

REPUBLICA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA GOSPODARSTVO  
URAD RS ZA INTELEKTUALNO LASTNINO

(10) **SI 23130 A**

(12) **PATENT**

(21) Številka prijave: **200900262**

(51) Int. Cl. (2011.01)

(22) Datum prijave: **24.09.2009**

**A23C 9/00**

(45) Datum objave: **31.03.2011**

(72) Izumitelji: **Gordana Kocić, 18000 Niš, RS;**  
**Goran Nikolić, 18000 Niš, RS;**  
**Dušica Stojanović, 18000 Niš, RS;**  
**Radmila Pavlović, 18000 Niš, RS;**  
**Tatjana Jevtović\_Stoimenov, 18000 Niš, RS;**  
**Dušan Sokolović, 18000 Niš, RS;**  
**Svetlana Stojanović, 18000 Niš, RS;**  
**Snežana Pajović, 11000 Beograd, RS;**  
**Radivoj Kocić, 18000 Niš, RS;**  
**Francesco Carluccio, Pisa Section of Lecce, IT;**  
**Avrelija Cencič, 2000 Maribor, SI;**  
**Ivan Krajnc, 2000 Maribor, SI;**  
**Ander Murua Txopitea, 2000 Maribor, SI**

(73) Imetnik: **Prof.dr. CENCIČ AVRELIJA,**  
**Industrijska 5, 3242 Ruše, SI**

(74) Zastopnik: **dr. Jure Marn, univ.dipl.inž., univ.dipl.prav., Ljubljanska ulica 9, 2000 Maribor, SI**

(54) **KOMPOZITNI DIETETIČNI MLEČNI NAPITEK IN POSTOPEK ZA PROIZVODNJO KOMPOZITNEGA DIETETIČNEGA MLEČNEGA NAPITKA Z REDUCIRANIM NIVOJEM SEČNE KISLINE IN PURINA**

(57) Napitek in postopek proizvodnje dietetskega mlečnega napitka z reducirano vsebino sečne kisline in purina ima namen, da na netoksičen način, v čim večji meri odstrani sečno kislino, kot tudi purinske ribonukleotide, dezoksiribonukleotide, nukleozide in proste purinske baze (adenin in gvanin), ki so naravno prisotne v mleku. Aktivno oglje je uporabljeno kot način adsorpcije, ki omogoča trajno vezanje sečne kisline in purinskih derivatov iz mleka. Dodatni učinek je vezanje težkih kovin in lipidov, kar je v tem dietetskem izdelku pozitiven učinek, ker toksične kovine povzročajo poškodbo tubul, s čimer je ovirana sekrecija sečne kisline na nivoju

tubula ledvic, hiperlipidemija in hiperurikemija pa sta skupaj prisotni pri nekaterih obolenjih. Tehnološki postopek proizvodnje priložene dietetske formule poteka skozi naslednje faze: zbiranje primarnega mleka iz zbiralnice mleka, separacija sečne kisline in purina z dodatkom aktivnega oglja v predpisani količini, homogenizacija mleka, standardizacija maščob v mleku do 0,5 %, eliminacija aktivnega oglja s centrifugiranjem in filtriranjem mleka, dodatek aditivov, (vitamin C-L- askorbinska kislina 1000 mg/L, koencim Q10 naravnega porekla 200 mg/L), dezodorizacija vzorca, UHT sterilizacija, pakiranje in zapiranje embalaže.

## KOMPOZITNI DIETETIČNI MLEČNI NAPITEK IN POSTOPEK ZA PROIZVODNJO KOMPOZITNEGA DIETETIČNEGA MLEČNEGA NAPITKA Z REDUCIRANIM NIVOJEM SEČNE KISLINE IN PURINA

### Področje tehnike na katero se iznajdba nanaša

Prehrambena tehnologija, dietetični preparati

### Tehnični problem

Putika je bolezen, ki jo spremljajo močne bolečine in komplikacije zaradi nabiranja in sedimentiranja sečne kisline ali njenih soli uratov. Terapija se sastoji iz dajanja zdravil, ki inhibirajo produkcijo sečne kisline in „apurinski dieti“, ki ne vsebuje živil bogatih s purini, pred vsem mesa, mesnih izdelkov in drobovine. Mleko se priporoča kot edini izvor polnovrednih beljakovin. Problem takšne rešitve je v dejstvu da je mleko v veliki meri bogato z nukleinskimi kisljinami, kot tudi z derivati mononukleotidnega in nukleozidnega značaja, oziroma s prostimi bazami purinskega tipa (hipoksantin, ksantin), zlasti pa s samo sečno kislino! Sečna kislina, ki je nastala v črevesju ali prispela iz hrane, se v človeškem organizmu naprej ne metabolizira in se resorbira v krvni obtok!

### Stanje tehnike v svetu in pri nas

Količina sečne kisline v vzorcih kravjega mleka, se po podatkih v literaturi giblje okrog 200  $\mu\text{mol/L}$ , v ostalih purinskih bazah pa do 20  $\mu\text{mol/L}$ . Mleko je bogato z nizom purinskih ribonukleotidov, substratov za encime nukleaze, ki so tudi v mleku, posebej pa v digestivnem traktu. Količina prisotnih ribonukleotidov v obliki polinukleotida in oligonukleotida po podatkih v literaturi znaša okrog 68 +/- 55  $\mu\text{mol/L}$ , kot mononukleotida 84 +/- 25  $\mu\text{mol/L}$  in okrog 10 +/- 2  $\mu\text{mol/L}$  kot

nukleozida. Dokazana je tudi določena količina prostih purinskih baz, kot sta hipoksantin in ksantin do 20  $\mu\text{mol/L}$ . Navedeni derivati so neminovno podvrženi hidrolitični razgradnji v črevesju, kar pomeni, da je okrog 200  $\mu\text{mol/L}$  minimalna količina sečne kisline, ki se lahko producira in/ali vnese z uživanjem 1L mleka.

Vsebina sečne kisline varira v vzorcih mleka, toda ni pod 100  $\mu\text{mol/L}$ , čeprav naši podatki potrjujejo, da manipulacije, ki aktivirajo ksantin oksidazo (homogeniziranje) ali preiskus v polnomastnem, neobranem mleku, dajejo visoke vrednosti sečne kisline, ki se gibajo tudi do 300  $\mu\text{mol/L}$ . Naši podatki varirajo v odvisnosti od specifičnosti metodologije kot tudi tipa mleka. Ker smo dobili okrog 330  $\mu\text{mol/L}$  v vzorcih mleka, ko je narejena spektrofotometrijska tehnika, se je pristopilo k bolj natančni hromatografski tehniki, oz. HPLC metodi. Rezultati so pokazali, da se vrednosti sečne kisline gibajo od 100-200  $\mu\text{mol/L}$  za sečno kislino, dočim je koncentracija purinskih baz (adenina, hipoksantina, ksantina in guanina) in baz v okviru ribonukleinskih kislin do 50  $\mu\text{mol/L}$ . V tabeli 1 so prikazane vrednosti sečne kisline, merjene s HPLC metodo ob prisotnosti ustreznega standarda v kravjem mleku po različnih nadmorskih višinah pridelave.

Mleko je zelo bogato s ksantin oksidazo, ključnim encimom produkcije sečne kisline, iz katere je prvič in izolirana in proučena. Komercialni preparati prečiščene ksantin oksidaze se tudi sedaj proizvajajo iz mleka. Kot močen producent prostih radikalov deluje baktericidno, toda njena škodljivost se odraža v veliki produkciji sečne kisline iz dostopnih egzogenih substratov. Upoštevajoč tudi veliko bogatstvo mleka v purinskih ribonukleotidih, kot tudi v nukleazah, je jasno, da stopnja manipulacije z vzorcem, kot je dolžina homogeniziranja in temperatura, v veliki meri prispevajo k porastu količine nukleozidov, prostih baz in sečne kisline v mleku.

Načini izolacije purinskih nukleotidov iz mleka so v glavnem imeli za cilj bolj natančno determinacijo tipa prisotnih purinskih in pirimidinskih baz, kar pomeni, da so omenjeni izključno v raziskovalne namene, vendar ne tudi z namenom izolacije ali eliminacije iz hrane, tj. dietetske namene. V literaturi se kot način izolacije iz mleka opisuje tehnika izolacije purinskih baz na jonoizmenjevalni koloni. Priprava kolone je po rutinski proceduri polnjenja s katjonsko smolo, najpogosteje DOWEX tipa, ki veže na sebe anjone, kot je sečna kislina. Da bi se izolirale omenjene baze je nujno, da se predhodno opravi deproteinizacija vzorca. V kolikor se ne bi opravila deproteinizacija, bi katjonska smola vezala tudi proteine iz mleka, ki tudi vsebujejo anjonske lastnosti, s čemer bi se zmanjšala stopnja prečiščenosti vzorca na koloni, toda v širšem, uporabnem smislu, mleko bi bilo osiromašeno s proteini. Zaradi tega

ima ta metoda v glavnem le analitični pomen. V proceduri analize vrste in značilnosti purinskih baz in derivatov v mleku smo koristili tehnike hromatografije HPLC, takrat pa je vzorec mleka moral biti predhodno deproteiniziran.

Druge oblike izolacije sečne kisline razumevajo tehnike dialize. V tem smislu se iz mleka lahko nespecifično izolira večina malih, difuzibilnih molekul, kot so laktoza, urea, sečna kislina, kreatinin, amino kisline in joni. Tehnika je zahtevna, v kolikor se izvaja pod laboratorijskimi pogoji, saj je nujna prisotnost aparata dijalizatorja s specifičnimi dijalizerji za male molekule. Ta metoda se v medicini ne more prezreti, saj pacienti z ledvično insuficijenco, ki imajo porast sečne kisline preko 700  $\mu\text{mol/L}$  in spremljajočo ledvično insuficijenco, po opravljeni dializi, pomembno zmanjšajo koncentracije sečne kisline v plazmi, kot tudi ureo. Če bi se mleko podvrglo dializi v pogojih proizvodnje, to pomeni, da bi mlekarna morala imeti aparat dializator, kot tudi pripravljeno dializno tekočino, kar bi podražilo proces proizvodnje. V kolikor se dializa mleka izvaja v adaptiranih pogojih, z uporabo dializne membrane iz celofana ob dializni tekočini, ki ne bo imela anjonov druge vrste, ampak samo hidrosilne skupine (zaradi Donanovega zakona), dializa daje slabe rezultate, ker ni zagotovljen pritisk, niti kontinuirani pretok dializne tekočine. Poleg tega je mleko izpostavljeno zunanjim vplivom v odprtem sistemu in zaradi tega omenjena metoda ni povsem primerna za tehnološki postopek izolacije sečne kisline v industriji.

Uporabljene reference:

1. Tiemeyer W, Stohrer M, Giesecke D. Metabolites of Nucleic Acids in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science* Vol. 67, No. 4, 1984
2. Roubenoff R, Klag MJ, Mead LA, Liang KY, Seidler AJ, Hochberg MC. Incidence and risk factors for gout in white men. *JAMA* 1991;266:3004-3007.
2. Kramer HM, Curhan G. The association between gout and nephrolithiasis: the National Health and Nutrition Examination Survey III, 1988-1994. *Am J Kidney Dis* 2002;40:37-42.
3. Emmerson BT. The management of gout. *N Engl J Med* 1996;334:445-451.
4. Fam AG. Gout, diet, and the insulin resistance syndrome. *J Rheumatol* 2002;29:1350-1355.
5. Gibson T, Rodgers AV, Simmonds HA, Court-Brown F, Todd E, Meilton V. A controlled study of diet in patients with gout. *Ann Rheum Dis* 1983;42:123-127.

6. Matzkies F, Berg G, Madl H. The uricosuric action of protein in man. *Adv Exp Med Biol* 1980;122:227-231.
7. Loenen HM, Eshuis H, Lowik MR, et al. Serum uric acid correlates in elderly men and women with special reference to body composition and dietary intake (Dutch Nutrition Surveillance System). *J Clin Epidemiol* 1990;43:1297-1303.
8. Garrel DR, Verdy M, PetitClerc C, Martin C, Brule D, Hamet P. Milk- and soy-protein ingestion: acute effect on serum uric acid concentration. *Am J Clin Nutr* 1991;53:665-669.
9. Ghadirian P, Shatenstein B, Verdy M, Hamet P. The influence of dairy products on plasma uric acid in women. *Eur J Epidemiol* 1995;11:275-281.
10. Clifford AJ, Riumallo JA, Young VR, Scrimshaw NS. Effect of oral purines on serum and urinary uric acid of normal, hyperuricemic and gouty humans. *J Nutr* 1976;106:428-434.
11. Zollner N, Griebisch A. Diet and gout. *Adv Exp Med Biol* 1974;41:435-442.
12. Griebisch A, Zollner N. Effect of ribomononucleotides given orally on uric acid production in man. *Adv Exp Med Biol* 1974;41:443-449.
13. Roubenoff R. Gout and hyperuricemia. *Rheum Dis Clin North Am* 1990;16:539-550.
14. Champion EW, Glynn RJ, DeLabry LO. Asymptomatic hyperuricemia: risks and consequences in the Normative Aging Study. *Am J Med* 1987;82:421-426.
15. Nugent CA. Renal urate excretion in gout studied by feeding ribonucleic acid. *Arthritis Rheum* 1965;8:671-685.
16. Gibson T, Highton J, Potter C, Simmonds HA. Renal impairment and gout. *Ann Rheum Dis* 1980;39:417-423.
17. Glynn RJ, Champion EW, Silbert JE. Trends in serum uric acid levels 1961-1980. *Arthritis Rheum* 1983;26:87-93.
18. Raiziss GW, Dubin H, Ringer AI. Studies in endogenous uric acid metabolism. *J Biol Chem* 1914;19:473-485.
19. Dessein PH, Shipton EA, Stanwix AE, Joffe BI, Ramokgadi J. Beneficial effects of weight loss associated with moderate calorie/carbohydrate restriction, and increased proportional intake of protein and unsaturated fat on serum urate and lipoprotein levels in gout: a pilot study. *Ann Rheum Dis* 2000;59:539-543

20. Shadick NA, Kim R, Weiss S, Liang MH, Sparrow D, Hu H. Effect of low level lead exposure on hyperuricemia and gout among middle aged and elderly men: the Normative Aging Study. *J Rheumatol* 2000;27:1708-1712.
21. Abbott RD, Brand FN, Kannel WB, Castelli WP. Gout and coronary heart disease: the Framingham Study. *J Clin Epidemiol* 1988;41:237-242.
22. Hochberg MC, Thomas J, Thomas DJ, Mead L, Levine DM, Klag MJ. Racial differences in the incidence of gout: the role of hypertension. *Arthritis Rheum* 1995;38:628-632.
23. Sharpe CR. A case-control study of alcohol consumption and drinking behaviour in patients with acute gout. *Can Med Assoc J* 1984;131:563-567.
24. Kearns J. *Charcoal Filtration Basics* 2007; 1-7.  
Choi HK, Atkinson K, Karlso EW, Willett W, Curhan G. Purine-Rich Foods, Dairy and Protein Intake, and the Risk of Gout in Men. *N Engl J Med*. 2004; 350:1093-1103

### Opis nove rešitve

Predstavljen tehnični problem rešuje kompozitni dietetični mlečni napitek in postopek za proizvodnjo kompozitnega dietetičnega mlečnega napitka z reduciranim nivojem sečne kisline in purina. Napitek po izumu ima naslednje lastnosti:

- da se maksimalno eliminira sečna kislina, nukleinske kisline, nukleotidi in proste baze purinskega tipa iz mleka
- vsebuje substance, ki bodo omogočile boljše eliminacijo sečne kisline ledvicam- da se sproži tako imenovani urikozurični efekt
- da se eliminirajo težke kovine, ki delujejo toksično in uničujoče na tubulski sistem in so dodatni razlog hiperurikemije, saj onemogočajo aktivne sekrecije sečne kisline
- da se maksimalno eliminira prisotna ksantin oksidaza, s katero je mleko zelo bogato, da bi preostala količina bila v največji meri nepovratno inhibirana in, da prisotnost naravnih inhibitorjev ksantin oksidaze zmanjša aktivnost tega encima v črevesju.
- vsebuje antioksidante, ki bodo imeli lastnost, da zmanjšajo oksidativni stres in naravno inhibirajo ksantin oksidazo.

Postopek po izumu izpolnjuje pogoje za pridobitev zgoraj zapisanih lastnosti ciljem, da na netoksičen način, v čim večji meri odstrani sečno kislino, kot tudi purinske

ribonukleotide, dezoksiribonukleotide, nukleozide in proste purinske baze (adenin in guanin), ki so prisotne v mleku. Ta tip dietičnega mlečnega napitka lahko uživajo brez kakršnekoli nevarnosti vse osebe, je pa prvenstveno namenjen osebam s putiko in povečano vsebino sečne kisline v krvi.

Tehnika izolacije purinskih baz in nukleotidov z aktivnim ogljem se je v raziskovalnih pogojih pokazala kot neuporabna, saj je ustvarjanje adsorpcije sečne kisline in purinskih baz tako stabilno, da se le-te ne morejo eluirati z adsorbensa niti z bolj agresivnimi tretmaji (kot je NaOH), oziroma detektirati in kvantificirati. Ravno to je moment, ki je v naših pogojih separacije sečne kisline iz mleka koristen, ker tako visoka afiniteta onemogoča sproščanje purinskih baz in sečne kisline iz mleka in zaradi tega maksimalno učinkuje. Aktivni ogelj deluje kot močan adsorbens in na sebe veže niz snovi, zlasti pa purinske in pirimidinske derivate, z zelo visoko afiniteto. Na ta način se nepovratno odstranjuje sečna kislina, kot tudi drugi purinski in pirimidinski derivati, ker aktivni ogelj ima visoko moč adsorpcije za te snovi, ki je odvisna od koncentracije aktivnega oglja, minimalnega časa izpostavljanja, pa tudi fizičnih pogojev, kot je temperatura. Aktivno oglje se šteje za netoksično snov za človeški organizem, saj se skoraj sploh ne resorbira v digestivnem traktu, in se je uporabljalo kot terapija pri različnih zastrupitvah, zlasti s težkimi kovinami. Aktivno oglje je zelo močan adsorbens, saj je znano, da ima 1g aktivno ploščino okrog 1000m<sup>2</sup>. O učinkovitosti aktivnega oglja priča podatek, da se tudi voda za pitje čisti z uporabo filtra z aktivnim ogljem, ter je to tudi dokaz, da je aktivno oglje ena izmed najmanj toksičnih snovi.

Tudi sedaj se uporabljajo tablete aktivnega oglja pri terapiji različnih zastrupitev, pa tudi pri terapiji hiperlipidemija, saj na sebe veže tudi lipide, zlasti pa holesterol. Nekoč, ko ni bilo zdravil za terapijo putike, se je aktivno oglje omenjalo v literaturi kot način terapije, toda takrat so se uporabljale velike doze, saj je bilo potrebno zagotoviti stalno prisotnost aktivnega oglja v digestivnem traktu. Jemale so se velike količine, do 35g dnevno, toda na ta način se je zagotavljala samo trenutna eliminacija sečne kisline iz digestivnega trakta. Vsakodnevno uživanje tolikšne količine aktivnega oglja je težko in nesmiselno, ker se le-ta hitro izloči s peristaltiko. Razen odstranjanja purinskih in pirimidinskih nukleotidov, se z delovanjem aktivnega oglja odpravljajo tudi nekatere neželjene vonjave, ki izhajajo od vodonik sulfidov. Zaradi tega se aktivno oglje ne uporablja rutinsko niti v terapiji hiperlipidemija, čeprav se je pokazalo, da zmanjšuje tudi do 30% vrednost holesterola in aterogenih lipoproteidov v krvi.

Upoštevajoč vsa navedena spoznanja smo prišli na idejo, da uporabimo aktivno oglje kot način vezave sečne kisline in purinskih derivatov v mleku. Dodatni učinek je vezava težkih kovin, pa tudi lipidov, kar je v tem dietsem izdelku pozitiven učinek, glede na to, da toksične kovine prispevajo k poškodbi tubula in s čemer je sekrecija sečne kisline na ravni tubula ledvice otežana, lipidi pa so eden izmed vzrokov sekundarne hiperurikemije v stanjih debelosti in diabetesa.

V smislu supstitucije aditiva, predlagan proizvod podrazumeva kompozitni dietetski mlečni izdelek. Predlagana formula se lahko modificira v odnosu na obliko napitka (mleko ali fermentirani mlečni napitek-jogurt). Mleko je lahko v obliki tekočine ali kondenziranega kompozitnega mleka. V opisu tehnoloških postopkov faz separacije sečne kisline, kot tudi drugih purinskih in pirimidinskih derivatov, se opravlja z metodo adsorpcije z aktivnim ogljem.

**Dietetska upravičenost izuma:** O možnem pomenu novih mlečnih izdelkov najbolje priča podatek, da je FDA (Food and Drug Administration program) najavil svoja pričakovanja, da bo v "prihodnosti mleko postalo funkcionalna hrana, katero bodo konzumenti izbirali po svojih potrebah". Poleg tega je 21. stoletje stoletje funkcionalne hrane in stoletje genomike. V tem smislu ima nutrigenomika, kot del genomike, svoje mesto v funkcionalni hrani, ker razvoj sodobnih znastvenih trendov, kot je nutrigenomika, odpirajo možnost sodobnega dietnega pristopa. Ta pristop bo z vsakodnevno prehrano lahko pomembno oblikoval individualno predispozicijo k boleznimi in s tem preprečiti prediktivno tveganje za obolenje.

Putika je relativno pogosta bolezen, nastaja s nalaganjem sečne kisline in njenih soli v sklepkih in v drugih delih organizma, pretežno ledvicah. Prevalenca putike v razvitih državah je večja, tekem 1999 leta je incidenca v Ameriki znašala 41 obolelih na 1000, v Angliji pa celo 14 obolelih na 1000. Domneva se, da je samo v Ameriki okrog 5 milijonov obolelih. Ameriški podatki kažejo, da okrog 10% oseb ima hiperurikemijo, toda kdaj in pri kateremu od njih se bo razvila putika, se ne more z gotovostjo predvideti. Putika je bolezen, ki je v porastu. Osebe nad 65 let spadajo v močno predisponirano populacijo. Pri mlaših ljudeh putika običajno nastane kot posledica prirojenih defektov alosterijske regulacije sinteze purina, tako da enormno sintezo spremlja kot posledica enormna razgradnja, ali Leech-Nyhan sindrom, nastal kot deficit encima HGPRT transferaze. Od putike večinoma zbolijo moški, saj je odnos obolelih moških v primerjavi z ženskami okrog 9:1, toda zaradi pojavov sekundarne hiperurikemije zaradi debelosti ali diabetesa v poznejši življenjski dobi, se odnos spremeni na 3,6:1. Pogosto je družinska bolezen. U takšnih družinah se



nahajajo tudi člani, ki bolujejo od sladkorne bolezni, pretirane debelosti ali ledvičnih kamnov. Zaradi nalaganja sečne kisline in njenih soli uratov, nastanejo spremembe (deformacije) in propadanje sklepnega hrustanca, ki je trajno in v določenih primerih povzroča vse manjšo gibljivost sklepov, deformiteto, omejitve delovne in fizične sposobnosti. Čeprav je putika kronična bolezen, akutni napad putike nastopa v krizah. Pacienti, ki imajo putiko, kažejo tudi niz spremljajočih komorbiditetov, kot so koronarna bolezen, hipertenzija, diabetes in ledvične bolezni. Smatra se, da je hiperurikemija tukaj sekundarnega značaja.

Podatki, ki so objavljeni v časopisu New England Journal of Medicine o vplivu nutritivnih faktorjev na razvoj putike kažejo, da je incidenca putike manjša pri osebah, ki uživajo obrano mleko, z manj maščobe. To je tudi logično, če se upošteva podatek da je ksantin oksidaza locirana prav v mastnih kapljicah. Naši podatki potrjujejo nižjo raven sečne kisline v takšnem mleku. Večina spletnih strani in navodil o pravilni prehrani pri pacientih s putiko ali s sekundarno hiperurikemijo, priporoča mleko kot dovoljeno živilo in se nahaja na listah takoimenovane „apurinske dijeete“. Ali je to tudi res? Vsekakor ne, iz več razlogov. Upoštevajoč tako veliko pogostost obolenja, potencialna tveganja, ki jih nosi s seboj, kot tudi pomen mleka kot edinega živila, ki je izvor polnovrednih beljakovin, se vsiljuje potreba za proizvodnjo cele linije mlečnih dietetskih izdelkov, namenjenih tej populaciji. Pomen omenjenih aditivov je prikazan v literaturi, pri čemer je dokazano, da osebe, ki spijejo dnevno vsaj 1.500 miligramov C vitamina zmanjšajo tveganje obolenja za putike za 45 procentov, v primerjavi s tistimi, ki zaužijejo manj kot 250 miligramov tega vitamina dnevno. Konzim Q10 (ubihinon, ubidekarenon, koenzim Q), je pomemben koenzim respiratorne verige mitohondrija, pa tudi močen antioksidans. Dokazano je, da je koristen učinek v terapiji s koenzimom Q10 prisoten zlasti pri pacientih s koronarno boleznijo, hipertenzijo in srčno insuficijenco.

Upoštevajoč škodljivi učinek prostih radikalov pri adultnih osebah, se zastavlja vprašanje, kako preprečiti delovanje ksantin oksidaze v kravjem mleku. Encim v kravjem mleku je zelo obstojen in ga lahko uniči šele sterilizacija na 80°C, ki traja najmanj 10 s, oziroma UHT sterilizacija. V kolikor je encim ostal prisoten, zaradi oksidacijskega delovanja spremeni in okus in organoleptične lastnosti mleka. Ne tako redko, meritev delovanja ksantin oksidaze v mleku lahko da lažno nizke rezultate, ker je encim lokaliziran v specifičnih mlečnomaščobnih globulah, najpogosteje v tem okolju zavarovan in neaktiven, tako da je nedostopen za meritve aktivnosti. Procesi homogenizacije povzročajo razdiranje mlečnomastnih globul, ko

se sprošča encim in je dejaven producent prostih radikalov. Dočim sveže mleko ima v povprečju aktivnost okrog 50-60 IJ/L, mastni del mleka ima aktivnost okrog 200 IJ/L. V zvezi s tem se je koncem osemdesetih let prejšnjega stoletja razvila teorija o direktnem aterogenem efektu in povečanem kardiovaskularnem tveganju v primeru uživanja homogeniziranega mleka, glede na to, da se dostopna ksantin oksidaza lahko tudi resorbira in v cirkulaciji iskaže direktne toksične efekte na endotel ožilja. Posebej so občutljive celične strukture, ki vsebujejo sestavljene lipide plazmalogene.

### Opis izvedbenega primera

Podroben opis priprave proizvoda je dan po etapah skozi katere gre mleko v mlekarni, začevši od prevzemanja na zbirnih mestih.

**Faza I Primarna faza:** Za tehnološki postopek procesiranja mleka v mlekarnah se vzame mleko, pridobljeno z molžo zdravih, pravilno hranjenih in redno molženih krav ali koz, najmanj 15 dni pred in 5 dni po otelitvi, ki se mu ne sme nič predhodno dodati ali odvzeti. Povprečna kemijska sestava kravjega mleka domače pisane rase je: voda (87,3%) in suha snov (12,7%). Suha snov vsebuje: proteine, vglavnem kazein (3,55%); maščobe (3,8%); laktozo (4,7%); mineralne snovi (0,65%). Kislost ne sme biti večja od 7,60 SH, da je hranjeno na optimalno nizki temperaturi in da je mikrobiološko pravilno, svojstvenega vonja in okusa. Mleko se dobiva iz zbirne mlekarne.

**Faza II Faza eliminacije sečne kisline, nukleinskih kislin in nukleotidov:** V tej fazi se prične tehnološki postopek separacije sečne kisline in purina, tako da se iz dobljene količine mleka, ki se pripravlja za distribucijo, lahko vzame 1L mleka. V mleko se doda granulirano aktivno oglje (kokosovo) v količini 30 -100 g na en liter mleka, tj. 5% do 10% Mleko se meša in se pusti, da stoji okrog 2-4 ure na temperaturi od 25-30°C.

**Faza III Homogenizacija.** Mleko se podvrže procesu homogenizacije, cilj pa je povečanje stabilnosti mlečne emulzije z zmanjšanjem povprečnega premera mastnih globul. To je rutinska procedura procesiranja mleka, ki omogoča boljšo in daljšo adsorpcijo. V nadaljnjem tekstu je posebej obdelan aspekt homogenizacije kot neugoden faktor v smislu sproščanja encima ksantin oksidaze iz neaktivne forme in so zaradi tega nekateri od aditivov dodani prav z namenom inhibicije ksantin oksidaze, ki se pri tem sprošča iz mastnih globul in postaja aktivna v proizvodnji sečne kisline.

Glede na to, da je aktivni ogelj že prisoten, se bo vsaka novonastala količina sečne kisline, vezala.

**Faza IV Standardizacija maščob v mleku do 0,5%.** Kravje mleko vsebuje odvisno od rase in individualnih lastnosti goveda, med 2,5 in 6,0% mlečne maščobe, tako, da je mlečna maščoba obvezna sestavina mleka. Predlagani izdelek mora vsebovati 0,5% mlečne maščobe. Do tega predloga smo prišli na osnovi raziskav o vsebini sečne kisline v vzorcih pasteriziranega ali UHT mleka, ki sta prisotna na domačem tržišču. Analizirani so vzorci mleka ranga od 3,2% do 0,5% mlečne maščobe in je ugotovljeno, da je najnižja raven sečne kisline v vzorcih, ki imajo najmanj maščobe. To je tudi logično, če se upošteva podatek, da je ksantin oksidaza locirana prav v mastnih kapljicah. Za ločevanje mlečne maščobe se uporablja centrifugalni separator. Ločevanje m.m. temelji na razliki specifične mase m.m. in ostalih komponent mleka ( $0.93\text{g/cm}^3$  proti  $1.032\text{ g/cm}^3$ ). Predlagani mlečni napitek vsebuje 0,5% mlečne maščobe. Proces se imenuje „in line“ standardizacija maščobe v mleku in se sestoji iz naslednjih elementov: transmitter gostote, transmitter pretoka, kontrolni ventil, kontrolna plošča in ventil za izklop. Gre za standardni aparat, ki ga ima vsaka mlekarna, ki se ukvarja s proizvodnjo mlečnih izdelkov. Konkretni aparat je opisan na osnovi tega, s čimer razpolaga Niška mlekarna.

**Faza V: Eliminacija aktivnega oglja:** Mleko se procesira v baktofugu, ko se s procesom centrifugiranja izvrše tudi aktivno ogelje, saj večji delci sedimentirajo. V dodatek za baktofugo se uporablja tudi filter KOFIL S5/100 ( $\text{mm/g/m}^2$ ), skozi katerega se prepušča mleko, potem pa skozi Watman papir, na katerem končno ostanejo tudi najbolj drobni delčki aktivnega oglja. Baktofuga je sicer aparat, ki se uporablja samo za odstranjevanje bakterij, nesnage in spor, kar je njen standardni namen v procesu industrijske predelave mleka.

**Faza VI: Dodatek aditivov:** Potem, ko je pridobljeno mleko z reducirano vsebino sečne kisline, nukleinskih kislin in purina, se dodajo predlagani aditivi. Gre za hidrosolubilne snovi, ki se dobro raztapljajo v vodi, s tem pa tudi v mleku. Na osnovi njihovih fizikokemijskih lastnosti je ugotovljeno, da pri raztapljanju ni nikakršne interakcije s sestavinami mleka. Predlagani aditivi so:

- Vitamin C-L-askorbinska kislina 800 do 1200, prednostno 1000mg/l
- Koenzim Q10 (naravnega porekla) 100 do 300, prednostno 200mg/l
- L - arginin 400 do 600, prednostno 500 mg/l

Vzame se količina mleka 1L in se v njega doda L-askorbinska kislina, Koenzim Q in L-arginin v predpisani količini, potem pa se vzorec meša, da bi se dosegla popolna

raztoplјivost. V kolikor se vzame začetna večja količina mleka, se koncentracija dodatih aditivov preračunava po formuli:

priporočena doza x število litrov mleka

Upoštevajoč podatek, da tudi laktoza kaže malo stopnjo adsorpcije na aktivno ogelje, so njene vrednosti nekaj nižje kot v standardnih mlečnih izdelkih, kar je ugodno pri pacientih z diabetesom in debelstjo.

**Faza VII: Dezodorizacija.** S pomočjo parcialnega vakuuma se iz mleka odstranijo neželene vonjave, kar je običajni postopek. Dodajanje aktivnega oglja je ugodno v tej metodi, saj se aktivno oglje uporablja tudi z namenom odstranjevanja neželenih vonjav.

**Faza VIII: UHT sterilizacija:** Pod sterilizacijo se razume, da je mleko predhodno homogenizirano, ohlajeno na temperaturi od 4 do 1°C, prečiščeno in najpozneje 24 ur po molži zagrevano na temperaturi od 135 do 150°C, toliko časa, da se zagotovi sterilizacija, potem pa se ohladi in polni v aseptičnih pogojih. Tekom UHT sterilizacije ne prihaja do sprememb fizikokemijskih lastnosti omenjenih vitaminov, prihaja pa do nepovratne inhibicije ksantin oksidaze. Gre za standardni postopek, ki ga izvaja vsaka mlekarna, tako, da tega koraka ni potrebno opisovati, saj ni nov, niti spremenjen.

V fazah preizkušanja stopnje adsorpcije aktivnega oglja smo posebno pozornost usmerili na efekte naslednjih faktorjev: koncentracije aktivnega oglja v mleku, dolžino izpostavljanja mleka in temperaturo. V vsaki od teh variabil, mehanično tresenje mleka prispeva k boljši adsorpciji, kar je tudi v osnovi samega fizičnega procesa adsorpcije. V tabeli 2 in shemi 1 je dan prikaz različnih fizičnih vplivov na skrajno-rezidualno količino sečne kisline v mleku. Lahko se nedvomno potrdi, da dolžina izpostavljanja mleka in temperatura imajo mnogo več vpliva kot količina prisotne mlečne maščobe. To se lahko pričakuje, saj je adsorptivna površina aktivnega oglja velika, tako da prisotne maščobe ne kompetirajo v pomembnejši meri. V eksperimentu so uporabljena mleka z visoko vsebnostjo maščobe. Najboljše rezultate dobimo, ko je mleko 4 ure v aktivnem procesu adsorpcije na temperaturi do 37°C.

**Faza IX : Polnjenje in zapiranje embalaže.** Predvideno je pakiranje v nepovratni kartonski embalaži. Najbolj primerna kartonska embalaža je tetra-pak ali tetra-brik. Ovoj in originalno pakiranje je prikazano na sl.4. Pakiranje naj bi bilo v embalaži s

katero se zagotovi originalnost izdelka. Ko se navedeni izdelek spravlja v promet v originalnem pakiranju, bi morala deklaracija vsebovati naslednje podatke:

- 1) naziv izdelka
- 2) naziv in sedež proizvajalca
- 3) datum proizvodnje in rok trajanja,
- 4) neto količina (zapremina) pakiranja
- 5) seznam sestavin in dodani aditivi (Tabela 3 prikazuje deklaracijo dobljenega proizvoda z opisanim tehnološkim postopkom. Deklaracija vsebuje količino proteinov, sladkorjev, maščobe in količino sečne kisline, purinskih nukleotidov, koncentracijo dodanega vitamina C, koencima Q10 in arginina.
- 6) pogoji shranjevanja

Na sliki 1 je prikazan KROMATOGRAM MLEKA- tretman T4: mleko v procesu adsorpcije 4h na 25-30oC (OT ne tretirano, 6T tretirano kot 10% sestava)-analizirano s HPLC in sicer so na sliki 1a Kromatogrami vzorca določeni pri  $\lambda=254\text{nm}$ , na sliki 1b pa so lromatogrami vzorca določeni pri  $\lambda=280\text{nm}$  (za sečno kislino).

V nadaljevanju so prikazane tabele

Tabela 1. Odstotek sečne kisline v kravjem mleku po različnih nadmorskih višinah pridelave:

Tip mleka 3,2-3,5% mlečne maščobe	Sečna kislina ( $\mu\text{mol/L}$ )
Mleko z nižin (med 0-200m)	125.0 $\pm$ 13.5
Mleko z kontinentalnega dela (med 250-550m)	143.6 $\pm$ 12.5
Mleko s hribov (nad 600m)	149.5 $\pm$ 8.5

Tabele 2a, b in c. Odstotek sečne kisline in derivatov purina v odvisnosti od postopka obdelave z ogljenim filtrom

a) Kozje mleko - Slovenija

	UA ( $\mu\text{mol/L}$ )	GMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	Xyp + Gua ( $\mu\text{mol/L}$ )	Xa ( $\mu\text{mol/L}$ )	AMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ade ( $\mu\text{mol/L}$ )
0T2	44,83	51,2	15,1	19,5	32,8	21,1
1T2	38,92	47,4	13,6	15,3	26,3	16,8
2T2	41,34	44,9	13,3	20,3	27,3	17,0
3T2	42,71	44,9	13,2	19,8	27,0	17,3
4T2	41,13	39,2	12,7	21,6	29,2	19,1
5T2	30,93	30,6	9,7	18,9	23,7	14,6
6T2	26,02	26,9	8,0	14,1	16,7	10,9
0T4	39,79	43,5	12,7	18,7	25,8	16,0
1T4	27,96	11,3	5,4	24,0	23,7	14,7
2T4	29,77	11,6	5,0	22,0	19,9	11,9
3T4	28,19	8,5	4,0	20,9	16,7	9,8
4T4	22,42	9,5	4,2	20,7	16,5	9,6
5T4	23,76	8,6	3,7	19,0	14,5	7,7
6T4	16,34	6,9	2,6	14,5	9,7	5,3
0H2	57,71	8,9	5,4	34,8	35,6	23,5
1H2	45,24	7,6	3,6	29,2	23,6	15,8
2H2	55,33	8,9	4,0	29,8	24,2	11,5
3H2	40,20	7,6	3,2	25,5	20,0	12,2
4H2	48,52	7,8	3,7	30,3	23,4	15,3
5H2	46,17	7,5	3,6	29,1	22,9	15,0
6H2	48,00	7,6	3,8	29,5	22,7	14,5
0H4	63,68	7,9	4,8	30,9	31,6	20,9
1H4	53,76	7,7	4,0	30,0	28,1	18,2
2H4	44,92	7,5	3,8	29,9	26,0	16,7
3H4	43,44	7,4	3,5	28,0	23,2	14,7
4H4	35,02	6,6	2,9	24,3	18,6	11,1
5H4	39,48	6,9	3,1	26,3	20,6	12,7
6H4	24,77	5,7	2,1	19,3	12,8	7,6

## b) Alpsko mleko - Slovenija

	UA ( $\mu\text{mol/L}$ )	GMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	Gua ( $\mu\text{mol/L}$ )	AMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ade ( $\mu\text{mol/L}$ )
A0T2	133,07	1,46	2,12	4,85	1,16
A1T2	119,98	1,27	1,62	4,26	1,01
A2T2	113,34	1,22	1,51	3,82	0,92
A3T2	101,07	1,21	1,41	3,81	0,85
A4T2	89,93	0,79	1,13	3,19	0,71
A5T2	86,07	0,75	1,01	3,07	0,68
AT62	62,81	0,72	0,68	2,33	0,51
A0T4	149,36	1,55	2,17	5,03	1,24
A1T4	113,58	1,11	1,43	3,97	0,90
A2T4	93,92	0,94	1,04	3,32	0,73
A3T4	68,92	0,72	0,74	2,54	0,51
A4T4	57,69	0,66	0,73	2,24	0,43
A5T4	54,23	0,57	0,73	2,05	0,41
A6T4	13,68	0,43	0,45	1,23	0,24
A0H2	134,01	1,41	2,09	4,59	1,07
A6H2	74,21	0,67	0,92	2,72	0,60
A0H4	132,60	1,26	1,97	4,48	1,05
A6H4	45,21	0,58	0,90	1,90	0,35

## c) Mleko (Z bregov) Slovenija

	UA ( $\mu\text{mol/L}$ )	GMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	Gua ( $\mu\text{mol/L}$ )	AMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ade ( $\mu\text{mol/L}$ )
M0T2	109,04	0,83	2,63	5,31	0,47
M5T2	51,49	0,27	0,99	2,53	/
M6T2	20,26	0,30	1,14	2,72	/
M0T4	101,35	1,14	2,35	5,70	0,50
M5T4	47,45	/	1,27	3,36	/
M6T4	29,94	/	0,98	1,99	/
M0H2	123,53	1,23	2,30	6,21	0,51
M5H2	82,19	0,46	1,57	4,10	0,30
M6H2	65,86	0,39	1,26	3,21	0,23
M0H4	127,07	0,57	2,30	5,67	0,47
M5H4	56,47	0,66	1,64	3,24	0,23
M6H4	34,37	/	0,71	1,83	0,13

## Legenda:

H-----mleko na hladnem (H2 2 uri, H4 4 ure)

T----- termično obdelano mleko of 25-30°C (T2 2 uri, T4 4 ure)

Številke spredaj predstavljajo odstotek aktivnega oglja:

0H in 0T je brez tretiranja z aktivnim ogljem.

Številke 1, 2, 3, 4, 5 pred H ali T pomenijo: 1%,2%,3%,4%,5% odsotek aktivnega oglja

6T pomeni 10% .

## Tipi mleka:

Kozje mleko -(z bregov) Vindija, uvoznik ERFA Ljubljana 3,0% mlečne masti;

2) Alpско mleko- Polno alpsko mleko, 3,5% mascobe (Ljubljanske mlekarne);

3) Mleko Spar 3,5% mlečne mascobe

Tabela 3. Predstavljena dietetska formula mlečnega napitka

Normalne sestavine in aditivi	Količina na 1L mleka
Mlečne maščobe	0,5%
Proteini	31g
Ogljikovi hidrati (laktoza, glukoza in galaktoza)	3,5-4,0g
Purinski nukleotidi	<0,01mg
Sečna kislina	<25μmol/L
Vitamin C	1000mg
Koenzim Q10	200mg
L-arginin	500 mg
Način pripravljanja	UHT sterilizacija

Za prof.dr. Avrelija Cencič

Dr. Jure Marn

Patentni zastopnik



## PATENTNI ZAHTEVKI

1. Postopek za proizvodnjo kompozitnega dietetskega mlečnega napitka z reduciranim nivojem sečne kisline in purina, **označen s tem**, da se v mleko dodaja granulirano aktivno oglje v količini med 30 in 70 g na liter mleka, prednostno 50 g na en liter mleka, nadalje da se mleko meša in pusti da stoji 2-4 ure na temperaturi 25-30°C.
2. Postopek po kateremkoli prejšnjem zahtevku, **označen s tem**, da se mleko filtrira skozi filter priporočenih dimenzij por od od 0,5-0,8mm<sup>2</sup>.
3. Postopek po kateremkoli prejšnjem zahtevku, **označen s tem**, da se potem, ko je pridobljeno mleko z reducirano vsebino sečne kisline, nukleinskih kislin in purina, dodajo predstavljeni aditivi v količini: vitamin C-L-askorbinska kislina v količini med 800 in 1200 mg/l, prednostno 1000 mg/l in koenzim Q10, prednostno naravnega porekla, v količini med 100 in 300 mg/l, prednostno 200 mg/l ter L-arginina v količini 400 do 600 mg/l, prednostno 500 mg/l.
4. Postopek po kateremkoli prejšnjem zahtevku, **označen s tem**, da se mleko segreje na temperaturi od 135 do 150°C, v času, ki zagotavlja sterilizacijo, potem pa se mleko hladi in polni v aseptičnih pogojih.
5. Kompozitni dietetni mlečni napitek po zahtevku 4, **označen po tem**, da obsega v bistvu 0,5-1,5% mlečnih maščob, v bistvu 31 g proteinov, v bistvu med 3,5 in 4,0 g ogljikovih hidratov (laktoza, glukoza in galaktoza), manj kot 0,01 mg nukleinskih kislin in nukleotidov, manj kot <25µmol/L sečne kisline, v bistvu 1000 mg vitamina C, v bistvu 200 mg koenzima Q10 in v bistvu 500 mg L-arginina, vse v 1L napitka.

Za prof. dr. Avrelija Cencič

Dr. Jure Marn

Patentni zastopnik

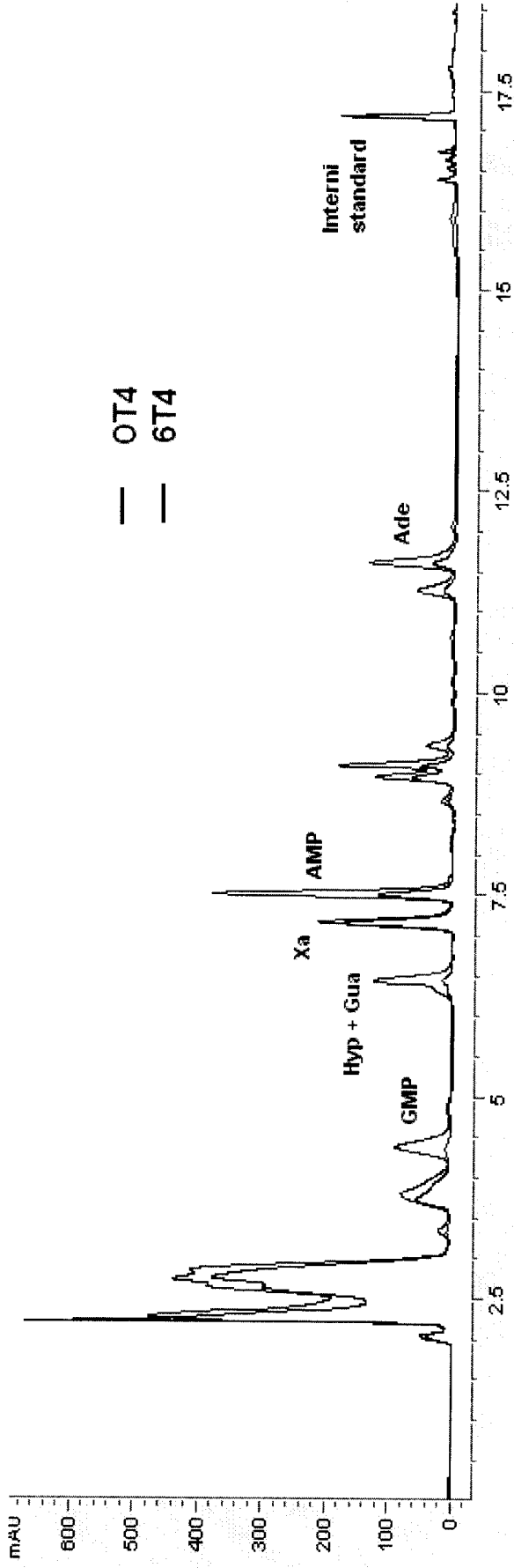


Fig. 1A

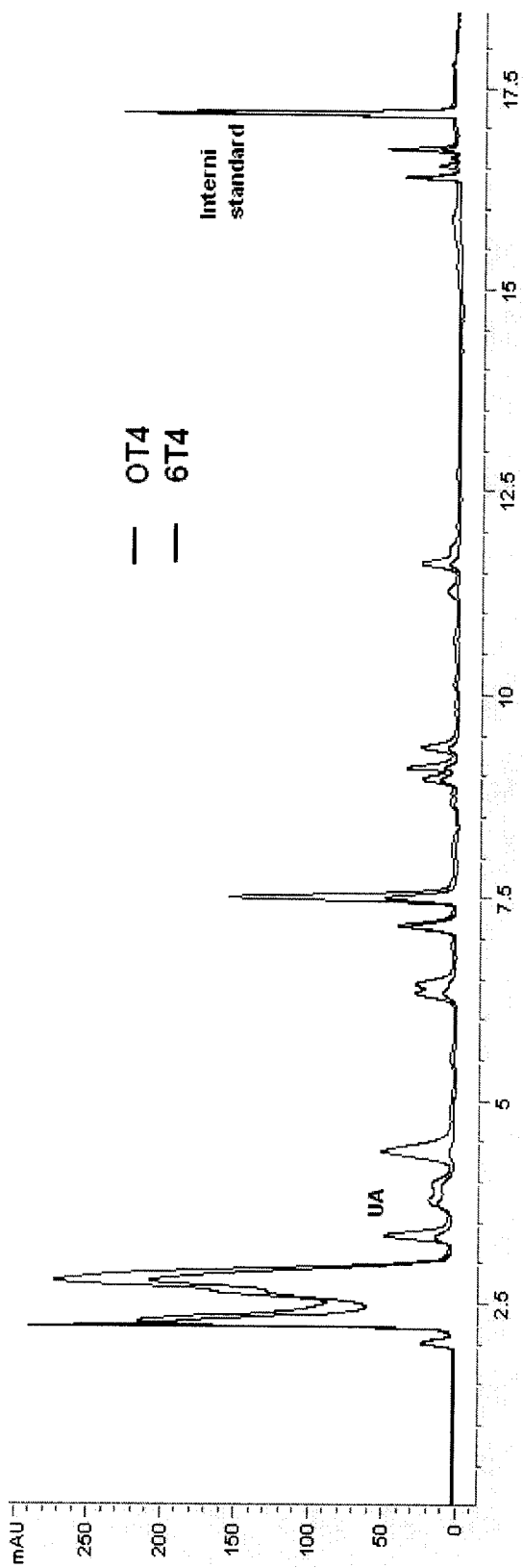


Fig. 1B