của lactoferin được duy trì tốt hơn khi dung dịch nước này được gia nhiệt ở nhiệt độ 100°C hoặc cao hơn, đặc biệt là ở nhiệt độ 120°C hoặc cao hơn.

Tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin và hàm lượng theo khối lượng lactoferin có thể được đo bằng cách thực hiện phương pháp tách HPLC. Cụ thể là, dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào để tách HPLC pha ngược sử dụng Alliance e2695 (sản xuất bởi Waters Corporation). Tiếp theo, phần có đỉnh hấp thụ ở 280nm được tách thành phần chứa lactoferin và phần chứa protein không phải lactoferin. Việc chứa lactoferin trong phần này có thể được kiểm tra, ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể kháng lactoferin có sẵn trên thị trường. Mỗi phần chứa lactoferin và phần chứa protein không phải lactoferin được thu gom lại. Dung môi được loại bỏ khỏi mỗi phần bằng cách làm khô lạnh, và sản phẩm đã được làm khô lạnh của mỗi phần được hòa tan trong nước mới được thêm vào. Lượng protein chứa trong mỗi trong số phần chứa lactoferin và phần chứa protein không phải

lactoferin được đo bằng thử nghiệm protein sử dụng phương pháp nhuộm. Hàm lượng lactoferin và hàm lượng protein không phải lactoferin có thể được đo theo cách này.

Trong dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng, giới hạn dưới của tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin có thể là, ví dụ, 0% khối lượng hoặc, có thể lớn hơn 0% khối lượng xét từ khía cạnh về hiệu quả sản xuất của nguyên liệu lactoferin cần sử dụng để điều chế dung dịch nước. Theo đó, trong dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng, tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin có thể là, ví dụ, 1/100000 hoặc cao hơn, 1/10000 hoặc cao hơn, 1/5000 hoặc cao hơn, 1/1000 hoặc cao hơn, hoặc 1/100 hoặc cao hơn.

Nhiệt độ tiệt trùng bằng nhiệt trong bước tiệt trùng là 100°C hoặc cao hơn. Do có thể sử dụng nhiệt độ cao này trong sáng chế, nên việc tiệt trùng trong thời gian ngắn là có thể. Nhiệt độ tiệt trùng bằng nhiệt trong bước tiệt trùng tốt hơn là 105°C hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 110°C hoặc cao hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 112°C hoặc cao hơn, 114°C hoặc cao hơn, 116°C hoặc cao hơn hoặc 118°C hoặc cao hơn, và đặc biệt tốt hơn là 120°C hoặc cao hơn. Bằng cách sử dụng nhiệt độ cao này theo sáng chế, có thể tiệt trùng vi khuẩn khó tiêu diệt trong thời gian ngắn. Ví dụ, theo sáng chế, điều kiện gia nhiệt cần thiết cho quá trình tiệt trùng thực phẩm chung cất (120°C, 4 phút hoặc cao hơn) hoặc phương pháp UHT có thể được áp dụng cho lactoferin.

Nhiệt độ tiệt trùng bằng nhiệt trong bước tiệt trùng tốt hơn là 180°C hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 160°C hoặc thấp hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 155°C hoặc thấp hơn hoặc 150°C hoặc thấp hơn, và đặc biệt tốt hơn là 140°C hoặc thấp hơn. Nhiệt độ quá cao có thể làm bay hơi nước, dẫn đến làm giảm lượng dung dịch nước chứa lactoferin.

Theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, nồng độ muối của

dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng là 5mM hoặc nhỏ hơn. Dựa vào nồng độ muối này, việc tạo thành chất kết tủa ít có khả năng xảy ra và hoạt tính của lactoferin được duy trì tốt hơn. Nồng độ muối của dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng có thể tốt hơn là 4mM hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 3mM hoặc nhỏ hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là 2mM hoặc nhỏ hơn.

Nồng độ muối của dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng có thể là, ví dụ, lớn hơn 0 μ M, lớn hơn hoặc bằng 0,1 μ M hoặc lớn hơn 0,1 μ M, 0,5 μ M hoặc lớn hơn, 1 μ M hoặc lớn hơn, 1,5 μ M hoặc lớn hơn, hoặc 10 μ M hoặc lớn hơn xét từ quan điểm về hiệu quả sản xuất của dung dịch nước.

Nồng độ muối của dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng có thể được đo bằng ICP-MS (máy quang phổ khối plasma kết hợp cảm ứng).

Nồng độ lactoferin của dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng có thể tốt hơn là 400mg/ml hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 200mg/ml hoặc nhỏ hơn hoặc 100mg/ml hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 30mg/ml hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 10mg/ml hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt tốt hơn là 1mg/ml hoặc nhỏ hơn. Nếu nồng độ lactoferin quá cao, lactoferin có thể không hòa tan hoàn toàn trong dung dịch nước.

Nồng độ lactoferin của dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng có thể ở mức thấp bất kỳ miễn là nó lớn hơn 0mg/ml. Nồng độ lactoferin của dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng có thể là, ví dụ, 0,00001mg/ml hoặc lớn hơn, 0,0001mg/ml hoặc lớn hơn, 0,001mg/ml hoặc lớn hơn, hoặc 0,01mg/ml hoặc lớn hơn.

Thời gian tiệt trùng bằng nhiệt trong bước tiệt trùng có thể được thiết lập bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực tùy thuộc vào các yếu tố

như nhiệt độ tiệt trùng và phương pháp tiệt trùng. Thời gian tiệt trùng bằng nhiệt trong bước tiệt trùng có thể là, ví dụ, 0,5 giây đến 15 phút, tốt hơn là 1 giây đến 10 phút, và tốt hơn nữa là 1 giây đến 8 phút.

Trong trường hợp sử dụng phương pháp tiệt trùng UHT, thời gian tiệt trùng bằng nhiệt trong bước tiệt trùng tốt hơn là 0,5 giây đến 10 giây, tốt hơn nữa là 0,8 giây đến 8 giây, và thậm chí tốt hơn nữa là 1 giây đến 5 giây.

Trong trường hợp sử dụng phương pháp tiệt trùng kiểu chung cất, thời gian tiệt trùng bằng nhiệt trong bước tiệt trùng tốt hơn là 2 phút đến 10 phút, tốt hơn nữa là 3 phút đến 8 phút, và đặc biệt là 4 phút đến 7 phút.

Theo sáng chế, thời gian tiệt trùng bằng nhiệt trong bước tiệt trùng dùng để chỉ khoảng thời gian trong suốt khoảng thời gian đó nhiệt độ của phần ở giữa của dung dịch nước chứa lactoferin được duy trì ở nhiệt độ cần đạt được (nhiệt độ tiệt trùng) trong suốt bước tiệt trùng.

Theo một phương án ưu tiên đặc biệt của sáng chế, nhiệt độ và thời gian tiệt trùng bằng nhiệt trong bước tiệt trùng lần lượt là 120°C hoặc cao hơn và 4 phút hoặc lâu hơn. Nhiệt độ và thời gian tiệt trùng này thỏa mãn điều kiện tiệt trùng cần thiết cho quá trình tiệt trùng kiểu chung cất.

Dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng tốt hơn là không chứa chất ổn định. Chất ổn định dùng để chỉ thành phần được thêm vào, tách biệt với nguyên liệu lactoferin được sử dụng để điều chế dung dịch nước chứa lactoferin, để tăng cường khả năng chịu nhiệt của lactoferin. Sáng chế cho phép duy trì hoạt tính của lactoferin mà không sử dụng chất ổn định này, và ngăn việc tạo thành chất kết tủa khi gia nhiệt. Hơn nữa, sự vắng mặt của chất ổn định này có thể ngăn sự thay đổi về hương vị và/hoặc các đặc tính vật lý của dung dịch nước chứa lactoferin được tạo ra.

Chất ổn định có thể được minh họa bằng các chất ổn định được mô tả trong tài liệu sáng chế 3 và 4 được trích dẫn ở trên. Theo đó, dung dịch nước

chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng không chứa một hoặc nhiều chất ổn định được chọn từ nhóm bao gồm este của glycerin và axit béo, natri casein, lexitin, polysacarit đậu nành, gôm xanthan, pectin, gôm arabic, gôm ghatti, caragenan, gôm bồ mễ hữu cơ, và carboxymetyl xenluloza. Đặc biệt là, dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng không chứa bất kỳ trong số este của glycerin và axit béo, natri casein, lexitin, polysacarit đậu nành, gôm xanthan, pectin, gôm arabic, gôm ghatti, caragenan, gôm bồ mễ hữu cơ, và carboxymetyl xenluloza làm chất ổn định.

Nguyên liệu lactoferin để sử dụng để điều chế dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng đôi khi có chứa natri casein dù chỉ lượng nhỏ. Nguyên liệu lactoferin để sử dụng để điều chế dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng đôi khi có chứa natri casein với lượng, ví dụ, 5% khối lượng hoặc nhỏ hơn, đặc biệt là 2% khối lượng hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt hơn là 0,5% khối lượng hoặc nhỏ hơn so với khối lượng của nguyên liệu lactoferin. Natri casein, ban đầu được chứa trong nguyên liệu lactoferin, không tương ứng với chất ổn định được mô tả ở trên.

Nồng độ natri casein của dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng có thể là, ví dụ, 20mg/ml hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 10mg/ml hoặc nhỏ hơn hoặc 5mg/ml hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 1,5mg/ml hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 0,5mg/ml hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt tốt hơn là 0,05mg/ml hoặc nhỏ hơn. Đặc biệt tốt hơn là, dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng không chứa natri casein.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, hoạt tính mà lactoferin có trước khi tham gia vào bước tiệt trùng vẫn được duy trì sau bước tiệt trùng.

Hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc hoạt tính ức chế catechol-O-metyltransferaza (sau đây còn được gọi là COMT) của lactoferin, ví dụ, có thể được sử dụng làm chỉ số duy trì hoạt tính của lactoferin.

Theo sáng chế, việc duy trì hoạt tính có thể hiểu là hoạt tính đặc biệt mà lactoferin có trước khi tham gia vào bước tiệt trùng được duy trì, ví dụ, ở mức 50% hoặc cao hơn, tốt hơn là ở mức 60% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là ở mức 70% hoặc cao hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là ở mức 80% hoặc cao hơn sau bước tiệt trùng. Theo sáng chế, việc duy trì hoạt tính có thể hiểu là hoạt tính mà lactoferin có trước khi tham gia vào bước tiệt trùng được duy trì, ví dụ, ở mức 90% hoặc cao hơn sau bước tiệt trùng.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, hoạt tính mà lactoferin có trước khi tham gia vào bước tiệt trùng có thể được tăng cường sau bước tiệt trùng. Ví dụ, hoạt tính ức chế COMT và hoạt tính kháng khuẩn của lactoferin, đặc biệt là hoạt tính kháng khuẩn của lactoferin có thể được tăng cường bằng bước tiệt trùng trong phương pháp sản xuất theo sáng chế.

Do đó, trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, hoạt tính mà lactoferin có trước khi tham gia vào bước tiệt trùng có thể hoặc là được duy trì hoặc là được tăng cường sau bước tiệt trùng.

Theo sáng chế, hoạt tính ức chế COMT của lactoferin trong dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng tốt hơn là được duy trì, ví dụ, ở mức 50% hoặc cao hơn, tốt hơn là ở mức 60% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là ở mức 70% hoặc cao hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là ở mức 80% hoặc cao hơn sau bước tiệt trùng. Do đó, bước tiệt trùng theo sáng chế có thể được thực hiện theo cách sao cho hoạt tính ức chế COMT của lactoferin trước bước tiệt trùng tốt hơn là được duy trì, ví dụ, ở mức 50% hoặc cao hơn, tốt hơn là ở mức 60% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là ở mức 70% hoặc cao hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là ở mức 80% hoặc cao hơn sau bước tiệt trùng.

COMT được biểu hiện trong nhiều cơ quan, và có hoạt tính cao trong gan và thận. COMT cũng biểu hiện trong ruột, đặc biệt là trong niêm mạc ruột. Vai trò sinh lý của COMT trong việc chuyển hóa chất dẫn truyền thần kinh đã

gây được sự chú ý trong lĩnh vực được.

Theo sáng chế, hoạt tính ức chế COMT có thể được đo bằng phương pháp được mô tả trong Ikeda et al., Inhibitory Effect of Bovine lactoferin on Catechol-O-Methyltransferase, *Molecules*, 2017, 22, 1373. Chi tiết về phương pháp đo hoạt tính ức chế COMT được mô tả trong các ví dụ thử nghiệm dưới đây.

Theo sáng chế, hoạt tính kháng khuẩn của lactoferin trong dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng tốt hơn là được duy trì hoặc tăng cường sau bước tiệt trùng. Việc duy trì hoạt tính kháng khuẩn có thể hiểu là dung dịch nước chứa lactoferin ức chế sự phát triển của vi khuẩn, như *Escherichia coli*, trước và sau bước tiệt trùng. Việc tăng cường hoạt tính kháng khuẩn có thể hiểu là dung dịch nước chứa lactoferin sau bước tiệt trùng ức chế sự phát triển của vi khuẩn, như *Escherichia coli*, nhiều hơn dung dịch nước chứa lactoferin trước bước tiệt trùng.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, trong dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng, tổng hàm lượng protein tốt hơn là có thể là 420mg/ml hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 31,5mg/ml hoặc nhỏ hơn hoặc 10,5mg/ml hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn là 1,05mg/ml hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt tốt hơn là 0,2mg/ml hoặc nhỏ hơn so với khối lượng dung dịch nước. Việc sử dụng hàm lượng protein mà nằm trong khoảng này có thể ngăn việc tạo thành chất kết tủa protein một cách tốt hơn.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, trong dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng, hàm lượng nước có thể là, ví dụ, 95% khối lượng hoặc cao hơn, tốt hơn là 96% khối lượng hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 97% khối lượng hoặc cao hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 98% khối lượng hoặc cao hơn, vẫn tốt hơn nữa là 99% khối lượng hoặc cao hơn, và đặc biệt tốt hơn là 99,5% khối lượng hoặc cao hơn so với khối lượng của dung

dịch nước. Do đó, trong dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng, hàm lượng các thành phần không phải là nước có thể là, ví dụ, 5% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 4% khối lượng hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là 3% khối lượng hoặc nhỏ hơn so với khối lượng của dung dịch nước. Nhờ hàm lượng nước nước như vậy, việc tạo thành chất kết tủa lactoferin ít có khả năng xảy ra.

Theo sáng chế, nước tốt hơn là nước tinh khiết như nước đã khử ion hoặc nước Milli-Q. Việc sử dụng nước tinh khiết có thể dễ dàng điều chỉnh nồng độ muối.

Theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, trong dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng, nồng độ hàm lượng chất rắn có thể là, ví dụ, 45% trọng lượng/thể tích hoặc nhỏ hơn, đặc biệt là 3% trọng lượng/thể tích hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt hơn là 0,1% trọng lượng/thể tích hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, độ nhớt của dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng có thể là, ví dụ, 800mPa·s hoặc nhỏ hơn, đặc biệt là 300mPa·s hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt hơn là 7mPa·s hoặc nhỏ hơn ở 25°C.

Phương pháp tiệt trùng bằng nhiệt dung dịch nước chứa lactoferin trong bước tiệt trùng có thể được lựa chọn một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, phương pháp UHT hoặc phương pháp tiệt trùng kiểu chưng cất có thể được sử dụng làm phương pháp tiệt trùng bằng nhiệt. Thiết bị để tiệt trùng bằng nhiệt có thể được lựa chọn một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực phụ thuộc vào phương pháp tiệt trùng bằng nhiệt được áp dụng. Ví dụ, trong trường hợp sử dụng phương pháp UHT, việc tiệt trùng bằng nhiệt có thể được thực hiện bằng cách sử dụng máy tiệt trùng dạng tấm. Trong trường hợp tiệt trùng kiểu chưng

cất, việc tiệt trùng bằng nhiệt có thể được thực hiện bằng cách đổ dung dịch nước chứa lactoferin vào nồi chung cất, và sau đó thực hiện quá trình tiệt trùng kiểu chung cất bằng cách sử dụng máy tiệt trùng kiểu chung cất.

Phương pháp tiệt trùng bằng nhiệt có thể sử dụng không bị giới hạn ở các phương pháp này. Bước tiệt trùng theo sáng chế có thể được thực hiện, ví dụ, theo tài liệu Production (Sterilization) Standard for Soft Drinks, the Food Sanitation Act, Ministry of Health, Labor and Welfare, Notice No. 213 (1986).

(2) Bước điều chế

Phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể bao gồm bước điều chế để điều chế dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng. Bước điều chế bao gồm bước trộn, ví dụ, nguyên liệu lactoferin, môi trường nước (ví dụ, nước hoặc dung dịch nước), và (các) thành phần tùy ý khác. Lactoferin chứa trong nguyên liệu lactoferin được hòa tan trong nước hoặc môi trường nước.

Trong bước điều chế, dung dịch nước chứa lactoferin có thể được điều chế theo cách sao cho tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin là 1/12 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 1/14 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 1/16 hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 1/18 hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt tốt hơn là 1/20 hoặc nhỏ hơn hàm lượng theo khối lượng lactoferin. Để điều chế dung dịch nước chứa lactoferin, nguyên liệu lactoferin có độ tinh khiết lactoferin cao có thể được hòa tan trong nước hoặc dung dịch nước. Nguyên liệu lactoferin có độ tinh khiết lactoferin là, ví dụ, 90% khối lượng hoặc cao hơn, tốt hơn là 92% khối lượng hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 94% khối lượng hoặc cao hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 95% khối lượng hoặc cao hơn, và đặc biệt tốt hơn là 96% khối lượng hoặc cao hơn, có thể được sử dụng làm nguyên liệu lactoferin.

Trong bước điều chế, dung dịch nước chứa lactoferin có thể được điều

chế theo cách sao cho nồng độ muối của dung dịch nước chứa lactoferin tốt hơn là 5mM hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 4mM hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 3mM hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt tốt hơn là 2mM hoặc nhỏ hơn. Nồng độ muối này có thể đạt được bằng cách sử dụng nguyên liệu lactoferin có hàm lượng muối thấp.

Nguyên liệu lactoferin có độ tinh khiết lactoferin cao và hàm lượng muối thấp có thể được sản xuất, ví dụ, bằng cách cho nước sữa hoặc sữa tách béo có chứa lactoferin vào quá trình xử lý hấp thụ nhựa trao đổi cation và quá trình xử lý siêu lọc. Ví dụ, lactoferin được hấp thụ vào nhựa trao đổi cation bằng cách cho nước sữa hoặc sữa tách béo tiếp xúc với nhựa trao đổi cation. Lactoferin mà được hấp thụ vào nhựa trao đổi cation được tách từ nhựa trao đổi cation bằng nước muối. Tiếp đó, lactoferin được khử muối bằng cách sử dụng màng siêu lọc để thu được nguyên liệu lactoferin có độ tinh khiết lactoferin cao và hàm lượng muối thấp.

Chất trao đổi ion dùng trong quá trình xử lý hấp thụ nhựa trao đổi cation tốt hơn là có nhóm carboxymetyl (CM) làm nhóm chức trao đổi ion. Chất trao đổi ion có nhóm CM làm nhóm chức được minh họa bằng, nhưng không chỉ giới hạn ở, CM-Sepharose FF (GE Healthcare Japan Corporation).

Nồng độ của nước muối mà được sử dụng để tách lactoferin, mà được hấp thụ vào nhựa trao đổi cation, từ nhựa này có thể là, ví dụ, 5 đến 15% khối lượng, tốt hơn là 6 đến 14% khối lượng, và tốt hơn nữa là 8 đến 12% khối lượng.

Trọng lượng phân tử cắt của màng siêu lọc có thể là, ví dụ, 5000 đến 50000, tốt hơn là 10000 đến 30000, và tốt hơn nữa là 15000 đến 25000. Màng siêu lọc được minh họa bằng, nhưng không chỉ giới hạn ở, GR 61PP (sản xuất bởi Alfa Laval, trọng lượng phân tử cắt 20000).

Tốt hơn là, trong quá trình điều chế dung dịch nước chứa lactoferin

được đưa vào bước tiệt trùng, nguyên liệu chứa protein không phải nguyên liệu lactoferin không được sử dụng. Theo sáng chế, nguyên liệu chứa protein bao gồm protein và peptit, đặc biệt có nghĩa là chỉ chứa protein và peptit. Bằng cách không sử dụng nguyên liệu chứa protein trong quá trình điều chế dung dịch nước chứa lactoferin, hàm lượng protein lẫn tạp chất trong dung dịch nước chứa lactoferin có thể dễ dàng được điều chỉnh. Hơn nữa, có thể ngăn việc tạo thành chất kết tủa trong bước tiệt trùng tốt hơn và hoạt tính của lactoferin có thể được duy trì và/hoặc tăng cường hơn.

Ví dụ về thành phần tùy ý khác có thể bao gồm chất tạo hương vị, chất tạo màu, chất tạo ngọt, chất tạo vị chua, và nước hoa quả. Bằng cách điều chế dung dịch nước chứa lactoferin chứa thành phần tùy ý khác trong bước điều chế, dung dịch nước chứa lactoferin sau bước tiệt trùng có thể được sử dụng như một loại đồ uống (ví dụ, đồ uống nhẹ). Thành phần tùy ý khác tốt hơn là không phải nguyên liệu protein.

Ví dụ về chất tạo hương vị có thể là hương hoa quả (ví dụ, hương vị dâu tây, hương vị chuối, hoặc hương vị đào), hương vị cà phê, và hương vị trà.

Ví dụ về chất tạo màu có thể là chất tạo màu tự nhiên và chất tạo màu tổng hợp.

Ví dụ về chất tạo ngọt có thể là chất tạo ngọt tự nhiên như glucoza, fructoza hoặc sucroza, và chất tạo ngọt cường độ cao như aspartam, axesulfam kali hoặc sucraloza.

Ví dụ về chất tạo vị chua có thể là axit xitric, natri xitrat, axit malic, và axit tartaric.

Ví dụ về nước hoa quả có thể là nước dâu, nước chuối, và nước đào.

(3) Bước làm đầy

Phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể bao gồm bước làm đầy trước khi tiệt trùng bằng cách đổ dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào

bước tiệt trùng vào bình chứa, hoặc bước làm đầy sau khi tiệt trùng bằng cách đổ dung dịch nước chứa lactoferin sau bước tiệt trùng vào bình chứa. Phương pháp làm đầy để sử dụng trong bước làm đầy này có thể được lựa chọn một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Ví dụ, trong bước làm đầy trước khi tiệt trùng, dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng được đổ vào túi chung cất, và quá trình tiệt trùng kiểu chung cất được thực hiện trong bước tiệt trùng. Theo cách này, có thể sản xuất dung dịch nước lactoferin, được rót vào trong túi chung cất và có khả năng bảo quản trong thời gian dài.

Một cách thay thế, ví dụ, trong bước làm đầy sau khi tiệt trùng, dung dịch nước chứa lactoferin sau bước tiệt trùng có thể được đổ một cách vô trùng vào bình chứa. Theo cách này, có thể sản xuất dung dịch nước lactoferin, được rót vào bình chứa và có khả năng bảo quản trong thời gian dài.

Như được mô tả ở trên, phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể tạo ra dung dịch nước chứa lactoferin đã được tiệt trùng được đổ vào bình chứa. Dung dịch nước chứa lactoferin được sản xuất theo cách đó có thể được cung cấp đến khách hàng hoặc nhà sản xuất thực phẩm/đồ uống dưới dạng đồ uống hoặc nguyên liệu cho thực phẩm và đồ uống trong đó hoạt tính của lactoferin được duy trì và có hàm lượng lactoferin gia tăng.

Dung dịch nước chứa lactoferin được sản xuất theo cách đó, mà đã được tiệt trùng bằng nhiệt, có khả năng bảo quản trong thời gian dài. Ví dụ, sản phẩm dung dịch nước chứa lactoferin có thể được bảo quản, ví dụ trong 3 tháng hoặc lâu hơn, tốt hơn là trong 4 tháng hoặc lâu hơn, và tốt hơn nữa là trong 5 tháng hoặc lâu hơn. Giới hạn trên của giai đoạn bảo quản có thể là, ví dụ, 24 tháng hoặc ít hơn, tốt hơn là 12 tháng hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là 10 tháng hoặc ít hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là 9 tháng hoặc ít hơn.

2. Dung dịch nước chứa lactoferin

Sáng chế cũng đề cập đến dung dịch nước chứa lactoferin trong đó tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin là 1/12 hoặc nhỏ hơn hàm lượng theo khối lượng lactoferin, và dung dịch này không chứa vi khuẩn sống. Dung dịch nước chứa lactoferin không chứa vi khuẩn sống có thể được phân phối dưới dạng đồ uống hoặc có thể được sử dụng làm nguyên liệu cho thực phẩm và đồ uống mà không yêu cầu việc tiệt trùng bằng nhiệt.

Theo sáng chế, sự có mặt hoặc vắng mặt của vi khuẩn sống trong dung dịch nước chứa lactoferin có thể được xác định bằng sự có mặt hoặc vắng mặt của *Clostridium botulinum* sống. Sự có mặt hoặc vắng mặt của *Clostridium botulinum* sống có thể được xác định bằng phương pháp theo quy trình được mô tả trong “Guidelines on food hygiene inspection of microorganisms”, 2004, Japan Food Hygiene Association.

Tốt hơn là, trong dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế, tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin là 1/12 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 1/14 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 1/16 hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 1/18 hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt tốt hơn là 1/20 hoặc nhỏ hơn hàm lượng theo khối lượng lactoferin. Điều này làm giảm việc tạo thành chất kết tủa trong dung dịch nước.

Trong dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế, giới hạn dưới của tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin có thể là, ví dụ, 0% khối lượng hoặc, xét về hiệu quả sản xuất, có thể lớn hơn 0% khối lượng. Theo đó, trong dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế, tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin có thể là, ví dụ, 1/100000 hoặc cao hơn, 1/10000 hoặc cao hơn, 1/5000 hoặc cao hơn, 1/1000 hoặc cao hơn, hoặc 1/100 hoặc cao hơn.

Nồng độ muối của dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế tốt hơn là 5mM hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 4mM hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt

hơn nữa là 3mM hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt tốt hơn là 2mM hoặc nhỏ hơn. Điều này làm giảm việc tạo thành chất kết tủa trong dung dịch nước.

Nồng độ muối của dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế có thể là, ví dụ, lớn hơn 0 μ M, lớn hơn hoặc bằng 0,1 μ M hoặc lớn hơn 0,1 μ M, 0,5 μ M hoặc lớn hơn, 1 μ M hoặc lớn hơn, 1,5 μ M hoặc lớn hơn, hoặc 10 μ M hoặc lớn hơn xét từ quan điểm về hiệu quả sản xuất của dung dịch nước.

Nồng độ lactoferin của dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế có thể tốt hơn là 400mg/ml hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 200mg/ml hoặc nhỏ hơn hoặc 100mg/ml hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 30mg/ml hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 10mg/ml hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt tốt hơn là 1mg/ml hoặc nhỏ hơn.

Nồng độ lactoferin của dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế có thể ở mức thấp bất kỳ miễn là nó lớn hơn 0mg/ml. Nồng độ lactoferin của dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiết trùng có thể là, ví dụ, 0,00001mg/ml hoặc lớn hơn, 0,0001mg/ml hoặc lớn hơn, 0,001mg/ml hoặc lớn hơn, hoặc 0,01mg/ml hoặc lớn hơn.

Dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế tốt hơn là không chứa chất ổn định. Dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế không chứa một hoặc nhiều chất ổn định được chọn từ nhóm bao gồm este của glyxerin và axit béo, natri casein, lexithin, polysacarit đậu nành, gồm xanthan, pectin, gồm arabic, gồm ghatti gum, caragenan, gồm bồ mễ hữu cơ, và carboxymetyl xenluloza. Đặc biệt là, dung dịch nước chứa lactoferin không chứa bất kỳ trong số este của glyxerin và axit béo, natri casein, lexithin, polysacarit đậu nành, gồm xanthan, pectin, gồm arabic, gồm ghatti, caragenan, gồm bồ mễ hữu cơ, và carboxymetyl xenluloza làm chất ổn định.

Dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế tốt hơn là chứa lactoferin hoạt tính. Lactoferin hoạt tính có thể là lactoferin, ví dụ, có hoạt tính

ức chế COMT và/hoặc hoạt tính kháng khuẩn. Dung dịch nước chứa lactoferin chứa lactoferin hoạt tính này có thể tốt hơn là thu được theo phương pháp được mô tả ở trên trong đề mục “1. Phương pháp sản xuất dung dịch nước chứa lactoferin”.

Dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế có thể chứa (các) thành phần tùy ý khác như chất tạo hương vị, chất tạo màu, chất tạo ngọt, chất tạo vị chua, và nước hoa quả. Thành phần khác tùy ý là như được giải thích trong “1. Phương pháp sản xuất dung dịch nước chứa lactoferin”.

Tổng hàm lượng protein trong dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế có thể tốt hơn là 420mg/ml hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 210mg/ml hoặc nhỏ hơn hoặc 105mg/ml hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 31,5mg/ml hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 10,5mg/ml hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt tốt hơn là 1,05mg/ml hoặc nhỏ hơn so với khối lượng dung dịch nước. Do điều này, mà việc tạo thành chất kết tủa ít có khả năng xảy ra.

Hàm lượng nước trong dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế có thể là, ví dụ, 95% khối lượng hoặc cao hơn, tốt hơn là 96% khối lượng hoặc cao hơn, và tốt hơn nữa là 97% khối lượng hoặc cao hơn so với khối lượng của dung dịch nước. Do đó, trong dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế, hàm lượng các thành phần không phải là nước có thể là, ví dụ, 5% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 4% khối lượng hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là 3% khối lượng hoặc nhỏ hơn so với khối lượng của dung dịch nước.

Theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, trong dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng, nồng độ hàm lượng chất rắn có thể là, ví dụ, 45% trọng lượng/thể tích hoặc nhỏ hơn, đặc biệt là 3% trọng lượng/thể tích hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt hơn là 0,1% trọng lượng/thể tích hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, độ nhớt của dung

dịch nước chứa lactoferin được đưa vào bước tiệt trùng có thể là, ví dụ, 800mPa·s hoặc nhỏ hơn, đặc biệt là 300mPa·s hoặc nhỏ hơn, và đặc biệt hơn là 7mPa·s hoặc nhỏ hơn ở 25°C.

Dung dịch nước chứa lactoferin theo sáng chế có thể được sản xuất theo phương pháp sản xuất được mô tả ở trên trong đề mục “1. Phương pháp sản xuất dung dịch nước chứa lactoferin”. Phương pháp sản xuất này có thể duy trì hoạt tính của lactoferin. Do đó, sáng chế có thể tạo ra dung dịch nước chứa lactoferin trong đó hoạt tính của lactoferin được duy trì và không chứa vi khuẩn sống.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết với việc viện dẫn tới các ví dụ sau, nhưng sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

[Ví dụ thử nghiệm 1]

Lactoferin (được sản xuất bởi Morinaga Milk Industry Co., Ltd., độ tinh khiết của lactoferin 96% khối lượng hoặc cao hơn) được bổ sung vào nước đã được khử ion sao cho nồng độ cuối cùng là 30mg/ml, nhờ đó điều chế được dung dịch nước chứa lactoferin. Lactoferin là nguyên liệu lactoferin được sản xuất theo quy trình được mô tả trong ví dụ 3 dưới đây. Alpha-casein, anbumin huyết thanh bò (BSA), alpha-lactalbumin (α LA) và natri casein (casein Na) được tạo ra làm protein bổ sung để thêm vào dung dịch nước chứa lactoferin. Một trong số các protein bổ sung được trộn vào dung dịch nước chứa lactoferin sao cho nồng độ cuối cùng của protein bổ sung là 0,3mg/ml, 0,6mg/ml, 1,2mg/ml, hoặc 2,4mg/ml. Theo cách đó, thu được bốn mẫu cho mỗi protein bổ sung. Từ độ tinh khiết của lactoferin và nồng độ protein bổ sung, tỉ lệ tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin so với hàm lượng theo khối lượng lactoferin (tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải là lactoferin/hàm lượng theo khối lượng lactoferin) trong các mẫu

này có thể được tính là 1/19 hoặc nhỏ hơn, 1/16 hoặc nhỏ hơn, 1/12 hoặc nhỏ hơn, và 1/8 hoặc nhỏ hơn cho nồng độ của từng protein bổ sung. Dung dịch nước chứa lactoferin, mà không được thêm protein bổ sung, cũng được tạo ra làm mẫu. Trong dung dịch nước chứa lactoferin không chứa protein bổ sung, tỉ lệ tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin với hàm lượng theo khối lượng lactoferin là 1/24 hoặc nhỏ hơn.

17 mẫu thu được từ đó (bốn mẫu có nồng độ protein bổ sung khác nhau cho mỗi trong số bốn protein bổ sung và một mẫu không chứa protein bổ sung) được đưa vào hấp tiệt trùng ở 121°C trong 10 phút. Độ đục của mỗi mẫu sau khi hấp tiệt trùng được đo bằng máy đo quang phổ Hitachi U-3900 (được sản xuất bởi Hitachi, Ltd.). Chiều dài bước sóng đo được là 660 nm. Kết quả đo độ đục được thể hiện trong bảng 1 dưới đây và trong Fig.1.

Bảng 1: Kết quả đo độ hấp thụ

Nồng độ protein bổ sung (mg/ml)	Alpha-casein	BSA	α LA	Casein Na
0	0,032	0,032	0,032	0,032
0,3	0,049	0,044	0,045	0,057
0,6	0,067	0,056	0,046	0,07
1,2	0,099	0,094	0,054	0,11
2,4	0,169	0,175	0,103	0,183

Như được thể hiện trong bảng 1 và Fig.1, việc thêm bất kỳ protein bổ sung nào vào dung dịch nước chứa lactoferin làm tăng độ đục của dung dịch nước khi xử lý bằng nhiệt. Nồng độ protein bổ sung càng cao, thì độ đục tăng càng nhiều. Do đó, hàm lượng theo khối lượng protein không phải protein lactoferin càng thấp, thì việc tăng độ đục khi dung dịch nước chứa lactoferin được xử lý bằng nhiệt càng ít. Do đó, có thể hiểu là hàm lượng theo khối lượng protein không phải protein lactoferin càng thấp, thì việc tạo thành kết tủa protein càng khó xảy ra khi gia nhiệt ở 120°C. Cũng có thể hiểu rằng việc

tạo thành chất kết tủa protein càng ít, thì hoạt tính của lactoferin được duy trì càng tốt.

Như được thể hiện trong bảng 1 và Fig.1, độ đục sau khi xử lý bằng nhiệt là khoảng 0,1 hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 0,1 khi nồng độ protein bổ sung là 1,2mg/ml hoặc nhỏ hơn, tức là khi tỉ lệ tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin với hàm lượng theo khối lượng lactoferin là 1/12 hoặc nhỏ hơn. Sự thay đổi về chất lượng của dung dịch nước chứa lactoferin trước và sau khi xử lý bằng nhiệt tốt hơn là nhỏ nhất có thể; cụ thể là, được ưu tiên là độ đục của dung dịch nước chứa lactoferin sau khi xử lý bằng nhiệt là khoảng 0,1 hoặc nhỏ hơn. Ví dụ, khi độ đục của dung dịch nước chứa lactoferin thấp ngay cả sau khi xử lý bằng nhiệt, việc trộn vi sinh vật vào sản phẩm dung dịch nước hoặc sự thay đổi trong sản phẩm này (việc tạo thành chất kết tủa hoặc tăng độ đục) có thể dễ dàng được kiểm tra một cách rõ ràng trong kiểm soát chất lượng sản phẩm. Khi tỉ lệ tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin với hàm lượng theo khối lượng lactoferin là 1/12 hoặc nhỏ hơn, dung dịch nước chứa lactoferin này được duy trì ở trạng thái mong muốn, đặc biệt là, việc tạo thành chất kết tủa không diễn ra, ngay cả khi dung dịch này được tiệt trùng bằng nhiệt ở 120°C. Hơn nữa, có thể nhận thấy rằng hoạt tính của lactoferin được duy trì tốt khi tỉ lệ tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin so với hàm lượng theo khối lượng lactoferin là 1/12 hoặc nhỏ hơn.

Độ đục của dung dịch nước chứa lactoferin sau khi được xử lý bằng nhiệt là 0,032 khi dung dịch này không chứa nguyên liệu protein bổ sung không phải là nguyên liệu lactoferin, tức là, khi tỉ lệ tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin so với hàm lượng theo khối lượng lactoferin là 1/24 hoặc nhỏ hơn. Điều này chỉ ra rằng có thể thu được dung dịch nước chứa lactoferin được ưu tiên đặc biệt trong trường hợp này.

[Ví dụ thử nghiệm 2]

Lactoferrin (được sản xuất bởi Morinaga Milk Industry Co., Ltd., độ tinh khiết của lactoferrin 96% khối lượng hoặc cao hơn) được bổ sung vào nước đã được khử ion sao cho nồng độ cuối cùng là 30mg/ml, nhờ đó điều chế được dung dịch nước chứa lactoferrin. NaCl, CaCl₂ hoặc MgCl₂ được trộn vào dung dịch nước chứa lactoferrin. Trong số các muối này, mỗi NaCl và CaCl₂ được thêm vào sao cho nồng độ cuối cùng của nó là 1,25mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 15,6mM, hoặc 20 mM. Theo đó, thu được sáu mẫu có nồng độ muối khác nhau cho mỗi muối. Mặt khác, MgCl₂ được thêm vào sao cho nồng độ cuối cùng của nó là 1,25mM, 2,5mM, 5mM, 7,6mM, 10mM, hoặc 20 mM. Theo đó, thu được sáu mẫu có nồng độ muối khác nhau.

Tổng 18 mẫu thu được từ đó (sáu mẫu có nồng độ muối khác nhau cho mỗi trong số ba muối) được đưa vào hấp tiệt trùng ở 121°C trong 10 phút. Đo độ đục của mỗi mẫu sau khi hấp tiệt trùng. Chiều dài bước sóng đo được là 660 nm. Kết quả đo độ đục được thể hiện trong bảng 2 dưới đây và trong Fig.2.

Bảng 2: Kết quả đo độ hấp thụ

Nồng độ muối (mM)	NaCl	CaCl ₂	MgCl ₂
20	0,823	3,2	3,32
15,6	0,322	2,06	—
10	0,095	0,263	0,357
7,6	—	—	0,162
5	0,05	0,073	0,073
2,5	0,041	0,048	0,047
1,25	0,037	0,045	0,04

Như được thể hiện trong bảng 2 và Fig.2, việc thêm bất kỳ muối nào vào dung dịch nước chứa lactoferrin làm tăng độ đục của dung dịch nước khi xử lý bằng nhiệt. Nồng độ muối bổ sung càng cao, thì độ đục tăng càng nhiều. Theo đó, nồng độ muối càng thấp, thì việc tăng độ đục khi dung dịch nước

chứa lactoferin được xử lý bằng nhiệt càng ít. Do đó, có thể nhận thấy là nồng độ muối càng thấp, thì việc tạo thành chất kết tủa protein càng ít có khả năng xảy ra.

Mong muốn thu được dung dịch nước chứa lactoferin nếu độ đục sau khi được xử lý bằng nhiệt là khoảng 0,1 hoặc nhỏ hơn. Như có thể thấy trong bảng 2 và Fig.2, độ đục sau khi được xử lý bằng nhiệt nhỏ hơn 0,1 khi nồng độ muối là 5mM hoặc nhỏ hơn. Theo đó, khi nồng độ muối của dung dịch nước chứa lactoferin là 5mM hoặc nhỏ hơn, thì dung dịch nước được duy trì ở trạng thái mong muốn, đặc biệt là, không diễn ra việc tạo thành chất kết tủa, ngay cả khi dung dịch nước được tiệt trùng bằng nhiệt ở 120°C.

Dữ liệu trong bảng 2 và Fig.2 thể hiện rằng độ đục giảm cùng với sự giảm nồng độ muối. Do đó, có thể nhận thấy rằng nếu thử nghiệm tương tự được tiến hành trên mẫu mà không được thêm muối, thì sau đó độ đục sẽ thấp hơn độ đục trên mẫu có nồng độ muối là 1,25mM.

[Ví dụ thử nghiệm 3]

Thử nghiệm dưới đây được thực hiện để chứng minh rằng việc sử dụng các nguyên liệu lactoferin khác nhau tạo ra sự khác nhau về độ đục giữa các dung dịch nước chứa lactoferin tạo thành. Hai loại nguyên liệu lactoferin được cung cấp (nguyên liệu 1 được sản xuất bởi Tatua, nguyên liệu 2 được sản xuất bởi Fonterra). Mỗi trong các nguyên liệu lactoferin được thêm vào nước Milli-Q sao cho nồng độ cuối cùng là 30mg/ml, nhờ đó điều chế được dung dịch nước chứa lactoferin. Theo cách này, hai loại dung dịch nước chứa lactoferin được điều chế (dung dịch chứa nguyên liệu 1 sẽ được gọi là mẫu 1, và dung dịch chứa nguyên liệu 2 sẽ được gọi là mẫu 2). Mỗi trong số mẫu 1 và mẫu 2 được đưa vào hấp tiệt trùng ở 121°C trong 10 phút. Đo độ đục của mỗi mẫu sau khi hấp tiệt trùng. Chiều dài bước sóng đo được là 660nm. Kết quả đo độ đục được thể hiện trong bảng 3 dưới đây và trong Fig.3.

Bảng 3: Kết quả đo độ hấp thụ

	Mẫu 1	Mẫu 2
Được xử lý bằng nhiệt	0,119	0,038
Không được xử lý bằng nhiệt	0,037	0,031

Đánh giá được từ dữ liệu trong bảng 3 và Fig.3 rằng một số loại nguyên liệu lactoferin tăng độ đục khi được xử lý bằng nhiệt.

[Ví dụ thử nghiệm 4]

Thử nghiệm sau đây được thực hiện để xác định tương quan giữa việc tăng độ đục của dung dịch nước lactoferin bằng cách xử lý bằng nhiệt và hoạt tính ức chế COMT.

Lactoferin (được sản xuất bởi Morinaga Milk Industry Co., Ltd., độ tinh khiết của lactoferin 96% khối lượng hoặc cao hơn) được bổ sung vào nước đã được khử ion sao cho nồng độ cuối cùng là 30mg/ml, nhờ đó điều chế được dung dịch nước chứa lactoferin. NaCl, anbumin (BSA) hoặc natri casein được trộn vào dung dịch nước chứa lactoferin. NaCl được thêm vào sao cho nồng độ của nó là 0mM, 10mM, 15mM, hoặc 20mM. BSA hoặc natri casein được thêm vào sao cho nồng độ của nó là 0mg/ml, 0,6mg/ml, 2,4mg/ml, hoặc 4,8mg/ml.

Theo đó, tổng 12 dung dịch được điều chế được đưa vào hấp tiệt trùng ở 121°C trong 10 phút. Đo độ đục của mỗi mẫu sau khi hấp tiệt trùng. Chiều dài bước sóng đo được là 660nm.

Hơn nữa, mỗi dung dịch sau khi hấp tiệt trùng được ly tâm ở 150000 x g trong 20 phút, và đo hoạt tính ức chế COMT của chất nổi trên bề mặt. Tiến hành đo hoạt tính ức chế COMT theo cách thức sau đây: 22,5µL các chất lỏng phản ứng, mỗi chất lỏng chứa phản ứng chứa 50mM axit phosphoric (pH 7,8), 2mM MgCl₂, 11,2µM SAM (S-adenosyl-L-methionin) được dán nhãn bằng đồng vị phóng xạ ¹⁴C, 1mM DTT (dithiothreitol), 4 µg/mL enzym COMT và

từng dung dịch trên, được điều chế. Mỗi trong các dung dịch được pha loãng với nồng độ là 0,1mg/ml, và được xử lý bằng nhiệt ở 100°C trong 10 phút trước khi phản ứng. Phản ứng enzym được thực hiện bằng cách cho mỗi chất lỏng phản ứng phản ứng ở 37°C trong 10 phút, sau đó thêm 2,5µL DBA (dihydroxy benzoic axit) làm chất nền cho chất lỏng phản ứng, và sau đó cho chất lỏng phản ứng phản ứng ở 37°C trong 10 phút. Phản ứng được làm dừng bằng cách thêm 12,5µL HCl 1M vào chất lỏng phản ứng. Sau khi dừng phản ứng, 300µL dung dịch rượu isoamyl/toluen (3:7) được thêm vào chất lỏng phản ứng để tiến hành chiết, và lượng bức xạ được tính bằng máy đếm nhấp nháy lỏng.

Tiếp theo, đối với mỗi trong số 12 dung dịch, lượng dung dịch cần thiết để ức chế 50% hoạt tính COMT được tính toán. Khi lượng dung dịch chỉ chứa lactoferin, cần thiết để ức chế 50% hoạt tính COMT, được giả định là 1, thì lượng dung dịch nước chứa lactoferin cũng chứa muối hoặc protein, cần thiết để ức chế 50% hoạt tính COMT, nên cao hơn 1 vì hoạt tính ức chế COMT của dung dịch này thấp hơn. Hoạt tính ức chế COMT (độ chuẩn tương đối) của chất nổi trên bề mặt của mỗi dung dịch được tính toán theo công thức tính toán sau: “Độ chuẩn tương đối” = “lượng dung dịch được hấp tiệt trùng chỉ chứa lactoferin, cần thiết để ức chế 50% hoạt tính COMT” / “lượng dung dịch được hấp tiệt trùng cũng chứa muối hoặc protein, cần thiết để ức chế 50% hoạt tính COMT”. Bảng 4 và Fig.4 thể hiện mối tương quan giữa độ chuẩn tương đối được tính và độ đục sau khi hấp tiệt trùng đối với mỗi mẫu.

Bảng 4: Mối tương quan giữa độ đục và hoạt tính ức chế COMT

NaCl

Nồng độ (mm)	Độ đục	Hoạt tính ức chế COMT
0	0,04	1,000
10	0,14	0,683
15	0,407	0,037
20	1,574	0,012

BSA

Nồng độ (mg/ml)	Độ đục	Hoạt tính ức chế COMT
0	0,04	1,000
0,6	0,079	0,898
2,4	0,211	0,802
4,8	0,441	0,640

Casein Na

Nồng độ (mg/ml)	Độ đục	Hoạt tính ức chế COMT
0	0,032	1,000
0,6	0,097	0,797
2,4	0,16	0,583
4,8	0,47	0,079

Như thể hiện trong bảng 4 và Fig.4, hoạt tính ức chế COMT của chất nổi trên bề mặt của mỗi dung dịch sau khi ly tâm giảm cùng với sự tăng của độ đục. Theo đó, có mối liên hệ giữa độ đục và hoạt tính ức chế COMT. Do đó, có thể nhận thấy rằng hoạt tính của lactoferin được duy trì khi sự tạo thành chất kết tủa bị ngăn chặn như quan sát thấy trong ví dụ thử nghiệm 1 và 2.

Như có thể thấy từ kết quả của ví dụ thử nghiệm 1 và 2 cũng như kết quả của ví dụ thử nghiệm 4, để duy trì hoạt tính ức chế COMT của lactoferin trong dung dịch nước chứa lactoferin ở mức khoảng 80% hoạt tính ức chế

COMT trước khi tiệt trùng bằng nhiệt (tức là, ở tỉ lệ của hoạt tính ức chế COMT là khoảng 0,8), thì đặc biệt ưu tiên là tạo ra tổng hàm lượng theo khối lượng protein không phải lactoferin là 1/20 hoặc nhỏ hơn hàm lượng theo khối lượng lactoferin, và tạo ra nồng độ muối là 5mM hoặc nhỏ hơn.

[Ví dụ thử nghiệm 5]

Lactoferin (được sản xuất bởi Morinaga Milk Industry Co., Ltd., độ tinh khiết của lactoferin là 96% khối lượng hoặc cao hơn) được hòa tan trong nước trao đổi ion để thu được dung dịch nước chứa lactoferin có nồng độ là 1mg/ml, 10mg/ml hoặc 30mg/ml. Mỗi trong số các dung dịch nước chứa lactoferin được tạo thành được đưa vào xử lý nhiệt bằng cách chưng cất (121°C, 7 phút), và bảo quản ở nhiệt độ 5°C, 25°C hoặc 37°C trong 44 ngày hoặc 98 ngày. Sau đó, mỗi dung dịch nước chứa lactoferin được thêm vào dung dịch TFA (axit trifloaxetic) 0,08% thể tích sao cho nồng độ lactoferin là 0,1mg/ml, nhờ đó thu được mẫu để phân tích HPLC. Việc phân tích HPLC được thực hiện bằng cách sử dụng mỗi trong số các mẫu thu được từ đó với lượng 40µL. Trong việc phân tích HPLC, sử dụng cột Cosmosil 5C4-MS (4,6mM x 250mm), tiến hành rửa giải bằng thang độ nồng độ chứa axetonitril chứa TFA 0,1% thể tích, và phát hiện ra lactoferin ở 280nm. Tỉ lệ phát hiện lactoferin (tỉ lệ phần trăm hấp thụ mẫu sau khi xử lý nhiệt bằng cách chưng cất tương ứng với sự hấp thụ mẫu trước khi xử lý nhiệt bằng cách chưng cất là 100%) được tính cho mỗi mẫu. Tỉ lệ phát hiện thu được từ đó được thể hiện trong bảng 5 và Fig.,5.

Bảng 5: Tỉ lệ phát hiện lactoferin (%)

Nồng độ	Trước khi gia nhiệt	5°C D44	25°C D44	37°C D44	5°C D98	25°C D98	37°C D98
1mg/ml	100,0	97,5	107,4	104,5	110,4	107,9	103,6
10mg/ml	100,0	100,6	103,6	95,7	95,9	96,8	93,8
30mg/ml	100,0	97,5	103,4	95,4	102,2	101,2	99,5

Có thể được thấy từ bảng 5 và Fig.5, lượng lactoferin, được phát hiện bởi việc phân tích HPLC, trong các mẫu mà đã được bảo quản trong thời gian dài sau khi xử lý nhiệt bằng cách chung cất gần như bằng với lượng lactoferin trong các mẫu trước khi xử lý nhiệt bằng cách chung cất. Theo đó, dữ liệu chứng minh rằng dung dịch nước chứa lactoferin mà đã được tiệt trùng theo sáng chế có rất ít sự thay đổi về chất lượng ngay cả khi nó được bảo quản trong thời gian dài.

[Ví dụ thử nghiệm 6]

Lactoferin (được sản xuất bởi Morinaga Milk Industry Co., Ltd., độ tinh khiết của lactoferin 96% khối lượng hoặc cao hơn) được hòa tan trong nước đã được khử ion sao cho nồng độ là 10mg/ml, nhờ đó điều chế được dung dịch nước chứa lactoferin. Dung dịch nước được đưa vào xử lý chung cất ở 121°C trong 7 phút. Sau khi xử lý chung cất, dung dịch nước này được bảo quản ở 5°C, 25°C hoặc 37°C trong 98 ngày. Sau khi bảo quản, đo hoạt tính ức chế COMT của dung dịch nước mà đã được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau. Giá trị số lần đếm đối với chất phóng xạ được sử dụng làm chỉ số của hoạt tính ức chế COMT.

Cũng tiến hành đo hoạt tính ức chế COMT của dung dịch nước chứa lactoferin mà không xử lý chung cất, và mẫu đo mà không được bổ sung lactoferin.

Kết quả được thể hiện trong bảng 6 và Fig.6.

Bảng 6: Kết quả đo hoạt tính ức chế COMT

Mẫu	Hoạt tính COMT
10mg/ml 5°C	551
10mg/ml 25°C	547,5
10mg/ml 37°C	644
Lactoferin không được chung cất	576
Lactoferin không được bổ sung	1085,5

Như có thể được thấy từ so sánh trong bảng 6 và Fig.6 giữa dữ liệu về dung dịch nước chứa lactoferin mà không được xử lý chung cất và dữ liệu đối

với mẫu đo không chứa lactoferin, thì lactoferin ức chế COMT. Hơn nữa, như có thể thấy từ so sánh giữa dữ liệu về dung dịch nước chứa lactoferin mà không được xử lý chung cất và dữ liệu về ba dung dịch nước chứa lactoferin mà được xử lý chung cất, thì dung dịch bất kỳ trong số ba dung dịch nước chứa lactoferin sau khi xử lý chung cất có hoạt tính ức chế COMT tương đương với dung dịch nước chứa lactoferin mà không được xử lý chung cất. Điều này chứng minh rằng dung dịch nước chứa lactoferin, được sản xuất theo sáng chế, duy trì hoạt tính ức chế COMT của nó mặc dù đã trải qua bước tiệt trùng.

[Ví dụ thử nghiệm 7]

Lactoferin (được sản xuất bởi Morinaga Milk Industry Co., Ltd., độ tinh khiết của lactoferin 96% khối lượng hoặc cao hơn) được hòa tan trong nước đã được khử ion sao cho nồng độ là 30mg/ml, nhờ đó thu được dung dịch nước chứa lactoferin. Dung dịch nước chứa lactoferin được đưa vào xử lý chung hấp ở 121°C trong 10 phút, và hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch được kiểm tra như sau. *Escherichia coli* được ủ trong 5-mL nước luộc thịt M9, và các tế bào vi khuẩn được thu hồi bằng cách ly tâm. Tế bào vi khuẩn được thu hồi được tạo huyền phù trong PBS (nước muối đệm phosphat, pH 7,4), và hai huyền phù 100µL có OD là 0,2 (630nm) được điều chế. Mặt khác, PBS được bổ sung vào dung dịch nước chứa lactoferin nêu trên sao cho nồng độ lactoferin là 2mg/ml, nhờ đó thu được dung dịch nước chứa lactoferin đã được pha loãng. Dung dịch nước chứa lactoferin đã được pha loãng được thêm vào mỗi trong số hai huyền phù 100µL với lượng tương đương (100µL), nhờ đó điều chế được hai chất lỏng chứa lactoferin với nồng độ cuối cùng là 1mg/ml và tế bào vi khuẩn.

Dung dịch nước chứa lactoferin, mà không được xử lý chung hấp, được thêm vào hai dung dịch huyền phù 100µL được điều chế theo cách mô tả

bên trên, nhờ đó điều chế được hai chất lỏng chứa lactoferin với nồng độ cuối cùng là 1mg/ml và các tế bào vi khuẩn.

Hai huyền phù 100 μ L, mà không được bổ sung dung dịch nước chứa lactoferin, cũng được tạo ra.

Mỗi trong số sáu mẫu bên trên được ủ ở 37°C trong 1 giờ, và sau đó các mẫu này được cho ly tâm. Chất kết tủa, thu được nhờ việc ly tâm, được tạo huyền phù trong PBS, và chất lơ lửng được cho vào đĩa M9. Đĩa này được ủ qua đêm ở 37°C để tạo cụm khuẩn, và tiến hành đo số lượng cụm khuẩn. Giá trị trung bình của số lượng cụm khuẩn đo được được thể hiện trong bảng 7 và Fig.7.

Bảng 7: Kết quả đo hoạt tính kháng khuẩn

	Giá trị trung bình	SD
Lactoferin không được xử lý	298,5	19,5
Lactoferin được xử lý bằng nhiệt	144	18
Không lactoferin	364	11

Có thể thấy từ so sánh trong bảng 7 và Fig.7 giữa dữ liệu với các mẫu không chứa lactoferin và dữ liệu với các mẫu chứa dung dịch nước chứa lactoferin mà không trải qua quá trình xử lý chung hấp, dung dịch nước chứa lactoferin có hoạt tính kháng khuẩn. Hơn nữa, như có thể thấy từ so sánh giữa dữ liệu với mẫu chứa dung dịch nước chứa lactoferin mà không trải qua quá trình xử lý chung hấp và dữ liệu với các mẫu chứa dung dịch nước chứa lactoferin mà trải qua quá trình xử lý chung hấp, hoạt tính kháng khuẩn được tăng cường bằng cách xử lý chung hấp. Điều này chứng minh rằng dung dịch nước chứa lactoferin, được sản xuất theo sáng chế, có hoạt tính kháng khuẩn mà được tăng cường bởi bước tiệt trùng.

[Ví dụ 1]

Lactoferin (được sản xuất bởi Morinaga Milk Industry Co., Ltd., độ tinh khiết của lactoferin là 96% khối lượng hoặc cao hơn) được hòa tan trong

nước được khử ion sao cho nồng độ là 10mg/ml, và 0,1% (trọng lượng/thể tích) hương vị dâu tây (T. Hasegawa Co., Ltd.) và 0,02% (trọng lượng/thể tích) chất tạo màu (T. Hasegawa Co., Ltd.) được bổ sung vào dung dịch này, nhờ đó thu được dung dịch nước chứa lactoferin. Dung dịch nước chứa lactoferin tạo thành được tiệt trùng bằng cách gia nhiệt ở 131°C trong 30 giây bằng cách sử dụng thiết bị tiệt trùng dạng tấm (được sản xuất bởi Morinaga Engineering Co., Ltd.). Sau khi làm mát dung dịch được tiệt trùng, đổ vào bình chứa một cách vô trùng, nhờ đó thu được đồ uống chứa lactoferin có khả năng bảo quản trong thời gian dài.

[Ví dụ 2]

Lactoferin (được sản xuất bởi Morinaga Milk Industry Co., Ltd., độ tinh khiết của lactoferin là 96% khối lượng hoặc cao hơn) và NaCl được hòa tan trong nước được khử ion sao cho nồng độ lactoferin là 30mg/ml và nồng độ NaCl là 2mM, nhờ đó thu được 10L dung dịch nước chứa lactoferin. Dung dịch nước chứa lactoferin tạo thành được phân phối vào túi chung cất. Sau khi phân phối, túi chung cất chứa dung dịch nước được tiệt trùng ở 120°C trong 7 phút trong máy tiệt trùng kiểu chung cất, nhờ đó thu được dung dịch nước chứa lactoferin có khả năng bảo quản trong thời gian dài.

[Ví dụ 3]

Thu được nguyên liệu lactoferin có độ tinh khiết lactoferin cao và hàm lượng muối thấp theo cách thức sau đây.

Đầu tiên, 1L chất trao đổi ion (CM-Sepharose FF (GE Healthcare Japan Corporation) được nén vào cột, và 2L axit clohydric 0,1N được cho đi qua cột, sau đó làm sạch bằng nước để làm cân bằng chất trao đổi ion. Tiếp theo, chất trao đổi ion được lấy ra khỏi cột, và đưa vào 100L sữa bò tách béo ở độ pH là 6,7 mà đã được làm lạnh ở 4°C, và hỗn hợp này được khuấy ở 4°C trong 6 giờ. Sữa tách béo được loại bỏ bằng cách lọc để thu gom chất trao đổi

ion, và chất trao đổi ion này được nén vào cột. Làm sạch cột bằng nước khử ion để loại bỏ sữa tách béo còn lại. Sau đó, 5L nước muối 10% khối lượng được cho đi qua cột để tách thành phần mà đã được hấp thụ vào chất trao đổi ion, nhờ đó thu được 5L chất lỏng được thu hồi. Chất lỏng được thu hồi này được đưa vào quá trình siêu lọc với tốc độ dòng chảy 8 L/phút và áp suất trung bình là 30 kg/cm² bằng cách sử dụng màng siêu lọc GR 61PP (sản xuất bởi Alfa Laval) có trọng lượng phân tử cắt 20000. Việc khử muối được thực hiện thêm bằng cách bổ sung nước khử ion và thực hiện lặp lại quá trình siêu lọc. Dung dịch tạo thành được làm khô lạnh để thu được 3,5g lactoferin dạng bột. Theo cách này, thu được nguyên liệu lactoferin có độ tinh khiết 96% khối lượng hoặc cao hơn và hàm lượng muối natri là 70mg mỗi 100g.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất dung dịch nước chứa lactoferin, bao gồm bước tiệt trùng dung dịch nước chứa lactoferin bằng nhiệt ở nhiệt độ 100°C hoặc cao hơn, trong đó dung dịch này có tổng lượng protein không phải lactoferin là nhỏ hơn hoặc bằng 1/12 lượng lactoferin theo khối lượng,

trong đó dung dịch nước chứa lactoferrin chứa

a) nồng độ muối là 5mM hoặc nhỏ hơn, và

b) cường độ ion ("I") không thỏa mãn:

$\log I < -3$;

trong đó muối là muối natri, muối canxi, hoặc muối magie.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch này có nồng độ lactoferin là 400mg/ml hoặc nhỏ hơn.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ trong bước tiệt trùng bằng nhiệt là 120°C hoặc cao hơn.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ trong bước tiệt trùng bằng nhiệt là 120°C hoặc cao hơn trong 4 phút hoặc lâu hơn.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch này không chứa chất ổn định.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch này có hoạt tính ức chế catechol-O-metyltransferaza ("COMT") của lactoferin được duy trì ở mức 80% hoặc cao hơn sau bước tiệt trùng bằng nhiệt.

7. Phương pháp sản xuất dung dịch nước chứa lactoferin, trong đó phương pháp này bao gồm bước tiệt trùng dung dịch nước chứa lactoferin bằng nhiệt ở nhiệt độ 100°C hoặc cao hơn,

trong đó các protein không phải lactoferin có mặt trong dung dịch nước là nhỏ hơn hoặc bằng 1/12 so với lactoferrin theo khối lượng,

trong đó dung dịch nước chứa lactoferrin có nồng độ lactoferin là

30mg/ml hoặc nhỏ hơn;

trong đó dung dịch nước chứa lactoferrin chứa nồng độ muối là 5mM hoặc nhỏ hơn,

trong đó muối là muối natri, muối canxi, hoặc muối magie.

8. Phương pháp sản xuất dung dịch nước chứa lactoferin, trong đó phương pháp này bao gồm bước tiệt trùng dung dịch nước chứa lactoferin bằng nhiệt ở nhiệt độ 100°C hoặc cao hơn,

trong đó các protein không phải lactoferin có mặt trong dung dịch nước là nhỏ hơn hoặc bằng 1/20 so với lactoferrin theo khối lượng,

trong đó dung dịch nước chứa lactoferrin chứa nồng độ muối là 5mM hoặc nhỏ hơn,

trong đó muối là muối natri, muối canxi, hoặc muối magie.

Fig.1

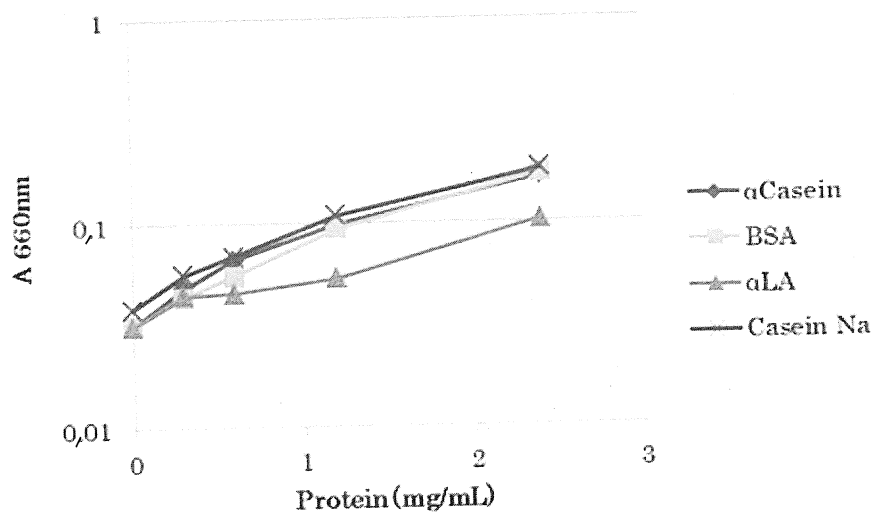


Fig.2

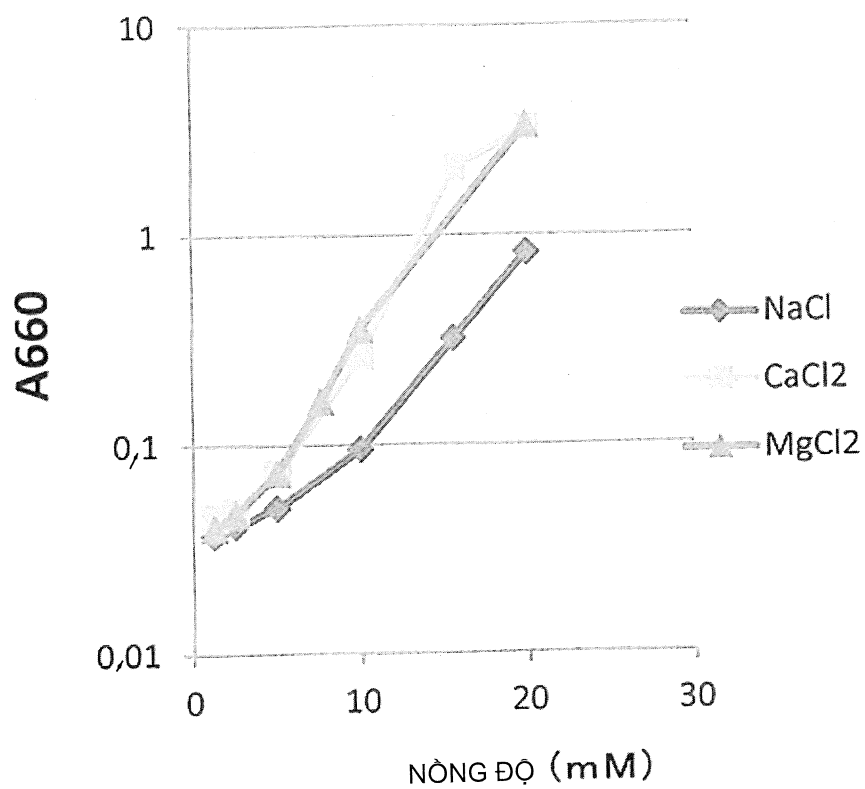


Fig. 3

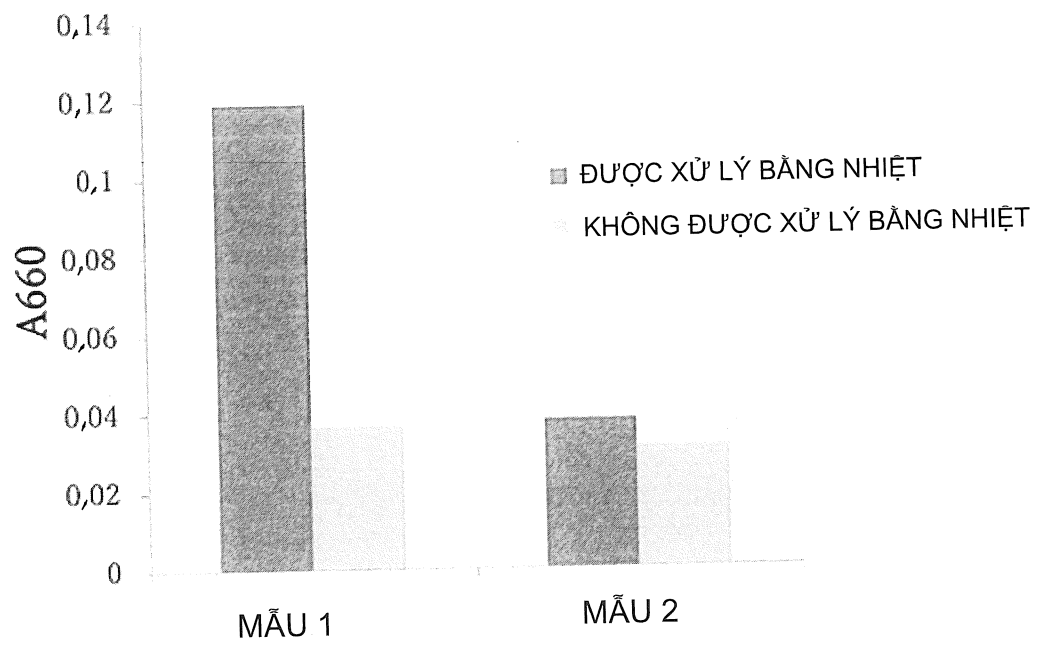


Fig.4

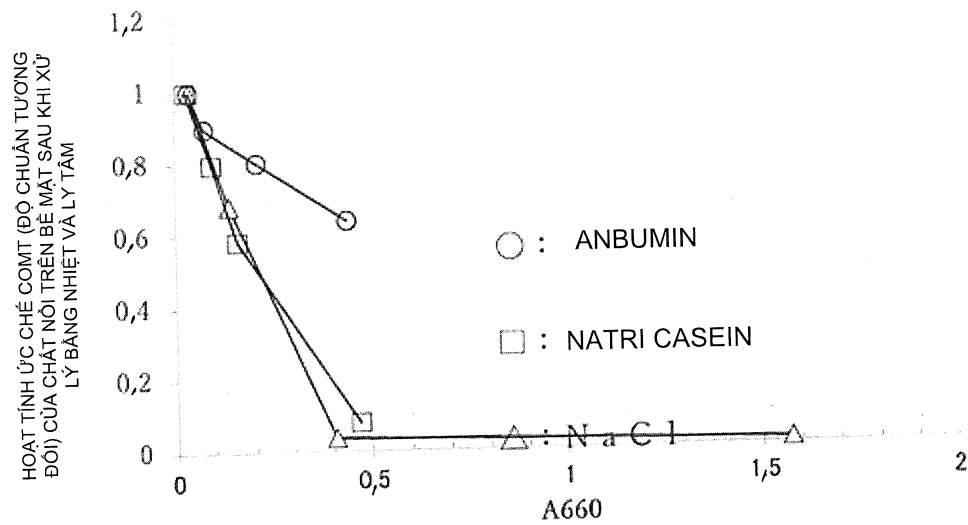


Fig.5

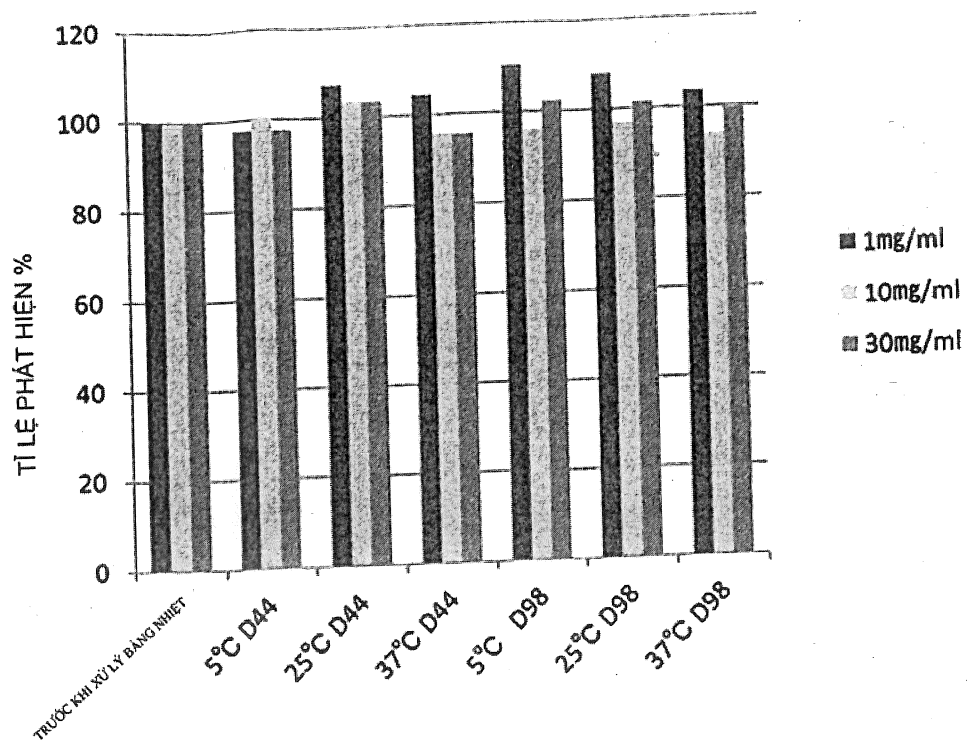


Fig.6

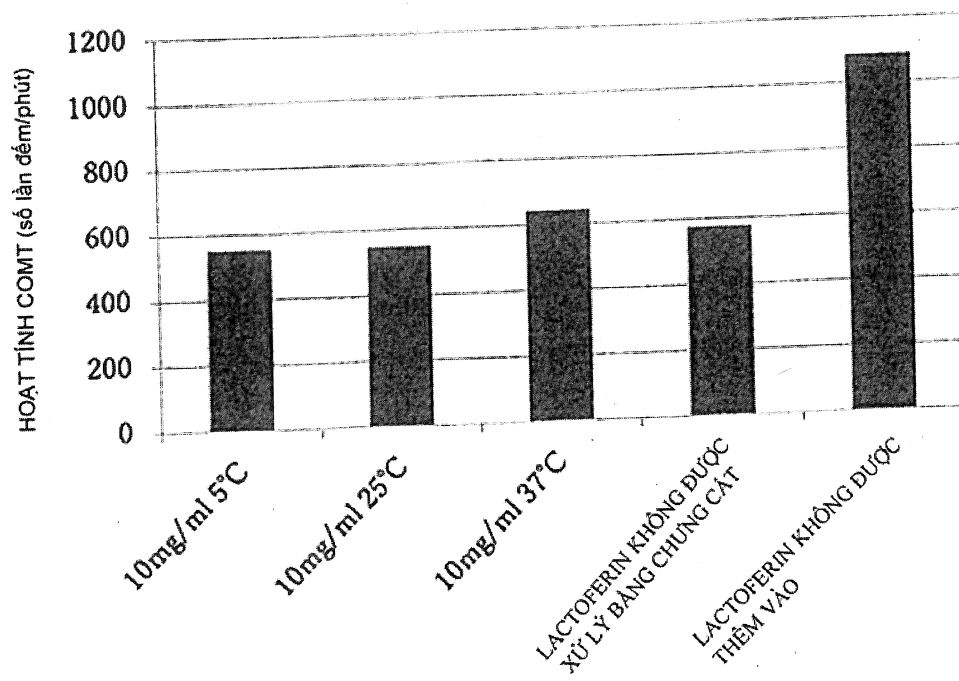


Fig.7

