



(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)



1-0053671

(51)^{2020.01} A23L 33/115; A23L 33/00

(13) B

(21) 1-2021-06041

(22) 26/03/2020

(86) PCT/EP2020/058469 26/03/2020

(87) WO2020/200989 08/10/2020

(30) 19166285.7 29/03/2019 EP

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/02/2022 407A

(73) FrieslandCampina Nederland B.V. (NL)

Stationsplein 4, 3818 LE Amersfoort, the Netherlands

(72) TIMMER-KEETELS, Christina Josephina Antonia Maria (NL); SIEMENSMA, André (NL); VAN LIESHOUT, Glenn Arnoldus Antonius (NL); HUPPERTZ, Thom (NL); NIEUWENHUIJSE, Johannes Andries (NL); GANZEVLES, Renate Antonia (NL).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHẾ PHẨM DINH DƯỠNG TỔNG HỢP VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CHẾ PHẨM DINH DƯỠNG NÀY

(21) 1-2021-06041

- (57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực chế phẩm dinh dưỡng, phương pháp tạo ra và sử dụng chúng. Cụ thể, sáng chế đề cập đến sữa bột công thức ăn liền cho trẻ sơ sinh hoặc trẻ đang phát triển thể hiện các tính chất tiêu hóa mong muốn trong dạ dày. Sáng chế đề cập đến chế phẩm dinh dưỡng chứa casein, các protein nước sữa bao gồm α -lactalbumin (aLac) và β -lactoglobulin (bLac), và các giọt chất béo được phủ protein, trong đó (i) hàm lượng protein trong chế phẩm là từ 5 đến 20% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn là 7-16% khối lượng, tính trên tổng các chất rắn; (ii) hàm lượng aLac + bLac ít nhất là 25% (khối lượng/khối lượng) tính trên mức protein tổng số; (iii) hàm lượng chất béo nằm trong khoảng từ 10% đến 50% (khối lượng/khối lượng) tính trên tổng các chất rắn; và (iv) các giọt chất béo được phủ bằng tải lượng protein trung bình là 2-10 mg/m² và trong đó tỉ lệ khối lượng của casein: (aLac + bLac) trên các giọt chất béo cao hơn ít nhất 4 lần, tốt hơn là cao hơn ít nhất 4,5 lần, so với tỉ lệ khối lượng của casein: protein nước sữa trong tổng chế phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực chế phẩm dinh dưỡng, phương pháp tạo ra và sử dụng chúng. Cụ thể, sáng chế đề cập đến sữa bột công thức ăn liền cho trẻ sơ sinh và trẻ đang phát triển thể hiện các tính chất tiêu hóa mong muốn trong dạ dày.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Từ lâu, các chuyên gia dinh dưỡng đã coi thức ăn hoặc dinh dưỡng tốt nhất cung cấp cho trẻ sơ sinh là sữa mẹ; tức là sữa mẹ tươi. Tuy nhiên, người ta nhận ra rằng nhiều tình huống phát sinh trong đó trẻ sơ sinh không thể được bú sữa mẹ và kết quả là sữa công thức từ sữa bò đã được điều chế và sử dụng để nuôi dưỡng trẻ sơ sinh. Sữa công thức này chứa hỗn hợp casein và protein nước sữa để cung cấp đặc tính axit amin gần giống với sữa mẹ nhất có thể. Nhiều nỗ lực đã được thực hiện để cải tiến sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh để gần giống hơn với sữa mẹ.

Hệ protein của sữa mẹ và sữa bò khác nhau về cơ bản, cả về định lượng và định tính. Sự khác biệt về định lượng nổi bật bao gồm hàm lượng protein tổng số thấp hơn, thường được thể hiện là hàm lượng nitơ tổng số nhân với 6,25 hoặc 6,38, của sữa mẹ (11 g/L) so với sữa bò (33-35 g/L). "Ngày càng có nhiều bằng chứng chỉ ra rằng, so với trẻ bú mẹ, việc hấp thụ lượng protein cao hơn ở trẻ được nuôi bằng sữa công thức gây tăng cân nhanh trong năm đầu đời mà có thể ảnh hưởng đến cấu tạo cơ thể sau này. Sự khác biệt khác đó là sữa mẹ không chứa β -lactoglobulin (bLac).

Nitơ tổng số chứa các thành phần trong sữa có thể được chia thành nitơ từ protein thật và nitơ không từ protein (NPN), với các casein và các protein huyết thanh (protein huyết thanh còn được gọi là protein nước sữa) là các nhóm protein chính. Casein là các protein từ sữa mà kết tủa tại độ pH 4,6, trong khi protein nước sữa hòa tan tại độ pH này. Trong sữa mẹ trưởng thành, tỉ lệ protein nước sữa so với casein là khoảng 60:40 đến 50:50, trong khi tỉ lệ protein nước sữa so với casein là khoảng 18:82 ở sữa bò. Phần casein trong sữa bò bao gồm α_{s1} -, α_{s2} , β - và κ -casein, trong khi α_{s2} -casein dường như là không có mặt trong sữa mẹ. Ngoài ra, thành phần của phần protein nước sữa cũng khác

giữa sữa mẹ và sữa bò. Các protein nước sữa phong phú nhất trong sữa mẹ là α -lactalbumin, lactoferrin và các globulin miễn dịch, trong khi phần protein nước sữa của sữa bò bao gồm khoảng ~50% β -lactoglobulin và ~15% α -lactalbumin.

Hàm lượng chất béo của sữa mẹ tăng lên trong suốt quá trình biểu hiện, điều này có nghĩa là thành phần của sản phẩm đi vào dạ dày của trẻ sơ sinh là thành phần động. Sữa đầu luôn chứa chỉ 2% chất béo, trong khi hàm lượng chất béo trong sữa sau có thể là 8% hoặc thậm chí cao hơn. Điều này dẫn đến việc ăn sữa mẹ ban đầu với giá trị calo thấp hơn, sau đó là sự tăng giá trị calo với việc tăng hàm lượng chất béo. Kết quả là, quá trình làm trống dạ dày mà chủ yếu được điều chỉnh bởi giá trị calo, tuân theo mô hình “chia pha”, hai pha với pha làm rỗng nhanh ban đầu bằng nước và làm rỗng bị trì hoãn bằng chất béo. Ngược lại, sữa công thức thông thường cho trẻ sơ sinh thường có bản chất đồng nhất, và do đó rỗng với giá trị calo không đổi tại tốc độ ổn định hơn và chậm hơn khi so với sữa mẹ.

Vì thế, không chỉ quan trọng trong việc điều chế sữa công thức cho trẻ sơ sinh bằng cách trộn một cách thích hợp các thành phần dinh dưỡng, bao gồm việc thay đổi các tỉ lệ của các chất béo thực vật được chọn được kết hợp một cách tùy chọn với chất béo từ sữa để thu được thành phần gần giống với thành phần của sữa mẹ, mà còn đảm bảo sự hấp thụ tối ưu các chất dinh dưỡng bằng cách chia pha tiêu hóa và làm rỗng dạ dày. Điều này sẽ giúp ngăn sự quá tải protein và chất béo trong ruột và do đó sẽ dẫn đến ảnh hưởng có lợi về sức khỏe đối với sự thoải mái của đường tiêu hóa, điều hòa năng lượng và sức khỏe chuyển hóa. Tổng quát là, sự tiêu hóa và các động lực hấp thụ được tối ưu hóa của sữa công thức có thể còn góp phần vào sự phát triển khỏe mạnh bình thường như được quan sát với trẻ sơ sinh được bú mẹ.

Trong nỗ lực để phát triển phương pháp cho trẻ sơ sinh ăn mà cung cấp sự tăng từ từ hàm lượng chất béo mà giống với của việc cho bú mẹ, US2006/188614 bộc lộ phương pháp bao gồm bước (a) cho trẻ sơ sinh ăn bằng đương lượng sữa đầu có thể tích, ví dụ là 30-60% của tổng bữa ăn và tỉ lệ phần trăm chất béo ví dụ là 2,5-3,5%; và (b) cho trẻ sơ sinh ăn bằng đương lượng sữa sau có thể tích, ví dụ là 40-70% của tổng bữa ăn và tỉ lệ phần trăm của chất béo, ví dụ là 3,7-5,5%. Để đạt được mục đích đó, đề xuất việc cho ăn được thực hiện với chai mà được chia thành hai ngăn, một ngăn được nạp đầy bằng đương lượng sữa đầu và ngăn còn lại có đương lượng sữa sau, chai này được thiết kế theo cách cho phép trẻ sơ sinh ăn đầu tiên là đương lượng sữa đầu và sau

đó là đương lượng sữa sau được trộn lẫn dần dần với đương lượng sữa đầu. Mặt hạn chế của phương pháp này đó là nhiều chế phẩm cần được điều chế và sản phẩm, mỗi chế phẩm ở lượng mong muốn.

EP2296494B1 nhằm mục đích cung cấp chế phẩm dinh dưỡng đơn mà có thể bắt chước sự khác biệt nồng độ chất béo của sữa mẹ. Được bộc lộ là sữa công thức cho trẻ sơ sinh có lượng các giọt chất béo đủ với đường kính tăng (5-25 μm) so với sữa công thức cho trẻ sơ sinh chuẩn. Do các khác biệt ở tỉ trọng giữa chất béo và nước, các giọt chất béo sẽ "nổi kem" để dẫn đến nồng độ chất béo tăng ở phần trên của vật chứa, ví dụ chai uống so với phần dưới của vật chứa. Tuy nhiên, có thể mất thời gian đáng kể trước khi gradien chất béo này được thiết lập trong chai. Ví dụ thậm chí khi các giọt có kích thước 15 micromet, người ta có thể tính là quá trình nổi kem sẽ mất thời gian dài (ví dụ khoảng 1 giờ đối với giọt có kích thước này để nổi kem vài xentimet (ví dụ 3-6)). Hơn nữa, sữa cho trẻ sơ sinh này sẽ không đồng nhất, mà luôn không được coi là hấp dẫn lắm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, các tác giả sáng chế đã nhắm đến việc phát triển chế phẩm dinh dưỡng dựa trên sữa bò mà bắt chước sự giải phóng được chia pha của sữa mẹ mà không dựa vào việc thiết lập gradien chất béo trước khi sử dụng chế phẩm cho trẻ sơ sinh. Lý tưởng là, chế phẩm này ổn định và đồng nhất, và không gây ra sự nổi kem hoặc sự tạo thành "các mắt béo" nhìn thấy trong chai uống. Hơn thế nữa, chế phẩm 'giải phóng chia pha' này tốt hơn là có thể được sản xuất theo cách mà ảnh hưởng tối thiểu đến hoạt tính sinh học được tạo ra bởi các globulin miễn dịch (Ig) sữa bò.

Ít nhất một số mục đích này được đáp ứng bằng sự phát hiện bất ngờ là sự nổi kem chất béo trong dạ dày có thể được cảm ứng bởi sữa công thức chứa các giọt chất béo mà chủ yếu được phủ bởi các casein thu được từ sữa. Các casein được thủy phân trong dạ dày rất nhanh (thậm chí tại độ pH 6). Vì các casein đã thủy phân ở mặt phân cách của giọt chất béo và chế phẩm nước còn lại là không ổn định, các giọt này bắt đầu kết bông và các hạt lớn chứa chất béo được tạo thành mà bắt đầu nổi kem. Bình thường, các giọt chất béo trong sữa công thức cho trẻ sơ sinh có đường kính là khoảng 0,5 micromet. Các giọt chất béo có kích thước này, được phủ bằng chủ yếu là các casein, sẽ kết bông ở sự tiêu hóa "sớm" trong dạ dày (pH 6,0 đến pH 5,5), để dẫn đến sự tách pha thành lớp đáy ít chất béo và lớp trên giàu chất béo. Kèm theo đó, việc làm rộng dạ dày

của chế phẩm dinh dưỡng này bao gồm pha chất béo thấp ban đầu mà sau đó là pha (được tri hoãn) chất béo đi vào ruột.

Do đó, sáng chế đề cập đến chế phẩm dinh dưỡng chứa casein, các protein nước sữa bao gồm α -lactalbumin (aLac) và β -lactoglobulin (bLac), và các giọt chất béo được phủ protein, trong đó

(i) hàm lượng protein của chế phẩm là từ 5 đến 20% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn là 7-16% khối lượng, tính trên tổng các chất rắn;

(ii) hàm lượng aLac + bLac ít nhất là 25% (khối lượng/khối lượng) tính trên mức protein tổng số;

(iii) hàm lượng chất béo nằm trong khoảng từ 10% đến 50% (khối lượng/khối lượng); và

(iv) các giọt chất béo được phủ protein được phủ bằng tải lượng protein trung bình là 2-15 mg/m² và trong đó tỉ lệ khối lượng của casein: (aLac + bLac) trên các giọt chất béo cao hơn ít nhất 4 lần so với tỉ lệ liên kết của casein: (aLac + bLac) trong tổng chế phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Các kiểu SDS-PAGE trong điều kiện khử thể hiện các băng tương ứng với casein, aLac và bLac ở các mẫu lấy từ các chế phẩm dinh dưỡng 1-3 của các ví dụ 1-3 và từ hai sản phẩm sữa công thức thương mại cho trẻ sơ sinh. Các làn được chỉ ra với (P) thể hiện tổng các thành phần, và các làn được chỉ ra với (F) là các phần chất béo của chúng bao gồm các giọt chất béo được phủ protein.

Hình 2: Các hình ảnh chụp về hành vi vĩ mô của sữa cho trẻ sơ sinh sau khi tiêu hóa ở dạ dày của trẻ sơ sinh được mô phỏng tại 37°C. Thời gian tiêu hóa và độ pH được chỉ ra.

Hình 3: Tổng của IgG, IgA và IgM hoạt tính trong các bột nền IF được điều chế theo phương pháp được mô tả trong ví dụ 1 và được gia nhiệt tại các nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 80°C. Các sản phẩm được điều chế và được phân tích lặp lại ba lần. Bảng A: nồng độ tuyệt đối tính theo mg/100 g. Bảng B: tổng IgG, IgM và IgA hoạt tính được biểu hiện so với tổng của tổng số IgG, IgM và IgA ban đầu.

Mô tả chi tiết sáng chế

Khái niệm bao phủ/phủ các giọt chất béo bằng tải lượng protein mà được làm giàu các casein như được bộc lộ trong sáng chế chưa được bộc lộ hoặc được gợi ý trong

tình trạng kỹ thuật. Đã có báo cáo rằng sự cải biến các giọt chất béo (còn được đề cập đến trong tình trạng kỹ thuật là 'các viên lipit') có thể được sử dụng để điều biến tốc độ và phạm vi của sự tạo thành khối tụ protein trong dạ dày và/hoặc để làm tăng tốc độ làm rỗng dạ dày. Tuy nhiên, các phương pháp này tập trung vào việc phủ các giọt chất béo bằng các thành phần lipit đã xác định.

Ví dụ, WO2010/027259 liên quan đến lĩnh vực sữa công thức cho trẻ sơ sinh và sữa cho trẻ đang phát triển để ngăn ngừa bệnh béo phì sau này khi lớn. Tài liệu bộc lộ chế phẩm dinh dưỡng chứa từ 10 đến 50% khối lượng các lipit thực vật tính trên khối lượng khô của chế phẩm, và i) từ 0,5 đến 20% khối lượng các phospholipit tính trên tổng số các lipit hoặc ii) từ 0,6 đến 25% khối lượng của các lipit phân cực tính trên tổng số các lipit, trong đó các lipit phân cực là tổng của các phospholipit, glycosphingolipit và cholesterol, và chế phẩm này chứa các viên lipit với lõi chứa các lipit thực vật đã nêu và lớp phủ chứa các phospholipit hoặc lipit phân cực đã nêu.

WO2016/163882 đề cập đến phương pháp làm giảm tốc độ và phạm vi của sự tạo thành khối tụ protein ở dạ dày và/hoặc làm tăng tốc độ làm rỗng dạ dày ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này chế phẩm dinh dưỡng chứa các cacbohydrat, protein, và các viên lipit, trong đó protein này bao gồm casein và viên lipit bao gồm các triglyxerit thu được từ chất béo thực vật và các phospholipit thu được từ sữa động vật có vú không phải người. Các viên lipit có đường kính kiểu từ 2 đến 6 μm và/hoặc diện tích bề mặt riêng là từ 0,5 đến 15 m^2/g lipit, và các viên lipit bao gồm lớp phủ chứa các phospholipit.

Chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế chứa casein, các protein nước sữa, cụ thể là α -lactalbumin và β -lactoglobulin, và các giọt chất béo được phủ protein.

Tổng hàm lượng protein trong chế phẩm là từ 5 đến 20% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn là 7-16 % khối lượng, tính trên tổng các chất rắn. Tổng lượng α -lactalbumin và β -lactoglobulin ít nhất là 25% (khối lượng/khối lượng) tính trên mức protein tổng số.

Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế có hàm lượng protein thấp, tức là hàm lượng protein trong chế phẩm theo sáng chế nhỏ hơn 4 g trên 100 kCal, ví dụ nhỏ hơn 3,8 g trên 100 kCal, tốt hơn là nhỏ hơn 3,0 g / 100 kCal, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 2 g / 100 kCal. Thậm chí tốt hơn nữa là, hàm lượng protein trong chế phẩm theo sáng

chế là giữa 0,95 g và 3,8 g trên 100 kCal, đặc biệt tốt hơn là giữa 1,0 g và 2,5 g mỗi 100 kCal, tốt nhất là giữa 1,6 và 1,8 g trên mỗi 100 kCal.

α -lactalbumin và β -lactoglobulin dễ sử dụng trong sáng chế có thể thu được từ nguồn protein nước sữa thích hợp bất kỳ. Ví dụ, một trong hai hoặc cả hai loại trong số α -lactalbumin và β -lactoglobulin thu được từ sữa, từ nước sữa pho mát, từ nước sữa casein axit hoặc từ huyết thanh sữa hoặc từ các biến thể dạng cô đặc, được pha loãng, được khử khoáng hoặc dạng bột của chúng. Ngoài α -lactalbumin và β -lactoglobulin, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các protein nước sữa khác nữa, như albumin huyết thanh, lactoferrin và/hoặc các globulin miễn dịch. Theo khía cạnh cụ thể, nó chứa tất cả các protein "không phải casein" như được tìm thấy trong sữa bò.

Để cho phép tiêu hóa protein một cách tối ưu, α -lactalbumin và β -lactoglobulin trong chế phẩm theo sáng chế chủ yếu ở trạng thái tự nhiên ví dụ từ tổng lượng của α -lactalbumin và β -lactoglobulin >50% hòa tan được tại độ pH 4,6. Tốt hơn là, ít nhất 60% của α -lactalbumin và β -lactoglobulin là tự nhiên, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, tốt nhất là ít nhất 90%, hoặc ít nhất 95%. Điều này đạt được một cách thích hợp bằng cách sử dụng các protein mà không được tiếp xúc với các nhiệt độ trên 85°C (ví dụ xử lý UHT) mà tại đó > 50% số protein nước sữa bị biến tính. Tốt hơn là, các nguồn của aLac và bLac được sử dụng đã trải qua ít nhất một xử lý nhiệt trong 15 giây tại 72°C hoặc xử lý nhiệt "nhẹ" tương đương.

Cũng vậy, casein có thể thu được từ các nguồn phổ biến. Theo một phương án, casein được chọn từ nhóm bao gồm casein mixen, casein không phải mixen, casein axit, canxi caseinat, magie caseinat, natri caseinat, kali caseinat và amoni caseinat, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Casein này ví dụ có thể thu được từ sữa toàn phần, sữa tách kem và/hoặc chất cô protein sữa.

Thông thường, tỉ lệ khối lượng của các casein so với tổng số các protein nước sữa (tức là α -lactalbumin, β -lactoglobulin, và tùy ý còn các protein nước sữa khác) trong chế phẩm dinh dưỡng nằm trong khoảng là 70:30-20:80, ví dụ 60:40-20:80, 55:45-25:75 hoặc 50:50-20:80. Tốt hơn là, tỉ lệ khối lượng của các casein so với tổng số các protein nước sữa nằm trong khoảng là 50:50-30:70.

Hàm lượng chất béo của chế phẩm dinh dưỡng nằm trong khoảng từ 10% đến 50% (khối lượng/khối lượng) tính trên tổng các chất rắn. Theo một phương án, hàm lượng chất béo là 15-40% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn là 25-35 % khối lượng.

Trong khi tỉ lệ khối lượng của tổng chất béo so với protein tổng số không quan trọng, tốt hơn là nó nằm trong khoảng là 3,5:1-1:1,5.

Tốt hơn là, chất béo này được đồng nhất hóa để thu được sản phẩm ổn định và đồng nhất trong đó chất béo chủ yếu có mặt trong chế phẩm ở dạng các giọt chất béo được phủ protein. Theo một khía cạnh, các giọt chất béo này có lõi mà gồm ít nhất 90% khối lượng, tốt hơn là ít nhất 95% khối lượng các triglycerit. Các giọt chất béo này thông thường có đường kính trung bình nằm trong khoảng từ 0,2 đến 1,0 micromet, tốt hơn là từ 0,3 đến 0,8 micromet, tức là nhỏ hơn nhiều so với sữa mẹ hoặc chế phẩm tổng hợp của EP2296494B1. Bên cạnh các casein và protein nước sữa, bề mặt giọt chất béo có thể chứa vật liệu màng giọt chất béo sữa (MFGM).

Loại nguồn chất béo bất kỳ thường được sử dụng trong các sữa công thức dinh dưỡng (cho trẻ sơ sinh) có thể được sử dụng. Thành phần chất béo của sữa công thức cho trẻ sơ sinh theo truyền thống đã được coi là nguồn năng lượng quan trọng nhất cho trẻ sơ sinh cũng như là yêu cầu cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển bình thường. Tiêu chuẩn dược điển (Codex Standard) được thiết lập đối với lượng chất béo trong sữa công thức cho trẻ sơ sinh là không nhỏ hơn 3,3 gam và không lớn hơn 6,0 gam trên 100 kilocalo sẵn có. Chất béo cung cấp khoảng 9 kilocalo trên mỗi gam. Do đó, chất béo đóng góp từ 30 phần trăm đến 54 phần trăm số kilocalo sẵn có trong sữa công thức cho trẻ sơ sinh. Trong sữa công thức thương mại nhất cho trẻ sơ sinh, chất béo cung cấp khoảng một nửa số năng lượng thức ăn.

Chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế là chế phẩm dinh dưỡng tổng hợp, tức là nó được sản xuất bởi con người. Chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế không phải là sữa từ động vật có vú, như sữa mẹ.

Theo một phương án, nguồn chất béo là chất béo từ sản phẩm sữa, dầu thực vật, chất béo thực vật, dầu thực vật được hydro hóa, dầu từ thủy sản, dầu tảo, dầu đơn bào hoặc hỗn hợp của loại bất kỳ trong số các loại đã nêu. Nguồn chất béo này tốt hơn là có tỉ lệ các axit béo n-6 so với n-3 là từ khoảng 5:1 đến khoảng 15:1; ví dụ, từ khoảng 8:1 đến khoảng 10:1. Theo khía cạnh được ưu tiên, chế phẩm này chứa chất béo từ sản phẩm sữa, tốt hơn nữa là chất béo từ sản phẩm sữa được chọn từ nhóm bao gồm sữa toàn phần, kem, chất béo từ sữa khan và các phân đoạn từ chất béo từ sữa. Theo một phương án, sự kết hợp của chất béo từ sản phẩm sữa và hỗn hợp chất béo thực vật được sử dụng. Ví dụ, chế phẩm này chứa hỗn hợp của chất béo từ sữa và các dầu thực vật. Các nguồn chất

béo được ưu tiên bao gồm chất béo từ sữa, dầu hướng dương, dầu dừa và dầu hạt cải. Theo khía cạnh cụ thể, chất béo trong chế phẩm này gồm ít nhất 20% khối lượng, tốt hơn là ít nhất 30% khối lượng, chất béo từ sản phẩm sữa.

Tốt hơn là, chế phẩm theo sáng chế cũng chứa nguồn của các axit béo đa chưa no mạch dài, tốt hơn là được chọn từ axit docosahexaenoic (DHA), axit arachidonic (ARA), axit eicosapentaenoic (EPA) và/hoặc axit dihomogamma-linolenic acid (DGLA).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm các bước:

- a. Trộn sữa tách kem và nguồn protein nước sữa bao gồm α -lactalbumin và β -lactoglobulin (và có thể có các protein nước sữa khác),
- b. Thanh trùng hỗn hợp này tại nhiệt độ nhỏ hơn 85°C,
- c. Làm bay hơi tại nhiệt độ nhỏ hơn 68°C,
- d. Bổ sung nguồn chất béo,
- e. Làm đồng nhất,
- f. Sấy phun để thu được chế phẩm dạng bột, và
- g. Tùy ý, hoàn nguyên chế phẩm dạng bột với chất lỏng

Trước khi trộn với các protein nước sữa, sữa tách kem có thể được xử lý bằng lọc màng gồm để làm giảm số lượng vi khuẩn. Để đảm bảo khả năng tiêu hóa tối ưu của các protein sữa, phương pháp này tốt hơn là không bao gồm bước cho α -lactalbumin và β -lactoglobulin tiếp xúc với các điều kiện mà gây ra sự biến tính và/hoặc sự kết tụ của α -lactalbumin và β -lactoglobulin. Theo khía cạnh cụ thể, ít nhất 95% số α -lactalbumin và β -lactoglobulin là tự nhiên.

Tốt hơn là bước thanh trùng này được thực hiện tại nhiệt độ nhỏ hơn 80°C, tốt hơn nữa là từ 70 đến 80°C.

Nguồn của α -lactalbumin và β -lactoglobulin có thể là nước sữa pho mát, nước sữa axit hoặc huyết thanh sữa thu được qua việc lọc màng, tùy ý trong đó nước sữa này được xử lý bằng lọc màng gồm để làm giảm số lượng vi khuẩn. Ví dụ, chế phẩm này chứa nước sữa được khử khoáng, chất cô protein nước sữa hoặc chất cô huyết thanh sữa, các phân đoạn, hoặc các tổ hợp của chúng. Ví dụ, WPC được làm giàu aLac hoặc phospholipid từ sữa có thể được sử dụng.

Theo phương án thay thế, phương pháp tạo ra chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế bao gồm các bước

- a. Chuẩn bị bột nền thứ nhất bao gồm hoặc gồm chủ yếu tương đương ổn định hóa caseinat với lactoza là chất mang.
- b. Chuẩn bị bột nền thứ hai bao gồm α -lactalbumin và β -lactoglobulin (và có thể có các protein nước sữa khác), và tùy ý các protein sữa khác, chất khoáng và các vitamin.
- c. Trộn khô các bột thu được ở các bước a và b, tùy ý cùng với một hoặc nhiều chất phụ gia như các nucleotit, oligosacarit, nguyên tố vi lượng, v.v..

Chế phẩm theo sáng chế trong số những thứ khác được đặc trưng trong đó các giọt chất béo được phủ chủ yếu bằng các casein và protein nước sữa bao gồm α -lactalbumin và β -lactoglobulin, tải lượng protein trung bình là 2-10 mg/m², như 2-6 mg/m², tốt hơn là 3-10 mg/m², như 3-8. Theo một phương án, nó thấp hơn 8 mg/m², ví dụ nằm trong khoảng 3-7 mg/m². Theo khía cạnh cụ thể, tải lượng protein là từ 3 đến 5,5 mg/m².

Hơn thế nữa, tỉ lệ khối lượng của casein: (aLac + bLac) trên các giọt chất béo cao hơn ít nhất 4 lần so với tỉ lệ liên kết của casein: (aLac + bLac) trong tổng chế phẩm. Nói cách khác, các casein trong chế phẩm không được phân bố đều qua toàn bộ chế phẩm mà chúng được làm giàu/được tập trung tại bề mặt của các giọt chất béo. Vì các casein được thủy phân rất nhanh trong các điều kiện dạ dày, các giọt chất béo trở nên không ổn định và bắt đầu kết bông để tạo thành các hạt lớn chứa chất béo. Quá trình nổi kem này gây ra sự tách pha thành pha được làm giàu chất béo ở phía trên và pha chất béo ít ở phía dưới. Tốt hơn là, tỉ lệ khối lượng của casein: (aLac + bLac) trên các giọt chất béo cao hơn ít nhất 4,5, ví dụ ít nhất 4,6, 4,8, 5,0, 5,2 hoặc 5,5 lần so với tỉ lệ khối lượng của casein: (aLac + bLac) trong tổng chế phẩm. Theo một khía cạnh, tỉ lệ giữa (a) tỉ lệ khối lượng của casein: (aLac + bLac) trên các giọt chất béo và (b) tỉ lệ khối lượng của casein: (aLac + bLac) trong tổng chế phẩm nằm tổng khoảng là 4,2-8,0, tốt hơn là 4,5-7,5.

Tải lượng protein trên các giọt chất béo và tỉ lệ của casein: protein nước sữa (aLac+bLac) trong chế phẩm và các phân đoạn của chúng có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực sử dụng phương pháp cắt phân đoạn và tính đến kích thước hạt của giọt chất béo, hàm lượng protein và hàm lượng chất béo. Nếu chế

phẩm này ở dạng khô, nó được hoàn nguyên đầu tiên, ví dụ sử dụng nước được khử khoáng, đến hàm lượng chất béo nằm trong khoảng 2-10% (khối lượng/khối lượng). Sự phân bố kích thước của các giọt chất béo có thể được xác định bằng cách sử dụng thiết bị Malvern Mastersizer. Các giọt chất béo thông thường được tách khỏi phần còn lại của chế phẩm bằng cách sử dụng phương pháp ly tâm tỉ trọng. Việc tách các giọt chất béo được phủ protein khỏi phần còn lại của chế phẩm một cách ưu điểm bao gồm việc làm tăng mật độ của pha lỏng xung quanh các giọt chất béo. Điều này được thực hiện một cách thích hợp bằng cách bổ sung sucroza vào chế phẩm được hoàn nguyên.

Các tỉ lệ giữa các casein và các protein nước sữa α -lactalbumin + β -lactoglobulin trên các giọt chất béo và trong tổng chế phẩm dinh dưỡng được xác định một cách thích hợp bằng điện di gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit (SDS-PAGE) trong các điều kiện khử. Do đó, tỉ lệ dựa trên các tỉ lệ khối lượng sẽ thậm chí cao hơn một chút so với tỉ lệ dựa trên cường độ. Lượng protein sữa trong các băng protein tương ứng với các casein chính (ví dụ β -casein và α -s-casein), aLac và bLac có thể được định lượng bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ bằng phương pháp luận chụp hình không vết nhuộm (cũng xem Ví dụ 5 dưới đây). Theo một phương án, các tỉ lệ protein được xác định bằng cách sử dụng bộ Bio-Rad hệ thống tư liệu hóa Bio-Rad ChemiDoc XRS+ được cho phép không vết nhuộm được cung cấp phần mềm ImageLab.

Thông thường, tỉ lệ giữa các cường độ băng của các casein và các protein nước sữa α -lactalbumin và β -lactoglobulin trong tổng chế phẩm theo sáng chế là dưới 1, và ví dụ nằm trong khoảng từ khoảng 0,35 đến khoảng 0,95. Ngược lại, tỉ lệ đã nêu ở phần chất béo chứa các giọt lipid được phủ protein thường trên 1,5, tốt hơn là ít nhất 1,8, như 2,0 hoặc cao hơn, hoặc 3,0 hoặc cao hơn. Kết quả là, tỉ lệ của casein: (aLac + bLac) trên các giọt chất béo là cao hơn ít nhất 4 lần, tốt hơn là cao hơn ít nhất 4,5 lần, so với tỉ lệ khối lượng của casein: (aLac + bLac) trong tổng chế phẩm.

Chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế có thể ở dạng chế phẩm khô, bán khô hoặc lỏng. Ví dụ, nó là chế phẩm dạng bột mà thích hợp để tạo chế phẩm lỏng sau khi hoàn nguyên bằng dung dịch nước, tốt hơn là bằng nước.

Theo phương án khác, nó là chế phẩm lỏng, ví dụ chế phẩm uống hoặc mức bằng thìa ăn liền. Theo khía cạnh cụ thể, chế phẩm lỏng (bán lỏng) có tổng hàm lượng protein lên đến 30 gam trên mỗi lít. Các lượng tương đối của casein và protein nước sữa

có thể thay đổi. Theo một phương án, hàm lượng casein của chế phẩm lên đến 20 gam trên mỗi lít, tốt hơn là lên đến 18 gam trên mỗi lít.

Chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế có thể là loại sản phẩm bất kỳ để sử dụng trong dinh dưỡng cho động vật có vú, cụ thể là dinh dưỡng cho người. Đối với các tính chất khả năng tiêu hóa độc đáo của nó bắt trước hành vi của dạ dày của sữa mẹ, có ưu điểm là sữa công thức cho trẻ sơ sinh, sữa công thức cho giai đoạn tiếp theo hoặc sữa cho trẻ đang phát triển.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận biết và đánh giá rằng chế phẩm theo sáng chế phát hiện ra nhiều ứng dụng thú vị khác nhau. Ví dụ, nó được sử dụng thích hợp trong phương pháp giải phóng có kiểm soát protein và chất béo vào ruột của đối tượng, tốt hơn là đối tượng người. Các sử dụng khác, mà có thể là trị liệu hoặc không trị liệu, bao gồm phương pháp cải thiện sức khỏe đường tiêu hóa, phương pháp cải thiện sự điều hòa năng lượng và/hoặc phương pháp cải thiện sức khỏe chuyển hóa ở đối tượng. Theo một phương án, sáng chế đề xuất việc sử dụng chế phẩm dinh dưỡng (có thể thu được bằng phương pháp) như được bộc lộ ở đây trong phương pháp giải phóng có kiểm soát protein và chất béo vào trong ruột của đối tượng. Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng chế phẩm dinh dưỡng trong phương pháp duy trì hoặc cải thiện sức khỏe đường tiêu hóa, điều hòa năng lượng và/hoặc sức khỏe chuyển hóa của đối tượng. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế và / hoặc như có thể thu được theo phương pháp của sáng chế, trong phương pháp kiểm soát các động lực tiêu hóa chế phẩm công thức tổng thể ở đối tượng. Như được sử dụng ở đây, "kiểm soát sự tiêu hóa chế phẩm công thức tổng thể" như được sử dụng ở đây được định nghĩa là sự tiêu hóa chế phẩm công thức trong đó lượng ban đầu của chất béo và protein là thấp hơn khi so với lượng cuối cùng của protein và chất béo đang được giải phóng vào ruột non. Được tin là sự tiêu hóa chế phẩm công thức tổng thể có kiểm soát giúp ngăn sự phát triển nhanh chóng của đối tượng như thường được quan sát thấy ở các đối tượng được cho ăn bằng chế phẩm công thức khi so với các đối tượng được bú mẹ. Đối tượng tốt hơn là đối tượng người, tốt hơn nữa là đối tượng người có độ tuổi nằm trong khoảng từ 0 đến 36 tháng.

Protein nước sữa chứa khoảng 10-15% các globulin miễn dịch hoặc các kháng thể. Các globulin miễn dịch là họ kháng thể bảo vệ được phát hiện trong nước sữa. Sự áp dụng khác của chế phẩm "được xử lý nhiệt thấp" theo sáng chế liên quan đến thực tế

rằng nó chứa mức tương đối cao các globulin miễn dịch từ sữa bò nguyên vẹn và có hoạt tính chức năng, mà đã biết là có các tác dụng cải thiện sức khỏe ở người. Cụ thể hơn, các globulin miễn dịch sữa có thể ngăn việc gắn các mầm bệnh vào lớp ngoại biên mà là bước quan trọng trong việc tạo thành sự nhiễm trùng. Đã được báo cáo rằng sữa non của bò hoặc các globulin miễn dịch từ sữa hoặc sữa non của bò được sử dụng qua đường uống đã chứng tỏ hiệu quả trong việc ngăn chặn sự nhiễm trùng gây ra qua đường uống. Các nghiên cứu lâm sàng đã được thực hiện để đánh giá hiệu lực của các sản phẩm sữa miễn dịch ở dạng điều trị ngăn ngừa đối với các nhiễm trùng bệnh viện khác nhau, đặc biệt là những nhiễm trùng gây ra bởi vi khuẩn kháng kháng sinh và *Helicobacter pylori*, tác nhân gây viêm dạ dày mãn tính. El-Loly (Int. J. of Dairy Science, Volume 2 (3): 183-195, 2007) đã đánh giá tổng quan các tính chất của các globulin miễn dịch bò, phân lập chúng từ sữa non và sử dụng trong điều chế sữa miễn dịch bò để ngăn ngừa và điều trị nhiễm khuẩn ở người và động vật.

Do đó, sáng chế cũng đề xuất chế phẩm dinh dưỡng để sử dụng làm "sản phẩm sữa miễn dịch", trong số những sản phẩm khác trong phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị nhiễm khuẩn ở đối tượng, tốt hơn là đối tượng người, tốt hơn nữa là đối tượng người ở độ tuổi từ 0 đến 36 tháng. Tốt hơn là, chế phẩm dinh dưỡng được thanh trùng tại nhiệt độ từ 70 và 80°C. Theo một phương án, sự nhiễm khuẩn này là nhiễm trùng đường tiêu hóa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chế phẩm dinh dưỡng dựa trên huyết thanh sữa

Chế phẩm Hiprotal® Milkserum 60 lỏng (FrieslandCampina, Hà Lan) được trộn với chất thấm sữa (FrieslandCampina, Lochem Hà Lan) để thu được chất cô sữa với 38% khối lượng protein trên tổng số các chất rắn. Chế phẩm Hiprotal® Milkserum 60 lỏng là chất cô protein nước sữa tự nhiên thu được bằng cách vi lọc sữa tách kem sau đó siêu lọc chất thấm vi lọc này.

Do đó, hỗn hợp thu được này được trộn với sữa tách kem được làm nóng (66°C, 30 giây) và được vi lọc, dung dịch lactoza (20% khối lượng/khối lượng) và kem được thanh trùng (85°C, 30 giây). Thành phần của hỗn hợp được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1: thành phần của hỗn hợp trước khi bay hơi

Các chất rắn	21,3%
Chất béo	4,5%

Protein	3,3%
Casein	1,3%
Protein nước sữa	1,9%

Hỗn hợp này sau đó được gia nhiệt tại 72,8°C trong 30 giây, trực tiếp sau đó là bay hơi tới khi 44,5% chất khô bằng cách sử dụng máy bay hơi nén lại hơi cơ học (MVR) với nhiệt độ hơi là 65°C. Sau khi làm nguội, các chất khoáng và vitamin được bổ sung và chất cô thu được được gia nhiệt lên đến 74°C trừ khi được chỉ ra là khác. Chất béo thực vật được phun, sau đó là sự đồng nhất hóa 2 bước tại 120/30 bar. Nhũ tương này sau đó được sấy phun tại nhiệt độ cửa không khí vào là 177°C, nhiệt độ cửa không khí ra là 91,0°C và áp suất vòi phun là 185 bar. Xem Bảng 2 đối với công thức của bột nền IF tạo thành. Sản phẩm này sẽ còn được gọi là Chế phẩm 1.

Bảng 2 Công thức bột nền IF (trên mỗi 100 kg bột)

Thành phần	Khối lượng [kg]
Huyết thanh sữa Hiprotal 60	64,9
Chất thấm sữa	87,1
Sữa tách kem được xử lý CMF	15,0
Kem được thanh trùng	43,2
Lactoza	31,1
Hỗn hợp chất béo thực vật	17,2
Trikali xitrat monohydrat	0,25
Canxi cacbonat	0,43
Magie clorua hexahydrat	0,20
Tricanxi phosphat	0,11
Trinatri xitrat dihydrat	0,16
Canxi hydroxit	0,03
Các vitamin trộn trước	0,45
Taurin	0,06

Ví dụ 2: Chế phẩm dinh dưỡng dựa trên nước sữa pho mát

Chế phẩm Deminal® 90 lỏng (FrieslandCampina Domo, Hà Lan), >90% sản phẩm nước sữa pho mát được khử khoáng, được cô đặc và được thanh trùng (77°C, 30

giây), được trộn với sữa tách kem được làm nóng và được vi lọc (68°C , 20 giây) và kem được thanh trùng (85°C , 30 giây). Thành phần của hỗn hợp này được trình bày trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Thành phần hỗn hợp trước khi làm bay hơi.

Các chất rắn	21,5%
Chất béo	4,3%
Protein	3,5%
Casein	1,4%
Protein nước sữa	2,0%

Hỗn hợp này sau đó được gia nhiệt tại $72,8^{\circ}\text{C}$ trong 30 giây trực tiếp sau đó được làm bay hơi tiếp đến 43,0% chất khô bằng cách sử dụng máy làm bay hơi nén lại hơi cơ học (MVR) với nhiệt độ hơi là 65°C . Sau khi làm nguội, các chất khoáng và vitamin được bổ sung và chất cô thu được được gia nhiệt lên đến 74°C , chất béo thực vật được phun sau đó là làm đồng nhất hai bước tại 120/30 bar. Nhũ tương này sau đó được sấy phun tại nhiệt độ cửa không khí vào là 176°C , nhiệt độ cửa không khí ra là $89,3^{\circ}\text{C}$ và áp suất vòi phun là 170 bar. Xem Bảng 4 đối với công thức của bột nền IF tạo thành. Sản phẩm này sẽ còn được gọi là Chế phẩm 2.

Bảng 4 Công thức bột nền IF (trên mỗi 100 kg bột)

Thành phần	Khối lượng [kg]
Sữa tách kem được làm nóng	147,3
Chất cô nước sữa được khử khoáng	168,1
Kem được thanh trùng	39,9
Hỗn hợp chất béo thực vật	17,2
Trikali xitrat monohydrat	0,67
Canxi cacbonat	0,51
Magie clorua hexahydrat	0,29
Tricanxi phosphat	0,17
Trinatri xitrat dihydrat	0,12
Canxi hydroxit	0,037
Các vitamin trộn trước	0,53
Taurin	0,068

Ví dụ 3: Sản xuất quy mô lớn với các chất cô sữa

Dung dịch 45% (khối lượng/khối lượng) lactoza được tạo ra bằng cách trộn lactoza với nước ở 80°C. Refit® MCI 80 TL (chất phân lập casein mixen từ FrieslandCampina; 18% các chất rắn, 80% protein trên tổng số các chất rắn với khoảng 92% casein trên tổng số protein) được bổ sung vào dung dịch lactoza, sau đó bổ sung chế phẩm Hiprotal® Milkserum 60 lỏng (FrieslandCampina, Hà Lan; khoảng 30% các chất rắn và 60% protein trên tổng các chất rắn). Sau đó, hỗn hợp các chất khoáng và vitamin được bổ sung, sau đó bổ sung chất béo sữa khan và hỗn hợp chất béo thực vật bao gồm các vitamin hòa tan trong chất béo, beta-caroten và chất chống oxy hóa.

Hỗn hợp này sau đó được đồng nhất hóa tại 60/20 bar và được gia nhiệt đến 77°C bằng máy trao đổi nhiệt được cạo với thời gian lưu lại tổng cộng là 53 giây, trực tiếp sau đó sấy phun tại máy sấy phun Filtermat. Nhiệt độ cửa không khí vào là 182°C và nhiệt độ cửa không khí ra là 82°C. Áp suất vòi phun là 153 bar. Sau này, bột nền được trộn với bột Lactoza, GOS (Vivinal®), Maltodextrin, DHA và ARA (Vana Sana) và các hỗn hợp trộn trước chứa các yếu tố vi lượng và các nucleotit.

Bảng 5 thể hiện công thức của bột nền IF và công thức của chế phẩm dinh dưỡng thành phẩm được thể hiện trong Bảng 6. Sản phẩm này sẽ còn được gọi là Chế phẩm 3.

Bảng 5 Công thức bột nền IF (trên mỗi 100 kg bột)

Thành phần	Khối lượng [kg]
Huyết thanh sữa Hiprotal 60	67,3
Refit® MCI 80 TL	10,4
Lactoza	39,7
Hỗn hợp chất béo thực vật	16,1
Chất béo sữa khan	19,9
Trikali xitrat monohydrat	1,3
Tricanxi phosphat	0,78
Magie clorua hexahydrat	0,37
Natri clorua	0,44
Canxi hydroxit	0,035
Kali hydroxit	0,15
Kali clorua	0,017

Thành phần	Khối lượng [kg]
Các vitamin trộn trước (hòa tan trong nước)	0,27
Taurin	0,075
Các vitamin trộn trước (hòa tan trong chất béo)	0,031
Beta-caroten	0,0013
Chất chống oxy hóa trộn trước	0,036

Bảng 6 Công thức của sữa công thức cho trẻ sơ sinh (trên 100 kg bột)

Thành phần	Khối lượng [kg]
Bột nền (xem bảng 5)	73,5
Lactoza	17,0
Vivinal® GOS Maltodextrin bột	6,6
Các nguyên tố vi lượng trộn trước	1,00
Vana Sana DHA	0,75
Vana Sana ARA	0,45
Cholin Bitartrat	0,34
Các vitamin trộn trước	0,19
Các nucleotit trộn trước	0,17

Ví dụ 4: Phân tích đặc tính của các giọt chất béo được phủ protein.

Ví dụ này mô tả phân tích kích thước viên chất béo trung bình và tải lượng protein bề mặt riêng của các giọt chất béo.

Tất cả các chế phẩm dinh dưỡng theo ví dụ 1-3 trên đây, còn được gọi là các chế phẩm 1-3, được hoàn nguyên tại khoảng 3,0% khối lượng/khối lượng chất béo trong nước được khử khoáng để thu được chế phẩm dinh dưỡng dạng lỏng. Thiết bị Malvern Mastersizer 3000 được sử dụng để đo sự phân bố viên chất béo tại 24°C. chỉ số khúc xạ của pha được phân tán được đặt là 1,46, trong khi chỉ số khúc xạ của pha liên tục được đặt là 1,33. Hệ số hấp thụ được đặt là 0,01. Trước khi đo kích thước viên, 2 ml mẫu sữa cho trẻ sơ sinh được pha với 40 ml nước và 5 ml dung dịch gồm 0,125% Tween-20 và 1,5% ETDA để hòa tan các mixen casein, và hỗn hợp này được ủ trong 10 phút.

Để tách các viên chất béo khỏi phần còn lại của chế phẩm, sucroza được bổ sung để làm tăng sự chênh lệch tỉ trọng giữa các viên chất béo và pha huyết thanh. Sau khi bổ sung sucroza, dung dịch chứa 13,0 khối lượng/khối lượng% các cacbohydrat. Dung dịch này sau đó được ly tâm trong 60 phút tại $100.000 \times G$ tại 21°C trong Beckman/Coulter Avanti J-310 sử dụng roto văng JS-24,38.

Thu được ba phân đoạn sau khi ly tâm. Lớp chất béo phía trên (đĩa béo) được loại bỏ nhẹ nhàng bằng cách sử dụng bay trộn nhỏ. Hạt được làm lỏng và được tạo huyền phù lại trong pha huyết thanh trên đĩa khuấy tại nhiệt độ phòng tới khi tất cả các cục được hòa tan. Các khối lượng của cả đĩa chất béo và phần lắng dưới đáy (pha huyết thanh + hạt) được xác định.

Các hàm lượng protein tổng số [% khối lượng/khối lượng] của sữa cho trẻ sơ sinh, đĩa chất béo và chất lắng dưới đáy được xác định bằng cách sử dụng phương pháp Kjeldahl bằng cách xác định nitơ tổng số và nhân nó với hệ số bằng 6,38. Röse Gottlieb được sử dụng để xác định các hàm lượng chất béo tổng số [% khối lượng/khối lượng] của sữa cho trẻ sơ sinh, đĩa chất béo và chất lắng dưới đáy.

Thể tích của viên chất béo và diện tích bề mặt riêng được tính từ $d_{3,2}$ [μm] thu được từ phép đo kích thước hạt, và tỉ trọng chất béo là 0,91515 g/ml được sử dụng để chuyển đổi thể tích chất béo thành khối lượng chất béo. Tải lượng protein (PL) [mg/m^2] được đo theo phương trình sau đây:

$$PL = \frac{\text{Hàm lượng protein của đĩa chất béo}}{\text{Hàm lượng chất béo của đĩa chất béo}} \cdot \frac{1000}{SSA}$$

trong đó $SSA = \text{diện tích bề mặt riêng } [\text{m}^2/\text{g}]$.

Ví dụ 5: Xác định tỉ lệ casein so với protein nước sữa trên bề mặt viên chất béo

Các tỉ lệ giữa các casein và protein nước sữa (α -lactalbumin + β -lactoglobulin) trong sữa cho trẻ sơ sinh và các đĩa chất béo như thu được trong Ví dụ 4 được xác định bằng các điện di gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit (SDS-PAGE) bằng cách sử dụng hệ đệm dựa trên Laemmli và phương pháp luận chụp hình ảnh không vết nhuộm sử dụng bộ Bio-Rad hệ thống tư liệu hóa Bio-Rad ChemiDoc XRS+ được phép không vết nhuộm được trang bị phần mềm ImageLab. Các đĩa chất béo được phân lập được hòa tan trong dung dịch 2% SDS / 10 mM xitrat trong nước khử khoáng. Một đĩa chất béo đơn, có nguồn gốc từ 21 mL sữa cho trẻ sơ sinh, được bổ sung 8,4 mL dung dịch SDS/xitrat và hỗn hợp này được ủ lên đến 2 giờ tại 60°C để thu được chất béo và protein hòa tan.

Trong quá trình ủ, các mẫu được trộn đều bằng cách xoay tròn bằng tay và hai lần bằng hút pipet lên và xuống sử dụng pipet huyết thanh học 10 mL.

Để chạy SDS PAGE/điện di, các mẫu được pha loãng đến nồng độ protein là 2 mg/mL bằng cách bổ sung nước khử khoáng. Điện di được thực hiện trong điều kiện khử trong đó 90 μ L mẫu được pha loãng 2 mg/mL được trộn với 100 μ L 2x đệm mẫu Laemmli (Bio-rad, số lô 1610737) và 30 μ L dung dịch 1M DTT (Sigma, số lô 646563) sau đó gia nhiệt tại 90°C trong 10 phút bằng cách sử dụng bể khô kỹ thuật số Bio-Rad. Các mẫu đã gia nhiệt được ly tâm trong 4 phút tại 14.000 vòng/phút tại nhiệt độ phòng và chất lắng ở đáy được sử dụng cho phân tích SDS-PAGE.

Thể tích 5 μ L của mẫu đã khử 1 mg/mL, chứa khoảng 5 μ g protein được tải lên trên gel đúc sẵn 4-15% Bio-Rad Criterion TGX không vết nhuộm.

Chỉ thị khối lượng phân tử không nhuộm (Bio-rad, số lô 1610363) được bao gồm để xác định các protein sữa chính. Điện di được thực hiện trong 1x đệm điện di Tris/Glyxin/SDS (Bio-Rad, số lô 1610732) tại nhiệt độ phòng tại Điện áp không đổi (V): 100V trong 10 phút sau đó là 45 phút nữa tại 150V. Sau khi điện di, gel được lấy khỏi khung, được rửa trong 5 giây trong nước khử khoáng và được chụp hình ngay bắt đầu với 5 phút hoạt hóa UV và sau đó là vài lần tiếp xúc (mạnh, yếu, 10 giây). Các kết quả được thể hiện trên Hình 1.

Các hình ảnh cuối cùng được phân tích với Hộp công cụ phân tích từ phần mềm ImageLab. Các làn được chọn để phân biệt giữa các mẫu trên gel và các băng được chọn bên trong các làn đối với casein và các protein nước sữa cụ thể. Trên mỗi protein cụ thể, cường độ thể tích được xác định. Các mẫu sữa cho trẻ sơ sinh và các phần chất béo của nó luôn được kiểm tra trên cùng gel. Đối với mỗi sản phẩm, tổng các cường độ của tất cả các băng casein được tính, cũng như tổng các cường độ của các băng α -lactalbumin + β -lactoglobulin. Tỷ lệ của giá trị thứ nhất sau đó được chia cho giá trị thứ hai để thu được tỉ lệ casein : (aLac + bLac).

Vì các protein cần được phân tích chứa các lượng khác nhau của tryptophan, cường độ các băng không tương ứng chính xác với khối lượng của chúng. Ví dụ, tính theo khối lượng, aLac cho các băng cường độ mạnh nhất và các casein cường độ ít nhất. Nếu tỉ lệ giữa aLac và bLac trong sản phẩm ban đầu và phần chất béo bao gồm các giọt chất béo là bằng nhau, điều này không là vấn đề đối với tỉ lệ casein: (aLac + bLac) giữa các giọt chất béo và tổng chế phẩm. Tuy nhiên, nếu phần chất béo chứa tương đối nhiều

aLac hơn, tỉ lệ tính theo các tỉ lệ khối lượng sử thậm chí cao hơn một chút so với tính theo các cường độ bằng.

Ví dụ 6: Phân tích in vitro sự tách pha trong các điều kiện ở dạ dày

Để đánh giá các tính chất tiêu hóa của chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế, phương pháp sàng lọc sự tiêu hóa của trẻ sơ sinh in vitro được phát triển. Sơ đồ 1 cung cấp sự phác họa sơ đồ của phương pháp. Tóm tắt, phương pháp này mô phỏng sự tiêu hóa trong dạ dày của trẻ sơ sinh sau khi ăn sữa công thức cho trẻ sơ sinh hoặc sữa mẹ, mà sau hành vi vĩ mô được quan sát thấy và sự phân bố của chất béo và protein được đo.

Sau khi bắt đầu thí nghiệm, các bột nền từ các ví dụ 1 và 2 (tương ứng là chế phẩm 1 và 2) được trộn khô với lactoza và WPC35 (Hiprotal® 35, FrieslandCampina) theo:

	Chế phẩm hỗn hợp 1	Chế phẩm hỗn hợp 2
Chế phẩm 1	74,0%	
Chế phẩm 2		75,0%
WPC35	4,3%	
Lactoza	21,7%	25,0%

Các chế phẩm dạng bột được hoàn nguyên trong nước khử khoáng. Các mẫu sữa cho trẻ sơ sinh dạng lỏng được chuẩn hóa dựa vào nồng độ chất béo bằng với các mức sữa cho trẻ sơ sinh, tức là khoảng từ 3,0 đến 3,5% khối lượng. Dịch vị dạ dày được chuẩn bị bằng cách pha loãng pepsin (lợn) trong dung dịch 30 mM HCl đến 250 U/ml. Đường cong đệm được tạo ra cho mỗi mẫu để xác định lượng dịch vị dạ dày cần để đạt được độ pH 6,0 và 5,5. Trước khi bổ sung dịch vị dạ dày, các mẫu được lấy cho các phân tích protein và chất béo.

Các mẫu lặp kép gồm 60 mL được làm nóng lên đến 37°C. Thí nghiệm được bắt đầu bằng cách bổ sung dịch vị dạ dày đến pH 6,0 theo đường cong đệm đã định trước. Các mẫu được khuấy bằng tay trong vài giây để trộn dịch vị dạ dày với mẫu và sau đó được ủ trong 15 phút. Sau đó, độ pH được hạ thấp xuống đến pH 5,5 với dịch vị dạ dày. Sau khi hạ thấp độ pH, cả hai mẫu được khuấy đồng thời và một mẫu được ủ trong 15 phút và mẫu còn lại trong 30 phút tại 37°C. Sau đấy, tiến hành chụp hình. Các phần phân ước được lấy từ các lớp đáy để phân tích hàm lượng protein và chất béo. Phản

ứng enzym được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch gốc Pepstatin A (0,02 gam Pepstatin A, 18 mL metanol, 2 mL axit axetic băng).

Đề thu được thông tin về tốc độ và phạm vi phân tách và nổi kem, các hình được chụp tại các thời điểm khác nhau. Ngoài ra, lớp trên được loại bỏ cẩn thận và cả khối lượng của lớp trên (y) và lớp đáy (z) được xác định để tính sự phân bố khối lượng của lớp trên cùng và lớp đáy tại thời điểm cụ thể tại độ pH 5,5 theo:

$$\% \text{ của tổng khối lượng trong lớp đáy} = \frac{z}{(y + z)} \cdot 100\%$$

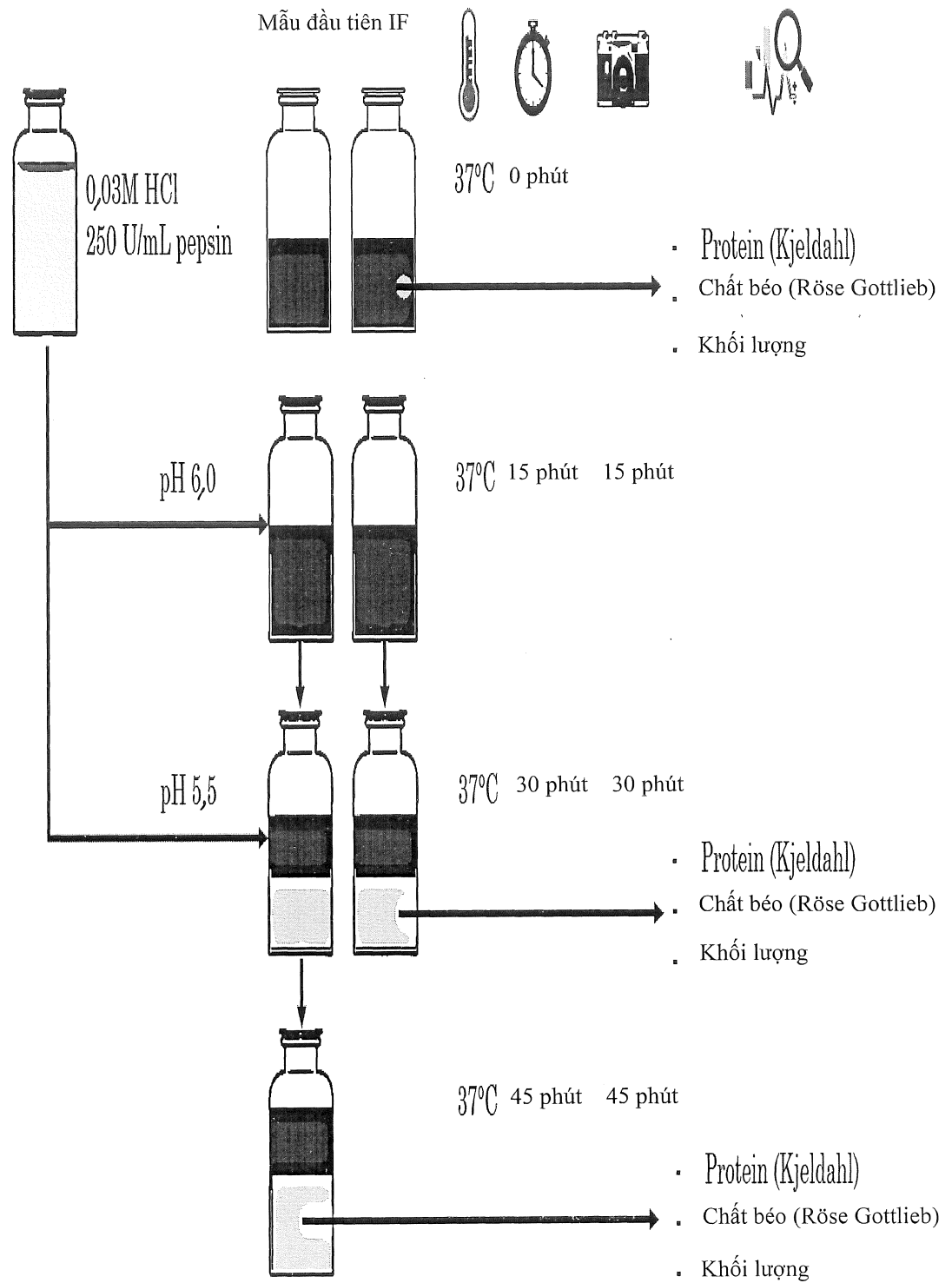
Nồng độ protein và chất béo ở lớp đáy được sử dụng làm chỉ dẫn cho dòng các chất dinh dưỡng ban đầu mà sẽ được làm trống khỏi dạ dày tại thời điểm cụ thể tại độ pH 5,5. Các lượng tương đối của chất béo và protein ở lớp đáy được tính theo:

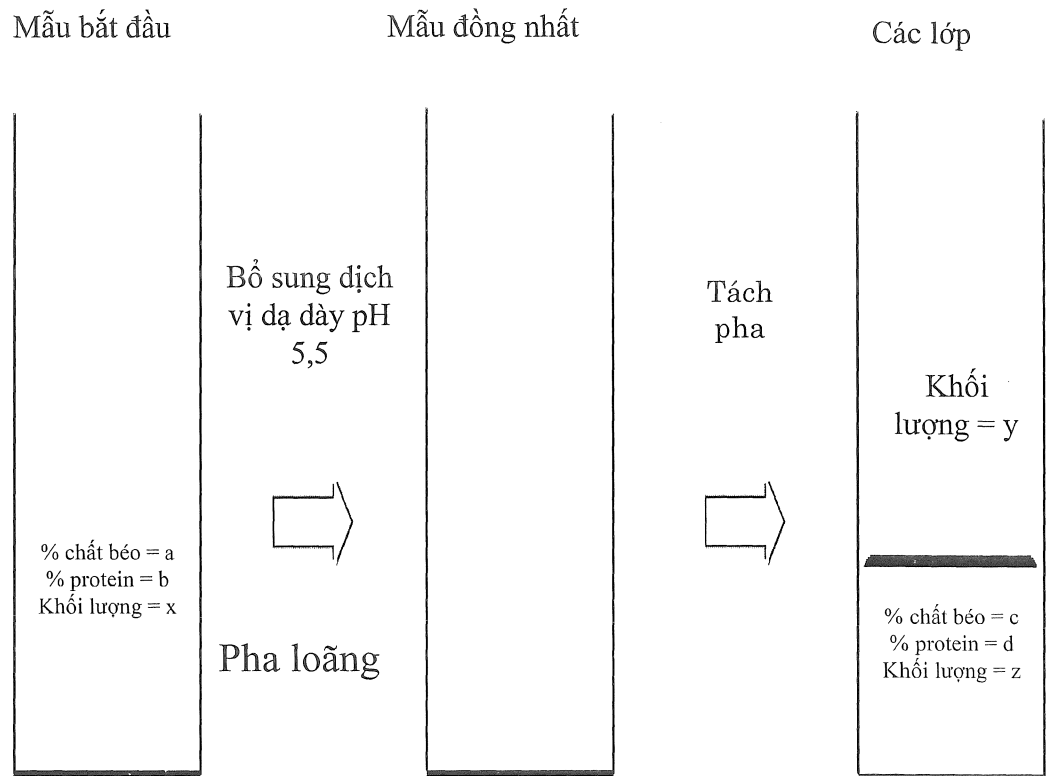
$$\% \text{ của chất béo tổng số ở lớp đáy} = \frac{(c \cdot z)}{(a \cdot x)} \cdot 100\%$$

$$\% \text{ của protein tổng số ở lớp đáy} = \frac{(d \cdot z)}{(b \cdot x)} \cdot 100\%$$

Trong đó:

- a = % chất béo ở mẫu ban đầu
- b = % protein ở mẫu ban đầu
- c = % chất béo ở lớp đáy
- d = % protein ở lớp đáy
- y = khối lượng của lớp trên cùng (tính theo g)
- z = khối lượng của lớp đáy (tính theo g)

Sơ đồ 1: Phác họa phương pháp tiêu hóa *in vitro*



1. Kết quả

1.1. Thành phần sản phẩm

Thành phần của các sản phẩm được thể hiện dưới đây. Ngoài các sản phẩm thử nghiệm theo sáng chế, còn hai sản phẩm sữa công thức thương mại cho trẻ sơ sinh được nghiên cứu làm ví dụ so sánh.

Bảng 7: Thành phần sản phẩm [g/100g]

	Chế phẩm 1	Chế phẩm 2	Chế phẩm 3	Sản phẩm thương mại 1	Sản phẩm thương mại 2
Protein [N*6,25]	12,3	12,7	10,0	11,5	10,6
Chất béo	34,3	35,3	27,0	27,1	27,8
Các cacbohydrat	44,7	45,8	55,8	53,4	52,9

1.2. Phân tích kích thước trung bình của giọt chất béo và tải lượng bề mặt riêng của các giọt chất béo

Kích thước giọt chất béo về tải lượng bề mặt riêng của các giọt chất béo được xác định theo phương pháp được mô tả trên đây. Bảng 8 thể hiện các kết quả thu được.

Bảng 8: Các đặc tính kích thước hạt và tải lượng bề mặt protein riêng của các giọt chất béo được phủ protein

	Chế phẩm 1	Chế phẩm 2	Chế phẩm 3	Sản phẩm thương mại 1	Sản phẩm thương mại 2
Sự phân bố kích thước hạt					
- D[3,2] (μm)	0,37	0,39	0,59	0,37	0,42
- D[4,3] (μm)	0,75	0,71	0,98	0,69	0,95
Tải lượng protein (mg/m ²)	3,0	4,0	3,0	3,8	6,9

Tải lượng protein cao của sản phẩm thương mại 2 (ví dụ so sánh) có thể tăng từ sự biến tính/kết tụ của các protein nước sữa, mà có thể là kết quả của tải lượng nhiệt cao.

1.3. Phân tích đặc tính của tỉ lệ casein so với protein nước sữa trong tổng chế phẩm và ở phân đoạn chứa các giọt chất béo được phủ protein.

Các kết quả SDS-PAGE được trình bày trong bảng 9 dưới đây.

Bảng 9

	Tỉ lệ giữa các cường độ băng của các casein và (α -lactalbumin + β -lactoglobulin)		Tỉ lệ phân đoạn chất béo/tổng chế phẩm
	Tổng chế phẩm	Phân đoạn chất béo	
Chế phẩm 1	0,40	2,0	5,0
Chế phẩm 2	0,90	5,0	5,6
Chế phẩm 3	0,45	2,1	4,6
Sản phẩm thương mại 1	0,67	2,6	3,8
Sản phẩm thương mại 2	0,66	1,2	1,8

1.4. Phân tích in vitro sự tách pha trong các điều kiện ở dạ dày

Các hình ảnh được chụp tại các thời điểm khác nhau và độ pH trong tiêu hóa ở dạ dày (xem Hình 2) chỉ ra sự tách pha rõ ràng của các sản phẩm được xử lý nhiệt tối thiểu của các chế phẩm theo sáng chế tại độ pH 5,5, trong khi các sản phẩm thương mại thì không.

Bảng 10 chỉ ra khối lượng của lớp đáy (% của tổng khối lượng) và tỉ lệ phần trăm của protein tổng số và chất béo tổng số trong đó sau 30 phút (cột A) hoặc 45 phút (cột B) tiêu hóa *in vitro*.

Bảng 10

	% của tổng khối lượng ở lớp đáy		% của protein tổng số ở lớp đáy		% của chất béo tổng số ở lớp đáy	
	A	B	A	B	A	B
Chế phẩm hỗn hợp 1	64%	72%	46%	53%	3%	3%
Chế phẩm hỗn hợp 2	45%	55%	28%	35%	0,2%	0,3%
Chế phẩm 3	69%	59%	57%	46%	24%	7%
Sản phẩm thương mại 1	0%	4%		*		*
Sản phẩm thương mại 2	0%	9%		*		*

(*) Không có khả năng về mặt kỹ thuật để lấy mẫu đại diện.

Ví dụ 6: Phân tích các globulin miễn dịch bò có hoạt tính miễn dịch

Các chế phẩm dạng bột (các bột nền IF) được điều chế theo Ví dụ 1 trong 3 thí nghiệm riêng rẽ, còn được gọi là Ví dụ 1-3. Các chất cô được gia nhiệt đến nhiệt độ nằm

trong khoảng từ 70 đến 80°C. Các mức globulin miễn dịch hoạt tính (bIgG, bIgA và bIgM) trong hỗn hợp của sữa tách kem, kem và chất cô protein huyết thanh trước khi xử lý nhiệt và làm bay hơi được đo bằng ELISA sử dụng các bộ định lượng ELISA thương mại từ Bethyl. Hơn nữa, các mức globulin miễn dịch được đo ở dạng bột.

Hình 3A thể hiện các mức globulin miễn dịch hoạt tính của bò ở chế phẩm dạng bột. Hình 3B thể hiện lượng tương đối của các globulin miễn dịch (so với hỗn hợp của các nguyên liệu thô) mà vẫn còn hoạt tính sau khi xử lý bột nền IF.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm dinh dưỡng tổng hợp chứa casein, protein nước sữa bao gồm α -lactalbumin (aLac) và β -lactoglobulin (bLac), và các giọt chất béo được phủ protein, trong đó:

(i) hàm lượng protein của chế phẩm là từ 5 đến 20% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn là từ 7 đến 16% khối lượng, tính trên tổng các chất rắn;

(ii) hàm lượng aLac + bLac ít nhất là 25% (khối lượng/khối lượng) tính trên mức protein tổng số;

(iii) hàm lượng chất béo nằm trong khoảng từ 10% đến 50% (khối lượng/khối lượng) tính trên tổng các chất rắn; và

(iv) các giọt chất béo được phủ bằng tải lượng protein trung bình là 2 đến 10 mg/m² và trong đó tỉ lệ khối lượng của casein: (aLac + bLac) trên các giọt chất béo là cao hơn ít nhất 4 lần, tốt hơn là cao hơn ít nhất 4,5 lần, so với tỉ lệ khối lượng của casein: (aLac + bLac) trong tổng chế phẩm.

2. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm 1, trong đó các giọt chất béo có đường kính trung bình nằm trong khoảng từ 0,2 đến 1,0 micromet.

3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ít nhất 70% của aLac và bLac, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, tốt nhất là 95%, là ở trạng thái tự nhiên.

4. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó tỉ lệ khối lượng của các casein so với tổng số các protein nước sữa trong chế phẩm là nằm trong khoảng từ 70:30 đến 20:80, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50:50 đến 30:70.

5. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó aLac và bLac thu được từ sữa, từ nước sữa pho mát, từ nước sữa axit casein hoặc từ huyết thanh sữa hoặc từ các biến thể dạng cô đặc, được pha loãng, được khử khoáng và/hoặc dạng bột của chúng.

6. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó casein được chọn từ nhóm bao gồm casein mixen, casein không phải mixen, casein axit, canxi caseinat, magie caseinat, natri caseinat, kali caseinat và amoni caseinat.

7. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó nguồn chất béo là chất béo từ sản phẩm sữa, dầu thực vật, chất béo thực vật, dầu thực vật được hydro hóa, dầu từ hải sản, dầu tảo, dầu tế bào đơn hoặc hỗn hợp của các loại nêu trên,

tốt hơn là chất béo từ sản phẩm sữa, tốt hơn nữa là chất béo từ sản phẩm sữa được chọn từ sữa toàn phần, kem, chất béo sữa khan và các phân đoạn từ chất béo sữa.

8. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó tỉ lệ khối lượng của chất béo so với protein là nằm trong khoảng từ 3,5:1 đến 1:1,5.

9. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó chế phẩm này là chế phẩm dạng bột.

10. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó chế phẩm này là chế phẩm dạng lỏng, tốt hơn là chế phẩm dạng lỏng có hàm lượng protein lên đến 30 gam trên lít.

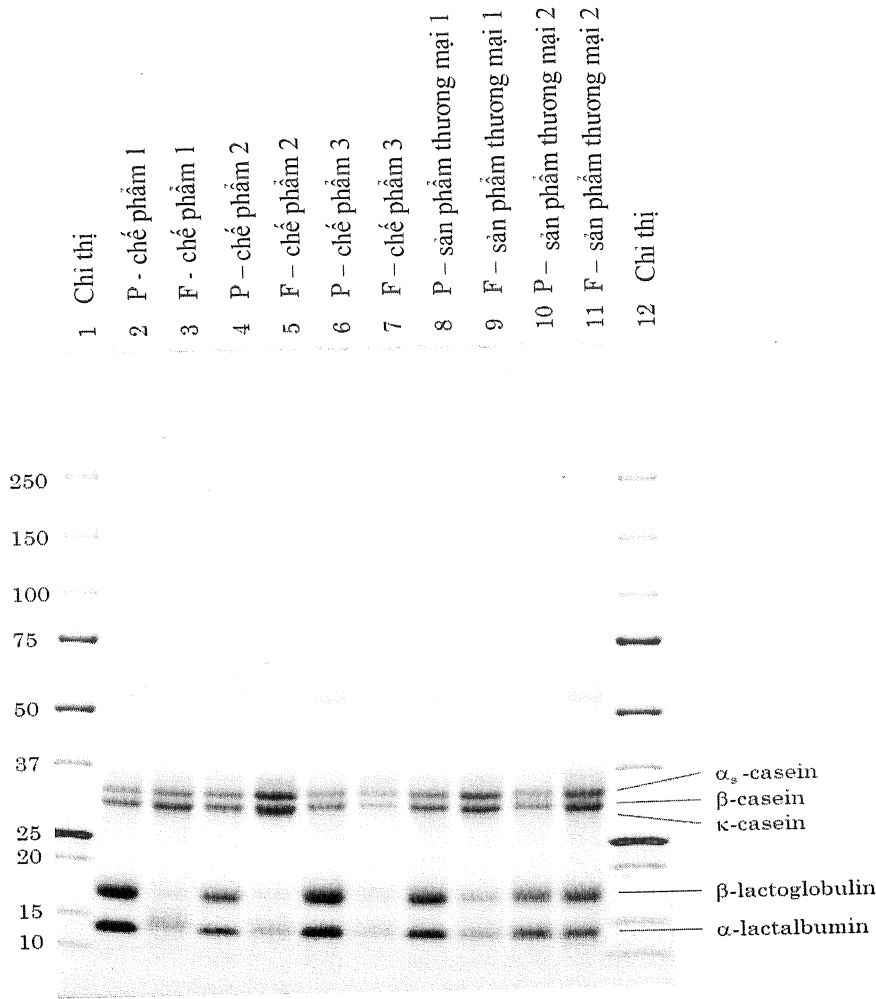
11. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó chế phẩm này là sữa công thức cho trẻ sơ sinh, sữa công thức cho giai đoạn tiếp theo hoặc sữa cho trẻ đang phát triển.

12. Phương pháp tạo ra chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, bao gồm các bước:

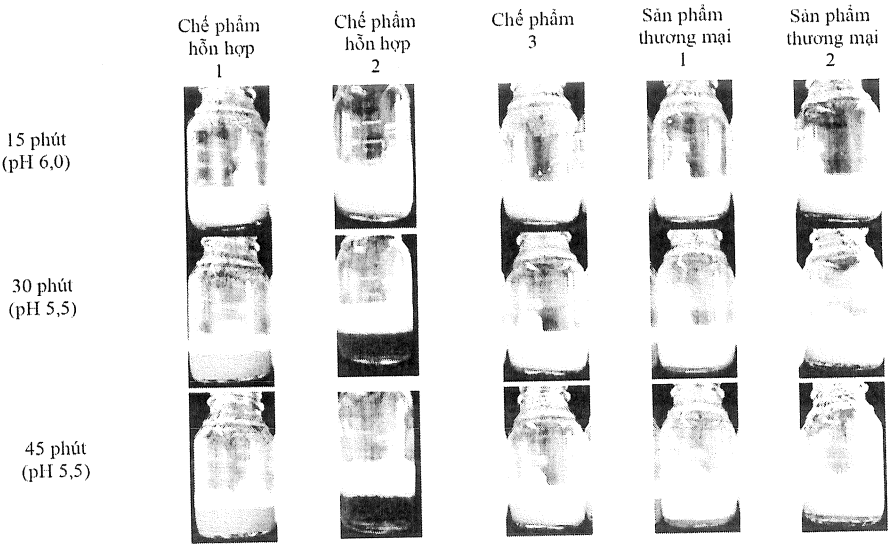
- a. Trộn sữa tách kem và nguồn protein nước sữa bao gồm α -lactalbumin và β -lactoglobulin;
- b. Thanh trùng hỗn hợp này tại nhiệt độ nhỏ hơn 85°C;
- c. Làm bay hơi tại nhiệt độ nhỏ hơn 68°C;
- d. Bổ sung nguồn chất béo;
- e. Làm đồng nhất chế phẩm thu được ở bước d;
- f. Sấy phun chế phẩm thu được ở bước e để thu được chế phẩm dạng bột;
- g. Tùy ý hoàn nguyên chế phẩm dạng bột của bước f bằng chất lỏng.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó phương pháp này không bao gồm bước cho α -lactalbumin và β -lactoglobulin tiếp xúc với các điều kiện gây ra sự biến tính và/hoặc sự kết tụ của α -lactalbumin và β -lactoglobulin.

HÌNH 1

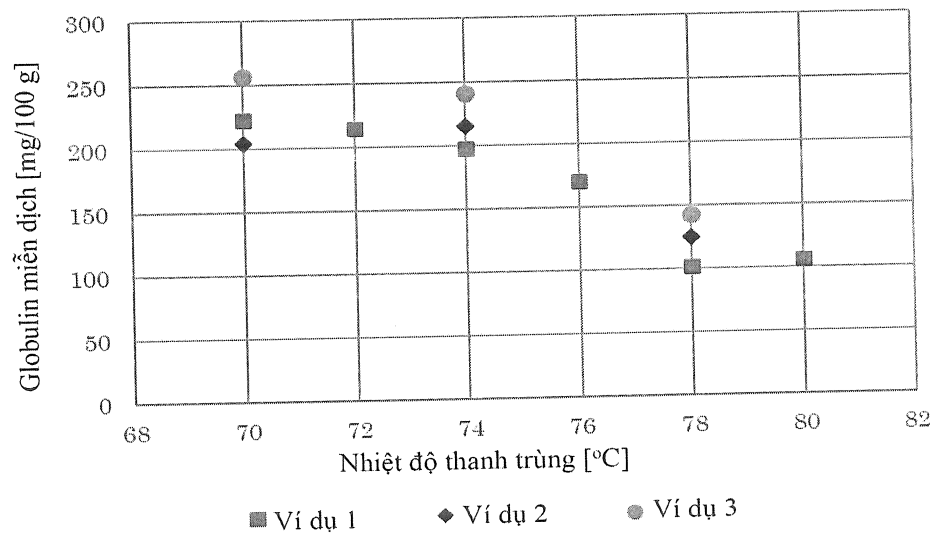


HÌNH 2

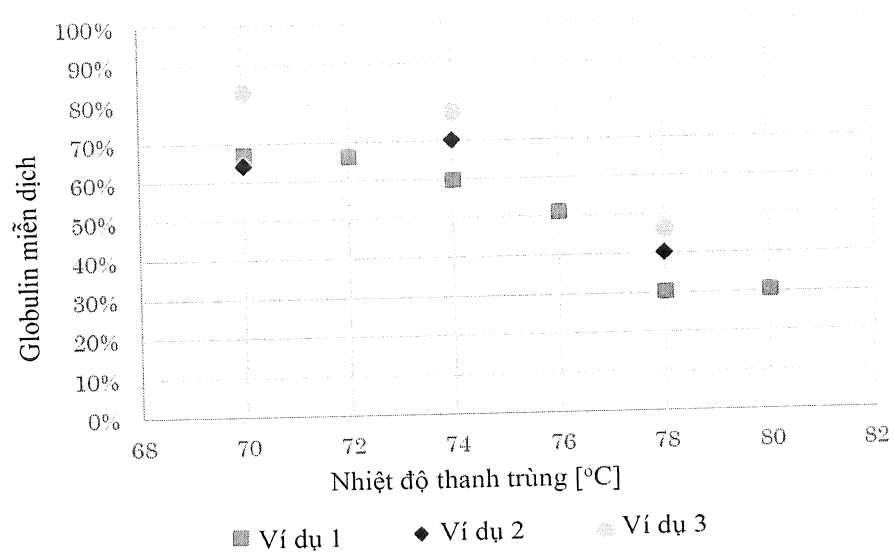


3/3

HÌNH 3A



HÌNH 3B



3/3