



(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)



1-0024716

(51)⁷ C07K 1/14; A61K 38/00; C07K 14/415; (13) B
A61K 36/18; A61P 1/10

(21) 1-2013-03433

(22) 30/03/2012

(86) PCT/JP2012/058616 30/03/2012

(87) WO2012/133792 04/10/2012

(30) 2011-080743 31/03/2011 JP

(45) 27/07/2020 388

(43) 27/01/2014 310A

(73) MEIJI CO., LTD. (JP)

2-10, Shinsuna 1-chome, Koto-ku, Tokyo 1368908, JP.

(72) KOGA, Jinichiro (JP); YONEKURA, Kumiko (JP); TAMURA, Kazuji (JP); SAITO, Satomi (JP); FUKASAWA, Tomoyuki (JP); SHINEI, Rie (JP).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT TÁC NHÂN CẢI THIỆN NHU ĐỘNG RUỘT

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa protein thu được từ hạt cacao với hàm lượng cao. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm này bao gồm các bước: (a) chiết từ nguyên liệu chứa protein có nguồn gốc từ hạt cacao trong điều kiện kiềm để thu được chất chiết chứa protein; và (b) kết tủa protein từ chất chiết thu được trong bước (a) trong điều kiện axit để thu được chế phẩm chứa protein từ hạt cacao với tỷ lệ trọng lượng từ 43 đến 70% tổng trọng lượng chất rắn. Phương pháp này còn có thể bao gồm bước (c) khử chất béo bằng cách loại bỏ thành phần chất béo của hạt cacao trước bước (a) và/hoặc sau bước (b).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột chứa chế phẩm chứa protein mà chế phẩm này chứa protein có trong hạt cacao với hàm lượng cao.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sôcôla và cacao đã được nghiên cứu không chỉ như là nguyên liệu thực phẩm để thỏa mãn vị giác mà còn như là nguyên liệu thực phẩm có chức năng về sức khỏe đối với cơ thể. Hơn nữa, cacao dạng khối thu được bằng cách bóc vỏ từ hạt cacao và nghiền sản phẩm thu được cũng chứa các thành phần chức năng như chất chống oxy hóa và chất xơ ăn kiêng, và vì vậy đã được nghiên cứu không chỉ như là nguyên liệu cho sôcôla hoặc cacao mà còn như là nguyên liệu thực phẩm với các yêu cầu chức năng dinh dưỡng (xem JP 07-213251 A; JP 06-321796 A).

Cụ thể là, chiết xuất cacao có nồng độ chất chống oxy hóa hoặc chất tương tự tăng lên được kỳ vọng là có nhiều hiệu quả khác nhau (xem JP 2010-524993 W; JP 2010-524995 W; JP 2010-526036 W; JP 2010-540670 W).

Hạt cacao không chỉ chứa chất chống oxy hóa và chất xơ ăn kiêng mà còn chứa cả protein. Tuy nhiên, hàm lượng protein của hạt cacao là thấp hơn hàm lượng protein của hạt đậu tương hoặc các loại hạt tương tự. Do đó, việc sử dụng protein trong hạt cacao chưa thu hút được sự chú ý. Chẳng hạn, các patent Nhật Bản số JP 2010-524993 W; JP 2010-524995 W; JP 2010-526036 W; JP 2010-540670 W mô tả chất chiết chứa các polyphenol với nồng độ là 25% trọng lượng hoặc lớn hơn thu được từ hạt cacao chưa rang, mà đó là hạt chưa lên men hoặc ít lên men, nhưng không mô tả nỗ lực làm tăng hàm lượng protein của chất chiết.

Hàm lượng protein của hạt cacao là thấp hơn hàm lượng protein của hạt đậu tương hoặc các loại hạt tương tự. Do đó, để làm tăng hàm lượng protein của thực phẩm hoặc tương tự được tạo ra nhờ sử dụng chất chiết hoặc dạng tương tự từ hạt cacao như là nguyên liệu chứa protein của hạt cacao, cần phải sử dụng một lượng lớn chất chiết hoặc dạng tương tự từ hạt cacao. Tuy nhiên, trong trường hợp này, vị đắng và vị chất kéo dài (tức là vị chất được duy trì liên tục) có nguồn gốc từ hạt cacao có thể làm thay

đổi hương và vị của thực phẩm hoặc dạng tương tự. Vì lý do này, việc sử dụng nguyên liệu chứa protein thu được bằng cách sử dụng hạt cacao cho các loại thực phẩm và đồ uống khác nhau, các loại dược phẩm, các sản phẩm hóa học và các sản phẩm tương tự bị hạn chế. Ngoài ra, hạt cacao chứa các chất hoạt tính sinh lý học như là cafein, theobromin và các chất tương tự. Do đó, khi chất chiết từ hạt cacao được sử dụng, các chất hoạt tính sinh lý học được nêu trên cũng được bổ sung vào, có thể dẫn đến các kết quả sinh lý học ngoài kỳ vọng. Do đó, không thể bổ sung chất chiết từ hạt cacao với một lượng lớn vào các loại thực phẩm và các đồ uống, các dược phẩm, các sản phẩm hóa học và các sản phẩm tương tự.

Ngoài ra, hạt cacao hoặc cacao dạng khối chứa bơ cacao với hàm lượng cao và thành phần chất béo của hạt cacao chuyển vào chất chiết hoặc dạng tương tự từ hạt cacao hoặc cacao dạng khối. Do đó, hiện tượng trong đó chất chiết hoặc dạng tương tự biến thành dạng dầu nhờ sự thay đổi nhiệt độ được nhìn thấy. Theo đó, việc xử lý chất chiết hoặc dạng tương tự như là nguyên liệu chứa protein là nặng nề. Hơn nữa, có vấn đề là việc bổ sung chất chiết hoặc dạng tương tự vào các thực phẩm hoặc dạng tương tự như là nguyên liệu chứa protein của hạt cacao có nghĩa là bổ sung thành phần chất béo của hạt cacao vào các thực phẩm hoặc dạng tương tự cùng với protein.

Hơn nữa, việc sử dụng hiệu quả bã cacao thu được sau khi chiết tách các thành phần chức năng như là chất chống oxy hóa chứa trong hạt cacao cũng được mong muốn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột chứa chế phẩm chứa protein, mà chế phẩm này có chứa hàm lượng cao protein thu được từ hạt cacao, hầu như không có thành phần chất béo, cafein, theobromin và các polyphenol và không có vị đắng và vị chất kéo dài (tức là vị chất được duy trì liên tục).

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu nhằm khắc phục các vấn đề được nêu trên. Kết quả là, các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng, các vấn đề này có thể được khắc phục nhờ chế phẩm chứa protein có hàm lượng cao protein có nguồn gốc từ hạt cacao. Các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng, hạt cacao đã rang và bã cacao thu được

sau khi chiết tách các thành phần chức năng từ hạt cacao cũng chứa protein có nguồn gốc từ hạt cacao và vì vậy, có thể được sử dụng làm nguyên liệu.

Tức là, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột chứa chế phẩm chứa protein bao gồm protein thu được từ hạt cacao với tỷ lệ trọng lượng nằm trong khoảng từ 42 đến 70% trên cơ sở tổng các chất rắn của chế phẩm. Chế phẩm chứa protein là hữu ích làm nguyên liệu cho các loại thực phẩm và các loại đồ uống khác nhau, các dược phẩm, các sản phẩm hóa học và các sản phẩm tương tự, vì chế phẩm có hàm lượng cao protein có trong hạt cacao, hầu như không có thành phần chất béo có nguồn gốc từ hạt cacao và hầu như không có vị đắng và vị chất kéo dài.

Theo đó, phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột chứa chế phẩm chứa protein từ hạt cacao với hàm lượng cao nêu trên bao gồm: (a) bước chiết gồm chiết tách protein từ nguyên liệu chứa protein từ hạt cacao trong điều kiện kiềm để thu được chất chiết chứa protein; và (b) bước kết tủa gồm kết tủa protein từ chất chiết thu được trong bước (a) trong điều kiện axit để thu được chế phẩm chứa protein.

Phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột theo sáng chế tốt hơn là còn bao gồm: (c) bước khử chất béo gồm loại bỏ thành phần chất béo chứa trong hạt cacao trước bước (a) và/hoặc sau bước (b). Trong trường hợp này, có khả năng tạo ra chế phẩm chứa protein mà hầu như không chứa thành phần chất béo từ hạt cacao.

Các điều kiện được ưu tiên để chiết tách protein trong bước (a) là như sau. Độ pH tốt hơn là nằm trong khoảng từ 8 đến 13 và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10 đến 12. Nhiệt độ tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20 đến 100°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30 đến 100°C, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 40 đến 100°C và đặc biệt tốt là nằm trong khoảng từ 50 đến 100°C. Khi protein được chiết tách trong các điều kiện này, hàm lượng protein của chế phẩm chứa protein có thể được tăng lên.

Các điều kiện được ưu tiên để kết tủa protein trong bước (b) là như sau. Độ pH tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 6 và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2 đến 5. Nhiệt độ tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0 đến 40°C và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0 đến 20°C. Khi protein được kết tủa trong các điều kiện này, hàm lượng protein của chế phẩm chứa protein có thể được tăng lên.

Trong trường hợp mà việc loại bỏ thành phần chất béo trong bước (c) được tiến hành bằng cách sử dụng nước, độ pH tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 7, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 7 và còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 4 đến 6 và nhiệt độ tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30 đến 90°C và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 40 đến 70°C.

Trong trường hợp mà việc loại bỏ thành phần chất béo trong bước (c) được tiến hành bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ, các ví dụ được ưu tiên về dung môi hữu cơ bao gồm etanol, dung dịch etanol lỏng, diethyl ete và hexan. Có thể sử dụng riêng một trong số các dung môi hữu cơ này, hoặc cũng có thể sử dụng kết hợp hai hoặc nhiều hơn hai loại dung môi nêu trên.

Giới hạn dưới của tỷ lệ trọng lượng của protein từ hạt cacao trong chế phẩm chứa protein theo sáng chế là 42%, tốt hơn là 44%, tốt hơn nữa là 46%, còn tốt hơn nữa là 48%, còn tốt hơn nữa là 50%, còn tốt hơn nữa là 52%, còn tốt hơn nữa là 54% và đặc biệt tốt là 56% dưới dạng tỷ lệ trọng lượng trong tổng hàm lượng chất rắn của chế phẩm. Khi tỷ lệ trọng lượng của protein lớn, thậm chí là bổ sung một lượng nhỏ chế phẩm theo sáng chế vào thực phẩm hoặc sản phẩm tương tự cũng có thể làm tăng hàm lượng protein của thực phẩm hoặc sản phẩm tương tự.

Giới hạn trên của tỷ lệ trọng lượng của protein từ hạt cacao trong chế phẩm chứa protein theo sáng chế là 70%, tốt hơn nữa là 65% và tốt nhất là 60% dưới dạng tỷ lệ trọng lượng trong tổng hàm lượng chất rắn của chế phẩm có tính đến sự dễ dàng xác định các điều kiện khác nhau trong phương pháp sản xuất theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các phương án theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Bước (a)

Nguyên liệu được sử dụng trong bước (a) theo phương pháp sản xuất theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là nguyên liệu đó chứa protein từ hạt cacao. Các ví dụ về nguyên liệu bao gồm hạt cacao (đã rang hoặc chưa rang), nhân cacao thu được sau khi bóc vỏ hạt cacao (đã rang hoặc chưa rang), cacao dạng khối thu được bằng cách nghiền hạt cacao, bột cacao (đã kiềm hóa hoặc chưa được kiềm hóa) thu được bằng cách loại bỏ bơ cacao từ cacao dạng khối thông qua quá trình ép, cacao dạng khối

đsc khử chất béo thu được bằng cách loại bỏ bơ cacao nhờ các phương tiện khử chất béo như là nước ấm, dung môi hữu cơ hoặc dạng tương tự, và bã cacao thu được sau khi chiết tách tác chất chống oxy hóa hoặc dạng tương tự từ các nguyên liệu được nêu trên được thể hiện dưới dạng các ví dụ (ví dụ, bã cacao hoặc dạng tương tự thu được sau khi chiết tách theo phương pháp được mô tả trong JP 07-213251 A). Có thể sử dụng riêng một trong số các nguyên liệu đó, hoặc có thể sử dụng kết hợp hai hoặc nhiều hơn hai loại nguyên liệu trong số các nguyên liệu đã nêu.

Trong bước (a), để chiết tách protein từ nguyên liệu chứa protein từ hạt cacao trong điều kiện kiềm, chất kiềm (là tác nhân để làm kiềm hóa dung dịch và còn được gọi là tác nhân kiềm hóa), là một trong số các ví dụ về phương tiện chiết tách, có thể được bổ sung vào chất huyền phù thu được bằng cách tạo huyền phù nguyên liệu trong nước. Điều kiện của quá trình chiết tách protein không bị giới hạn cụ thể miễn dung dịch có tính kiềm, nhưng theo quan điểm làm tăng hàm lượng protein của chế phẩm theo sáng chế, điều kiện tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 13, tốt hơn nữa là độ pH nằm trong khoảng từ 9 đến 13, còn tốt hơn nữa là độ pH nằm trong khoảng từ 10 đến 12 và đặc biệt tốt là độ pH nằm trong khoảng từ 10,5 đến 12.

Chất kiềm được sử dụng ở đây không bị giới hạn cụ thể miễn là chất kiềm đó có thể điều chỉnh độ pH của dung dịch đến độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 13 và có thể được sử dụng ở dạng chất rắn hoặc dạng dung dịch trong nước. Các ví dụ về chất kiềm bao gồm natri hydroxit, kali carbonat, trinatri phosphat và chất tương tự. Có thể sử dụng riêng một trong số các chất kiềm này, hoặc cũng có thể sử dụng kết hợp hai hoặc nhiều hơn hai chất kiềm trong số đó.

Giới hạn dưới của nhiệt độ để chiết tách protein không bị giới hạn cụ thể, nhưng theo quan điểm làm tăng hàm lượng protein của chế phẩm theo sáng chế, nhiệt độ tốt hơn là 20°C, tốt hơn nữa là 30°C, tốt hơn nữa là 40°C, tốt hơn nữa là 50°C, còn tốt hơn nữa là 70°C và đặc biệt tốt là 80°C. Giới hạn trên của nhiệt độ để chiết tách protein không bị giới hạn cụ thể, nhưng theo quan điểm đạt được sự ổn định trong việc làm tăng hàm lượng protein của chế phẩm theo sáng chế khi nhiệt độ vượt quá 80°C, giới hạn trên tốt hơn là 100°C, tốt hơn nữa là 95°C và đặc biệt tốt là 90°C.

Thời gian để thực hiện chiết tách protein tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30 phút đến 48 giờ và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30 phút đến 24 giờ. Khi thời

gian để thực hiện chiết tách là 30 phút hoặc lâu hơn, hàm lượng protein của chế phẩm theo sáng chế có thể được tăng lên một cách đáng kể. Khi thời gian để thực hiện chiết tách là 48 giờ hoặc ngắn hơn, quá trình chiết tách có thể được tiến hành một cách hiệu quả.

Sau khi chiết tách protein, việc phân tách rắn-lỏng bằng cách lọc hoặc tương tự có thể được tiến hành để thu được chất nổi trên bề mặt chứa protein từ hạt cacao.

Cần lưu ý rằng, theo công nghệ thông thường để chiết tách protein trong điều kiện kiềm thông thường, quá trình chiết tách được tiến hành trong điều kiện kiềm nhẹ ở nhiệt độ dưới 50°C nhằm tránh sự biến tính chất kiềm và sự biến tính nhiệt của protein trong quá trình chiết tách. Tuy nhiên, theo một phương án được ưu tiên của phương pháp sản xuất theo sáng chế, quá trình chiết tách protein được tiến hành trong điều kiện độ kiềm cao với độ pH 8 hoặc lớn hơn ở nhiệt độ lên đến 50°C hoặc cao hơn.

Bước (b)

Trong bước (b), nhằm thu được chế phẩm chứa protein trong điều kiện axit, chất axit có thể được bổ sung vào chất nổi trên bề mặt chứa protein từ hạt cacao thu được trong bước (a) làm kết tủa protein. Điều kiện kết tủa protein không bị giới hạn cụ thể miễn dung dịch là axit, nhưng theo quan điểm làm tăng hàm lượng protein của chế phẩm theo sáng chế, điều kiện tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 6, tốt hơn nữa là độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 5, còn tốt hơn nữa là độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 4 và đặc biệt tốt là pH nằm trong khoảng từ 2 đến 3,5.

Axit được sử dụng ở đây không bị giới hạn cụ thể miễn là axit có thể điều chỉnh độ pH của dung dịch đến độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 6 và có thể được sử dụng ở dạng chất rắn hoặc dung dịch lỏng. Các ví dụ về axit bao gồm: các axit vô cơ như là axit hydrocloric, axit sulfuric, axit phosphoric và axit tương tự; và axit hữu cơ như là axit citric, axit malic, axit tartaric và axit tương tự. Có thể sử dụng riêng một trong số các axit này, hoặc có thể sử dụng sự kết hợp hai hoặc nhiều hơn hai axit trong số chúng.

Theo quan điểm thúc đẩy sự kết tủa, nhiệt độ để kết tủa protein tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0 đến 40°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0 đến 20°C và đặc biệt tốt là nằm trong khoảng từ 0 đến 10°C.

Sau khi kết tủa protein, các thao tác như là phân tách rắn-lỏng nhờ lọc hoặc tương tự, rửa bằng nước, sấy khô và tương tự có thể được tiến hành để thu được chế phẩm chứa protein theo sáng chế.

Bước (c)

Trong trường hợp mà nguyên liệu chứa protein từ hạt cacao được sử dụng trong bước (a) chứa thành phần chất béo (chẳng hạn, cacao dạng khối chứa khoảng 55% các thành phần chất béo và bột cacao chứa khoảng 20% các thành phần chất béo), phương pháp sản xuất theo sáng chế tốt hơn là còn bao gồm bước (c) (tức là bước khử chất béo) ở thời điểm là trường hợp được lựa chọn từ các phương án từ (A) đến (C) sau đây: (A) chỉ trước bước (a); (B) chỉ sau bước (b); và (C) cả trước bước (a) và sau bước (b). Các phương án từ (A) đến (C) được nêu trên đôi khi được đề cập chung như là "trước bước (a) và/hoặc sau bước (b)". Bước (c) có thể tạo ra chế phẩm chứa protein mà hầu như không chứa thành phần chất béo từ hạt cacao.

Trong trường hợp mà bước (c) được tiến hành trước bước (a), thành phần chất béo được loại bỏ từ nguyên liệu chứa protein từ hạt cacao. Trong trường hợp mà bước (c) được tiến hành sau bước (b), thành phần chất béo được loại bỏ ra từ chế phẩm chứa protein thu được trong bước (b).

Trong cả hai trường hợp gồm bước (c) được tiến hành trước bước (a) và bước (c) được tiến hành sau bước (b), cùng một phương pháp loại bỏ thành phần chất béo được sử dụng, ngoại trừ các đối tượng mà từ đó các thành phần chất béo được loại bỏ là khác nhau. Do đó, các chi tiết của bước (c) sẽ được mô tả dưới đây với trường hợp trong đó bước (c) được tiến hành trước bước (a) được lấy làm trường hợp được mô tả.

Thành phần chất béo có thể được loại bỏ từ nguyên liệu chứa protein từ hạt cacao, chẳng hạn, bằng cách tạo huyền phù nguyên liệu trong dung môi dùng để loại bỏ thành phần chất béo như là nước, dung môi hữu cơ hoặc dạng tương tự, quá trình chiết tách thành phần chất béo và quá trình loại bỏ chất nổi trên bề mặt chứa thành phần chất béo nhờ phân tách rắn- lỏng nhờ lọc hoặc tương tự để thu được chất rắn trong đó thành phần chất béo được giảm xuống.

Điều kiện khử béo không bị giới hạn cụ thể, mà chẳng hạn, trong trường hợp sử dụng nước, điều kiện tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 7 và tốt hơn nữa là độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 6. Axit được sử dụng ở đây không bị giới hạn cụ thể

miễn là axit đó có thể điều chỉnh độ pH của dung dịch đến độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 7 và có thể được sử dụng ở dạng chất rắn hoặc dung dịch nước. Các ví dụ về axit bao gồm: các axit vô cơ như là axit hydrocloric, axit sulfuric, axit phosphoric và axit tương tự; và axit hữu cơ như là axit citric, axit malic, axit tartaric và axit tương tự. Có thể sử dụng riêng một trong số các axit này, hoặc cũng có thể sử dụng kết hợp hai hoặc nhiều hơn hai loại axit trong số chúng.

Trong trường hợp sử dụng dung môi hữu cơ để loại bỏ thành phần chất béo, các ví dụ về dung môi hữu cơ bao gồm etanol, dung dịch etanol lỏng, diethyl ete, hexan và dạng tương tự. Một trong số các dung môi hữu cơ này có thể được sử dụng tách riêng hoặc theo sự kết hợp hai hoặc nhiều hơn nữa các loại dung môi này. Trường hợp trong đó chế phẩm theo sáng chế là nguyên liệu thực phẩm hoặc dạng tương tự, trong số các dung môi hữu cơ này, etanol và dung dịch etanol lỏng là được ưu tiên theo quan điểm về độ an toàn.

Quá trình khử chất béo bằng nước và quá trình khử chất béo bằng dung môi hữu cơ có thể được tiến hành theo kiểu kết hợp. Ngoài ra, quá trình khử chất béo bằng nước và/hoặc quá trình khử chất béo bằng dung môi hữu cơ có thể được lặp đi lặp lại.

Nhiệt độ đối với quá trình khử chất béo tốt hơn là từ 30 đến 90°C trong trường hợp sử dụng nước hoặc là từ 20 đến 90°C trong trường hợp sử dụng dung môi hữu cơ. Trong cả trường hợp sử dụng nước và trường hợp sử dụng dung môi hữu cơ, nhiệt độ đối với quá trình khử chất béo tốt hơn nữa là từ 40 đến 70°C. Thời gian quá trình khử chất béo tốt hơn là từ 10 phút đến 24 giờ và tốt hơn nữa là từ 30 phút đến 2 giờ.

Sau quá trình khử chất béo, chẳng hạn, việc phân tách rắn-lỏng nhờ lọc hoặc tương tự có thể được tiến hành để thu được nguyên liệu trong đó thành phần chất béo được giảm xuống.

Phân chiết xuất cacao thông thường thu được theo công nghệ thông thường chứa cafein, theobromin, các polyphenol và chất tương tự từ hạt cacao. Tuy nhiên, chế phẩm chứa protein theo sáng chế hầu như đã được giảm cafein, theobromin và các polyphenol.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả dưới dạng các ví dụ. Sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ sau đây. Cần lưu ý rằng, trong các ví dụ theo sáng chế và các ví dụ so sánh được thể hiện dưới đây, ký hiệu "%" là chỉ "% trọng lượng/thể tích" (trọng lượng trong 100 ml (đơn vị: g)), "% trọng lượng" là chỉ "%trọng lượng/trọng lượng" và "% thể tích" là chỉ "% thể tích/thể tích".

Các hàm lượng protein được nêu trong các ví dụ theo sáng chế và các ví dụ so sánh được thể hiện dưới đây được xác định theo phương pháp chính thức, tức là, phương pháp Kjeldahl macro được cải tiến (hệ số chuyển đổi nitơ thành protein: 6,25). Các hàm lượng lipid được xác định theo phương pháp chính thức, tức là, phương pháp tiêu thụ axit. Các chi tiết về các phương pháp này đã được mô tả trong tài liệu "Official test method and standard test method discussion, Food hygiene inspection guideline, Physics and chemistry reviews 2005" (Trao đổi về phương pháp thử nghiệm chính thức và phương pháp thử nghiệm tiêu chuẩn, nguyên tắc chỉ đạo việc kiểm tra vệ sinh thực phẩm, tổng quan vật lý và hóa học 2005) (do Bộ sức khỏe, lao động và phúc lợi xã hội (Ministry of Health, Labour and Welfare) Nhật Bản biên tập, và được công bố bởi Hiệp hội vệ sinh thực phẩm Nhật Bản - Japan Food Hygiene Association).

1. Nghiên cứu về bước (a)

(1) Độ pH

Nước được bổ sung vào bột cacao để tạo huyền phù và huyền phù được điều chỉnh đến độ pH là 4 nhờ axit hydrocloric, được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 phút và được ly tâm để loại bỏ chất nổi trên bề mặt chứa thành phần chất béo. Nước được bổ sung một lần nữa vào chất kết tủa thu được để tạo huyền phù và quá trình khử chất béo như được nêu trên được tiến hành lại.

Sau đó, nước lại được bổ sung vào chất kết tủa thu được để tạo huyền phù và độ pH của huyền phù được điều chỉnh bởi dung dịch nước của natri hydroxit đến: 1) độ pH 8 (ví dụ so sánh 1); 2) độ pH 9 (ví dụ so sánh 2); 3) độ pH 10 (ví dụ 1); hoặc 4) độ pH 10,5 (ví dụ 2). Sau đó, huyền phù được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 1 giờ và sau đó được ly tâm để thu được chất nổi trên bề mặt chứa protein.

Chất nổi trên bề mặt thu được được lọc và sau đó phần nước được làm lạnh trên băng để điều chỉnh nhiệt độ chất lỏng xuống 4°C. Sau đó, độ pH của phần nước lọc được điều chỉnh đến độ pH 3,5 bằng axit hydrocloric. Chất nổi trên bề mặt được loại

bỏ nhờ quá trình ly tâm và chất kết tủa thu được được rửa bằng nước và được làm đông khô, nhờ đó thu được chế phẩm chứa protein từ hạt cacao.

(2) Độ pH và nhiệt độ

Theo cùng phương thức như ở ví dụ 2, quá trình khử chất béo được tiến hành trong điều kiện axit và nước được bổ sung một lần nữa vào chất kết tủa thu được để tạo huyền phù.

Sau đó, huyền phù được điều chỉnh bằng dung dịch nước của natri hydroxit đến: 1) độ pH 11 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 3); 2) độ pH 11 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 4); 3) độ pH 12 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 5); 4) độ pH 12 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 6); 5) độ pH 13 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ so sánh 3); hoặc 6) độ pH 13 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ so sánh 4), tiếp theo được ly tâm, nhờ đó thu được chất nổi trên bề mặt chứa protein.

Ngoài ra, theo cùng phương thức như ở ví dụ 1, protein được kết tủa trong điều kiện axit, nhờ đó thu được chế phẩm chứa protein từ hạt cacao.

Bảng 1 thể hiện các hàm lượng protein của các chế phẩm thu được được nêu trên.

Bảng 1

	Hàm lượng protein		Hàm lượng protein		Hàm lượng protein
Ví dụ 1	44	Ví dụ 4	57	Ví dụ so sánh 1	17
Ví dụ 2	56	Ví dụ 5	58	Ví dụ so sánh 2	26
Ví dụ 3	58	Ví dụ 6	59	Ví dụ so sánh 3	38
				Ví dụ so sánh 4	37

Từng các trị số trong Bảng 1 thể hiện hàm lượng protein (g) trong 100 g chế phẩm.

(3) Tỷ lệ thu hồi hàm lượng chất rắn

Theo cùng phương thức như ở ví dụ 2, quá trình khử chất béo được tiến hành trong điều kiện axit và nước được bổ sung một lần nữa chất kết tủa thu được để tạo huyền phù.

Sau đó, huyền phù được điều chỉnh bởi dung dịch nước của natri hydroxit đến: 1) độ pH 11 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 7); 2) độ pH 11 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 8); 3) độ pH 11 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 9); 4) độ pH 11,5 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 10); 5) độ pH 11,5 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 11); 6) độ pH 11,5 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 12); 7) độ pH 12 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 13); 8) độ pH 12 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 14); hoặc 9) độ pH 12 và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 1 giờ (ví dụ 15), tiếp theo được ly tâm, nhờ đó thu được chất nổi trên bề mặt chứa protein.

Ngoài ra, theo cùng phương thức như ở ví dụ 1, protein được kết tủa trong điều kiện axit, nhờ đó thu được chế phẩm chứa protein từ hạt cacao.

Bảng 2 thể hiện các hàm lượng protein, các tỷ lệ thu hồi hàm lượng chất rắn và các sự phân bố trọng lượng phân tử của các chế phẩm thu được nêu trên.

Các tỷ lệ thu hồi các hàm lượng chất rắn như được thể hiện trong bảng 2 được tính toán theo phương pháp như sau.

Tỷ lệ thu hồi hàm lượng chất rắn (% trọng lượng) = [Trọng lượng của chế phẩm chứa protein đông khô (g) / Trọng lượng của nguyên liệu (g)] × 100

Sự phân bố trọng lượng phân tử được xác định theo phương pháp như sau.

Trước hết, từng chế phẩm thu được trong các ví dụ theo sáng chế được cân chính xác làm mẫu thử nghiệm với mức trọng lượng là 0,25 g, 30 mL nước được bổ sung vào đó và hỗn hợp được khuấy đều. Sau đó, độ pH của hỗn hợp được điều chỉnh đến độ pH 10,5 bằng dung dịch nước của natri hydroxit có nồng độ 1 N và sau đó hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 phút. Tiếp theo, độ pH của hỗn hợp được điều chỉnh đến độ pH 7,0 bằng axit hydrocloric nồng độ 1 N và sau đó nước

được bổ sung vào hỗn hợp sao cho thể tích nước cuối cùng là 50 ml, nhờ đó tạo ra dung dịch chứa 0,5% làm mẫu thử nghiệm.

Dung dịch nước chứa 0,1% thể tích axit trifloaxetic và dung dịch axetonitril chứa 0,1% thể tích axit trifloaxetic được bổ sung vào dung dịch chứa 0,5% mẫu thử nghiệm được nêu trên để thu được hỗn hợp bao gồm 0,1% mẫu thử nghiệm và 45% thể tích axetonitril, tiếp theo được ly tâm ($10000 \times g$), nhờ đó thu được chất nổi trên bề mặt. Chất nổi trên bề mặt thu được được lọc qua bộ lọc có kích cỡ lỗ là $0,45 \mu m$, nhờ đó tạo ra mẫu dung dịch thử nghiệm.

Dung dịch mẫu thử nghiệm được phân tích bởi phép sắc ký thẩm gen (GPC) (GPC - Gel Permeation Chromatography). Dung dịch được chia nhỏ thành phân đoạn có trọng lượng phân tử cao (6,5 kDa hoặc lớn hơn) và phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp (307 Da hoặc lớn hơn và dưới 6,5 kDa) dựa trên chất đánh dấu trọng lượng phân tử có sẵn trên thị trường có sẵn trên thị trường và sự phân bố trọng lượng phân tử được tính toán như được thể hiện trong bảng 2. Từng trị số trong bảng 2 thể hiện tỷ lệ (%) của diện tích phân đoạn dung dịch thử nghiệm trên toàn bộ diện tích.

<Các điều kiện đo>

·Cột phân tích: Tosoh, G4000PWXL, $7,8 mm \times 300 mm$ (hoặc tương đương)

·Nhiệt độ cột: $40^\circ C$, phát hiện: tia tử ngoại nhìn thấy có bước sóng từ 190 đến 600 nm

·Pha di động: nước:axetonitril (tỷ lệ thể tích)=55:45 (chứa 0,1% thể tích axit trifloaxetic)

·Tốc độ dòng của pha di động: 0,5 mL/phút, lượng phun: 10 μL dung dịch chứa 0,1% mẫu thử nghiệm

<Các chất đánh dấu trọng lượng phân tử (mỗi chất có nồng độ cuối cùng là 0,1%)>

Aprotinin (trọng lượng phân tử: 6,500)

Glutation (trọng lượng phân tử: 307)

Bảng 2

	Hàm lượng	Tỷ lệ thu hồi	Sự phân bố trọng lượng phân tử
--	-----------	---------------	--------------------------------

	protein (g/100 g chế phẩm)	hàm lượng chất rắn (% trọng lượng)	Tỷ lệ diện tích phân đoạn có trọng lượng phân tử cao (%)	Tỷ lệ diện tích phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp (%)
Ví dụ 2	56	11	67	23
Ví dụ 7	54	9	63	37
Ví dụ 8	57	18	70	30
Ví dụ 9	58	22	74	26
Ví dụ 3	58	22	74	26
Ví dụ 10	56	13	71	29
Ví dụ 11	60	22	72	28
Ví dụ 12	60	25	72	28
Ví dụ 13	53	17	57	43
Ví dụ 14	59	26	74	26
Ví dụ 15	59	29	72	28
Ví dụ 5	58	28	69	31

Phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp: 307 Da hoặc lớn hơn và dưới 6,5 kDa;
phân đoạn có trọng lượng phân tử cao: 6,5 kDa hoặc lớn hơn

(4) Thời gian chiết tách

Theo cùng phương thức như ở ví dụ 2, quá trình khử chất béo được tiến hành trong điều kiện axit và nước được bổ sung một lần nữa vào chất kết tủa thu được để tạo huyền phù.

Sau đó, độ pH của huyền phù được điều chỉnh bởi dung dịch nước của natri hydroxit đến độ pH 12 và sau đó huyền phù được khuấy ở nhiệt độ 70°C trong thời gian: 1) 4 giờ (ví dụ 16); hoặc 2) 8 giờ (ví dụ 17), tiếp theo được ly tâm, nhờ đó thu được chất nổi trên bề mặt chứa protein.

Ngoài ra, theo cùng phương thức như ở ví dụ 1, protein được kết tủa trong điều kiện axit, nhờ đó thu được chế phẩm chứa protein từ hạt cacao.

Bảng 3 thể hiện các hàm lượng protein, các tỷ lệ thu hồi hàm lượng chất rắn và các phân bố trọng lượng phân tử của các chế phẩm thu được nêu trên.

Bảng 3

	Hàm lượng	Tỷ lệ thu hồi	Sự phân bố trọng lượng phân tử
--	-----------	---------------	--------------------------------

	protein (g/100 g chế phẩm)	hàm lượng chất rắn (% trọng lượng)	Tỷ lệ diện tích phân đoạn có trọng lượng phân tử cao (%)	Tỷ lệ diện tích phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp (%)
Ví dụ 15	59	29	72	28
Ví dụ 16	53	27	72	28
Ví dụ 17	50	27	68	33

Phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp: 307 Da hoặc lớn hơn và dưới 6,5 kDa;
phân đoạn có trọng lượng phân tử cao: 6,5 kDa hoặc lớn hơn

2. Nghiên cứu về bước (b)

(1) Độ pH

Theo cùng phương thức như ở ví dụ 2, quá trình khử chất béo trong điều kiện axit và quá trình chiết tách protein trong điều kiện kiềm được tiến hành.

Sau đó, chất nổi trên bề mặt thu được được lọc và phần nước lọc được làm lạnh trên băng để điều chỉnh nhiệt độ chất lỏng xuống 4°C. Sau đó, độ pH của phần nước lọc được điều chỉnh bằng axit hydrochloric đến: 1) độ pH 4 (ví dụ 18); hoặc 2) độ pH 5 (ví dụ 19) hoặc được điều chỉnh bằng axit sulfuric đến: 3) độ pH 2 (ví dụ 20).

Sau đó, chất nổi trên bề mặt được loại bỏ bằng cách ly tâm và chất kết tủa thu được được rửa bằng nước và được làm đông khô, nhờ đó thu được chế phẩm chứa protein từ hạt cacao.

(2) Loại axit

Theo cùng phương thức như ở ví dụ 2, quá trình khử chất béo trong điều kiện axit và quá trình chiết tách protein trong điều kiện kiềm được tiến hành.

Sau đó, chất nổi trên bề mặt thu được được lọc và phần nước lọc được làm lạnh trên băng để điều chỉnh nhiệt độ chất lỏng xuống 4°C. Sau đó, độ pH của phần nước lọc được điều chỉnh đến độ pH 3,5 bằng: 3) axit sulfuric (ví dụ 21); 4) axit phosphoric (ví dụ 22); 5) axit citric (ví dụ 23); 6) axit malic (ví dụ 24); hoặc 7) axit tartaric (ví dụ 25). Sau đó, chất nổi trên bề mặt được loại bỏ bằng cách ly tâm và chất kết tủa thu được được rửa bằng nước và được làm đông khô, nhờ đó thu được chế phẩm chứa protein từ hạt cacao.

Bảng 4 thể hiện các hàm lượng protein của các chế phẩm thu được nêu trên.

Bảng 4

	Hàm lượng protein		Hàm lượng protein		Hàm lượng protein
Ví dụ 2	56	Ví dụ 20	56	Ví dụ 23	55
Ví dụ 18	54	Ví dụ 21	53	Ví dụ 24	57
Ví dụ 19	42	Ví dụ 22	54	Ví dụ 25	59

Từng trị số trong bảng 4 thể hiện hàm lượng protein (g) trong 100 g chế phẩm.

3. Nghiên cứu về bước (c)

(1) Điều kiện khử chất béo

Trước hết, trong trường hợp không có quá trình khử chất béo (ví dụ 26), nước (nhiệt độ chất lỏng: 50°C) được bổ sung vào bột cacao để tạo huyền phù (độ pH: 6) và huyền phù được sử dụng mà không cần xử lý bổ sung đối với quá trình chiết tách protein sau đó. Trong trường hợp có quá trình khử chất béo với dung môi hữu cơ (ví dụ 27), dung dịch nước chứa 95% thể tích etanol được bổ sung vào bột cacao để tạo huyền phù và huyền phù được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 1 giờ và được lọc để loại bỏ chất nổi trên bề mặt chứa thành phần chất béo. Dung dịch nước chứa 95% thể tích etanol được bổ sung lần nữa vào chất kết tủa thu được để tạo huyền phù và quá trình khử chất béo nêu trên được tiến hành thêm hai lần.

Sau đó, theo cùng phương thức như ở ví dụ 2, quá trình chiết tách protein trong điều kiện kiềm và quá trình kết tủa protein trong điều kiện axit được tiến hành. Sau đó, chất nổi trên bề mặt được loại bỏ bằng cách ly tâm và chất kết tủa thu được được rửa bằng nước và được làm đông khô, nhờ đó thu được chế phẩm chứa protein từ hạt cacao.

(2) Thứ tự khử chất béo

Theo cùng phương thức như ở ví dụ 26, quá trình chiết tách protein trong điều kiện kiềm và quá trình kết tủa protein trong điều kiện axit được tiến hành mà không cần quá trình khử chất béo và chất nổi trên bề mặt được loại bỏ bằng cách ly tâm.

Sau đó, theo ví dụ 28, dung dịch nước chứa 95% thể tích etanol được bổ sung vào chất kết tủa thu được để tạo huyền phù và quá trình khử chất béo được tiến hành theo cùng phương thức như ở ví dụ 27. Mặt khác, ở ví dụ 29, chất kết tủa thu được

được làm đông khô và dung dịch nước chứa 95% thể tích etanol được bổ sung vào để tạo huyền phù, tiếp theo là quá trình khử chất béo theo cùng phương thức như ở ví dụ 27.

Sau đó, chất kết tủa thu được được sấy khô, nhờ đó thu được chế phẩm chứa protein từ hạt cacao.

Bảng 5 thể hiện các hàm lượng protein và các hàm lượng lipid của các chế phẩm thu được nêu trên.

Bảng 5

	Hàm lượng protein	Hàm lượng lipid
Ví dụ 2	56	1,5
Ví dụ 26	50	7,7
Ví dụ 27	46	0,7
Ví dụ 28	54	1,1
Ví dụ 29	50	3,8

Từng trị số trong bảng 5 thể hiện hàm lượng protein (g) hoặc hàm lượng lipid (g) trong 100 g chế phẩm.

4. Nghiên cứu về nguyên liệu

Bã cacao thu được nhờ quá trình chiết tách các thành phần chức năng từ bột cacao được cho trải qua quá trình khử chất béo trong điều kiện axit, quá trình chiết tách protein trong điều kiện kiềm và quá trình kết tủa protein trong điều kiện axit theo cùng phương thức như ở ví dụ 2, nhờ đó thu được chế phẩm chứa protein từ hạt cacao (ví dụ 30).

Bã cacao thu được bởi quá trình chiết tách các thành phần chức năng từ cacao dạng khối được chuẩn bị bằng cách sử dụng hạt cacao chưa lên men được cho trải qua quá trình khử chất béo trong điều kiện axit, quá trình chiết tách protein trong điều kiện kiềm và quá trình kết tủa protein trong điều kiện axit theo cùng phương thức như ở ví dụ 2, nhờ đó thu được chế phẩm chứa protein từ hạt cacao (ví dụ 31).

Bảng 6 thể hiện các hàm lượng protein của các chế phẩm thu được nêu trên.

Bảng 6

	Hàm lượng protein
Ví dụ 2	56
Ví dụ 30	49
Ví dụ 31	56

Từng trị số trong bảng 6 thể hiện hàm lượng protein (g) trong 100 g chế phẩm.

5. Hàm lượng cafein và hàm lượng theobromin

Hàm lượng cafein và hàm lượng theobromin được xác định bằng phân tích định lượng đối với các hàm lượng chất rắn của các chế phẩm thu được trong các ví dụ sử dụng cafein và theobromin có sẵn trên thị trường làm chuẩn với sự tham chiếu đến phương pháp được mô tả trong tài liệu AOAC Official Methods of Analysis (1990) 980.14 "Theobromine and Caffeine in Cacao Products Liquid Chromatographic Method".

Trước hết, từng chế phẩm thu được ở các ví dụ 2, 26, 27 và 31 được cân chính xác trong ống ly tâm như là các mẫu thử nghiệm và 30 mL ete dầu mỏ được bổ sung vào các chế phẩm để thu được hỗn hợp. Hỗn hợp được khuấy kỹ và được ly tâm, và chất nổi trên bề mặt được loại bỏ. Chất kết tủa thu được (tức là mẫu đã được khử chất béo) được chuyển vào bình nón và nước được bổ sung vào bình này sao cho đạt được thể tích tổng cộng là khoảng 100 mL. Sau đó, hỗn hợp được làm nóng trong bể nước có nhiệt độ 100°C trong thời gian 25 phút và sau đó được làm nguội tức thì. Sau đó, 10 mL dung dịch nước chứa 2% trọng lượng kẽm sulfat và 10 mL dung dịch nước chứa 1,8% trọng lượng bari hydroxit được bổ sung vào dung dịch và hỗn hợp thu được được khuấy và sau đó được để yên. Tiếp đó, hỗn hợp thu được được điều chỉnh với nước để thu được hỗn hợp có thể tích là 200 mL. Hỗn hợp này được làm nóng một lần nữa trong bể nước có nhiệt độ 100°C trong thời gian 10 phút và hỗn hợp sau khi làm nóng được lọc, nhờ đó thu được dung dịch mẫu thử nghiệm.

Dung dịch mẫu thử nghiệm được phân tích bằng phép sắc ký lỏng hiệu năng cao. Đồng thời, cafein và theobromin có sẵn trên thị trường được sử dụng để thực hiện xử lý và phân tích giống như được đề cập ở trên và đường cong hiệu chỉnh được tạo ra để tính toán hàm lượng cafein và hàm lượng theobromin của từng dung dịch thử nghiệm. Bảng 7 thể hiện các kết quả.

<Các điều kiện đo>

·Cột phân tích: Nước, μ -Bondapak C18, 10 μ m, 4mmID $\times$ 300mm (hoặc tương đương)

·Pha di động: nước : axetonitril (tỷ lệ thể tích)=85:15

·Tốc độ dòng của pha di động: 1,0 mL/phút, phát hiện: tia tử ngoại bước sóng 273 nm

Bảng 7

	Hàm lượng cafein (mg/g)	Hàm lượng theobromin (mg/g)
Ví dụ 2	0,0	0,3
Ví dụ 26	0,5	2,4
Ví dụ 27	0,0	0,0
Ví dụ 31	0,0	1,3
Bột cacao	3,7	23,6

Từng trị số trong bảng 7 thể hiện hàm lượng cafein (mg) hoặc hàm lượng theobromin (mg) trong 1 g chế phẩm.

6. Tổng hàm lượng polyphenol

Tổng hàm lượng polyphenol được xác định theo phương pháp nhuộm xanh Prussian. Các hàm lượng chất rắn của các chế phẩm thu được theo các ví dụ 2 và 26 được phân tích định lượng sử dụng epicatechin có sẵn trên thị trường làm chuẩn tham chiếu đối với phương pháp được mô tả trong tài liệu Martin L. Price and Larry G. Butler, J. Agric Food Chem., Vol. 25 No.6, 1268-1273 (1977).

Trước hết, các chế phẩm thu được được khử chất béo bằng cách xử lý với n-hexan và cho trải qua quá trình chiết tách bằng dung dịch nước chứa 50% trọng lượng metanol, nhờ đó tạo ra các dung dịch thử nghiệm. Sau đó, 100 μ L từng dung dịch thử nghiệm được bổ sung vào 50 mL nước cất để thu được dung dịch pha loãng. Sau đó, 3 mL dung dịch amoni sắt (III) sulfat nồng độ 0,1 M - axit hydrocloric nồng độ 0,1 N được bổ sung vào dung dịch được pha loãng trong khi khuấy. Sau 20 phút từ khi bổ sung dung dịch, 3 mL dung dịch nước của 8mm kali hexaxyanoferrat (III) được bổ sung vào dung dịch này. Tiếp theo, sau 20 phút kể từ khi bổ sung dung dịch nước, phổ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 720 nm được xác định.

Đồng thời, dung dịch thu được bằng cách bổ sung 100 μ L dung môi, mà dung môi này giống như dung môi được sử dụng để chuẩn bị các dung dịch thử nghiệm được đề cập ở trên và là dung dịch nước chứa 50% trọng lượng metanol, vào 50 mL nước cất và dung dịch của (-)-epicatechin có sẵn trên thị trường trong metanol được xử lý theo cùng phương thức như được nêu trên để tạo các đường cong hiệu chỉnh và tổng hàm lượng polyphenol của từng dung dịch thử nghiệm được tính toán. Bảng 8 thể hiện các kết quả.

Bảng 8

	Tổng hàm lượng polyphenol (w/w%)
Ví dụ 2	1,4
Ví dụ 26	2,7
Bột cacao	7,4

Từng trị số trong bảng 8 thể hiện tổng hàm lượng polyphenol (% trọng lượng) của chế phẩm.

Ví dụ thử nghiệm

1. Đánh giá trên chuột (xác nhận hiệu quả cải thiện nhu động ruột)

Chuột cái BALB/c sáu tuần tuổi (mỗi nhóm gồm sáu cá thể chuột) được nuôi trong 14 ngày bằng cách cho uống nước và ăn tự do. Chuột trong nhóm đối chứng được cho phép ăn theo tiêu chuẩn (tương ứng với AIN93G, không chứa xenluloza, được cấp với 5% trọng lượng tính bột ngũ cốc). Chuột trong nhóm bổ sung chế phẩm chứa protein được cho phép tiêu thụ thức ăn thu được bằng cách bổ sung chế phẩm chứa protein thu được ở ví dụ 2 (luân phiên với tinh bột ngô) ở mức 5% trọng lượng cho thức ăn tiêu chuẩn.

Sau đó, trọng lượng cơ thể (g) của chuột được xác định tại thời điểm bắt đầu nuôi ("ngày 0" trong bảng 9) và sau 7 ngày ("ngày 7" trong bảng 9) và 14 ngày ("ngày 14" trong bảng 9) từ khi nuôi. Đồng thời, lượng thức ăn (g/chuột/ngày) từ ngày thứ sáu đến ngày thứ bảy ("ngày 7" trong bảng 9) và lượng thức ăn (g/chuột/ngày) từ ngày thứ mười ba đến ngày thứ mười bốn ("ngày 14" trong bảng 9) sau khi bắt đầu nuôi được xác định. Tiếp theo, phân từ ngày thứ chín đến ngày thứ mười một (tức là ba ngày) sau

khi nuôi được gom lại và được làm đông khô, và các lượng phân (g/chuột/ngày) được xác định.

Bảng 9 thể hiện các trị số thu được như được nêu trên.

Bảng 9

	Trọng lượng cơ thể trung bình (g)			Lượng thức ăn được ăn (g/chuột/ngày)		Lượng phân (g/chuột/ngày)
	Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 7	Ngày 14	
Nhóm đối chứng	21,7±0,6	23,0±0,3	23,8±0,4	2,9	2,9	0,08
Chế phẩm chứa nhóm bổ sung protein	21,6±0,4	22,4±0,4	23,4±0,5	2,8	3,0	0,23

Trong bảng 9, trong chế phẩm chứa nhóm bổ sung protein, không quan sát được sự tăng hoặc giảm trọng lượng cơ thể trung bình và lượng thức ăn so với các thông số tương ứng của nhóm đối chứng, nhưng lượng phân được tăng lên khoảng gấp ba lần.

2. Đánh giá chế phẩm chứa protein thu được

Các chế phẩm chứa protein thu được theo ví dụ 2 và ví dụ 26 được nhận ra là bột màu nâu đậm có thể chảy lỏng có màu hơi đen hơn so với bột cacao.

Các chế phẩm được đánh giá bằng cách nếm (bảng 10) và nhận thấy là không có hương cacao như được phát hiện trong bột cacao và không có các mùi hương khác. Ngoài ra, các chế phẩm được nhận thấy là không có vị đắng và vị chất kéo dài (tức là vị chất được duy trì liên tục) như được phát hiện trong bột cacao và không có các vị khác (ví dụ là vị ngọt, vị chua, vị mặn và vị ngọt umami).

Bảng 10

	Ví dụ 2	Ví dụ 26	Bột cacao
Hương cacao	-	-	++
Vị đắng	-	-	++
Vị chất kéo dài	-	-	+
Tông màu	Màu nâu đậm hơi đen (màu sôcôla đen)	Màu nâu đậm hơi đen (màu sôcôla đen)	Màu nâu đậm (màu sôcôla sữa)

Hương cacao: ++: mạnh, +: yếu, -: không phát hiện được

Vị đắng: ++: mạnh, +: yếu, -: không phát hiện được

Vị chất kéo dài: ++: mạnh, +: yếu, -: không phát hiện được

Như được đề cập ở trên, chế phẩm hầu như không chứa thành phần chất béo, cafein, theobromin và các polyphenol chứa trong hạt cacao và có hàm lượng protein từ hạt cacao tăng lên và phương pháp sản xuất chế phẩm có khả năng được xác lập. Ngoài ra, theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa protein, bã cacao thu được sau khi chiết tách các thành phần chức năng như là chất chống oxy hóa từ hạt cacao có thể được sử dụng một cách hiệu quả.

Hơn nữa, hiệu quả cải thiện nhu động ruột của chế phẩm theo sáng chế có thể được xác nhận.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm chứa protein theo sáng chế có hàm lượng cao protein thu được từ hạt cacao. Do đó, ngay cả khi bổ sung một lượng nhỏ chế phẩm vào thực phẩm hoặc sản phẩm tương tự cũng có thể làm tăng hàm lượng protein của thực phẩm hoặc sản phẩm tương tự.

Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế có hàm lượng cao protein thu được từ hạt cacao, hầu như không có vị đắng và vị chất kéo dài (tức là vị chất được duy trì liên tục) có nguồn gốc từ hạt cacao và không có vị và mùi. Hơn nữa, chế phẩm theo sáng chế hầu như không có thành phần chất béo từ hạt cacao. Do đó, chế phẩm theo sáng chế không chuyển thành dạng dầu do sự thay đổi nhiệt độ và dễ xử lý. Do vậy, chế phẩm chứa protein theo sáng chế có thể được sử dụng một cách có lợi làm nguyên liệu chứa protein mà nguyên liệu này không làm thay đổi hương và vị của sản phẩm, lượng thành phần chất béo và dạng tương tự, để tạo ra các loại thực phẩm và các loại đồ uống khác nhau, các dược phẩm, các sản phẩm hóa học và sản phẩm tương tự.

Ngoài ra, theo phương pháp sản xuất chế phẩm chứa protein theo sáng chế, có khả năng tạo ra chế phẩm chứa protein mà chế phẩm này có hàm lượng protein thu được từ hạt cacao tăng lên trong chế phẩm chứa protein, hầu như không có thành phần chất béo, cafein, theobromin và các polyphenol từ hạt cacao và hầu như không có vị đắng và vị chất kéo dài. Điều này tạo khả năng sử dụng rộng rãi chế phẩm theo sáng chế, trong khi đó chế phẩm thông thường chứa protein thu được từ hạt cacao không được sử dụng làm nguyên liệu thực phẩm vì chế phẩm thông thường có thành phần chất béo, vị đắng và vị chất kéo dài có nguồn gốc từ hạt cacao hoặc không được bổ

sung vào với lượng lớn vì chế phẩm thông thường có hàm lượng cao các chất hoạt tính sinh lý học như là cafein và theobromin. Hơn nữa, hạt cacao đã rang và bã cacao sau khi chiết tách thành phần chức năng như là chất chống oxy hóa chứa trong hạt cacao có thể được sử dụng một cách hữu hiệu để thu được chế phẩm theo sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột chứa chế phẩm chứa protein, trong đó chế phẩm này chứa protein thu được từ hạt cacao với tỷ lệ trọng lượng nằm trong khoảng từ 42 đến 70% trên tổng các chất rắn của chế phẩm, phương pháp này bao gồm:

(a) bước chiết gồm chiết tách protein từ nguyên liệu bao gồm protein thu được từ hạt cacao trong điều kiện kiềm để thu được chất chiết chứa protein; và

(b) bước kết tủa gồm kết tủa protein từ chất chiết thu được trong bước (a) trong điều kiện axit để thu được chế phẩm chứa protein.

2. Phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột theo điểm 1, trong đó bước (a) được tiến hành trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 13 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 100°C.

3. Phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột theo điểm 2, trong đó bước (a) được tiến hành trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 10 đến 12 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 100°C.

4. Phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó bước (b) được tiến hành trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 6 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 40°C.

5. Phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột theo điểm 4, trong đó bước (b) được tiến hành trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 20°C.

6. Phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó phương pháp này còn bao gồm:

(c) bước khử chất béo gồm loại bỏ thành phần chất béo của hạt cacao trước bước (a) và/hoặc sau bước (b).

7. Phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột theo điểm 6, trong đó bước (c) được tiến hành bằng cách sử dụng nước trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 7 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 90°C.

8. Phương pháp sản xuất tác nhân cải thiện nhu động ruột theo điểm 6 hoặc điểm 7, trong đó bước (c) được tiến hành bằng cách sử dụng một hoặc nhiều loại dung môi hữu cơ được lựa chọn từ nhóm gồm có etanol, dung dịch etanol lỏng, diethyl ete và hexan.