



(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)



1-0051563

(51)^{2020.01} G01N 33/04; C12Q 1/37

(13) B

(21) 1-2021-03104

(22) 29/10/2019

(86) PCT/NZ2019/050143 29/10/2019

(87) WO 2020/091608 07/05/2020

(30) 62/752,080 29/10/2018 US

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/08/2021 401A

(73) THE A2 MILK COMPANY LIMITED (NZ)

Level 10, 51 Shortland Street, Auckland 1010, New Zealand

(72) COONEY, Terence Patrick (NZ); JAINE, Jacob Evan (NZ).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH LƯỢNG BETA-CASEIN TRONG SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA

(21) 1-2021-02911

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm tra sự có mặt và định lượng biến thể beta-casein typ A1 hoặc beta-casein typ A2 trong sữa và các sản phẩm sữa có nguồn gốc từ sữa, bằng cách sử dụng sự phân giải bằng chymotrypsin, sau đó sử dụng phương pháp phân tích sắc ký lỏng-phổ khối (LC-MS) để xác định nồng độ của các peptit phân giải beta-casein và sử dụng các nồng độ này để tính toán lượng biến thể beta-casein typ A1 hoặc biến thể beta-casein typ A2 có mặt.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân tích các protein beta-casein có mặt trong sữa động vật và các sản phẩm sữa được chế biến từ sữa động vật. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm tra sự có mặt và định lượng beta-casein typ A1 và beta-casein typ A2 và các biến thể beta-casein liên quan trong sữa và các sản phẩm sữa có nguồn gốc từ sữa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sữa, chủ yếu là sữa bò, được sử dụng trên khắp thế giới, là nguồn protein chủ yếu trong chế độ ăn của người. Một lít sữa bò thường chứa khoảng từ 30 đến 40g protein. Các casein là thành phần lớn nhất (80%) của protein, và các beta-casein chiếm khoảng 37% casein. Trong hai thập kỷ qua, đã có bằng chứng về sự phát triển của cơ thể liên quan đến các protein casein, đặc biệt là các beta-casein, trong nhiều tác dụng sinh lý hoặc sinh học (với một số tác dụng có liên quan đến các rối loạn về sức khỏe).

Các beta-casein có thể được phân loại thành thành beta-casein typ A1 và beta-casein typ A2. Beta-casein A1 và beta-casein A2 là các beta-casein chủ yếu trong sữa bò được tiêu thụ bởi phần lớn dân số. Nhiều biến thể beta-casein có thể được phân loại thành typ A1 hoặc typ A2 dựa trên gốc axit amin ở vị trí 67 của trình tự 209 axit amin của beta-casein. Beta-casein A1 khác với beta-casein A2 về một axit amin. Axit amin histidin nằm ở vị trí 67, trong khi prolin nằm ở cùng vị trí của beta-casein A2. Tuy nhiên, sự khác biệt về một axit amin này là yếu tố quan trọng quyết định đối với sự phân giải các beta-casein nhờ enzyme ở ruột. Sự có mặt của histidin ở vị trí 67 cho phép đoạn protein chứa bảy axit amin, được gọi là beta-casomorphin-7 (BCM-7), được tạo ra khi phân giải nhờ enzyme. Do đó, BCM-7 là sản phẩm phân giải của beta-casein A1. Trong trường hợp beta-casein A2, vị trí 67 bị chiếm bởi prolin sẽ cản trở sự phân cắt liên kết axit amin ở vị trí này. Do đó, BCM-7 không là sản phẩm phân giải của beta-casein A2.

Các biến thể beta-casein khác như các biến thể B, C, F, G và H1 cũng có

histidin ở vị trí 67, trong khi các biến thể A3, D, E, H2 và I có prolin ở vị trí 67 như biến thể A2. Tuy nhiên, chỉ phát hiện được các biến thể này với lượng rất thấp, hoặc không hề phát hiện được chúng trong sữa từ bò có nguồn gốc từ châu Âu. Do đó, trong ngữ cảnh của sáng chế này, thuật ngữ beta-casein A1 có thể dùng để chỉ beta-casein bất kỳ có histidin ở vị trí 67, và thuật ngữ beta-casein A2 có thể dùng để chỉ beta-casein bất kỳ có prolin ở vị trí 67.

BCM-7 là peptit opioit và có thể gắn kết với và hoạt hóa các thụ thể opioit trong khắp cơ thể, và đã được chứng minh là làm hạn chế sự sản sinh glutathion/chất chống oxy hóa dẫn đến làm thay đổi chức năng tế bào và sự biểu hiện của gen.¹ BCM-7 có khả năng ngấm qua thành dạ dày-ruột và đi vào hệ tuần hoàn để tác động đến các hoạt động của toàn thân và tế bào qua các thụ thể opioit. Tác giả sáng chế và những người khác đã xác định được từ trước đó mối liên quan bất lợi giữa việc sử dụng beta-casein A1 trong sữa hoặc các sản phẩm sữa và bệnh đái tháo đường typ I,² bệnh tim mạch vành,³ các rối loạn thần kinh,⁴ bệnh viêm ruột,⁵ các triệu chứng của tình trạng không dung nạp lactoza,⁶ sự điều hòa nồng độ glucoza trong máu,⁷ chức năng nhận thức,⁸ và khu hệ vi sinh vật đường ruột.⁹

Toàn bộ những phát hiện được báo cáo này đều liên quan đến sự ảnh hưởng của BCM-7, hoặc các biến thể beta-casein sản sinh ra BCM-7 khi phân giải, đối với các đặc điểm hành vi của các đối tượng mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh được chẩn đoán lâm sàng. Các phát hiện này không liên quan đến các đối tượng khỏe mạnh. Ngoài ra, đã biết rõ rằng kết quả của các nghiên cứu dựa trên thử nghiệm nuôi cấy tế bào chắc chắn không thể ngoại suy thành các kết quả lâm sàng hoặc *in vivo* do có nhiều biến số liên quan đến sự sản sinh, vận chuyển và chuyển hóa BCM-7 làm ảnh hưởng đến sự tiếp xúc với mô và do đó là đáp ứng sinh học. Ví dụ, đã biết rằng nồng độ của các opioit và ái lực của chúng với các thụ thể opioit là yếu tố quan trọng đối với sự đáp ứng của tế bào.

Ngày càng có nhiều bằng chứng khoa học về mối liên quan giữa các biến thể beta-casein với tác dụng phụ của việc sử dụng sữa và các sản phẩm sữa dẫn đến tầm quan trọng của việc có thể phân tích chính xác và tin cậy đối với sữa và các sản phẩm sữa về sự có mặt của biến thể beta-casein, cụ thể là beta-casein A1 và các biến thể liên quan của nó có histidin ở vị trí 67 của trình tự axit amin.

Việc xác định tổng hàm lượng của beta-casein trong sữa bò là tương đối dễ

dàng. Phương pháp phổ biến nhất bao gồm bước tách các protein nguyên vẹn bằng phương pháp sắc ký lỏng (liquid chromatography: LC), sau đó phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị phát hiện tia tử ngoại (ultraviolet detector: UV) hoặc bằng phương pháp phổ khối lượng (mass spectrometry: MS). Phương pháp này đã được Vincent và các đồng tác giả¹⁰ sử dụng gần đây để nghiên cứu sữa ở Úc, và được Givens và các đồng tác giả¹¹ sử dụng để nghiên cứu sữa ở Vương Quốc Anh. Trong cả hai trường hợp, các biến thể beta-casein chủ yếu có thể được phát hiện riêng rẽ, nhưng do các biến thể beta-casein tinh khiết không có sẵn trên thị trường làm chất chuẩn phân tích, chúng không thể được định lượng riêng biệt. Ngoài ra, cả hai phương pháp đều cần sử dụng phổ kế khối có độ phân giải cao, và cả hai phương pháp này đều không đủ độ nhạy để phân biệt lượng vi lượng của biến thể beta-casein A1 khi có mặt biến thể beta-casein A2 với lượng lớn.

Phương pháp khác bao gồm bước phân giải các protein sữa và định lượng peptit tạo thành. Phương pháp này được Lutter và các đồng tác giả¹² chọn đã sử dụng trypsin để phân giải nhiều loại thực phẩm để xác định nồng độ của các protein sữa chủ yếu. Các mẫu được phân tích bằng phương pháp LC-MS/MS bằng cách sử dụng sự hiệu chỉnh chất nội. Trong khi phương pháp này có độ đặc hiệu và độ nhạy cao hơn so với các phương pháp sử dụng protein nguyên vẹn, phương pháp này vẫn không có khả năng quan trọng để phân biệt các biến thể beta-casein.

Trong khi các phương pháp đã công bố trên đây có thể thích hợp để phân tích sữa tươi, không có phương pháp nào đáp ứng được tất cả các yêu cầu phân tích cần thiết đối với các sản phẩm sữa chứa một biến thể hiện đại. Điều này đặc biệt đúng đối với các sản phẩm như sữa tiệt trùng (UHT) hoặc sữa công thức dùng cho trẻ em, mà trong đó có thể có sự cải biến đáng kể của protein trong quá trình chế biến. Trong quá trình phân tích, các casein trong các chất nền này có thể không có tác dụng theo cách giống như các casein 'kiểu đại' từ sữa tươi, và các quy trình phân tích cũng phải được làm thích ứng theo chất nền. Ví dụ, việc phân tích các beta casein nguyên vẹn từ các mẫu sữa tươi nguyên chất bằng cách sử dụng phương pháp LC-UV tạo ra các đỉnh riêng biệt của mỗi biến thể beta casein thích hợp cho cả việc phân tích định tính và định lượng, do chúng có thể được nhận biết và lấy tích phân dễ dàng. Trái lại, quy trình tương tự được áp dụng với sữa công thức dùng cho trẻ em tạo ra các đỉnh rộng mà không bị phân giải với nhau và không thích hợp cho việc phân tích định tính hoặc

định lượng.

Các phương pháp phân tích sử dụng sự phân giải bằng các enzym phân giải protein cũng có thể gặp phải vấn đề cản trở việc sử dụng chúng trong quá trình phân tích beta casein. Proteaza được sử dụng rộng rãi nhất là trypsin, khi chất này được cho tiếp xúc với beta casein, sẽ tạo ra peptit mạch dài chứa 48 gốc. Chiều dài đáng kể của peptit này làm cho nó dễ bị cải biến nhiều lần, dẫn đến làm thay đổi khối lượng, điều này lại làm phức tạp đáng kể đối với việc phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp phổ khối lượng. Ngoài ra, chiều dài này làm cho khó tổng hợp peptit này để sử dụng làm chất chuẩn phân tích, và do đó làm cho phương pháp phân giải trên cơ sở trypsin không thích hợp để phân tích định lượng beta casein trong một số sản phẩm sữa. Vì thế, cần sử dụng các enzym thay thế để phân tích beta casein.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp định lượng tuyệt đối các biến thể beta-casein A1 và beta-casein A2 trong sữa và các sản phẩm sữa ở cấp độ liên quan về mặt thương mại.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp phân tích các biến thể beta-casein trong sữa động vật các sản phẩm có nguồn gốc từ sữa động vật, hoặc ít nhất là tạo ra giải pháp thay thế hữu ích cho các phương pháp hiện nay.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp xác định lượng biến thể beta-casein typ A1 hoặc biến thể beta-casein typ A2 trong chế phẩm với độ chính xác cao hơn 80%, trong đó các biến thể beta-casein typ A1 là biến thể beta-casein có histidin ở vị trí 67 của trình tự axit amin beta-casein và các biến thể beta-casein typ A2 là biến thể beta-casein có prolin ở vị trí 67 của trình tự axit amin beta-casein, và trong đó chế phẩm này là sữa hoặc sản phẩm được chế biến từ sữa, bao gồm các bước:

- (i) cho chế phẩm tiếp xúc với chymotrypsin trong các điều kiện cho phép phân giải beta-casein trong chế phẩm này bằng chymotrypsin;
- (ii) thu được dung dịch nước chứa các peptit phân giải beta-casein;
- (iii) xác định nồng độ của:
 - a) hai hoặc nhiều peptit phân giải beta-casein có mặt trong dung dịch này, trong đó mỗi peptit chứa từ 8 đến 20 gốc axit amin và có histidin ở vị trí tương ứng với vị trí 67 của trình tự axit amin beta-casein; và

- b) hai hoặc nhiều peptit phân giải beta-casein có mặt trong dung dịch này, trong đó mỗi peptit chứa từ 8 đến 20 gốc axit amin và có prolin ở vị trí tương ứng với vị trí 67 của trình tự axit amin beta-casein; bằng cách phân tích hỗn hợp sử dụng phương pháp sắc ký lỏng-phổ khối; và
- (iv) tính toán nồng độ của biến thể beta-casein typ A1 trong chế phẩm hoặc nồng độ của các biến thể beta-casein typ A2 trong chế phẩm bằng cách sử dụng nồng độ của các peptit phân giải beta-casein xác định được trong bước (iii).

Theo một số phương án của sáng chế, các biến thể beta-casein typ A1 chứa một hoặc nhiều thành phần bất kỳ trong số beta-casein A1, beta-casein B, beta-casein C, beta-casein F, beta casein G và beta-casein H1. Ví dụ, các biến thể beta-casein typ A1 có thể chỉ chứa beta-casein A1.

Theo một số phương án của sáng chế, các biến thể beta-casein typ A2 chứa một hoặc nhiều thành phần bất kỳ trong số beta-casein A2, beta-casein A3, beta-casein D, beta-casein E, beta-casein H2 và beta-casein I. Ví dụ, các biến thể beta-casein typ A2 có thể chỉ chứa beta-casein A2.

Theo một số phương án, các biến thể beta-casein typ A1 chỉ chứa beta-casein A1 và các biến thể beta-casein typ A2 chỉ chứa beta-casein A2.

Theo một số phương án của sáng chế, nồng độ của ba hoặc bốn peptit phân giải beta-casein có histidin ở vị trí tương ứng với vị trí 67 của trình tự axit amin beta-casein được xác định. Theo một số phương án, trong đó sữa này là sữa bò, các peptit phân giải beta-casein được chọn từ nhóm bao gồm VYPFPGPIHN, SLVYPFPGPIHN, VYPFPGPIHNSLPQ, và SLVYPFPGPIHNSLPQ.

Theo một số phương án của sáng chế nồng độ của ba hoặc bốn peptit phân giải beta-casein có prolin ở vị trí tương ứng với vị trí 67 của trình tự axit amin beta-casein được xác định. Theo một số phương án, trong đó sữa này là sữa bò, các peptit phân giải beta-casein được chọn từ nhóm bao gồm VYPFPGPIP, SLVYPFPGPIP, VYPFPGPIPNSLPQ, và SLVYPFPGPIPNSLPQ.

Theo một số phương án của sáng chế, hỗn hợp được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng-phổ khối chứa các peptit được đánh dấu bằng đồng vị tương ứng với mỗi peptit trong số các peptit từ mục a) và b). Các peptit được đánh

dấu bằng đồng vị có thể được bổ sung vào chế phẩm trước khi xử lý bằng chymotrypsin trong bước (i) hoặc sau khi xử lý bằng chymotrypsin trong bước (i).

Theo một số phương án của sáng chế trong đó sữa này là sữa bò, các peptit được đánh dấu bằng đồng vị có thể tương ứng với các peptit phân giải như sau:

Peptit phân giải	Peptit được đánh dấu bằng đồng vị
VYFPFGPIHN	(*V)YFPFGPIHN
SLVYFPFGPIHN	SL(*V)YFPFGPIHN
VYFPFGPIHNSLPQ	VYFPFGPIHNS(*L)PQ
SLVYFPFGPIHNSLPQ	SL(*V)YFPFGPIHNSLPQ

Theo một số phương án của sáng chế trong đó sữa này là sữa bò, các peptit được đánh dấu bằng đồng vị có thể tương ứng với các peptit phân giải như sau:

Peptit phân giải	Peptit được đánh dấu bằng đồng vị
VYFPFGPIP	(*V)YFPFGPIP
SLVYFPFGPIP	SL(*V)YFPFGPIP
VYFPFGPIPNSLPQ	VYFPFGPIPNS(*L)PQ
SLVYFPFGPIPNSLPQ	SL(*V)YFPFGPIPNSLPQ

Theo một số phương án của sáng chế trong đó sữa này là sữa bò, nồng độ của các peptit sau đây xác định được trong bước (iii): VYFPFGPIHN, SLVYFPFGPIHN, VYFPFGPIHNSLPQ, SLVYFPFGPIHNSLPQ, VYFPFGPIP, SLVYFPFGPIP, VYFPFGPIPNSLPQ, và SLVYFPFGPIPNSLPQ.

Theo một số phương án của sáng chế, lượng biến thể beta-casein typ A1 và biến thể beta-casein typ A2 trong chế phẩm được xác định với độ chính xác cao hơn 90%, cao hơn 95%, hoặc cao hơn 99%.

Theo một số phương án của sáng chế, chế phẩm là sữa bò hoặc sản phẩm sữa được chế biến từ sữa bò.

Theo một số phương án của sáng chế, sữa này là sữa tươi, sữa tươi nguyên chất, sữa bột, sữa lỏng được hoàn nguyên từ sữa bột, sữa đã tách kem, sữa đã làm đồng nhất, sữa đặc có đường, sữa cô đặc, sữa được tạo hương vị, sữa UHT, sữa thanh trùng, hoặc sữa không thanh trùng. Theo một số phương án của sáng chế, sản phẩm sữa là sữa công thức dùng cho trẻ em, kem, sữa chua, pho mát tươi, pho mát, bơ hoặc kem ăn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện tỷ lệ của các beta-casein typ A1 trong loạt các chất chuẩn là sữa tương đối được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp của sáng chế, cũng như phương pháp phân tích HPLC nguyên vẹn.

Fig.2 thể hiện lượng beta-casein trong loạt các mẫu sữa và sản phẩm sữa khi được xác định bằng phương pháp của sáng chế, so với hàm lượng beta-casein theo lý thuyết được xác định từ hàm lượng protein của các mẫu.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Thuật ngữ “beta-casomorphin-7” hoặc “BCM-7” để chỉ mảnh protein Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile, heptapeptit được tạo ra khi phân giải các biến thể beta-casein của bò nhờ enzym, chất này có histidin, chứ không phải prolin, ở vị trí 67 của trình tự axit amin.

Thuật ngữ “biến thể beta-casein typ A1” để chỉ biến thể beta-casein bất kỳ có gốc histidin ở vị trí 67 của trình tự axit amin của nó, và bao gồm một hoặc nhiều thành phần bất kỳ trong số beta-casein A1, beta-casein B, beta-casein C, beta-casein F, và beta-casein G.

Thuật ngữ “biến thể beta-casein typ A2” để chỉ biến thể beta-casein bất kỳ có gốc prolin ở vị trí 67 của trình tự axit amin của nó, và bao gồm beta-casein A2, beta-casein A3, beta-casein D, beta-casein E, beta-casein H1, beta-casein H2 và beta-casein I.

Thuật ngữ “vị trí 67” của trình tự axit amin beta-casein có nghĩa là vị trí số 67 tính từ các gốc axit amin của trình tự này từ đầu tận cùng N của beta-casein (sau khi loại bỏ peptit tín hiệu).

Thuật ngữ “AQ”, đôi khi được gọi là “AQUA”, có nghĩa là “định lượng tuyệt đối” và thể hiện rằng phương pháp của sáng chế có thể được sử dụng để xác định nồng độ tuyệt đối của các beta-casein dưới dạng tỷ lệ trong mẫu (ví dụ, tỷ lệ theo khối lượng), trái ngược với các phương pháp khác không xác định nồng độ tuyệt đối, mà xác định tỷ lệ của các beta-casein so với thành phần khác trong mẫu, hoặc tỷ lệ của một biến thể của beta-casein so với biến thể khác.

Trong toàn bộ bản mô tả này, trừ khi có lưu ý cụ thể theo cách khác hoặc ngữ cảnh yêu cầu theo cách khác, sự viện dẫn đến một bước, thành phần của chất, nhóm các bước hoặc nhóm các thành phần của chất sẽ bao gồm một hoặc nhiều (nghĩa là một hoặc nhiều hơn một) bước, thành phần của chất, các nhóm của các bước hoặc nhóm các thành phần của chất.

Dự định rằng sự viện dẫn bất kỳ đến một khoảng chữ số được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, từ 1 đến 10) cũng kết hợp viện dẫn đến tất cả các chữ số liên quan trong khoảng này (ví dụ, 1, 1,1, 2, 3, 3,9, 4, 5, 6, 6,5, 7, 8, 9 và 10) và cả khoảng bất kỳ của các số hữu tỷ nằm trong khoảng này (ví dụ, từ 2 đến 8, từ 1,5 đến 5,5 và từ 3,1 đến 4,7) và do đó tất cả các khoảng giá trị nhỏ của tất cả các khoảng được mô tả trong bản mô tả này đều được bộc lộ rõ ràng. Đây chỉ là các ví dụ về các giá trị được dự định cụ thể và tất cả các tổ hợp có thể có của các giá trị bằng số giữa giá trị thấp nhất và giá trị cao nhất đã liệt kê được cho là được chỉ rõ trong bản mô tả này theo cách tương tự.

Trong toàn bộ bản mô tả này, từ “bao gồm”, hoặc các phương án của nó như “có chứa” hoặc “chứa”, sẽ được hiểu là thể hiện sự bao gồm cả yếu tố, số nguyên hoặc bước, hoặc nhóm các yếu tố, số nguyên hoặc bước đã nêu mà không loại trừ yếu tố, số nguyên hoặc bước, hoặc nhóm các yếu tố, số nguyên hoặc bước khác bất kỳ.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng sáng chế được mô tả trong bản mô tả này có thể có các thay đổi và cải biến khác với các thay đổi và cải biến đã được mô tả cụ thể. Cần hiểu rằng sáng chế bao gồm tất cả các thay đổi và cải biến này. Sáng chế cũng bao gồm tất cả các bước hoặc dấu hiệu được đề cập hoặc chỉ ra trong bản mô tả này, theo cách chung hoặc riêng, và tổ hợp bất kỳ hoặc tất cả các tổ hợp hoặc hai hoặc nhiều bước hoặc dấu hiệu bất kỳ trong số các bước hoặc dấu hiệu nêu trên.

Phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ cụ thể được mô tả trong bản mô tả này, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa. Các sản phẩm, chế phẩm và phương pháp tương đương về mặt chức năng vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế này.

Việc viện dẫn bất kỳ đến các tài liệu đã biết trong bản mô tả này không được cho là sự thừa nhận rằng các tài liệu này là đã được biết rộng rãi hoặc tạo ra một phần kiến thức chung trong lĩnh vực này.

Phương pháp kiểm tra

Sáng chế đề xuất phương pháp xác định lượng biến thể beta-casein typ A1 và biến thể beta-casein typ A2 trong chế phẩm. Điều quan trọng là phương pháp này cho phép lượng của hai loại biến thể beta-casein được xác định với độ chính xác cao hơn 80%, và thậm chí độ chính xác lên đến 100%. Mức độ chính xác trở nên quan trọng do yêu cầu về sữa và sản phẩm sữa không chứa beta-casein A1 (và các biến thể liên quan) tăng lên đáng kể trong thập kỷ trước. Người tiêu dùng cũng như các nhà sản xuất và nhà cung cấp cần biết liệu một sản phẩm có gần như không chứa các biến thể beta-casein typ A1 hay không.

Phương pháp này bao gồm bước phân giải các protein beta-casein trong chế phẩm bằng enzym serin proteaza chymotrypsin. Tác giả sáng chế đã xác định được rằng quá trình phân giải tạo ra các peptit có thể nhận biết đặc hiệu. Sự có mặt và lượng của mỗi peptit được tạo ra từ chế phẩm có thể được xác định và sau đó lượng này được sử dụng để tính toán lượng theo tỷ lệ % của các biến thể beta-casein typ A1 và biến thể beta-casein typ A2 trong chế phẩm. Số lượng peptit (ví dụ, 2, 3, 4 hoặc nhiều hơn) được phân tích sẽ xác định mức độ chính xác. Ví dụ, việc phân tích chỉ hai peptit có thể đưa ra quyết định cuối cùng về lượng theo tỷ lệ % của hai loại biến thể beta-casein trong chế phẩm với mức độ chính xác chỉ 80%. Việc phân tích ba peptit có thể tạo ra mức độ chính xác khoảng 90%, và việc phân tích bốn peptit có thể tạo ra mức độ chính xác khoảng 95%.

Chế phẩm cần được phân tích có thể là sữa từ động vật bất kỳ hoặc sản phẩm được chế biến từ sữa động vật. Chế phẩm này cũng có thể là sản phẩm không phải sữa chứa beta-casein thu được từ sữa.

Sữa có thể ở dạng sữa tươi, sữa tươi nguyên chất, sữa bột, sữa lỏng được hoàn nguyên từ sữa bột, sữa đã tách kem, sữa đã làm đồng nhất, sữa đặc có đường, sữa cô đặc, sữa được tạo hương vị, sữa UHT, sữa thanh trùng, hoặc sữa không thanh trùng, hoặc dạng sữa khác bất kỳ.

Phương pháp của sáng chế là thích hợp nhất để phân tích sữa bò và sản phẩm sữa bò, nhưng có thể được làm thích ứng dễ dàng đối với sữa và sản phẩm sữa từ nhiều loại động vật khác nhau bao gồm người, cừu, dê, ngựa, lợn, trâu, hươu, và các động vật có vú khác bất kỳ sản sinh ra các casein trong sữa của chúng.

Chế phẩm cũng có thể là sản phẩm có nguồn gốc từ sữa bất kỳ như sữa công

thức dùng cho trẻ em, kem, sữa chua, pho mát tươi, pho mát, bơ hoặc kem ăn.

Khi chế phẩm cần được phân tích là sữa, cần chuẩn bị mẫu tối thiểu. Tốt hơn là làm biến tính các protein có mặt trong mẫu sữa, ví dụ, bằng cách xử lý bằng chất làm biến tính như guanidin hydroclorua hoặc ure.

Trong trường hợp các sản phẩm sữa ở dạng rắn hoặc bán rắn, việc chuẩn bị mẫu thường bao gồm bước cân trọng lượng của lượng sản phẩm đã đồng nhất vào bình riêng biệt và chiết các protein casein vào dung dịch với thể tích đã biết.

Sự phân giải các beta-casein trong mẫu bằng cách sử dụng chymotrypsin có thể được tiến hành trong điều kiện thích hợp để cho phép phân giải hữu hiệu. Mẫu này thường được ủ ở nhiệt độ khoảng 37°C trong vài giờ trước khi làm ngừng bằng chất phản ứng như axit formic, để làm bất hoạt chymotrypsin.

Khi mẫu đã được phân giải bằng chymotrypsin, và chuẩn bị mẫu sau phân giải bất kỳ, một số peptit được đánh dấu bằng đồng vị được bổ sung vào mẫu này trước khi phân tích bằng phương pháp LC-MS (sắc ký lỏng – phổ khối). Các peptit được đánh dấu bằng đồng vị được chọn lọc dựa trên sự xác định trước đó của tác giả sáng chế rằng chymotrypsin phân hủy các biến thể beta-casein typ A1 để tạo ra các peptit phân giải:

VYFPFGPIHN, SLVYFPFGPIHN, VYFPFGPIHNSLPQ, và
SLVYFPFGPIHNSLPQ

và phân hủy các biến thể beta-casein typ A2 để tạo ra các peptit phân giải:

VYFPFGPIPNSLPQ, SLVYFPFGPIPNSLPQ, VYFPFGPIPNSLPQ, và
SLVYFPFGPIPNSLPQ

Các peptit được đánh dấu bằng đồng vị có thể là peptit từ nhóm:

(*V)YFPFGPIHN, SL(*V)YFPFGPIHN, VYFPFGPIHNS(*L)PQ,
SL(*V)YFPFGPIHNSLPQ, (*V)YFPFGPIPNSLPQ, SL(*V)YFPFGPIPNSLPQ,
VYFPFGPIPNS(*L)PQ, và SL(*V)YFPFGPIPNSLPQ, trong đó *V là gốc valin được đánh dấu bằng đồng vị và *L là gốc leuxin được đánh dấu bằng đồng vị. Cần hiểu rằng gốc bất kỳ hoặc nhiều gốc axit amin của peptit có thể được đánh dấu bằng đồng vị. Tuy nhiên, valin hoặc leuxin được đánh dấu bằng đồng vị thường được ưu tiên.

Theo một số phương án của sáng chế, các peptit được đánh dấu bằng đồng vị được sử dụng tương ứng với các peptit phân giải theo Bảng 1.

Bảng 1: Các peptit phân giải và các dạng tương đương được đánh dấu bằng đồng vị của chúng

Peptit phân giải	Peptit được đánh dấu bằng đồng vị
VYFPFGPIHN	(*V)YFPFGPIHN
SLVYFPFGPIHN	SL(*V)YFPFGPIHN
VYFPFGPIHNSLPQ	VYFPFGPIHNS(*L)PQ
SLVYFPFGPIHNSLPQ	SL(*V)YFPFGPIHNSLPQ
VYFPFGPIP	(*V)YFPFGPIP
SLVYFPFGPIP	SL(*V)YFPFGPIP
VYFPFGPIPNSLPQ	VYFPFGPIPNS(*L)PQ
SLVYFPFGPIPNSLPQ	SL(*V)YFPFGPIPNSLPQ

Phương pháp của sáng chế cần bổ sung ít nhất hai peptit được đánh dấu bằng đồng vị vào mẫu. Tuy nhiên, để độ chính xác cao hơn, ba, bốn peptit được đánh dấu bằng đồng vị hoặc có thể nhiều hơn được bổ sung vào mẫu này.

Phương pháp LC-MS/MS cho phép xác định dễ dàng sự có mặt của peptit bất kỳ trong số các peptit phân giải dựa trên thời gian duy trì của các peptit và tỷ lệ ion của các mảnh được tạo ra khi được phân tích theo chế độ MS/MS. Chế độ này được gọi theo cách khác là chế độ theo dõi nhiều phản ứng (multiple reaction monitoring: MRM), hoặc chế độ theo dõi phản ứng chọn lọc (selected reaction monitoring: SRM). So sánh mức độ đáp ứng của mỗi peptit với peptit làm chất chuẩn nội được đánh dấu bằng đồng vị có mặt trong hỗn hợp và với đường cong chất chuẩn được vẽ đồng thời cho phép xác định được nồng độ của mỗi peptit, từ đó nồng độ của các biến thể beta-casein typ A1 trong chế phẩm và các biến thể beta casein typ A2 trong chế phẩm có thể được tính toán.

Bàn luận về các ví dụ

Ví dụ về các bước thử nghiệm được thể hiện dưới đây. Ví dụ 1 thể hiện quy trình mà các mẫu có thể được chuẩn bị để phân tích. Quy trình này thường bao gồm bước chiết các beta-casein thành trạng thái có chứa nước, trong đó chúng có thể được giải phóng nhờ tác dụng của chất làm biến tính chaotrop như ure, sao cho tác dụng sau

đó của chymotrypsin đối với mẫu này hữu hiệu hơn. Trong trường hợp mẫu ở dạng lỏng như sữa nguyên chất hoặc sữa UHT, quy trình này chỉ bao gồm bước chuyển phần phân ước của mẫu vào bình và bổ sung chất làm biến tính. Đối với các mẫu ở dạng rắn hoặc bán rắn, quá trình này bao gồm bước điều chế dung dịch được xác định chính xác của chất rắn được hòa tan trong chất đệm chiết, thường là dung dịch chất đệm. Sau đó, các mẫu được xử lý theo cách giống như đối với các mẫu dạng lỏng.

Ví dụ 2 mô tả bước phân giải bằng chymotrypsin. Các mẫu đã làm biến tính được cho tiếp xúc với dung dịch chứa chymotrypsin trong các điều kiện được kiểm soát cẩn thận. Các điều kiện này thường bao gồm chất đệm để kiểm soát độ pH của dung dịch, do các enzym phân giải protein chỉ có hoạt tính trong khoảng độ pH hẹp. Các điều kiện cũng thường bao gồm sự khuấy cơ học sản phẩm phân giải để làm giảm hoặc loại bỏ hạn chế về sự chuyển khối, và gia nhiệt để xúc tiến phản ứng. Điều này dẫn đến sự phân giải có kiểm soát của các beta-casein, và các protein khác trong chất nền, để tạo ra tập hợp các peptit có thể được xác định duy nhất là có nguồn gốc từ protein cụ thể. Sau một khoảng thời gian định trước, phản ứng được làm ngừng ('dừng') bằng cách bổ sung dung dịch axit đậm đặc trong dung môi hữu cơ, để làm ngừng tức thì sự phân giải. Sau đó, các mẫu được tăng cường bằng cách bổ sung các peptit làm chất chuẩn nội được đánh dấu bằng đồng vị mà sau đó được sử dụng để tính toán nồng độ của các beta-casein.

Ví dụ 3 mô tả quá trình phân tích các mẫu bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng với sự thiết bị phát hiện phổ khối ba tứ cực. Quá trình này tạo ra sự tách các peptit theo không gian và thời gian với nhau, chúng có thể được định lượng riêng biệt bằng cách cho dung môi rửa giải đi qua máy phân tích phổ khối được vận hành theo chế độ theo dõi nhiều phản ứng, hoặc quy trình phát hiện đặc hiệu tương đương như quy trình theo dõi ion chọn lọc có độ phân giải cao. Diện tích đỉnh của các peptit đích được xác định bằng cách lấy tích phân, cũng như các chất chuẩn nội được đánh dấu bằng đồng vị. Sau đó, tỷ lệ diện tích đỉnh được sử dụng để xác định nồng độ của các peptit đích bằng cách so sánh với đường cong chất chuẩn. Để đảm bảo việc các peptit được nhận biết chính xác, các tiêu chí kiểm soát chất lượng như sự phù hợp về thời gian duy trì và sự phù hợp về tỷ lệ ion được sử dụng trong quá trình này.

Trong ví dụ 4, nồng độ của các peptit được sử dụng để tính toán nồng độ của các beta-casein gốc. Nói chung, thu được các hệ số chuyển đổi dựa trên tỷ lệ của khối

lượng peptit với khối lượng của protein gốc, và được sử dụng để chuyển đổi từ nồng độ peptit thành nồng độ protein. Đối với các peptit đích có trình tự trùng nhau mà sau đó nồng độ có thể được tính tổng để thu được tổng hàm lượng beta-casein typ A1, và tổng hàm lượng beta-casein typ A2, cũng như số liệu thu được từ các giá trị này, như tỷ lệ của beta-casein typ A1 trong mẫu so với beta-casein toàn phần.

Ví dụ 5 thể hiện việc áp dụng phương pháp của sáng chế để phân tích nhiều sản phẩm sữa. Các kết quả được so sánh và đối chiếu với kết quả từ các phương pháp hiện hành để xác định tỷ lệ % beta-casein typ A1 trong mẫu sữa hoặc sản phẩm sữa. Đối với nhiều loại chất nền, đã chứng minh được rằng nồng độ của các beta-casein trong mẫu phù hợp với giá trị dự kiến dựa trên hàm lượng protein ghi trên nhãn, và do đó tỷ lệ của các beta-casein typ A1 trong mẫu là chính xác. Ngoài ra, tỷ lệ của các beta-casein typ A1 phù hợp với các phương pháp trước đây đối với các chất nền đơn giản như sữa hoặc sữa bột, nhưng tạo ra sự đánh giá chính xác hơn đối với các sản phẩm được cải biến nhiều như sữa công thức dùng cho trẻ em. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 6.

Cột 1 của Bảng 6 thể hiện thông tin mô tả của các sản phẩm được phân tích. Cột 2 thể hiện hàm lượng protein toàn phần của mỗi mẫu khi được xác định bằng phương pháp phân tích nitơ Kjeldahl. Kết quả này có thể được so sánh với cột 3, cột này thể hiện hàm lượng protein như được ghi trên nhãn của sản phẩm. Nói chung, có sự thống nhất đáng kể giữa hai kết quả này, điều này cho thấy rằng hàm lượng protein ghi trên nhãn là chính xác. Cột 4 thể hiện hàm lượng beta-casein theo lý thuyết của mỗi mẫu, được xác định bằng cách nhân giá trị hàm lượng protein ghi trên nhãn với 0,32, là hệ số chuyển đổi thường được chấp nhận thể hiện tỷ lệ theo khối lượng của beta-casein trong sản phẩm sữa so với hàm lượng protein toàn phần.

Cột 9 thể hiện hàm lượng beta-casein toàn phần, tính theo g/100g, là tổng hàm lượng beta-casein typ A1 và beta-casein typ A2, khi được xác định bằng phương pháp của sáng chế. Nói chung, các kết quả này cho thấy sự thống nhất đáng kể với các giá trị trong cột 4, điều này cho thấy rằng phương pháp theo sáng chế là chính xác và phù hợp với mục đích.

Cột 10 thể hiện tỷ lệ % của các beta-casein typ A1 so với hàm lượng beta-casein toàn phần, được tính theo tổng hàm lượng beta-casein typ A1 và beta-casein typ A2. Các kết quả này có thể được so sánh với kết quả trong cột 5, thể hiện tỷ lệ %

A1 khi được xác định bằng phương pháp phân tích protein nguyên vẹn bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với sự phát hiện tia cực tím. Đối với sữa và sản phẩm sữa không được cải biến đáng kể, có sự thống nhất đáng kể giữa hai hình vẽ này. Tuy nhiên, có sự khác biệt đáng kể trong trường hợp các mẫu sữa công thức dùng cho trẻ em, do tính chất của quá trình sản xuất chúng, là không thích hợp để phân tích khi còn nguyên vẹn và tạo ra nhiều kết quả không đúng. Quan sát được xu hướng tương tự khi so sánh cột 10 với cột 6, cột này thể hiện tỷ lệ % của các beta-casein typ A1 được xác định bằng cách sử dụng phương pháp enzym nguyên thủy sử dụng quá trình phân giải mẫu bằng trypsin với sự hiệu chỉnh sau đó dựa trên chất chuẩn sữa tương đối được pha loãng theo thể tích.

Fig.1 thể hiện tỷ lệ của các beta-casein typ A1 trong loạt các chất chuẩn là sữa tương đối được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp của sáng chế, cũng như phương pháp phân tích HPLC nguyên vẹn. Các mẫu được tạo ra bằng cách pha loãng theo thể tích đối với sữa từ hai động vật riêng biệt, một loại được đánh giá là kiểu gen A1/A1 và do đó tạo ra sữa chứa beta-casein typ A1 tinh khiết, và loại còn lại là kiểu gen A2/A2, do đó tạo ra sữa chứa beta-casein typ A2 tinh khiết. Sự phân nhóm chặt chẽ của các điểm số liệu quanh đường thẳng phù hợp nhất cho thấy phương pháp này là chính xác, như được thể hiện bằng hệ số tương quan ($R^2 = 0,9996$). Độ dốc của đường thẳng (0,9861) được hiểu là thể hiện phương pháp của sáng chế cũng chính xác.

Fig.2 thể hiện lượng beta-casein trong loạt các mẫu sữa và sản phẩm sữa khi được xác định bằng phương pháp của sáng chế, so với hàm lượng beta-casein theo lý thuyết được xác định từ hàm lượng protein của các mẫu. Sự phân nhóm tốt của các điểm số liệu quanh đường thẳng phù hợp nhất cho thấy phương pháp này là chính xác, cũng được thể hiện bằng hệ số tương quan ($R^2 = 0,9075$). Độ dốc của đường thẳng này (0,9075) cũng thể hiện phương pháp của sáng chế là chính xác.

Sáng chế được mô tả thêm cùng với các ví dụ sau. Cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: chuẩn bị mẫu

Các mẫu dạng lỏng – Đối với các mẫu dạng lỏng không nhớt, ví dụ, sữa, chất

lỏng (40 μ l) được chuyển vào ống ly tâm có dung tích 2ml. Dung dịch ure (120 μ l, 500g/l) được bổ sung để làm biến tính protein, và sau đó hỗn hợp được trộn lẫn ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 5 phút.

Các mẫu dạng rắn – Đối với các mẫu dạng rắn hoặc mẫu dạng lỏng nhớt, mẫu (5,00 $\pm$ 0,01g) được cân trọng lượng vào ống falcon (50ml). Dung dịch amoni bicacbonat (46,6ml, 4 g/l) được bổ sung và hỗn hợp được lắc để làm ướt toàn bộ bột. Sau khi ủ ở nhiệt độ 50°C trong 15 phút, hỗn hợp này được lắc cho đến khi đồng nhất. Trong trường hợp sữa công thức dùng cho trẻ em, mẫu (100 μ l) được chuyển vào ống ly tâm có dung tích 2ml, chất kết tủa casein (amoni axetat 150 g/l, độ pH = 4,2, 1000 μ l) được bổ sung và hỗn hợp này được trộn lẫn ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 5 phút và sau đó được ly tâm với lực ly tâm tương đối (RCF) 5000 trong 5 phút. Sau khi lắng gạn dịch nổi bề mặt, chất kết tủa casein (1000 μ l) được bổ sung vào viên vón dạng rắn và hỗn hợp được trộn lẫn ở tốc độ 2000 vòng/phút và sau đó được ly tâm với lực 5000 RPM trong 5 phút trước khi lắng gạn dịch nổi bề mặt. Nước (1000 μ l) được bổ sung vào viên vón dạng rắn, bước trộn lẫn và ly tâm được lặp lại và dịch nổi bề mặt được lắng gạn. Dung dịch ure (120 μ l, 500 g/l) được bổ sung để làm biến tính protein, và sau đó hỗn hợp được trộn lẫn với tốc độ 2000 trong 5 phút.

Ví dụ 2: sự phân giải bằng chymotrypsin

Dung dịch chymotrypsin (1000 μ l) được bổ sung vào mẫu được chuẩn bị theo Ví dụ 1. Hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 8 giờ trong khi lắc với tốc độ 200 vòng/phút. Dung dịch làm ngừng phản ứng (120 μ l, dung dịch axit formic 500 g/l) được bổ sung và hỗn hợp được trộn lẫn ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 5 phút và được ly tâm với lực 10000 RCF trong 10 phút. Mẫu (980 μ l) được chuyển vào lọ LC, dung dịch chứa chất chuẩn peptit được đánh dấu bằng đồng vị (20 μ l) được thêm vào, và hỗn hợp được xoay tròn trong 10 giây. Dung dịch chứa chất chuẩn peptit được đánh dấu (Biomatik, sản phẩm đặt hàng, $\geq$ 95,0%) được điều chế bằng cách cân trọng lượng của mỗi peptit (2,00 $\pm$ 0,10mg) trong Bảng 1 vào ống ly tâm polyetylen dung tích 2ml. Các peptit được hòa tan bằng cách cho thêm axetonitril 20% chứa axit formic 0,1%. Thể tích được điều chỉnh để thu được nồng độ bằng 1.000,0 mg/l. Ví dụ, nếu chỉ cân trọng lượng 1,90mg, thì 1,90ml dung dịch được thêm vào. Chất chuẩn peptit đã đánh dấu của Bảng 2 tương ứng với các peptit đích của Bảng 3.

Bảng 2: Chất chuẩn peptit được đánh dấu bằng đồng vị

Peptit	Trình tự	Công thức	Ion $[M+H]^+$ (m/z)
A1C-VN(10)-H	(*V)YFPFGPIHN	$[^{13}C_5, ^{15}N_1]-C_{51}H_{77}N_{11}O_{13}$	1146,32
A1C-SN(12)-H	SL(*V)YFPFGPIHN	$[^{13}C_5, ^{15}N_1]-C_{60}H_{93}N_{14}O_{16}$	1346,56
A1C-VQ(14)-H	VYFPFGPIHNS(*L)PQ	$[^{13}C_6, ^{15}N_1]-C_{69}H_{108}N_{17}O_{19}$	1572,81
A1C-SQ(16)-H	SL(*V)YFPFGPIHNSLPQ	$[^{13}C_5, ^{15}N_1]-C_{79}H_{124}N_{19}O_{22}$	1772,16
A2C-VN(10)-H	(*V)YFPFGPIPN	$[^{13}C_5, ^{15}N_1]-C_{50}H_{77}N_{10}O_{13}$	1106,29
A2C-SN(12)-H	SL(*V)YFPFGPIPN	$[^{13}C_5, ^{15}N_1]-C_{59}H_{93}N_{12}O_{16}$	1306,53
A2C-VQ(14)-H	VYFPFGPIPN(*L)PQ	$[^{13}C_6, ^{15}N_1]-C_{68}H_{108}N_{15}O_{19}$	1532,78
A2C-SQ(16)-H	SL(*V)YFPFGPIPNSLPQ	$[^{13}C_5, ^{15}N_1]-C_{78}H_{124}N_{17}O_{22}$	1732,02

Bảng 3: các peptit đích

Peptit	Trình tự	Công thức	Ion $[M+H]^+$ (m/z)
A1C-VN(10)	VYFPFGPIHN	$C_{56}H_{77}N_{13}O_{13}$	1140,28
A1C-SN(12)	SLVYFPFGPIHN	$C_{65}H_{93}N_{15}O_{16}$	1340,65
A1C-VQ(14)	VYFPFGPIHNSLPQ	$C_{75}H_{108}N_{18}O_{19}$	1565,81
A1C-SQ(16)	SLVYFPFGPIHNSLPQ	$C_{84}H_{124}N_{20}O_{22}$	1766,16
A2C-VN(10)	VYFPFGPIPN	$C_{55}H_{77}N_{11}O_{13}$	1100,39
A2C-SN(12)	SLVYFPFGPIPN	$C_{64}H_{93}N_{13}O_{16}$	1300,62
A2C-VQ(14)	VYFPFGPIPNSLPQ	$C_{74}H_{108}N_{16}O_{19}$	1525,78
A2C-SQ(16)	SLVYFPFGPIPNSLPQ	$C_{83}H_{124}N_{18}O_{22}$	1726,13

Ví dụ 3: Phân tích bằng phương pháp LC-MS/MS

Các mẫu (1µl) được bơm vào cột Waters Xselect HSS T3 C18 (2,5µm x 2,1mm x 50mm) được gắn với thiết bị Phenomenex KrudCatcher bằng cách sử dụng hệ thống LC Thermo Vanquish. Các thông số tách được tóm tắt trong Bảng 4. Tóm lại, gradien được thực hiện từ axetonitril 20% đến axetonitril 40% để tách các peptit đích, trong các thời điểm mà dung môi rửa giải được cho đi qua phổ kế khối để phát hiện. Sau đó, cột được rửa bằng dòng chảy tăng tốc trước khi bắt đầu bơm mẫu tiếp theo. Trong thời

gian rửa này, các thành phần không mong muốn được chuyển hướng vào nước thải, và tắt quá trình thu thập số liệu.

Bảng 4: thông số gradien và thông số thu thập được chọn

Thời gian	% A	% B	Dòng	Chuyển hướng	Thu thập MS
0,0	80	20	0,5	1-6	Tắt
0,5	80	20	0,5	1-2	Bật
4,0	60	40	0,5	1-2	Tắt
4,5	0	100	0,8	1-6	Tắt
6,0	0	100	0,8	1-6	Tắt
6,5	80	20	0,8	1-6	Tắt
7,5	80	20	0,5	1-6	Tắt
8,0	80	20	0,5	1-6	Tắt

Quá trình thu thập số liệu phổ khối được thực hiện bằng cách sử dụng phổ kế khối Thermo TSQ Altis, vận hành ở chế độ MRM ion vị trí. Mỗi peptit có cả sự chuyển đổi bộ định lượng và bộ định tính, tạo ra tổng cộng 32 chế độ MRM. Tất cả các chế độ này được theo dõi liên tục trong quá trình thu thập số liệu mà không cần sử dụng việc lập chương trình. Thời gian dừng được thiết lập đến 10 ms, độ phân giải Q1 và Q3 được thiết lập đến 2 Da, và áp lực khí CID được thiết lập đến 2 mTorr (0,27Pa). Phần liệt kê về sự chuyển đổi và các thông số liên quan được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5: Số liệu MRM của phương pháp theo dõi mười sáu peptit đích

Ký hiệu	Sự chuyển đổi	Sử dụng	CE (V)	Rf (V)
A1C-VN(10)	571,2 → 440,1	Bộ định lượng	16	60
	571,2 → 634,3	Bộ định tính	22	60
A1C-SN(12)	671,2 → 878,6	Bộ định lượng	21	60
	671,2 → 300,2	Bộ định tính	22	60
A1C-VQ(14)	783,9 → 244,4	Bộ định lượng	27	70
	783,9 → 652,5	Bộ định tính	22	70
A1C-SQ(16)	883,5 → 244,4	Bộ định lượng	28	70
	883,5 → 1523,1	Bộ định tính	25	70
A1C-VN(10)-H	574,2 → 440,1	Bộ định lượng	16	60
	574,2 → 634,3	Bộ định tính	22	60
A1C-SN(12)-H	674,3 → 878,6	Bộ định lượng	21	60
	674,3 → 306,2	Bộ định tính	22	60
A1C-VQ(14)-H	787,4 → 244,4	Bộ định lượng	27	70
	787,4 → 656,0	Bộ định tính	22	70
A1C-SQ(16)-H	886,8 → 244,4	Bộ định lượng	28	70
	886,8 → 1523,1	Bộ định tính	25	70
A2C-VN(10)	1100,6 → 594,3	Bộ định lượng	39	60
	1100,6 → 838,4	Bộ định tính	37	60

A2C-SN(12)	1300,7 → 594,4	Bộ định lượng	42	60
	1300,7 → 838,4	Bộ định tính	42	60
A2C-VQ(14)	763,4 → 244,2	Bộ định lượng	20	70
	763,4 → 655,4	Bộ định tính	19	70
A2C-SQ(16)	863,5 → 244,2	Bộ định lượng	24	70
	863,5 → 655,3	Bộ định tính	20	70
A2C-VN(10)-H	1107,0 → 594,3	Bộ định lượng	39	60
	1107,0 → 838,4	Bộ định tính	37	60
A2C-SN(12)-H	1307,1 → 594,4	Bộ định lượng	42	60
	1307,1 → 838,4	Bộ định tính	42	60
A2C-VQ(14)-H	767,4 → 244,2	Bộ định lượng	20	70
	767,4 → 662,4	Bộ định tính	19	70
A2C-SQ(16)-H	867,0 → 244,2	Bộ định lượng	24	70
	867,0 → 655,3	Bộ định tính	20	70

Ví dụ 4: Xác định nồng độ của biến thể beta-casein typ A1 và biến thể beta-casein typ A2

Các phép tính được thực hiện tự động bằng cách sử dụng bảng tính điện tử kỹ thuật số đã được thiết kế sẵn, mặc dù chúng có thể được thực hiện bằng tay. Nồng độ của các biến thể beta-casein A1 được tính toán bằng cách cộng kết quả nồng độ của mỗi peptit là thương số của khối lượng protein gốc và khối lượng peptit, sau đó nhân với hệ số chuẩn bị:

$$C_{A1-\beta CN} = \left(\left(C_{A1C-VN(10)} \times \frac{MW_{A1-\beta CN}}{MW_{A1C-VN(10)}} \right) + \left(C_{A1C-SN(12)} \times \frac{MW_{A1-\beta CN}}{MW_{A1C-SN(12)}} \right) + \left(C_{A1C-VQ(14)} \times \frac{MW_{A1-\beta CN}}{MW_{A1C-VQ(14)}} \right) + \left(C_{A1C-SQ(16)} \times \frac{MW_{A1-\beta CN}}{MW_{A1C-SQ(16)}} \right) \right) \times P$$

Phép tính tương tự được sử dụng để tính toán nồng độ của biến thể beta-casein A2, nhưng với khối lượng được điều chỉnh tương ứng:

$$C_{A2-\beta CN} = \left(\left(C_{A2C-VN(10)} \times \frac{MW_{A2-\beta CN}}{MW_{A2C-VN(10)}} \right) + \left(C_{A2C-SN(12)} \times \frac{MW_{A2-\beta CN}}{MW_{A2C-SN(12)}} \right) + \left(C_{A2C-VQ(14)} \times \frac{MW_{A2-\beta CN}}{MW_{A2C-VQ(14)}} \right) + \left(C_{A2C-SQ(16)} \times \frac{MW_{A2-\beta CN}}{MW_{A2C-SQ(16)}} \right) \right) \times P$$

Hệ số chuẩn bị P được tính toán như sau:

$$P = \frac{v_1}{m_1} \times \frac{v_2}{v_3} \times \frac{v_4}{v_5}$$

trong đó v_1 là thể tích cuối của sản phẩm sau khi chiết, m_1 là khối lượng của sản phẩm được cân trọng lượng, v_2 là thể tích trong ống phân giải sau khi làm ngừng,

V_3 là thể tích của chất chiết được bổ sung vào ống phân giải, V_4 là thể tích cuối trong ống LC, và V_5 là thể tích của sản phẩm phân giải được chuyển vào ống LC.

Nồng độ beta-casein toàn phần được tính toán bằng cách cộng tổng nồng độ của hai chất đa hình:

$$C_{Total\beta CN} = C_{A1\beta CN} + C_{A2\beta CN}$$

Tỷ lệ % của biến thể beta-casein A1 trong sản phẩm được tính toán bằng cách chia nồng độ biến thể beta-casein A1 cho tổng nồng độ của các biến thể beta-casein A1 và A2:

$$\%A1 = \frac{C_{A1\beta CN}}{C_{A1\beta CN} + C_{A2\beta CN}} \times 100\%$$

Ví dụ 5: Phân tích sữa và sản phẩm sữa

Các mẫu sữa tươi, sữa bột, sữa công thức dùng cho trẻ em và sữa UHT khác nhau được thử nghiệm theo phương pháp được thể hiện trong các ví dụ từ 1 đến 4. Loạt các chất chuẩn sữa cũng được chuẩn bị và thử nghiệm. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4, trong đó các kết quả được xác định theo phương pháp của sáng chế được so sánh với các phương pháp khác để xác định hàm lượng beta-casein.

Bảng 6: số liệu về nồng độ của các biến thể beta-casein trong sữa và các sản phẩm sữa

Mẫu	Protein Kjeldahl (g/100g)	Protein ghi trên nhãn (g/100g)	bCN theo tính toán (g/100g)	% A1 theo UV nguyên vẹn	% A1 theo trypsin	A1 theo AQ (g/100g)	A2 theo AQ (g/100g)	bCN toàn phần theo AQ (g/100g)	% A1 theo AQ
Sữa (không được làm đồng nhất, A1/A2)	3,62	3,80	1,22	39,79	18,26	0,34	0,84	1,18	28,77
Sữa (nguyên chất béo, A1/A2)	3,17	3,30	1,06	40,93	18,10	0,03	0,07	1,09	28,59
Sữa (ít chất béo, A1/A2)	3,09	3,30	1,06	42,04	19,28	0,35	0,80	1,15	30,26
Sữa (không chứa chất béo, A1/A2)	3,57	4,00	1,28	38,53	18,54	0,34	0,85	1,19	28,52
Sữa bột (nguyên chất béo, A2)	21,3	23,80	7,62	0,00	0,00	0,01	8,11	8,12	0,13
Sữa bột (ít chất béo, A2)	29,9	33,60	10,75	0,00	0,00	0,02	10,89	10,90	0,15
Sữa bột (nguyên chất béo, A1/A2)	21,8	24,00	7,68	35,83	16,03	2,29	6,09	8,39	27,35
Sữa bột (ít chất béo, A1/A2)	29,3	32,80	10,50	34,77	16,78	3,10	7,70	10,81	28,71
Sữa công thức dùng cho trẻ em (giai đoạn 1, A2)	9,41	10,15	1,51	28,24	0,00	0,18	2,15	2,33	7,64
Sữa công thức dùng cho trẻ em (giai đoạn 2, A2)	13,3	15,25	2,82	32,44	0,00	0,14	4,52	4,66	2,94
Sữa công thức dùng cho trẻ em (giai đoạn 3, A2)	12,8	13,91	2,60	38,32	0,67	0,18	3,89	4,07	4,52
Sữa công thức dùng cho trẻ em (giai đoạn 1, A1/A2)	9,6	10,55	1,56	39,56	14,02	0,72	1,85	2,57	28,19
Sữa công thức dùng cho trẻ em (giai đoạn 2, A1/A2)	13,3	15,03	2,80	32,79	14,67	1,08	2,67	3,74	28,71
Sữa công thức dùng cho trẻ em (giai đoạn 3, A1/A2)	15,7	16,10	2,97	43,00	23,37	2,19	4,25	6,44	34,02
Sữa UHT (ít chất béo, A1/A2)	4,82	3,90	1,25	42,96	18,62	0,44	1,12	1,57	28,38
Sữa UHT (nguyên chất béo, A1/A2)	3,73	4,00	1,28	39,20	18,14	0,39	0,91	1,30	30,12

Chất chuẩn là sữa tương đối (0,0% A1)	-	-	-	0,14	0,00	0,00	0,00	1,51	1,52	0,16
Chất chuẩn là sữa tương đối (0,5% A1)	-	-	-	0,44	0,43	0,01	0,01	1,54	1,55	0,48
Chất chuẩn là sữa tương đối (1,0% A1)	-	-	-	0,96	-	0,01	0,01	1,45	1,47	0,92
Chất chuẩn là sữa tương đối (2,0% A1)	-	-	-	1,73	2,55	0,03	0,03	1,45	1,48	1,91
Chất chuẩn là sữa tương đối (5,0% A1)	-	-	-	4,60	4,41	0,07	0,07	1,45	1,52	4,87
Chất chuẩn là sữa tương đối (10,0% A1)	-	-	-	9,68	9,38	0,15	0,15	1,41	1,56	9,80
Chất chuẩn là sữa tương đối (20,0% A1)	-	-	-	20,93	20,93	0,30	0,30	1,22	1,52	20,00
Chất chuẩn là sữa tương đối (40,0% A1)	-	-	-	40,01	37,86	0,57	0,57	0,94	1,51	37,99
Chất chuẩn là sữa tương đối (60,0% A1)	-	-	-	59,88	64,97	0,81	0,81	0,59	1,39	58,02
Chất chuẩn là sữa tương đối (80,0% A1)	-	-	-	-	-	1,08	1,08	0,29	1,37	78,76
Chất chuẩn là sữa tương đối (100% A1)	-	-	-	98,58	-	1,41	1,41	0,00	1,41	99,93

Tài liệu tham khảo

1. Trivedi, M.S., Shah, J.S., Al-Mughairy, S., Hodgson, N.W., Simms, B., Trooskens, G., Van Crieckinge, W., and Deth, R.C., *J. Nutr. Biochem.*, 2014, 25, 1011-1018.
2. WO 1996/014577
3. WO 1996/036239
4. WO 2002/019832
5. WO 2014/193248
6. WO 2015/005804
7. WO 2015/026245
8. WO 2017/171563
9. WO 2018/063008
10. Vincent, D., Elkins, A., Condina, M.R., Ezernieks, V., and Rochfort, S., 2016, *PLOS ONE* 11, e0163471.
11. Givens, I., Aikman, P., Gibson, T., and Brown, R., *Food Chemistry*, 2013, 139, 549-552.
12. Lutter, P., Parisod, V., and Weymuth, H., *J. AOAC Int.*, 2011, 94, 1043-1059.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp xác định lượng biến thể beta-casein typ A1 hoặc biến thể beta-casein typ A2 trong chế phẩm với độ chính xác cao hơn 80%, trong đó các biến thể beta-casein typ A1 là biến thể beta-casein có histidin ở vị trí 67 của trình tự axit amin beta-casein và các biến thể beta-casein typ A2 là biến thể beta-casein có prolin ở vị trí 67 của trình tự axit amin beta-casein, và trong đó chế phẩm này là sữa hoặc sản phẩm được chế biến từ sữa, bao gồm các bước:

- (i) cho chế phẩm tiếp xúc với chymotrypsin trong các điều kiện cho phép phân giải các beta-casein trong chế phẩm này bằng chymotrypsin;
- (ii) thu được dung dịch nước chứa các peptit phân giải beta-casein;
- (iii) xác định nồng độ của:
 - a) hai hoặc nhiều peptit phân giải beta-casein có mặt trong dung dịch này, trong đó mỗi peptit chứa từ 8 đến 20 gốc axit amin và có histidin ở vị trí tương ứng với vị trí 67 của trình tự axit amin beta-casein; và
 - b) hai hoặc nhiều peptit phân giải beta-casein có mặt trong dung dịch này, trong đó mỗi peptit chứa từ 8 đến 20 gốc axit amin và có prolin ở vị trí tương ứng với vị trí 67 của trình tự axit amin beta-casein;bằng cách phân tích hỗn hợp sử dụng phương pháp sắc ký lỏng-phổ khối; và
- (iv) tính toán nồng độ của các biến thể beta-casein typ A1 trong chế phẩm hoặc nồng độ của các biến thể beta-casein typ A2 trong chế phẩm bằng cách sử dụng nồng độ của các peptit phân giải beta-casein xác định được trong bước (iii).

2. Phương pháp như được nêu trong điểm 1, trong đó các biến thể beta-casein typ A1 chứa một hoặc nhiều thành phần bất kỳ trong số beta-casein A1, beta-casein B, beta-casein C, beta-casein F và beta-casein G.

3. Phương pháp như được nêu trong điểm 1 hoặc 2, trong đó các biến thể beta-casein typ A1 chỉ chứa beta-casein A1.

4. Phương pháp như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó các biến thể beta-casein typ A2 chứa một hoặc nhiều thành phần bất kỳ trong số beta-casein A2, beta-casein A3, beta-casein D, beta-casein E, beta-casein H1, beta-casein H2 và beta-casein I.
5. Phương pháp như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó các biến thể beta-casein typ A2 chỉ chứa beta-casein A2.
6. Phương pháp như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó các biến thể beta-casein typ A1 chỉ chứa beta-casein A1 và các biến thể beta-casein typ A2 chỉ chứa beta-casein A2.
7. Phương pháp như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó nồng độ của ba hoặc bốn peptit phân giải beta-casein có histidin ở vị trí tương ứng với vị trí 67 của trình tự axit amin beta-casein được xác định.
8. Phương pháp như được nêu trong điểm 7, trong đó sữa này là sữa bò và các peptit phân giải beta-casein được chọn từ nhóm bao gồm:
- (i) VYPFPGPIHN;
 - (ii) SLVYPFPGPIHN;
 - (iii) VYPFPGPIHNSLPQ; và
 - (iv) SLVYPFPGPIHNSLPQ.
9. Phương pháp như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó nồng độ của ba hoặc bốn peptit phân giải beta-casein có prolin ở vị trí tương ứng với vị trí 67 của trình tự axit amin beta-casein được xác định.
10. Phương pháp như được nêu trong điểm 8, trong đó sữa này là sữa bò và các peptit phân giải beta-casein được chọn từ nhóm bao gồm:
- (i) VYPFPGPIP N;
 - (ii) SLVYPFPGPIP N;
 - (iii) VYPFPGPIP NSLPQ; và
 - (iv) SLVYPFPGPIP NSLPQ.

11. Phương pháp như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó hỗn hợp được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng-phổ khối chứa các peptit được đánh dấu bằng đồng vị tương ứng với mỗi peptit trong số các peptit từ mục a) và b) của bước (iii).

12. Phương pháp như được nêu trong điểm 11, trong đó các peptit được đánh dấu bằng đồng vị tương ứng với các peptit phân giải như sau:

peptit phân giải	peptit được đánh dấu bằng đồng vị
VYFPFGPIHN	(*V)YFPFGPIHN
SLVYFPFGPIHN	SL(*V)YFPFGPIHN
VYFPFGPIHNSLPQ	VYFPFGPIHNS(*L)PQ
SLVYFPFGPIHNSLPQ	SL(*V)YFPFGPIHNSLPQ

13. Phương pháp như được nêu trong điểm 11, trong đó các peptit được đánh dấu bằng đồng vị tương ứng với các peptit phân giải như sau:

peptit phân giải	peptit được đánh dấu bằng đồng vị
VYFPFGPIP	(*V)YFPFGPIP
SLVYFPFGPIP	SL(*V)YFPFGPIP
VYFPFGPIPNSLPQ	VYFPFGPIPNS(*L)PQ
SLVYFPFGPIPNSLPQ	SL(*V)YFPFGPIPNSLPQ

14. Phương pháp như được nêu trong điểm 1, trong đó sữa này là sữa bò và nồng độ của các peptit sau đây xác định được trong bước (iii):

- (i) VYFPFGPIHN;
- (ii) SLVYFPFGPIHN;
- (iii) VYFPFGPIHNSLPQ;
- (iv) SLVYFPFGPIHNSLPQ;
- (v) VYFPFGPIP;
- (vi) SLVYFPFGPIP;
- (vii) VYFPFGPIPNSLPQ; và
- (viii) SLVYFPFGPIPNSLPQ.

15. Phương pháp như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó lượng biến thể beta-casein typ A1 và biến thể beta-casein typ A2 trong chế phẩm được xác định với độ chính xác cao hơn 90%.

16. Phương pháp như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó lượng biến thể beta-casein typ A1 và biến thể beta-casein typ A2 trong chế phẩm được xác định với độ chính xác cao hơn 95%.

17. Phương pháp như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó lượng biến thể beta-casein typ A1 và biến thể beta-casein typ A2 trong chế phẩm được xác định với độ chính xác cao hơn 99%.

18. Phương pháp như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó chế phẩm là sữa bò hoặc sản phẩm sữa được chế biến từ sữa bò.

19. Phương pháp như được nêu trong điểm 18, trong đó sữa này là sữa tươi, sữa tươi nguyên chất, sữa bột, sữa lỏng được hoàn nguyên từ sữa bột, sữa đã tách kem, sữa đã làm đồng nhất, sữa đặc có đường, sữa cô đặc, sữa được tạo hương vị, sữa tiệt trùng (UTH), sữa thanh trùng, hoặc sữa không thanh trùng.

20. Phương pháp như được nêu trong điểm 18, trong đó sản phẩm sữa là sữa công thức dùng cho trẻ em, kem, sữa chua, pho mát tươi, pho mát, bơ hoặc kem ăn.

1/1

Fig.1

Chất chuẩn tương đối – Định lượng tuyệt đối (AQ) so với thực tế

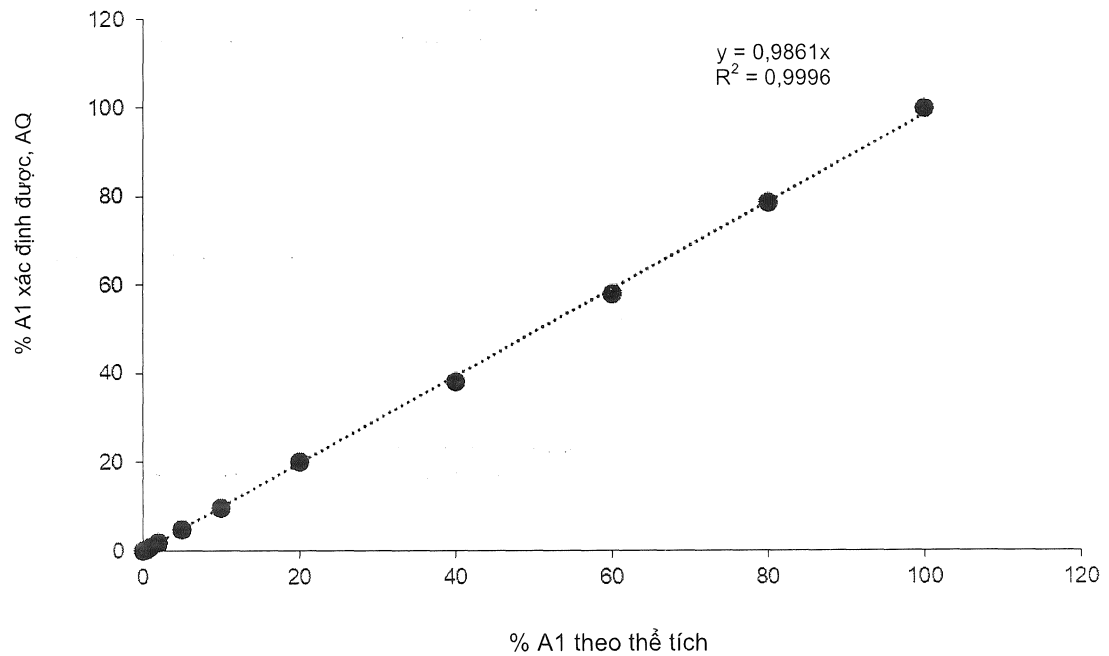


Fig.2

Các sản phẩm sữa – AQ so với bCN theo tính toán

