



(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)



1-0023348

(51)⁷ A23L 2/52; C07K 5/06; C07D 241/08; (13) B
A23L 1/313; A61P 25/24

(21) 1-2012-02121

(22) 26/02/2010

(86) PCT/JP2010/053699 26/02/2010

(87) WO2011/077761 30/06/2011

(30) 2009-296247 25/12/2009 JP

(45) 27/04/2020 385

(43) 26/11/2012 296A

(73) 1. Suntory Holdings Limited (JP)

1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203 Japan

2. Suntory Beverage & Food Asia Pte. Ltd. (SG)

18 Cross Street, #12-01/08 China Square Central, Singapore 048423, Republic of Singapore

(72) Matsubayashi, Hideki (JP); Yamamoto, Kenji (JP); Watanabe, Hiroshi (JP)

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

(54) PHẦN CHIẾT CHỨA 2,5-PIPERAZINDION,3,6-BIS(PHENYLMETYL)-(3S,6S)-,
ĐỒ UỐNG CÓ TÍNH AXIT CHỨA PHẦN CHIẾT NÀY VÀ QUY TRÌNH SẢN
XUẤT PHẦN CHIẾT VÀ ĐỒ UỐNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phần chiết chứa 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)-,
(3S,6S)- được dùng trong việc sản xuất đồ uống có tính axit. Sáng chế cũng đề cập đến đồ
uống có tính axit chứa phần chiết này và quy trình sản xuất phần chiết và đồ uống này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thực phẩm và đồ uống có tính axit chứa 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)-,(3S,6S)-, và cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phần chiết và đồ uống chứa 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)-,(3S,6S)-, trong đó độ pH thấp hơn 5.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong xã hội hiện đại khá phức tạp, việc giảm sự quyết tâm đã trở thành một vấn đề. Ví dụ, thuật ngữ “khủng hoảng động lực” được sử dụng để mô tả vấn đề động lực bị giảm đi ở người trẻ. Hơn nữa, người ta cho rằng các bệnh nhân bị bệnh trầm cảm thường thể hiện các triệu chứng giảm ý chí, và cần phải phát triển các thuốc có khả năng cải thiện việc giảm ý chí.

Trong những năm gần đây, “dipeptit” bao gồm hai axit amin liên kết với nhau đã nhận được sự chú ý như là một chất chức năng. Dipeptit có thể được dự tính là có các tính chất vật lý bổ sung và/hoặc có các chức năng mới, điều này không thể thấy được ở các axit amin đơn lẻ, và do đó chúng được cho là có thể có phạm vi áp dụng rộng hơn so với các axit amin. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng dẫn xuất 2,5-diketopiperazin, tức là 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)-,(3S,6S)- (số đăng ký CA: 2862-51-3) (sau đây được gọi là “hợp chất A”) có tác dụng cải thiện động lực học tập (đơn yêu cầu cấp patent nộp đồng thời: đơn yêu cầu cấp patent Nhật số 2009-296164).

Mặt khác, hầu hết người tiêu dùng đều ưa thích đồ uống có tính axit. Các sản phẩm được biết là chứa hợp chất A bao gồm phần chiết từ gà ở dạng lỏng thu được bằng cách ninh lấy nước thịt gia súc, cũng như nước cốt gà và các sản phẩm tương tự ở dạng rắn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Tuy nhiên, các sản phẩm bao gồm phần chiết từ gà và nước cốt gà lại có độ pH trung tính. Nếu phần chiết trung tính này được bổ sung vào chất lỏng có tính axit

nhằm tạo ra đồ uống chứa hợp chất A ở dạng đồ uống có tính axit mà được hầu hết người tiêu dùng ưa thích thì phần chiết này không chỉ gây ra sự lắng cặn mà còn để lại vị và cảm giác uế oải hoặc có hạt trên lưỡi đặc biệt đối với phần chiết từ gà, khiến cho không thể có được đồ uống thỏa mãn về mặt hương vị.

Hơn nữa, hợp chất A khó tan trong nước và do đó không thể bổ sung một cách đơn giản như vậy vào đồ uống.

Từ các vấn đề nêu trên, sáng chế nhằm tạo ra phần chiết sẵn sàng để dùng trong việc sản xuất đồ uống có tính axit và chứa hợp chất A, là chất hữu ích có tác dụng cải thiện động lực học tập, cũng như đồ uống có tính axit chứa hợp chất A.

Là kết quả của các nỗ lực mở rộng và chuyên sâu được thực hiện để giải quyết các vấn đề nêu trên, tác giả sáng chế đã thành công trong việc thu được phần chiết có tính axit chứa hợp chất A, phần chiết này không gây ra sự lắng cặn ngay cả khi được bổ sung vào đồ uống và có hương vị và cảm giác thơm ngon trên lưỡi. Thành công này dẫn đến việc hoàn thành sáng chế.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến các đối tượng từ [1] đến [20] được thể hiện dưới đây.

- [1] Phần chiết chứa hợp chất A và có độ pH thấp hơn 5.
- [2] Phần chiết theo mục [1] nêu trên, trong đó tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A ($\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) là $0,1 (\mu\text{g}/100\text{g})/\text{Bx}$ hoặc cao hơn.
- [3] Phần chiết theo mục [1] nêu trên, trong đó tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A ($\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) là $6 (\mu\text{g}/100\text{g})/\text{Bx}$ hoặc cao hơn.
- [4] Phần chiết theo bất kỳ mục trong số các mục từ [1] đến [3] nêu trên, trong đó phần chiết này chứa hợp chất A với nồng độ $1\mu\text{g}/100\text{g}$ hoặc cao hơn.
- [5] Phần chiết theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3] nêu trên, trong đó phần chiết này chứa hợp chất A với nồng độ $60\mu\text{g}/100\text{g}$ hoặc cao hơn.
- [6] Phần chiết theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5] nêu trên, trong đó hợp chất A được chiết từ sản phẩm có trong tự nhiên.
- [7] Phần chiết theo mục [6] nêu trên, trong đó sản phẩm có trong tự nhiên là thịt của gia súc hoặc gia cầm, thịt cá, hoặc thịt động vật có vỏ.

[8] Phần chiết theo mục [6] hoặc [7] nêu trên, trong đó sản phẩm có trong tự nhiên là thịt gà.

[9] Phần chiết khô có thể thu được bằng cách sấy phần chiết theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8] nêu trên.

[10] Đồ uống có tính axit có thể thu được bằng cách bổ sung phần chiết theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8] nêu trên.

[11] Đồ uống có tính axit chứa hợp chất A và có độ pH thấp hơn 5.

[12] Đồ uống có tính axit theo mục [10] hoặc [11] nêu trên, trong đó tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A ($\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) là $0,1 (\mu\text{g}/100\text{g})/\text{Bx}$ hoặc cao hơn.

[13] Đồ uống có tính axit theo mục bất kỳ trong số các mục từ [10] đến [12] nêu trên, trong đó phần chiết này chứa hợp chất A với nồng độ $1\mu\text{g}/100\text{g}$ hoặc cao hơn.

[14] Đồ uống có tính axit theo mục bất kỳ trong số các mục từ [10] đến [13] nêu trên, trong đó đồ uống này không có cặn lắng.

[15] Đồ uống có tính axit theo mục bất kỳ trong số các mục từ [10] đến [13] nêu trên, trong đó đồ uống này chứa cặn lắng và trong đó lượng protein có trong 1g cặn lắng thu được từ đồ uống này là $0,01\text{mg}$ hoặc nhỏ hơn.

[16] Đồ uống đóng gói, trong đó đồ uống theo mục bất kỳ trong số các mục từ [10] đến [15] nêu trên được đóng gói vào vật đựng.

[17] Quy trình sản xuất phần chiết theo mục [1] nêu trên, bao gồm:

(1) bước xử lý sơ bộ trong đó thịt của gia súc hoặc gia cầm, thịt cá hoặc thịt động vật có vỏ được dùng làm nguyên liệu ban đầu và được gia nhiệt trong chất lỏng để loại bỏ các protein tan trong nước có trong đó,

(2) bước gia nhiệt trong đó chất lỏng trên được thay thế sau bước xử lý sơ bộ và việc gia nhiệt được lặp lại lần nữa,

(3) bước xử lý axit trong đó axit được bổ sung vào, và

(4) bước lọc trong đó mẫu lỏng thu được được lọc.

[18] Quy trình theo mục [17] nêu trên, trong đó axit được bổ sung trong bước (3) là một hoặc nhiều axit được chọn từ nhóm bao gồm axit phosphoric, axit malic và axit

xitric.

[19] Quy trình sản xuất đồ uống theo mục [11] nêu trên, bao gồm:

(1) bước xử lý sơ bộ trong đó thịt của gia súc hoặc gia cầm, thịt cá hoặc thịt động vật có vỏ được dùng làm nguyên liệu ban đầu và được gia nhiệt trong chất lỏng để loại bỏ các protein tan trong nước có trong đó,

(2) bước gia nhiệt trong đó chất lỏng được thay thế sau bước xử lý sơ bộ và việc gia nhiệt được lặp lại lần nữa,

(3) bước xử lý axit trong đó axit được bổ sung vào, và

(4) bước lọc trong đó mẫu lỏng thu được được lọc.

[20] Quy trình theo mục [19] nêu trên, trong đó axit được bổ sung trong bước (3) là một hoặc nhiều axit được chọn từ nhóm bao gồm axit phosphoric, axit malic và axit xitric.

Sáng chế đề cập đến phần chiết có tính axit chứa hợp chất A có tác dụng cải thiện động lực học tập và có độ an toàn cao mà không có các tác dụng phụ và không gây ra sự lắng cặn ngay cả khi được bổ sung vào đồ uống. Phần chiết theo sáng chế có thể được bổ sung vào đồ uống v.v. mà không làm hỏng vị vốn có của thực phẩm và đồ uống, và có thể được sử dụng để sản xuất các đồ uống có tính axit được hầu hết người tiêu dùng ưa thích. Phần chiết hoặc đồ uống có tính axit theo sáng chế, cũng như thực phẩm và đồ uống chứa chúng có thể được dùng liên tục trong khoảng thời gian dài như là thực phẩm và đồ uống hữu ích để cải thiện động lực học tập.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả thử nghiệm xem liệu việc dùng mẫu thử nghiệm có làm giảm thời gian cần thiết để chuột để tìm ra bậc thoát khi lặp lại thử nghiệm hay không.

Fig.2 thể hiện kết quả thử nghiệm xem liệu việc dùng mẫu thử nghiệm có giảm thời gian cần thiết để chuột tìm ra bậc thoát khi lặp lại thử nghiệm hay không.

Fig.3 thể hiện kết quả thử nghiệm xem liệu việc dùng mẫu thử nghiệm có giảm thời gian cần thiết để chuột tìm ra bậc thoát khi lặp lại thử nghiệm hay không.

Fig.4 thể hiện kết quả định lượng hợp chất A trong phần chiết thu được với các nguyên liệu ban đầu khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phần mô tả chi tiết sáng chế sẽ được trình bày dưới đây cho các phương án của sáng chế.

<Phần chiết có tính axit>

Phần chiết có tính axit theo sáng chế chứa hợp chất A là chất hữu ích có tác dụng cải thiện động lực học tập, và không gây ra sự lắng cặn ngay cả khi được bổ sung vào đồ uống có tính axit.

Phần chiết có tính axit theo sáng chế cũng có thể dùng được cho đồ uống có tính axit mà không gây ra sự lắng cặn. Phần chiết có tính axit theo sáng chế là phần chiết mà cho phép hợp chất A được kết hợp vào đồ uống ở nồng độ cao đồng thời ngăn chặn sự ảnh hưởng đến hương vị tổng thể hoặc cảm giác trên lưỡi của đồ uống. Các đặc tính này cho phép khoảng thiết kế hương vị của đồ uống rộng hơn.

Phần chiết theo sáng chế có tính axit, và thuật ngữ “có tính axit” được sử dụng trong bản mô tả được dự tính là để chỉ độ pH thấp hơn 5. Chất lỏng theo sáng chế có độ pH thấp hơn 5, tốt hơn là bằng 4,5 hoặc thấp hơn, và tốt hơn nữa là bằng 4 hoặc thấp hơn.

Một phương án về phần chiết theo sáng chế là phần chiết có độ pH thấp hơn 5 và chứa hợp chất A ở nồng độ cao, và có tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A ($\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) là 0,1 hoặc cao hơn, tốt hơn là 6 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)/Bx hoặc cao hơn.

Vì hợp chất A là chất hữu ích có tác dụng cải thiện động lực học tập, nên mong muốn hơn nữa là nó có hàm lượng cao hơn trong phần chiết. Cụ thể hơn, hàm lượng này tốt hơn là $1\mu\text{g}/100\text{g}$ hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là $60\mu\text{g}/100\text{g}$ hoặc cao hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là $75\mu\text{g}/100\text{g}$ hoặc cao hơn. Tuy nhiên, phần chiết có độ Brix cao có nghĩa là các chất khác (ví dụ, các chất đắng) có nguồn gốc từ nguyên liệu ban đầu có mặt với nồng độ cao, và bản thân phần chiết này không thích hợp làm đồ uống và còn ảnh hưởng lớn đến hương vị hoặc cảm giác trên lưỡi đến mức khiến cho nó thường không thích hợp để sử dụng cho đồ uống. Do đó, độ Brix thấp hơn được mong muốn hơn đối với phần chiết. Cần lưu ý rằng “Bx” được sử dụng trong bản mô tả có thể được xác định bằng máy đo Bx có bán trên thị trường.

Do đó, ưu tiên phần chiết giàu hợp chất A, là chất hữu ích, và có độ Brix thấp,

tức là phần chiết có tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A ($\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) cao. Cụ thể hơn, tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A ($\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) tốt hơn là 0,1 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)/Bx hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 6 hoặc cao hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là 10 hoặc cao hơn. Phần chiết này có lợi ở chỗ nó có thể được kết hợp với lượng nhỏ vào đồ uống và cho phép khoảng thiết kế đồ uống rộng hơn vì độ Bx của nó tương đối thấp mặc dù nó chứa hợp chất A với hàm lượng cao. Kết quả là, có thể tạo ra đồ uống có hình thức đẹp (không gây lắng cặn hoặc vẩn đục) và hương vị của nó không bị suy giảm.

Nồng độ của hợp chất A có thể được xác định theo nhiều cách, ví dụ, bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Phần chiết có tính axit theo sáng chế là phần chiết dạng lỏng, có thể được dùng luôn hoặc có thể được bổ sung vào thực phẩm và đồ uống. Ngoài ra, phần chiết này có thể dễ dàng được chuyển hóa thành dạng bột qua bước làm đông khô hoặc sấy thăng hoa, v.v.. Phần chiết dạng bột thu được tan được trong nước và có thể dễ dàng hòa tan được trong chất lỏng (ví dụ, nước) trước khi dùng. Hơn nữa, việc chuyển hóa thành dạng bột tạo điều kiện thuận lợi cho việc bổ sung phần chiết này vào nhiều loại thực phẩm và đồ uống, và cho phép sử dụng phần chiết dễ dàng.

Theo cách khác, cũng có thể dùng dạng viên nang mềm hoặc viên nén. Viên nang mềm hoặc viên nén bao phần chiết theo sáng chế, hoặc phần chiết dạng bột hoặc hạt của nó.

Không có giới hạn về loại hoặc dạng thực phẩm và đồ uống trong đó phần chiết hoặc phần chiết dạng bột được kết hợp. Ví dụ, chúng có thể được tạo ra ở dạng thực phẩm dùng cho sức khỏe dưới dạng viên nén (ví dụ, viên nén và viên nang), thực phẩm dạng rắn bao gồm sữa chua, thực phẩm đã qua chế biến, đồ tráng miệng và đồ ngọt (ví dụ, gôm, kẹo, thạch), đồ uống dạng lỏng bao gồm cà phê, trà ô long, trà, đồ uống không chứa cồn và các chế phẩm uống được. Hơn nữa, thực phẩm dùng cho vật nuôi trong nhà và thức ăn cho động vật cũng được tính đến.

<Đồ uống có tính axit>

Sáng chế đề cập đến đồ uống có tính axit chứa hợp chất A và có độ pH thấp hơn 5. Một phương án của sáng chế là đồ uống chứa hợp chất A và có độ pH thấp hơn

5, trong đó tỷ lệ hàm lượng hợp chất A/Bx là 0,1 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)/Bx hoặc cao hơn.

Vì hợp chất A là chất hữu ích có tác dụng cải thiện động lực học tập nên mong muốn hơn nữa là nó có hàm lượng cao hơn trong đồ uống. Cụ thể hơn là, hàm lượng này tốt hơn là $1\mu\text{g}/100\text{g}$ hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là $60\mu\text{g}/100\text{g}$ hoặc cao hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là $75\mu\text{g}/100\text{g}$ hoặc cao hơn.

Ngược lại với hàm lượng hợp chất A mà càng cao càng tốt, độ Brix thấp hơn được mong muốn hơn vì đồ uống có độ Brix cao không được ưu tiên xét về mặt hương vị và cảm giác trên lưỡi, v.v.. Do đó, ưu tiên đồ uống giàu hợp chất A, là chất hữu ích, và có độ Brix thấp, tức là đồ uống có tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A ($\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) cao. Cụ thể hơn là, tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A ($\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) tốt hơn là 0,1 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)/Bx hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 6 hoặc cao hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là 10 hoặc cao hơn.

Đồ uống theo sáng chế được đặc trưng không chỉ ở chỗ nó có tác dụng cải thiện động lực học tập và có thể dùng được liên tục trong khoảng thời gian dài, mà còn ở chỗ nó có hương vị và cảm giác trên lưỡi rất tốt và còn có hình thức đẹp. Đặc biệt là trong trường hợp các đồ uống được tạo ra bằng cách sử dụng phần chiết theo sáng chế nêu trên, các cặn lắng có nguồn gốc từ phần chiết không sinh ra khi bổ sung phần chiết vào đồ uống mặc dù hợp chất A có mặt trong đó với hàm lượng cao. Do đó, đồ uống thu được được đặc trưng ở chỗ chúng không chứa cặn lắng có nguồn gốc từ phần chiết. Các chất lỏng có phần chiết được kết hợp vào bao gồm các chất lỏng mà bản thân chúng không có cặn lắng (ví dụ, đồ uống có gốc là nước ép hoa quả trong, ví dụ như đồ uống từ nước ép táo có gốc là nước ép hoa quả trong) và các chất lỏng mà bản thân chúng chứa cặn lắng (ví dụ, các đồ uống có gốc là nước ép hoa quả đục, ví dụ như đồ uống từ nước ép cam có gốc là nước ép hoa quả đục). Nếu đồ uống được tạo ra bằng cách bổ sung phần chiết theo sáng chế vào chất lỏng không chứa thành phần cặn lắng thì các đồ uống thu được cũng không chứa cặn lắng. Mặt khác, nếu đồ uống được tạo ra bằng cách bổ sung phần chiết theo sáng chế vào đồ uống mà bản thân nó có chứa thành phần cặn lắng (ví dụ, đồ uống có gốc là nước ép hoa quả đục), thì đồ uống thu được sẽ chứa cặn lắng có nguồn gốc từ nước ép hoa quả đục nhưng hầu như không chứa cặn lắng có nguồn gốc từ phần chiết theo sáng chế.

Trong đồ uống được tạo ra bằng cách bổ sung phần chiết theo sáng chế vào

chất lỏng không chứa thành phần cặn lắng, việc có hoặc không có sự lắng cặn có thể được xác nhận, ví dụ, bằng mắt hoặc bằng thực tế là không thu gom được chất rắn nào bằng cách ly tâm.

Mặt khác, trong đồ uống được tạo ra bằng cách bổ sung phần chiết theo sáng chế vào đồ uống mà bản thân nó chứa thành phần cặn lắng (ví dụ, đồ uống có gốc là nước ép cam), để xác nhận liệu chúng có hầu như là không chứa cặn lắng có nguồn gốc từ phần chiết theo sáng chế hay không, ví dụ, cặn lắng trong đồ uống này có thể được thu gom và phân tích để xác định liệu các cặn lắng này có lượng rất nhỏ protein được hòa tan với chất hoạt động bề mặt như natri dodecyl sulfat (sau đây được gọi là “SDS”) hay không. Nếu đồ uống chứa cặn lắng là thành phần có nguồn gốc từ phần chiết thì các protein có nguồn gốc từ phần chiết được hòa tan bằng cách xử lý với chất hoạt động bề mặt. Ngược lại, nếu đồ uống hầu như không chứa cặn lắng có nguồn gốc từ phần chiết thì chỉ có lượng rất nhỏ protein được hòa tan. Cần lưu ý là sự hòa tan protein bằng SDS có thể được thực hiện theo cách đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, ví dụ, bằng cách sử dụng dung dịch SDS 0,025%. Trong trường hợp này, kết quả mà chỉ có lượng rất nhỏ protein được hòa tan được dự tính có nghĩa là lượng protein được hòa tan với dung dịch SDS 0,025% hầu như không có trong lượng chất rắn (trọng lượng ướt) của cặn lắng (tức là, 0,01mg/g cặn lắng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 0,001mg/g cặn lắng hoặc nhỏ hơn).

Như được sử dụng ở đây, lượng chất rắn (trọng lượng ướt) của cặn lắng được dự tính là để chỉ trọng lượng của chất rắn ở trạng thái ướt, mà được thu gom từ đồ uống bằng cách ly tâm trong máy tách ly tâm ở tốc độ từ 3000 đến 5000 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 1 đến 5 phút.

Đồ uống theo sáng chế có độ pH thấp hơn 5, tốt hơn là 4,5 hoặc thấp hơn, và tốt hơn nữa là 4 hoặc thấp hơn.

Đồ uống theo sáng chế có thể được tạo ra ở dạng đồ uống đóng gói, như trong trường hợp các đồ uống thông thường.

<Quy trình sản xuất phần chiết hoặc đồ uống>

Sáng chế đề cập đến phần chiết có tính axit hoặc đồ uống chứa hợp chất A. Phần chiết hoặc đồ uống này có thể được tạo ra, ví dụ, bằng quy trình sản xuất được thể hiện dưới đây:

(1) bước xử lý sơ bộ trong đó thịt của gia súc hoặc gia cầm, thịt cá hoặc thịt động vật có vỏ được dùng làm nguyên liệu ban đầu và được gia nhiệt trong chất lỏng để loại bỏ các protein tan trong nước có trong đó,

(2) bước gia nhiệt trong đó chất lỏng được thay thế sau bước xử lý sơ bộ và việc gia nhiệt được lặp lại lần nữa,

(3) bước xử lý axit trong đó axit được bổ sung vào, và

(4) bước lọc trong đó mẫu lỏng thu được được lọc.

Nguyên liệu ban đầu được ưu tiên sử dụng trong bước xử lý sơ bộ (1) nêu trên là sản phẩm có trong tự nhiên từ đó hợp chất A, thành phần hữu ích, có thể thu được một cách hiệu quả, cụ thể là thịt của gia súc hoặc gia cầm, thịt cá, hoặc thịt động vật có vỏ. Ví dụ về thịt của gia súc hoặc gia cầm bao gồm thịt của gia súc, tức là, trâu bò, lợn, ngựa, cừu hoặc dê, thịt của động vật không phải gia súc như lợn rừng hoặc nai, thịt của gia cầm, tức là, gà, gà tây, chim cút, vịt nhà hoặc vịt lai giống, cũng như thịt của loài chim hoang dã không phải gia cầm như vịt trời, gà lôi, chim sẻ hoặc chim hét. Tương tự, cũng có thể sử dụng thịt cá và thịt động vật có vỏ mà ăn được trong khóa ăn kiêng thông thường. Ví dụ khác là, nguyên liệu thực vật như cà phê và ca cao cũng có thể được sử dụng. Trong số các ví dụ về thịt của gia súc hoặc gia cầm, thịt cá và thịt động vật có vỏ này, thịt gà được ưu tiên để sử dụng vì hợp chất A có thể thu được một cách hiệu quả ở nồng độ cao.

Mặc dù chưa rõ lý do tại sao hợp chất A thu được với lượng lớn khi sử dụng thịt gà, nhưng có thể suy luận rằng các protein trong thịt gà là giàu cấu trúc phenylalanine (-Phe-Phe-) tiếp giáp và do đó tạo ra dipeptit (Phe-Phe) với lượng lớn, kết quả là thu được hợp chất A cần quan tâm với lượng lớn.

Trong bước xử lý sơ bộ (1), có thể thực hiện việc xử lý bất kỳ để làm giảm các protein tan trong nước có trong nguyên liệu ban đầu, ví dụ, bằng cách đun trong nước ở nhiệt độ từ 100°C đến 160°C trong khoảng thời gian từ 30 phút đến vài giờ (tốt hơn là từ 3 đến 8 giờ, tốt hơn nữa là khoảng từ 3 đến 4 giờ). Đối với thiết bị gia nhiệt, nồi áp suất, nồi hấp v.v. có thể được kết hợp để sử dụng tùy thuộc vào các điều kiện dự tính. Hơn nữa, không có giới hạn về số lần thay thế chất lỏng được thực hiện trong bước xử lý sơ bộ (1). Ví dụ, trong bước (1), chất lỏng bổ sung (ví dụ, nước) hoặc nguyên liệu ban đầu bổ sung có thể được bổ sung tiếp vào để điều chỉnh nồng độ của

phần chiết hoặc đồ uống.

Bước gia nhiệt (2) tốt hơn là được thực hiện ở nhiệt độ cao dưới áp suất cao (nhiệt độ 100°C hoặc cao hơn và áp suất 1atm hoặc cao hơn), ví dụ, ở 100°C hoặc cao hơn, và tốt hơn nữa là ở 125°C hoặc cao hơn. Ngoài ra, thời gian gia nhiệt trong bước gia nhiệt (2) tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30 phút đến vài giờ, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 7 giờ. Đối với thiết bị gia nhiệt, nồi áp suất, nồi hấp v.v. cũng có thể được kết hợp để sử dụng tùy thuộc vào các điều kiện dự tính.

Bước xử lý sơ bộ (1) và bước gia nhiệt (2) có thể được thực hiện liên tục như là một bước đơn mà không có sự thay thế chất lỏng. Theo cách khác, bước xử lý sơ bộ có thể được tiếp tục bằng việc lấy thịt được xử lý sơ bộ ra và sau đó thay thế chất lỏng trước khi thịt được đưa qua bước gia nhiệt. Vì có thể thu được các mẫu có độ Brix thấp hơn nếu thực hiện việc thay thế chất lỏng sau bước xử lý sơ bộ (1) và trước bước gia nhiệt (2), nên mong muốn hơn là có áp dụng việc thay thế chất lỏng.

Cần lưu ý là việc xử lý nhiệt trong bước (1) và (2) tốt hơn là được thực hiện trong dung môi để ngăn ngừa việc cháy nguyên liệu thực vật và động vật. Ví dụ về dung môi được ưu tiên để sử dụng bao gồm nước, etanol, hoặc hỗn hợp của chúng. Cụ thể là, nguyên liệu thực vật hoặc động vật đựng các protein (tốt hơn là các protein giàu cấu trúc phenylalanin (-Phe-Phe-) tiếp giáp) được trộn với dung môi và được đem xử lý nhiệt, sau đó thu gom dung môi để thu được dung dịch giàu hợp chất A.

Để đảm bảo trạng thái trong đó chất lỏng (phần chiết) chứa hợp chất A không chứa cặn lắng ở điều kiện axit hoặc trạng thái trong đó đồ uống có tính axit thu được bằng cách bổ sung phần chiết không chứa cặn lắng, việc xử lý axit nên được thực hiện để axit hóa sản phẩm chứa hợp chất A thu được ở bước (2). Việc xử lý axit này tốt hơn là được thực hiện sau bước (2). Axit bất kỳ có thể được bổ sung nhằm mục đích này, và ưu tiên là các chất phụ gia thực phẩm và nguyên liệu thực phẩm thường dùng để sản xuất thực phẩm. Ví dụ về chất phụ gia thực phẩm bao gồm axit adipic, axit xitric, axit lactic, axit axetic, axit glucono-delta-lacton, axit fumaric, axit gluconic, axit axetic băng, axit malic, axit tartaric, axit phosphoric, axit L-ascorbic, v.v.. Tương tự, ví dụ về nguyên liệu thực phẩm bao gồm axit itaconic, axit phytic, axit α -ketoglutaric, giấm ume, giấm ngũ cốc, nước hoa quả, giấm mạch nha, giấm nho, giấm táo, giấm gạo, v.v.. Mặc dù axit bất kỳ có thể được sử dụng miễn là nó thường được sử dụng trong sản

xuất thực phẩm, nhưng ưu tiên axit malic, axit xitric và axit phosphoric, là các chất có hương vị tuyệt vời. Các axit này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với nhau mà không có giới hạn bất kỳ.

Axit này nên được bổ sung với lượng cần thiết để điều chỉnh độ pH đến trị số mong muốn mà có thể được xác định là thích hợp tùy thuộc vào loại axit được bổ sung và độ pH mong muốn.

Công suất lọc trong bước lọc có thể được chọn lựa để phù hợp, tùy thuộc vào dạng thực phẩm mà phần chiết thu được được kết hợp vào đó, và phương pháp lọc cũng có thể được xác định phù hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, trong trường hợp phần chiết được sử dụng cho các thực phẩm dạng rắn (ví dụ, viên nén) và đồ uống thu được không cần phải trong (ví dụ, đồ uống đóng hộp có hình thức được che khuất trong vật đựng), thì chỉ cần lọc ra các cặn lắng sinh ra trong bước gia nhiệt trước đó và việc lọc qua lưới lọc có thể được dùng cho mục đích này. Theo cách khác, trong trường hợp phần chiết cần phải trong (ví dụ, được sử dụng cho các đồ uống trong các chai trong suốt hoặc các chai nhựa) thì nên dùng cách lọc công suất lớn. Đối với mục đích làm trong, việc lọc qua lưới lọc có thể được tiếp tục bằng việc lọc qua màng (màng trao đổi ion, màng RO, màng điện thế zeta, màng UF) và/hoặc lọc qua diatomit, v.v.

Trong phần chiết hoặc đồ uống theo sáng chế, dung dịch giàu hợp chất A này có thể được dùng trực tiếp hoặc, nếu cần, có thể được cô để làm tăng thêm nồng độ hợp chất A. Việc cô này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị bay hơi hoặc bằng cách làm đông khô, v.v.

Hàm lượng hợp chất A gia tăng trước và sau khi cô, trong khi đó tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A (đơn vị: $\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) vẫn giữ hầu như là không đổi. Điều này là vì độ Brix cũng tăng khi cô. Do đó, khi các mẫu có tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A (đơn vị: $\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) bằng 6 hoặc cao hơn được cô thì có thể thu được các phần chiết chứa hàm lượng hợp chất A cao hơn và có tỷ lệ bằng 6 hoặc cao hơn. Ngược lại, khi các mẫu có tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A (đơn vị: $\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) nhỏ hơn 6 được cô thì không thể thu được các phần chiết có tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A (đơn vị: $\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) bằng 6 hoặc cao hơn, mặc dù thu được các phần chiết chứa hàm lượng hợp chất A cao.

Đồ uống theo sáng chế có thể được tạo ra nếu thích hợp ở dạng đồ uống đóng gói nếu cần.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ sau, các ví dụ này không được dự tính là làm giới hạn phạm vi sáng chế.

<Ví dụ 1> Tác dụng cải thiện động lực học tập của hợp chất A (1)

Hợp chất A được đánh giá tác dụng nâng cao động lực học tập của nó bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, tức là phương pháp mê cung nước Morris (Morris Water Maze-MWM).

Đầu tiên, nước đã được nhuộm màu đen bằng mực Ấn Độ được đổ đầy vào thùng hình trụ có đường kính 90cm và chiều cao 35cm để có được độ sâu của nước là 20cm, và nhiệt độ của nước được đặt ở $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Cho chuột C57BL/6 (đực, 9 tuần tuổi) vào thùng này và để chúng bơi trong không gian mở (open space swimming: OSS). Khi OSS, các con chuột sẽ có các thay đổi về hành vi của chúng và đi vào trạng thái tương ứng với sự trầm cảm. Sau khi lặp lại OSS trong 5 ngày, các con chuột này được chia thành 7 nhóm.

Tiếp theo, trong thùng hình trụ đường kính 90cm và chiều cao 35cm nêu trên, bậc thoát đường kính 10cm được đặt dưới mặt nước 0,5cm. Mỗi nhóm trong số 7 nhóm chuột nêu trên được dùng hợp chất A qua đường miệng (Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)) hoặc dùng thuốc so sánh, fluvoxamin maleat. Sau 60 phút, mỗi con chuột được cho vào thùng đã bố trí bậc thoát, và đo thời gian cần thiết để nó tìm ra bậc thoát không nhìn thấy được đặt dưới bề mặt nước (tức là, thời gian chờ trốn thoát) để đánh giá khả năng ghi nhớ về không gian và học tập của mỗi con chuột (MWM). Để làm đối chứng, các con chuột không được cho OSS được dùng nước muối sinh lý và đưa qua thử nghiệm MWM. Việc thử nghiệm MWM được lặp lại năm lần mỗi ngày trong 10 ngày.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.1. Như có thể thấy từ Fig.1, các con chuột không được cho OSS (không OSS-tá được), thời gian chờ trốn thoát được giảm xuống khi lặp lại thử nghiệm, trong khi đó các con chuột được cho OSS thể hiện động lực học tập giảm và không giảm được thời gian chờ trốn thoát (OSS-nước muối).

Ngược lại, nhóm dùng hợp chất A thể hiện sự giảm thời gian chờ trốn thoát phụ thuộc liều. Trong nhóm dùng 0,02mg/kg, thời gian chờ trốn thoát ở 10 ngày của thử nghiệm MWM được giảm xuống khoảng 20%, khi được so sánh với nhóm đối chứng (OSS-nước muối) trong đó các con chuột OSS được dùng nước muối sinh lý. Hơn nữa, trong nhóm dùng 20mg/kg, thời gian cần thiết để đến được bậc thoát trong 10 ngày của thử nghiệm MWM về cơ bản là giống như thời gian của nhóm (OSS-Fluvoxamin) dùng fluvoxamin maleat, chất này thường được dùng làm SSRI. Điều này chỉ ra rằng hợp chất A có tác dụng nâng cao động lực học tập.

<Ví dụ 2> Tác dụng cải thiện động lực học tập (2)

Theo cách tương tự như được thể hiện trong ví dụ 1, nhóm khác dùng 0,002mg/kg được chuẩn bị và được đưa qua thử nghiệm MWM tương tự.

Thời gian cần để đến được bậc thoát trong 7 ngày thử nghiệm MWM được thể hiện trên Fig.2 với mỗi nhóm. Hợp chất A được xác nhận là có tác dụng khi được dùng ở liều 0,02mg/kg hoặc cao hơn. Trong trường hợp liều dùng cho người được dự đoán từ liều hữu hiệu đối với động vật, thì liều dùng cho người được tính là bằng 1/10 liều dùng cho chuột với hệ số 10 dựa trên cơ sở đặc tính loài động vật (Safety Assessment of Foods, do Kageaki Aibara và Mitsuru Uchiyama biên tập, Japan Scientific Societies Press, 1987). Do đó, liều 0,02mg/kg hữu hiệu trong thử nghiệm nêu trên tương ứng với liều 0,1mg/người (có trọng lượng 50kg). Nếu thực phẩm chứa hợp chất A được tạo ra ở dạng đồ uống và thể tích của chúng được đặt là 100ml, thì nồng độ hữu hiệu được tính là 1,0 μ g/ml.

<Ví dụ 3> Tác dụng cải thiện động lực học tập (3)

Theo cách thức giống như được thể hiện trong ví dụ 1, các con chuột được dùng liều 20mg/kg hợp chất A và sau đó được đưa qua thử nghiệm MWM. Để làm đối chứng, dipeptit mạch thẳng (Phe-Phe) được dùng với liều 20mg/kg, sau đó thực hiện thử nghiệm MWM.

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.3. Như có thể thấy từ Fig.3, dipeptit mạch thẳng (Phe-Phe) không được xác nhận là có tác dụng đáng kể, trong khi đó hợp chất A cho thấy tác dụng cải thiện động lực học tập đáng kể so với nhóm đối chứng (OSS-nước muối). Cụ thể là, được chỉ ra rằng cấu trúc dipeptit mạch vòng là cần thiết để có tác dụng cải thiện động lực học tập.

<Ví dụ 4> Nghiên cứu đối với nguyên liệu ban đầu

Để làm nguyên liệu ban đầu chứa protein, thịt bò, thịt lợn, cá, thịt chim cút, thịt hến và thịt gà (gà đen, gà) được sử dụng. Mỗi nguyên liệu động vật này được trộn với một thể tích nước và được đưa vào vật đựng, sau đó xử lý nhiệt trong nồi hấp ở 135°C trong 4 giờ (bước xử lý sơ bộ) và xử lý tiếp ở 135°C trong 4 giờ (bước gia nhiệt). Chất lỏng đã được xử lý nhiệt được thu gom và điều chỉnh đến độ pH bằng 3 bằng dung dịch axit phosphoric 75% dùng làm phụ gia thực phẩm (Nippon Chemical Industrial Co., Ltd., Japan). Sau đó, chất lỏng này được rửa giải bằng axetonitril từ cột xử lý sơ bộ (OASIS MAX (Waters: 30 mg/1cm³)), sau đó thực hiện sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để định lượng hàm lượng hợp chất A. Các điều kiện đối với HPLC được thể hiện dưới đây. Kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 4.

(Các điều kiện HPLC)

Hệ thống: Agilent 1100 series

Cột: Develosil C30-UG-5 (4,6 x 150mm, 5µm)

Pha động A: nước, pha động B: dung dịch axetonitril 100%

Gradien:	Thời gian (phút)	Dung môi B
	0,00	20%
	9,00	20%
	23,00	28%
	24,00	70%
	31,00	70%
	31,10	20%
	40,00	20%

Thể tích tiêm: 10µl

Bước sóng dò UV: 215nm

Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

Nhiệt độ cột: 32°C

Cần lưu ý rằng chất lỏng chứa hợp chất A cũng có thể được thu gom từ bản thân hạt cà phê rang, trong khi đó hợp chất A không được phát hiện trong đồ uống cà phê được chiết từ hạt cà phê rang.

<Ví dụ 5> Sản xuất phần chiết có tính axit chứa hợp chất A

(1) Ở bước xử lý sơ bộ để loại bỏ các protein tan trong nước, thịt gà (200g) và nước (200g) được đưa vào cột trong hệ thống và được xử lý ở nhiệt độ cao dưới áp suất cao bằng thiết bị phản ứng nhiệt độ cao, áp suất cao dung tích 400cm³ (AKIKO).

(2) Sau đó, ở bước gia nhiệt, chất lỏng trong bình nêu trên được tách ra và loại bỏ. Nước được bổ sung vào với lượng bằng với khối lượng thịt gà, và lặp lại việc xử lý tương tự như được thể hiện ở mục (1) lần nữa ở nhiệt độ cao dưới áp suất cao.

(3) Chất lỏng thu được được lọc qua lưới lọc cỡ khoảng 40 mắt lưới. Sau đó, dịch lọc được điều chỉnh đến độ pH bằng 3 bằng axit dùng cho phụ gia thực phẩm (ví dụ, axit phosphoric, axit citric, axit malic) và sau đó ly tâm (6500 vòng/phút, 5 phút) và được lọc tiếp qua lưới lọc (cỡ 300 mắt lưới), sau đó lọc qua bộ lọc 5μm (Sumitomo 3M Limited, Japan).

Cần lưu ý rằng phần chiết 1 trong bảng 1 dưới đây không được đưa qua bước xử lý sơ bộ.

Độ pH, hàm lượng hợp chất A và độ Bx được đo đối với mỗi phần chiết để tính tỷ lệ hàm lượng hợp chất A/Bx.

Để xác định độ Bx, máy đo độ Bx (RX-5000α: Atago Co., Ltd., Japan) được sử dụng để đo.

Kết quả trong bảng 1 chỉ ra rằng nếu bước xử lý sơ bộ (1) được thực hiện để loại bỏ các protein tan trong nước hoặc nếu các điều kiện xử lý sơ bộ được cài đặt ở nhiệt độ cao và khoảng thời gian dài hơn, thì các phần chiết thu được trong bước gia nhiệt (2) có độ Bx thấp hơn. Kết quả là, đã chỉ ra rằng thu được các phần chiết có tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A (μg/100g) và độ Brix (Bx) cao.

[Bảng 1]

Phần chiết	1	2	3	4	5
Bước xử lý sơ bộ		160°C	160°C	160°C	160°C

		3 giờ	6 giờ	9 giờ	12 giờ
Bước gia nhiệt	160°C	160°C	160°C	160°C	160°C
	3 giờ	3 giờ	3 giờ	3 giờ	3 giờ
Thể tích axit bổ sung (với mỗi 100ml phần chiết)	Axit phosphoric 2,0 ml	Axit phosphoric 0,70 ml	Axit phosphoric 0,20 ml	Axit phosphoric 0,14 ml	Axit phosphoric 0,07 ml
Hàm lượng hợp chất A (µg/100g)	135,7	139,8	111,7	112,5	108,3
Độ Bx	12,58	4,28	1,42	0,79	0,62
Tỷ lệ	10,8	32,7	78,7	142,4	174,6
Độ pH	3,1	3,1	3,1	2,9	3,1

<Ví dụ 6> Xác nhận việc có hay không có sự lắng cặn khi bổ sung phần chiết có tính axit

Phần chiết từ gà hoặc nước cốt gà có độ pH trung tính hoặc phần chiết có tính axit (1g) được bổ sung vào các dung dịch lỏng (mỗi dung dịch 100g), dung dịch này đã được điều chỉnh đến các độ pH khác nhau bằng axit xitric và 3Na xitrat, để nghiên cứu việc có hay không sự lắng cặn.

Kết quả là, các sản phẩm trung tính như phần chiết từ gà và sản phẩm nước cốt gà có bán trên thị trường được thấy là gây ra sự lắng cặn khi được bổ sung vào các dung dịch lỏng có tính axit. Cần lưu ý là nước cốt gà này được hòa tan trong nước trước khi sử dụng, như được chỉ định trên nhãn bao bì (150ml nước với mỗi 3,55g khối nước cốt gà).

Ngược lại, phần chiết có tính axit theo sáng chế được thấy là ổn định không gây ra sự lắng cặn ngay cả khi được bổ sung vào các dung dịch lỏng có tính axit.

Trong bảng sau đây, “○” thể hiện rằng phần chiết được bổ sung vào dung dịch lỏng được hòa tan và do đó không gây ra sự lắng cặn, trong khi đó “×” thể hiện rằng phần chiết bổ sung vào dung dịch lỏng không được hòa tan và do đó gây ra sự lắng cặn.

[Bảng 2]

	Phản chiết từ gà bán trên thị trường (New Moon)	Nước cốt (khối nước cốt gà của Ajinomoto)	Phản chiết 4 theo ví dụ 5
pH=7	○	○	○
pH=6	○	○	○
pH=5	○	○	○
pH=4	×	×	○
pH=3	×	×	○

<Ví dụ 7> Xác nhận sự lắng cặn (1)

(Chuẩn bị mẫu)

Đối với các hỗn hợp (i) và (ii) được thể hiện dưới đây, các mẫu được chuẩn bị để có hàm lượng hợp chất A và độ Brix được thể hiện trong các công thức pha chế từ số 1 đến số 6 của bảng 3. Đối với hỗn hợp (iii), các mẫu được chuẩn bị để có hàm lượng hợp chất A và độ Brix được thể hiện trong các công thức pha chế từ số 1 đến số 9 của bảng 3. Đối với nước ép (iv), các mẫu được điều chỉnh bằng cách pha loãng nếu thích hợp để có độ Brix giống như được thể hiện trong các công thức pha chế từ số 1 đến số 9 của bảng 3. Nước ép (iv) không chứa hợp chất A, và tỷ lệ hàm lượng hợp chất A/Bx bằng 0 trong mỗi mẫu.

Các mẫu của các hỗn hợp từ (i) đến (iii) và nước ép (iv) đã được chuẩn bị trên đây được tiệt trùng ở 85°C trong 10 phút.

Phản chiết từ gà có bán trên thị trường được sử dụng trong thử nghiệm này có độ Brix bằng 10 và độ pH bằng 6,3, và chứa 45µg hợp chất A với mỗi 100g phản chiết. Tương tự, bột gà có bán trên thị trường được sử dụng trong thử nghiệm này là dạng bột của phản chiết từ gà có bán trên thị trường, và chứa 45µg hợp chất A với mỗi 10g bột. Phản chiết có tính axit theo sáng chế có độ Brix bằng 61,1 và độ pH bằng 2,55, và chứa 48µg hợp chất A với mỗi 1g phản chiết có tính axit. Nước ép táo được sử dụng trong thử nghiệm này là nước uống hoa quả trong, có độ pH bằng 3,8.

Cần lưu ý rằng vì tỷ lệ giữa hàm lượng hợp chất A/Bx là 4,5 (µg/100g)/Bx trong phản chiết từ gà có bán trên thị trường, đối với hỗn hợp (i) dựa trên phản chiết từ

gà này, không thể thu được các mẫu có tỷ lệ hàm lượng hợp chất A/Bx cao hơn 4,5 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)/Bx. Do đó, chỉ có thể thu được các mẫu được thể hiện trong các công thức pha chế từ số 1 đến số 6 của bảng 3. Tương tự, trong trường hợp hỗn hợp (ii) dựa trên dạng bột của phần chiết từ gà có bán trên thị trường, chỉ có thể thu được các mẫu được thể hiện trong các công thức pha chế từ số 1 đến số 6 của bảng 3. Do đó, các hỗn hợp (i) và (ii) không thể nghiên cứu được trong các điều kiện được thể hiện ở cột 7, 8 hoặc 9, và do đó chỉ nghiên cứu được trong các điều kiện được thể hiện ở các cột từ 1 đến 6.

- (i) Hỗn hợp phần chiết từ gà có bán trên thị trường và nước ép táo 100%
- (ii) Hỗn hợp phần chiết dạng bột có bán trên thị trường và nước ép táo 100%
- (iii) Hỗn hợp phần chiết có tính axit theo sáng chế và nước ép táo 100%
- (iv) nước ép táo 100% (đối chứng)

(Xác nhận sự lắng cặn và cảm giác trên lưỡi)

Các mẫu được tiết trùng nêu trên được để yên và xác nhận có hoặc không có sự lắng cặn bằng cách kiểm tra bằng mắt và xác nhận cảm giác trên lưỡi. Kết quả thu được được thể hiện bằng mục “sự lắng cặn” và “cảm giác trên lưỡi” trong bảng 4.

Trong bảng này, “×” thể hiện là sự lắng cặn không thể quan sát được bằng mắt, trong khi đó “○” thể hiện là sự lắng cặn có thể quan sát được bằng mắt.

Cảm giác trên lưỡi được đánh giá theo thang năm điểm so với mẫu đối chứng (nước ép táo có bán trên thị trường được điều chỉnh để có độ Bx giống như được thể hiện trong các công thức pha chế từ 1 đến 9 bằng cách pha loãng bằng nước):

5 = có độ êm dịu giống như ở mẫu đối chứng

4 = để lại cảm giác hơi có hạt trên lưỡi so với mẫu đối chứng

3 = để lại cảm giác tương đối có hạt trên lưỡi so với mẫu đối chứng

2 = để lại cảm giác có hạt trên lưỡi so với mẫu đối chứng

1 = để lại cảm giác có hạt rõ ràng trên lưỡi so với mẫu đối chứng

(Đo hàm lượng chất rắn và nồng độ protein)

1. Mỗi mẫu được chuẩn bị trên đây (20g) được ly tâm (4000 vòng/phút, 1 phút) để loại bỏ phần lỏng, và cặn lắng thu được (tức là, chất rắn) được thu gom và đo trọng

lượng của chúng.

2. Chất rắn thu được ở mục 1 được lấy với lượng 0,05g, và bổ sung 200 μ l SDS 0,025% (Sigma Catalogue#L3771) vào đó.
3. Mẫu thu được ở mục 2 được lắc xoáy và sau đó ly tâm (14.000 vòng/phút, 1 phút).
4. Dịch nổi bề mặt thu được ở mục 3 được lấy với thể tích 20 μ l và được trộn với 1ml thuốc thử Bradford (BIO-RAD Catalog #500-0205) ở nhiệt độ trong phòng.
5. Dung dịch thu được ở mục 4 được phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút hoặc lâu hơn, và sau đó được đo độ hấp thụ ở bước sóng 595nm bằng quang phổ kế (UV-1601 UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER SHIMADZU).
6. Độ hấp thụ thu được ở mục 5 được sử dụng để xác định nồng độ protein theo đường cong hiệu chỉnh đã được chuẩn bị trước.
7. Nồng độ protein thu được ở mục 6 được sử dụng để xác định lượng protein trong mỗi 1g cặn lắng.

Bảng 4 thể hiện số liệu hàm lượng chất rắn được xác định ở mục 1 (“hàm lượng chất rắn g”), nồng độ protein được xác định ở mục 6 (“Protein (mg) trong cặn lắng”) và trị số được xác định ở mục 7 (“Protein (mg)/g cặn lắng”) đối với mỗi mẫu.

Cần lưu ý là đường cong hiệu chỉnh được sử dụng trong thử nghiệm này được tạo ra bằng quy trình được thể hiện dưới đây.

1. 70 μ l albumin huyết thanh bò (2mg/ml; BIO-RAD Catalog #500-0206) được trộn với 70 μ l SDS 0,025% để thu được dung dịch albumin huyết thanh bò nồng độ 1000 μ g/ml.
2. Dung dịch thu được ở mục 1 được pha loãng theo dãy với 70 μ l SDS 0,025% để tạo ra các dung dịch albumin huyết thanh bò có nồng độ lần lượt là 750 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml và 125 μ g/ml.
3. 70 μ l SDS 0,025% được sử dụng để làm dung dịch nồng độ 0 μ g/ml.
4. Mỗi phần trong số các phần 20 μ l của dung dịch albumin huyết thanh bò nêu trên được trộn với 1ml thuốc thử Bradford (BIO-RAD Catalog #500-0205) ở nhiệt độ

trong phòng.

5. Sau khi phản ứng với thuốc thử Bradford ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút hoặc lâu hơn, độ hấp thụ ở bước sóng 595nm được đo bằng quang phổ kế (UV-1601 UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER SHIMADZU).

6. Sử dụng các trị số độ hấp thụ xác định được và các nồng độ dung dịch albumin huyết thanh bò để tạo ra đường cong hiệu chỉnh.

[Bảng 3]

Công thức pha chế số	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hợp chất A	30 µg	60 µg	100 µg	30 µg	60 µg	100 µg	30 µg	60 µg	100 µg
Hợp chất A/Bx	1	1	1	4,5	4,5	4,5	6	6	6
Bx	6	12	20	1,33	2,66	4,44	1	2	3,33
Trọng lượng	500g	500g	500g	500g	500g	500g	500g	500g	500g

[Bảng 4]

Mẫu số	i-1	i-2	i-3	i-4	i-5	i-6
Sự lắng cặn	○	○	○	○	○	○
Cảm giác trên lưỡi	3	2	2	4	3	3
Hàm lượng chất rắn (g)	0,72	1,21	1,85	0,66	1,06	1,5
Protein (mg)/g cặn lắng	0,27	1,53	1,36	0,88	1,34	1,48
Protein (mg) trong cặn lắng	0,19	1,85	2,52	0,58	1,42	2,22

Mẫu số	ii-1	ii-2	ii-3	ii-4	ii-5	ii-6
Sự lắng cặn	○	○	○	○	○	○
Cảm giác trên lưỡi	2	1	1	3	2	2

Hàm lượng chất rắn (g)	2,42	1,31	1,89	0,65	1,2	1,71
Protein (mg)/g cặn lắng	0,45	1,24	1,74	0,80	1,05	1,32
Protein (mg) trong cặn lắng	1,10	1,63	3,29	0,52	1,26	2,25

Mẫu số	iii-1	iii-2	iii-3	iii-4	iii-5	iii-6	iii-7	iii-8	iii-9
Sự lắng cặn	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Cảm giác trên lưỡi	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Hàm lượng chất rắn (g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Protein (mg)/g cặn lắng	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Protein (mg) trong cặn lắng	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mẫu số	iv-1	iv-2	iv-3	iv-4	iv-5	iv-6	iv-7	iv-8	iv-9
Sự lắng cặn	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Cảm giác trên lưỡi	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Hàm lượng chất rắn (g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Protein (mg)/g cặn lắng	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Protein (mg) trong cặn lắng	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<Ví dụ 8> Xác nhận sự lắng cặn (2)

Đối với các hỗn hợp (vi) và (vii) được thể hiện dưới đây, như trong trường hợp của ví dụ 7, các mẫu được tạo ra để có hàm lượng hợp chất A và độ Brix được thể hiện ở các công thức pha chế từ số 1 đến số 6 của bảng 3. Đối với hỗn hợp (viii), các mẫu được tạo ra để có hàm lượng hợp chất A và độ Brix được thể hiện ở các công thức

pha chế từ số 1 đến số 9 của bảng 3. Đối với nước ép (ix), các mẫu được điều chỉnh bằng cách pha loãng nếu thích hợp để có độ Brix giống như được thể hiện ở các công thức pha chế từ số 1 đến số 9 của bảng 3. Nước ép (ix) không chứa hợp chất A, và tỷ lệ hàm lượng hợp chất A/Bx bằng 0 trong mỗi mẫu.

Các mẫu của các hỗn hợp từ (vi) đến (viii) và nước ép (ix) được tạo ra trên đây được tiệt trùng ở nhiệt độ 85°C trong thời gian 10 phút.

Phần chiết từ gà có bán trên thị trường được sử dụng trong thử nghiệm này có độ Brix bằng 10 và độ pH bằng 6,3, và chứa 45µg hợp chất A với mỗi 100g phần chiết. Tương tự, bột gà có bán trên thị trường được sử dụng trong thử nghiệm này là dạng bột của phần chiết từ gà có bán trên thị trường, và chứa 45µg hợp chất A với mỗi 10g bột. Phần chiết có tính axit theo sáng chế có độ Brix bằng 61,1 và độ pH bằng 2,55, và chứa 48µg hợp chất A với mỗi 1g phần chiết có tính axit. Nước ép cam được sử dụng trong thử nghiệm này là nước hoa quả đục, có độ pH bằng 3,74.

Cần lưu ý là vì tỷ lệ hàm lượng hợp chất A/Bx là 4,5 (µg/100g)/Bx trong phần chiết từ gà có bán trên thị trường, đối với hỗn hợp (vi) dựa trên phần chiết từ gà này, không thể thu được các mẫu có tỷ lệ hàm lượng hợp chất A/Bx cao hơn 4,5 (µg/100g)/Bx. Do đó, chỉ có thể thu được các mẫu thể hiện trong các công thức pha chế từ số 1 đến số 6 của bảng 3. Tương tự, trong trường hợp hỗn hợp (vii) dựa trên dạng bột của phần chiết từ gà có bán trên thị trường, chỉ có thể thu được các mẫu được thể hiện trong các công thức pha chế từ số 1 đến số 6 của bảng 3. Do đó, các hỗn hợp (vi) và (vii) không thể nghiên cứu được trong các điều kiện được thể hiện trên cột 7, 8 hoặc 9, và do đó chỉ nghiên cứu được trong các điều kiện được thể hiện ở các cột từ 1 đến 6.

- (vi) Hỗn hợp phần chiết từ gà có bán trên thị trường và nước ép cam 100%
- (vii) Hỗn hợp phần chiết dạng bột có bán trên thị trường và nước ép cam 100%
- (viii) Hỗn hợp phần chiết có tính axit theo sáng chế và nước ép cam 100%
- (ix) Nước ép cam 100% (đối chứng)

Mỗi mẫu được chuẩn bị trên đây được phân tích theo cách thức giống như được thể hiện ở ví dụ 7 để xác nhận có hay không sự lắng cặn, đánh giá cảm giác trên lưỡi, và xác định hàm lượng chất rắn và nồng độ protein. Kết quả thu được được thể

hiện trong bảng 5.

[Bảng 5]

Mẫu số	vi-1	vi-2	vi-3	vi-4	vi-5	vi-6
Sự lắng cặn	○	○	○	○	○	○
Cảm giác trên lưỡi	3	2	2	3	2	2
Hàm lượng chất rắn (g)	1,28	2,58	3,21	0,30	0,69	1,09
Protein (mg)/g cặn lắng	0,09	0,86	0,62	0,60	0,85	0,97
Protein (mg) trong cặn lắng	0,12	2,22	1,99	0,18	0,59	1,06

Mẫu số	vii-1	vii-2	vii-3	vii-4	vii-5	vii-6
Sự lắng cặn	○	○	○	○	○	○
Cảm giác trên lưỡi	3	3	2	3	2	1
Hàm lượng chất rắn (g)	1,36	2,73	3,35	0,40	0,55	1,45
Protein (mg)/g cặn lắng	0,32	0,26	1,30	1,87	2,42	3,15
Protein (mg) trong cặn lắng	0,43	0,71	4,36	0,75	1,33	4,57

Mẫu số	viii-1	viii-2	viii-3	viii-4	viii-5	viii-6	viii-7	viii-8	viii-9
Sự lắng cặn	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Cảm giác trên lưỡi	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Hàm lượng chất rắn (g)	1,57	2,47	2,83	0,53	0,49	1,08	0,44	0,63	0,83
Protein (mg)/g cặn lắng	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Protein (mg) trong cặn lắng	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Mẫu số	ix-1	ix-2	ix-3	ix-4	ix-5	ix-6	ix-7	ix-8	ix-9
Sự lắng cặn	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Cảm giác trên lưỡi	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Hàm lượng chất rắn (g)	1,18	2,47	2,27	0,48	0,77	1,02	0,44	0,57	0,78
Protein (mg)/g cặn lắng	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Protein (mg) trong cặn lắng	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

<Ví dụ 9> Sản xuất đồ uống có tính axit chứa hợp chất A (1)

Phân chiết theo sáng chế được bổ sung để tạo ra đồ uống. Công thức pha chế được sử dụng như được thể hiện dưới đây.

Phân chiết có tính axit được sử dụng được chuẩn bị từ phân chiết 3 của ví dụ 5 (được thể hiện trong bảng 1) bằng cách cô trong thiết bị làm bay hơi.

[Bảng 6]

Phân chiết có tính axit	Phân chiết 3 của ví dụ 5 (đã được cô)
Bx	61,1
Độ axit (g/100g)	36,36
Độ pH	2,55
Hợp chất A ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	4806
Tỷ lệ	78,7

[Bảng 7]

Đồ uống có tính axit	
Nguyên liệu ban đầu (với mỗi 100g)	
Đường	17,2g
Axit xitric	0,21
3Na xitrat	0,075g
Hương liệu	150 μl
Phân chiết được thể hiện trên đây	1,66g

Nước	Điều chỉnh đến 100g
Bx	18,5
Độ axit (g/100g)	0,66
Độ pH	2,75
Hợp chất A ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	85
Tỷ lệ	4,59
Đánh giá cảm quan	Đồ uống không có vấn đề vì nó không có mùi, vị đắng và vị không mong muốn có nguồn gốc từ thịt của gia súc hoặc gia cầm
Hình thức	Màu nâu nhạt, trong suốt, không đục

<Ví dụ 10> Sản xuất phân chiết dạng bột chứa hợp chất A

Phân chiết được tạo ra theo ví dụ 5 nêu trên được làm đông khô để tạo ra phân chiết dạng bột.

1. Phân chiết có tính axit (phân chiết 3 theo ví dụ 5 (được thể hiện trong bảng 1); 100g) được lấy vào bình thu hồi dung tích 200ml.
2. Bình này được bảo quản trong tủ đông (-18°C) trong 2 hoặc 3 ngày cho đến khi phân chiết được đông lạnh hoàn toàn.
3. Bình này được đặt lên thiết bị làm đông khô (LABCONCO, đặt ở nhiệt độ -40°C hoặc thấp hơn) và làm đông khô đến khi khô hoàn toàn.

Theo cách trên đây, thu được bột khô với lượng 2g.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề xuất phân chiết có tính axit và đồ uống có tác dụng cải thiện động lực học tập và có độ an toàn cao mà không gây tác dụng phụ. Phân chiết có tính axit theo sáng chế có thể được bổ sung vào đồ uống có tính axit v.v. mà không gây ra sự lắng cặn và suy giảm vị vốn có của thực phẩm và đồ uống. Phân chiết có tính axit hoặc đồ uống theo sáng chế, cũng như thực phẩm và đồ uống chứa chúng có thể được dùng liên tục trong khoảng thời gian dài làm thực phẩm và đồ uống hữu ích để cải thiện động lực học tập.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phần chiết chứa 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)- (3S,6S)- và có độ pH thấp hơn 5.
2. Phần chiết theo điểm 1, trong đó tỷ lệ giữa hàm lượng 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)-,(3S,6S)- ($\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) là 0,1 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)/Bx hoặc cao hơn.
3. Phần chiết theo điểm 1, trong đó tỷ lệ giữa hàm lượng 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)-,(3S,6S)- ($\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) là 6 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)/Bx hoặc cao hơn.
4. Phần chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó phần chiết này chứa 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)-,(3S,6S)- với nồng độ $1\mu\text{g}/100\text{g}$ hoặc cao hơn.
5. Phần chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó phần chiết này chứa 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)-,(3S,6S)- với nồng độ $60\mu\text{g}/100\text{g}$ hoặc cao hơn.
6. Phần chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)-,(3S,6S)- được chiết từ sản phẩm có trong tự nhiên.
7. Phần chiết theo điểm 6, trong đó sản phẩm có trong tự nhiên là thịt của gia súc hoặc gia cầm, thịt cá, hoặc thịt động vật có vỏ.
8. Phần chiết theo điểm 6 hoặc 7, trong đó sản phẩm có trong tự nhiên là thịt gà.
9. Phần chiết khô có thể thu được bằng cách sấy phần chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.
10. Đồ uống có tính axit có thể thu được bằng cách bổ sung phần chiết theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.
11. Đồ uống có tính axit chứa 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)-,(3S,6S)- và có độ pH thấp hơn 5.
12. Đồ uống có tính axit theo điểm 10 hoặc 11, trong đó tỷ lệ giữa hàm lượng 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)-,(3S,6S)- ($\mu\text{g}/100\text{g}$) và độ Brix (Bx) là 0,1 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)/Bx hoặc cao hơn.

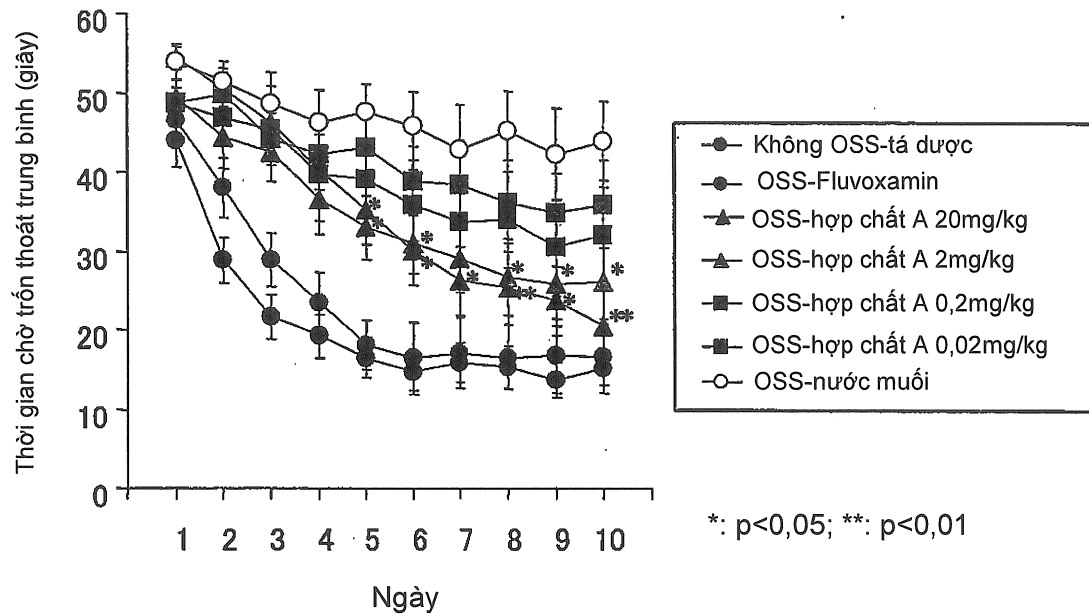
13. Đồ uống có tính axit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 12, trong đó đồ uống này chứa 2,5-piperazindion,3,6-bis(phenylmetyl)-,(3S,6S)- với nồng độ 1µg/100g hoặc cao hơn.
14. Đồ uống có tính axit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 13, trong đó đồ uống này không có cặn lắng.
15. Đồ uống có tính axit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 13, trong đó đồ uống này chứa cặn lắng, và trong đó lượng protein có trong 1g cặn lắng thu được từ đồ uống này là 0,01mg hoặc nhỏ hơn.
16. Đồ uống đóng gói, trong đó đồ uống theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 15 được đóng gói vào vật đựng.
17. Quy trình sản xuất phần chiết theo điểm 1, bao gồm các bước:
- (1) bước xử lý sơ bộ trong đó thịt của gia súc hoặc gia cầm, thịt cá hoặc thịt động vật có vỏ được dùng làm nguyên liệu ban đầu và được gia nhiệt trong chất lỏng để loại bỏ các protein tan trong nước có trong đó,
 - (2) bước gia nhiệt trong đó chất lỏng được thay thế sau bước xử lý sơ bộ và việc gia nhiệt được lặp lại lần nữa,
 - (3) bước xử lý axit trong đó axit được bổ sung vào, và
 - (4) bước lọc trong đó mẫu lỏng thu được được lọc.
18. Quy trình theo điểm 17, trong đó axit được bổ sung trong bước (3) là một hoặc nhiều axit được chọn từ nhóm bao gồm axit phosphoric, axit malic và axit xitric.
19. Quy trình sản xuất đồ uống theo điểm 11, bao gồm các bước:
- (1) bước xử lý sơ bộ trong đó thịt của gia súc hoặc gia cầm, thịt cá hoặc thịt động vật có vỏ được dùng làm nguyên liệu ban đầu và được gia nhiệt trong chất lỏng để loại bỏ các protein tan trong nước có trong đó,
 - (2) bước gia nhiệt trong đó chất lỏng được thay thế sau bước xử lý sơ bộ và việc gia nhiệt được lặp lại lần nữa,
 - (3) bước xử lý axit trong đó axit được bổ sung vào, và

(4) bước lọc trong đó mẫu lỏng thu được được lọc.

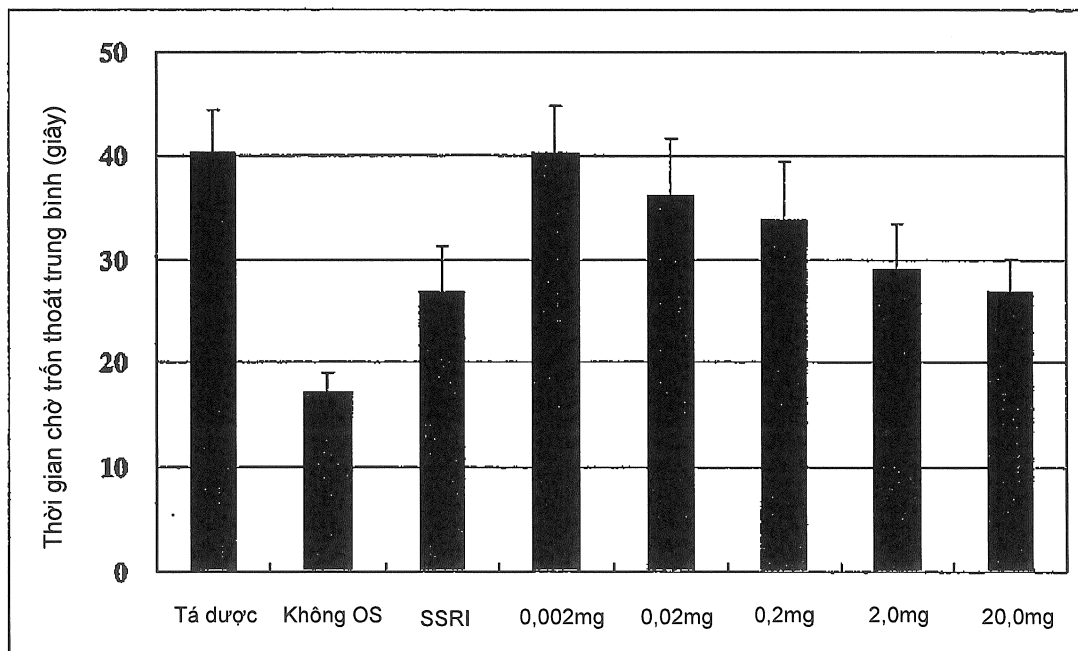
20. Quy trình theo điểm 19, trong đó axit được bổ sung trong bước (3) là một hoặc nhiều axit được chọn từ nhóm bao gồm axit phosphoric, axit malic và axit xitric.

1/2

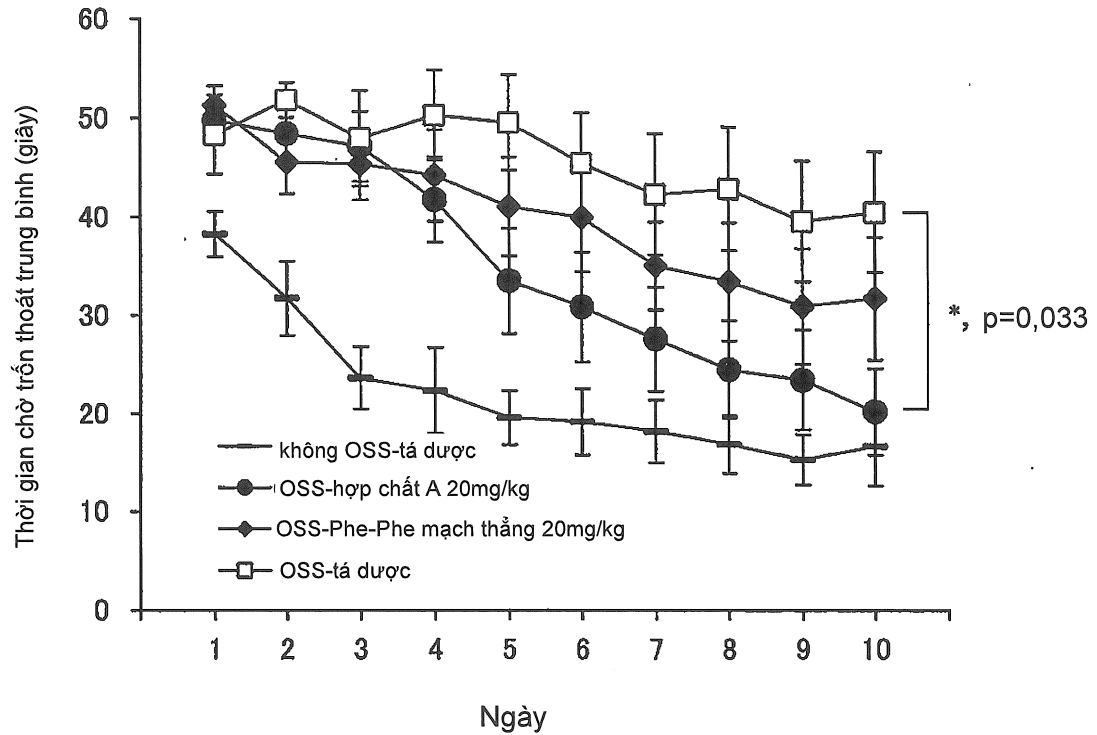
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

