



(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)



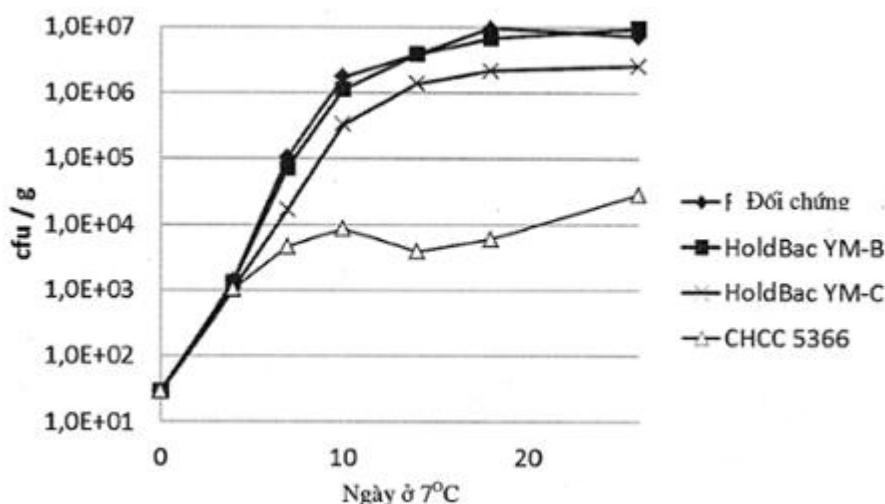
1-0026282

(51)⁷ C12N 1/20; A23C 9/123; A23C 9/158; (13) B
C12R 1/225; A23L 3/3571; A61K 35/74;
A01N 63/00; A23L 1/30

(21) 1-2014-03740 (22) 09/04/2013
(86) PCT/EP2013/057410 09/04/2013 (87) WO2013/153074 17/10/2013
(30) 12163508.0 09/04/2012 EP; PCT/EP2012/056384 09/04/2012 EP; 12168977.2
22/05/2012 EP; 13154591.5 08/02/2013 EP
(45) 25/11/2020 392 (43) 25/05/2015 326A
(73) CHR. HANSEN A/S (DK)
Bøge Allé 10-12, DK-2970 Hørsholm, Denmark
(72) HORNBAEK, Tina (DK); LISBERG, Maike (DK); DIEMER, Silja, Kej (DK).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHỦNG LACTOBACILLUS RHAMNOSUS, CHẾ PHẨM CHỐNG NẤM CHỨA CHỦNG NÀY, SẢN PHẨM THỰC PHẨM, THỨC ĂN GIA SÚC, DƯỢC PHẨM, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT

(57) Sáng chế thuộc lĩnh vực bảo vệ bằng biện pháp sinh học, cụ thể là đề cập đến chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 có số hiệu lưu giữ DSM23035. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm chống nấm chứa chủng này, chế phẩm chống nấm chứa chủng này và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei*, các sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc và dược phẩm chứa chế phẩm chống nấm như vậy, phương pháp sản xuất sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc và dược phẩm như vậy, phương pháp làm giảm hàm lượng của nấm men và nấm mốc của sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc và dược phẩm như vậy và ứng dụng của chế phẩm chống nấm này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực bảo vệ bằng biện pháp sinh học, đặc biệt là đề cập đến chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 có số hiệu lưu giữ DSM23035. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm chống nấm chứa chủng này, chế phẩm chống nấm chứa chủng này và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei*, các sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc và dược phẩm chứa chế phẩm chống nấm như vậy, phương pháp sản xuất sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc và dược phẩm như vậy, phương pháp làm giảm hàm lượng của nấm men và nấm mốc của sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc và dược phẩm như vậy và ứng dụng của chế phẩm chống nấm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Từ nhiều năm trước đã biết đến việc dùng vi khuẩn axit lactic để làm tăng thời hạn sử dụng của sản phẩm thực phẩm. Trong quá trình lên men, vi khuẩn axit lactic tạo ra axit lactic và các axit hữu cơ khác do đó làm giảm độ pH của sản phẩm thực phẩm, là điều kiện không thuận lợi cho sự sinh trưởng của các vi sinh vật ngoài mong muốn, như vi khuẩn, nấm men và nấm gây bệnh.

Ngoài ra, một số vi khuẩn axit lactic còn tạo ra các sản phẩm trao đổi chất có hoạt tính kháng khuẩn.

Đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP0221499 bộc lộ đặc tính chống nấm của *Lactobacillus rhamnosus* NRRL-B-15972, là chủng có khả năng ức chế sự sinh trưởng của các nấm mốc khác nhau khi được chủng trên môi trường thạch có bổ sung dịch chiết dừa chuột.

Đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP0576780 đề cập đến *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 là chủng có khả năng ức chế sự sinh trưởng của *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* và *Candida* trên môi trường trên cơ sở lactoserum (là nước sữa sau khi tách đông), được bổ sung dịch thủy phân casein và có dịch chiết nấm men.

Đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP1442113 đề cập đến hỗn hợp của *Propionibacterium jensenii* và *Lactobacillus* sp., như *Lactobacillus rhamnosus* chẳng hạn, có hoạt tính diệt vi sinh vật dùng để bảo vệ bằng biện pháp sinh học.

Tuy nhiên, vẫn cần tìm ra các chất có tác dụng bảo vệ sinh học có tác dụng chống nấm cải thiện như là chủng đơn lẻ hoặc kết hợp với các chủng khác có tác dụng bảo vệ sinh học.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tìm ra các chủng vi khuẩn axit lactic mới dùng làm các chất có tác dụng bảo vệ sinh học hiệu quả cao.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nhiều nghiên cứu và sàng lọc, và tìm ra được các chủng *Lactobacillus rhamnosus* có hiệu quả lên nấm men và nấm mốc cao hơn đáng kể chủng so với các chủng có tác dụng bảo vệ sinh học thương mại có trên thị trường cũng như kali sorbat, là chất thường được dùng làm hóa chất bảo quản.

Các tác giả sáng chế cũng đã phát hiện ra rằng một nhóm vi khuẩn axit lactic nhất định khi được dùng kết hợp với nhóm vi khuẩn axit lactic có tác dụng diệt vi sinh vật hiệp đồng. Các tác giả sáng chế cũng bất ngờ phát hiện ra rằng tác dụng diệt vi sinh vật của hai nhóm vi khuẩn kết hợp cao hơn tổng tác dụng của hai nhóm vi khuẩn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện sự sinh trưởng của nấm mốc trong sữa chua có 1,5% chất béo được lên men chỉ bằng chủng khởi động YF-L901 (hàng trên cùng), cùng với

HOLDBAC™ YM-B (hàng giữa) và cùng với *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366. Các chủng tạp đích được cho vào ở nồng độ như được đề cập trong phần mô tả tính từ trái sang phải lần lượt là: *Penicillium brevicompactum* (M1), *Penicillium commune* (M6), *Aspergillus versicolor* (M7) và *Penicillium crustosum* (M10). Sữa chua đã được ủ ở nhiệt độ $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 45 ngày.

Fig. 2 thể hiện số đếm tế bào của thể phân lập *Debaryomyces hansenii* được cho vào sữa chua có 1,5% chất béo được lên men chỉ bằng chủng khởi động YF-L901 (đối chứng) hoặc cùng với các chủng sau: HOLDBAC™ YM-B (HoldBac YM-B), HOLDBAC™ YM-C (HoldBac YM-C) hoặc *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (CHCC 5366). Sữa chua được bảo quản ở nhiệt độ $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ và được phân tích ở khoảng thời gian thích hợp.

Fig. 3 thể hiện sự sinh trưởng của nấm mốc trên các đĩa thu được từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động (đối chứng, ảnh thứ nhất), cùng với *Lb. paracasei* CHCC14676 (ảnh thứ hai), cùng với *Lb. rhamnosus* CHCC5366 (ảnh thứ ba) hoặc cùng với tổ hợp của *Lb. paracasei* CHCC14676 và *Lb. rhamnosus* CHCC5366 (ảnh thứ tư). Các chủng tạp đích được cho vào ở các nồng độ được đề cập trong phần mô tả từ phía cao bên trái và dịch theo chiều kim đồng hồ đến phía dưới cùng bên trái của đĩa tương ứng với: *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* và *Penicillium crustosum*. Các đĩa này đã được ủ ở nhiệt độ $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 12 ngày.

Fig. 4 thể hiện sự sinh trưởng của: (1) *Penicillium solitum*, (2) *P. palitans*, (3) *P. discolor*, (4) *P. spathulatum*, (5) *P. commune*, (6). *P. crustosum*, (7) *P. paneum*, (8) *P. roqueforti* trong sữa chua đối chứng (cột bên trái), sữa chua được tạo ra bằng 0,023% kali sorbat (cột nằm giữa) và sữa chua được tạo ra bằng $1\text{E}+07$ cfu/g CHCC5366 (cột bên phải) sau 60 ngày ủ ở nhiệt độ 7°C khi được cấy ở nồng độ vào khoảng 1000 bào tử/cốc.

Fig. 5 thể hiện sự sinh trưởng của *Mucor* ssp. trên sữa chua Hy Lạp thu được từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động (cốc bên trái) hoặc từ sữa được lên men khi có mặt *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (cốc bên phải).

Fig. 6 thể hiện sự sinh trưởng của nấm mốc *Rhizopus stolonifer* trên sữa chua Hy Lạp thu được từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động (R, tức là đối chứng), bằng chủng khởi động và HOLDBAC™ YM-B (YM-B), bằng chủng khởi động và *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366), hoặc bằng chủng khởi động và tổ hợp của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5366+14676).

Fig. 7 thể hiện sự sinh trưởng của *Saccharomyces cerevisiae* trên phô mát trắng ngâm muối (white brine cheese) làm từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động (đối chứng); bằng chủng khởi động và HOLDBAC™ YM-B (YM-B); hoặc bằng chủng khởi động, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 và *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366+14676).

Fig. 8 thể hiện sự sinh trưởng của *Kluyveromyces marxianus* trên phô mát trắng ngâm muối làm từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động (đối chứng); bằng chủng khởi động và HOLDBAC™ YM-B (YM-B); hoặc bằng chủng khởi động, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 và *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366+14676).

Fig. 9 thể hiện sự sinh trưởng của *Penicillium commune* trên phô mát trắng ngâm muối làm từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động (R, tức là đối chứng); bằng chủng khởi động và HOLDBAC™ YM-B (YM-B); hoặc bằng chủng khởi động, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 và *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366+14676).

Fig. 10 thể hiện sự sinh trưởng của *P. crustosum* trên pho mát trắng ngâm muối làm từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động (R, tức là đối chứng); bằng chủng khởi động và HOLDBAC™ YM-B (YM-B); hoặc bằng chủng khởi động và *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366).

Fig. 11 thể hiện sự sinh trưởng của nấm mốc *Penicillium paneum* trong sữa chua có 1,5% chất béo thu được từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động (R, tức là đối chứng), bằng chủng khởi động và HOLDBAC™ YM-B (YM-B), bằng chủng khởi động và *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366), hoặc bằng chủng khởi động và tổ hợp của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5366+14676).

Fig. 12 thể hiện sự sinh trưởng của nấm mốc *Penicillium crustosum* trong sữa chua có 1,5% chất béo thu được từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động (hàng trên cùng), bằng chủng khởi động và HOLDBAC™ YM-B (hàng thứ hai), bằng chủng khởi động và *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (hàng thứ ba) hoặc bằng chủng khởi động và tổ hợp của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (hàng cuối cùng). Các chủng tập đích được cho vào ở nồng độ 100 bào tử/cốc và các sữa chua này đã được ủ ở nhiệt độ $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ (cột bên trái), $12\pm 1^{\circ}\text{C}$ (cột ở giữa) hoặc $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ (cột bên phải) trong thời gian 36 ngày.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ "vi khuẩn axit lactic" dùng để chỉ vi khuẩn gram dương, ưa khí hoặc kỵ khí, có khả năng lên men các đường để tạo ra axit bao gồm axit lactic như là axit chủ yếu được tạo ra. Các vi khuẩn axit lactic hữu ích nhất để sản xuất công nghiệp là thuộc bộ "Lactobacillales" bao gồm *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp. và *Enterococcus* spp. Các vi khuẩn này

thường được dùng làm chủng trong sản phẩm thực phẩm ở dạng đơn lẻ hoặc kết hợp với các vi khuẩn axit lactic khác.

Thuật ngữ "thực phẩm" cũng dùng để chỉ pho mát. Thuật ngữ "pho mát" được hiểu là bao gồm pho mát bất kỳ, bao gồm pho mát rắn, bán rắn và mềm, như pho mát thuộc các dạng sau: Cottage, Feta, Cheddar, Parmesan, Mozzarella, Emmentaler, Danbo, Gouda, Edam, Feta-type, pho mát có đốm xanh (blue cheese), pho mát ngâm muối (brine cheese), Camembert và Brie. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết cách để chuyển hoá khối đông tụ thành pho mát, có thể tham khảo các phương pháp này trong tài liệu, xem chẳng hạn Kosikowski, F. V., and V. V. Mistry, "Cheese and Fermented Milk Foods", 1997, 3rd Ed. F. V. Kosikowski, L. L. C. Westport, CT. Như được sử dụng ở bản mô tả này, pho mát có nồng độ NaCl thấp hơn 1,7% (khối lượng/khối lượng) được gọi là "pho mát có lượng muối thấp".

Vi khuẩn axit lactic, bao gồm vi khuẩn thuộc các loài *Lactobacillus* sp. và *Lactococcus* sp., thường được cấp cho công nghiệp sản xuất sữa hoặc chủng dưới dạng chủng đông lạnh hoặc làm đông khô để nhân giống khối ban đầu hoặc còn được chủng gọi là chủng "làm đông trực tiếp trong hũ "Direct Vat Set"" (DVS), được dự định để cấy trực tiếp vào bình hoặc hũ lên men để sản xuất sản phẩm sữa, như sản phẩm sữa lên men hoặc pho mát. Các chủng vi khuẩn axit lactic như vậy thường được gọi là "chủng khởi động" hoặc "giống ban đầu".

Thuật ngữ "ưa ấm" trong bản mô tả này dùng để chỉ vi sinh vật phát triển mạnh tốt nhất ở nhiệt độ vừa phải (15°C-40°C). Vi khuẩn ưa ấm hữu ích nhất trong công nghiệp bao gồm *Lactococcus* spp. và *Leuconostoc* spp.. Thuật ngữ "lên men ưa ấm" trong bản mô tả này dùng để chỉ lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến vào khoảng 35°C. Thuật ngữ "sản phẩm sữa lên men ưa ấm" dùng để chỉ các sản phẩm sữa được lên men được tạo ra bằng cách lên men ưa ấm chủng khởi động và bao gồm như vậy các sản phẩm sữa được lên men như buttermilk, sữa chua (sour milk), sữa chua ăn kiêng (cultured milk), váng sữa smetana, kem chua (sour cream) và pho

mát tươi, như pho mát quark, pho mát tvarog và pho mát kem (cream cheese).

Thuật ngữ “ura nhiệt” trong bản mô tả này dùng để chỉ vi sinh vật phát triển mạnh tốt nhất ở nhiệt độ cao hơn 43°C. Vi khuẩn ura nhiệt hữu ích nhất trong công nghiệp bao gồm *Streptococcus* spp. và *Lactobacillus* spp. Thuật ngữ “lên men ura nhiệt” trong bản mô tả này dùng để chỉ lên men ở nhiệt độ cao hơn khoảng 35°C, như nằm trong khoảng từ 35°C đến vào khoảng 45°C. Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men ura nhiệt” dùng để chỉ các sản phẩm sữa được lên men được tạo ra bằng cách lên men chủng khởi động ura nhiệt và bao gồm các sản phẩm sữa được lên men như sữa chua dạng “tĩnh”, sữa chua dạng “động” và sữa chua uống.

Thuật ngữ “sữa” được hiểu là sự tiết sữa thu được bằng cách lấy sữa từ động vật có vú bất kỳ, như bò, cừu, dê, trâu hoặc lạc đà. Theo một phương án được ưu tiên, sữa là sữa bò. Thuật ngữ sữa cũng bao gồm các dung dịch protein/chất béo làm từ nguồn thực vật, ví dụ sữa đậu nành.

Thuật ngữ “cơ chất sữa” có thể là bất kỳ chất liệu sữa thô và/hoặc đã được chế biến bất kỳ có thể được xử lý bằng cách lên men theo phương pháp của sáng chế. Do đó, cơ chất sữa hữu ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số các dung dịch/huyền phù của sữa hoặc sản phẩm giống sữa bất kỳ chứa protein, như sữa nguyên kem hoặc tách béo, bột sữa gầy, buttermilk, sữa bột hoàn nguyên, sữa đặc, sữa bột, nước sữa (whey), váng sữa (whey permeate), lactoza, nước cái được tạo ra từ quá trình kết tinh lactoza, whey protein dạng đậm đặc, hoặc kem (cream). Rõ ràng là, cơ chất sữa có thể có nguồn gốc từ động vật có vú bất kỳ, ví dụ là sữa từ động vật có vú về cơ bản tinh khiết, hoặc sữa bột hoàn nguyên.

Trước khi lên men, cơ chất sữa có thể được làm đồng nhất hoá và được tiệt trùng theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

“Đồng nhất hóa” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ việc trộn mạnh để thu được huyền phù hoặc nhũ tương hòa tan. Nếu như quá trình đồng nhất

hoá được thực hiện trước khi lên men, thì có thể được thực hiện sao cho phá hủy chất béo của sữa thành kích cỡ nhỏ hơn để không bị tách ra khỏi sữa. Quá trình này có thể được thực hiện bằng cách đưa sữa ở áp suất cao qua các lỗ nhỏ.

“Tiệt trùng” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ việc xử lý cơ chất sữa để làm giảm hoặc hạn chế với sự có mặt của các sinh vật sống, như vi sinh vật. Tốt hơn nữa, đạt được quá trình tiệt trùng bằng cách duy trì nhiệt độ nhất định trong khoảng thời gian nhất định. Nhiệt độ nhất định thường đạt được bằng cách gia nhiệt. Nhiệt độ và thời gian có thể được lựa chọn để giết chết hoặc làm bất hoạt vi khuẩn nhất định, như vi khuẩn có hại. Sau đó có thể tiến hành bước làm mát nhanh.

“Lên men” trong các phương pháp theo sáng chế dùng để chỉ việc chuyển hóa hydrat cacbon thành rượu hoặc axit nhờ tác động của vi sinh vật. Tốt hơn nữa, quá trình lên men trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm bước chuyển hóa lactoza thành axit lactic.

Các quy trình lên men được sử dụng để sản xuất các sản phẩm sữa là đã biết và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách chọn lọc các điều kiện quy trình thích hợp, như nhiệt độ, oxy, lượng và đặc tính vi sinh vật và thời gian xử lý. Rõ ràng là, điều kiện lên men được lựa chọn sao cho đạt được mục đích sáng chế, tức là để thu được sản phẩm sữa ở dạng rắn (như pho mát) hoặc dạng lỏng (như sản phẩm sữa lên men).

Chế phẩm theo sáng chế có ưu điểm là có thể ức chế các vi sinh vật ngoài mong muốn được chọn từ nấm, vi khuẩn và các hỗn hợp của chúng, ví dụ trên các sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc và dược phẩm và ở người và động vật. Đặc biệt nhằm vào việc phòng và/hoặc ức chế sự sinh trưởng của nấm, như nấm men và nấm mốc. Do đó, theo một phương án được ưu tiên, thuật ngữ “diệt vi sinh vật” còn được hiểu là “chống nấm”.

Thuật ngữ “các vi sinh vật ngoài mong muốn” trong bản mô tả này dùng để chỉ vi sinh vật như vi khuẩn và nấm, như nấm men, mà có khả năng sinh bệnh và/hoặc có thể làm giảm chất lượng các thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm. Chế phẩm theo sáng chế có ưu điểm là có thể ức chế các vi sinh vật ngoài mong muốn được chọn từ nấm, vi khuẩn và các hỗn hợp của chúng, ví dụ trên các sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc và dược phẩm và ở người và động vật. Đặc biệt nhằm vào việc phòng và/hoặc ức chế sự sinh trưởng của nấm, như nấm men và nấm mốc.

Các thuật ngữ “để ức chế” và “ức chế” liên quan đến nấm men và nấm mốc dùng để chỉ ví dụ rằng sự sinh trưởng hoặc số lượng hoặc nồng độ của nấm men và nấm mốc, ví dụ trong sản phẩm thực phẩm và/hoặc trên bề mặt của sản phẩm thực phẩm chứa các chủng theo sáng chế, là thấp hơn trong sản phẩm thực phẩm và/hoặc trên bề mặt của sản phẩm thực phẩm không chứa các chủng này.

Trong phạm vi của sáng chế, thuật ngữ “thể đột biến” dùng để chỉ chủng thu được từ chủng theo sáng chế bằng ví dụ kỹ thuật di truyền, bức xạ và/hoặc xử lý bằng hóa chất. Tốt hơn nếu thể đột biến này là thể đột biến tương đương chức năng, ví dụ thể đột biến có đặc tính về cơ bản giống, hoặc được cải thiện (ví dụ về đặc tính chống nấm) như của chủng mẹ. Thể đột biến như vậy cũng thuộc sáng chế. Đặc biệt là, thuật ngữ “thể đột biến” dùng để chỉ chủng thu được bằng cách xử lý chủng theo sáng chế bằng xử lý làm phát sinh đột biến thường dùng bất kỳ bao gồm xử lý bằng tác nhân gây đột biến hóa chất như etan metan sulphonat (EMS) hoặc N-metyl-N'-nitro-N-nitroguanidin (NTG), tia UV hoặc thể đột biến xuất hiện tự phát. Thể đột biến có thể được xử lý một số lần làm phát sinh đột biến (một lần xử lý phải được hiểu là gồm một lần bước làm phát sinh đột biến tiếp đó là bước sàng lọc/chọn lọc), nhưng tốt hơn là thực hiện không nhiều hơn 20, hoặc không nhiều hơn 10, hoặc không nhiều hơn 5 lần xử lý (hoặc các bước sàng lọc/chọn lọc). Trong thể đột biến hiện được ưu tiên, ít hơn 5%, hoặc ít hơn 1% hoặc thậm chí ít hơn 0,1% số nucleotit trong hệ gen vi khuẩn được thay bằng nucleotit khác, hoặc được bỏ đi, so với chủng gốc.

Việc sử dụng từ "a" và "an" và "the" và các từ tương tự trong bản mô tả tiếng Anh của sáng chế (đặc biệt là trong phần yêu cầu bảo hộ) được xem là bao gồm cả dạng số ít và số nhiều, trừ khi được quy định khác đi trong bản mô tả này hoặc rõ ràng là mâu thuẫn với phần nội dung. Các từ "chứa", "có", "bao gồm" và "có chứa" được dùng là các thuật ngữ có phạm vi mở (tức là có nghĩa "bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số,") trừ khi được quy định khác đi. Việc nêu khoảng các giá trị trong bản mô tả này chỉ được dự định để cách viết tắt của từng giá trị nằm trong khoảng giá trị, trừ khi được quy định khác đi trong bản mô tả này, và mỗi giá trị riêng biệt được kết hợp vào bản mô tả như từng giá trị riêng biệt được nêu trong bản mô tả này. Tất cả các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo trình tự thích hợp bất kỳ trừ khi được quy định khác đi trong bản mô tả này hoặc theo cách khác rõ ràng mâu thuẫn với nội dung. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ ví dụ (ví dụ, "như") được nêu ra trong bản mô tả này, chỉ được dự định để minh họa rõ hơn sáng chế và không có nghĩa là giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi được yêu cầu bảo hộ theo cách khác. Không miêu tả nào trong bản mô tả chỉ ra rằng bất kỳ dấu hiệu không được nêu trong yêu cầu bảo hộ là dấu hiệu cần và đủ để thực hiện sáng chế.

Cách thực hiện và các khía cạnh của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã sàng lọc trong số 200 giống dự tuyển thuộc *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus rhamnosus* để tìm ra các chủng hữu hiệu nhất với một phạm vi rộng các vi sinh vật, như nấm men và nấm mốc.

Các nghiên cứu sàng lọc được thực hiện trong thử nghiệm mô hình phòng theo các sản phẩm sữa được lên men ư ấm giống như trong môi trường trên cơ sở sữa mà chủng khởi động liên quan được cho vào khi có hoặc không có các chủng dự tuyển có tác dụng bảo vệ sinh học và được lên men ở các điều kiện giống như các sản phẩm sữa được lên men ư ấm. Các sinh vật đích được phân lập ra khỏi sản phẩm sữa được lên

men ưa ấm. Cả hai vi khuẩn axit lactic thuần chủng từ chủng HOLDBAC™ từ Danisco A/S, Denmark, cũng như chủng HOLDBAC™ YM-B và HOLDBAC™ YM-C đầy đủ chứa cả vi khuẩn axit lactic và vi khuẩn axit propionic được dùng làm chuẩn so sánh.

Mô hình thử nghiệm này được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP11161609.0.

17 chủng dự tuyển trong các *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus rhamnosus* được nhận thấy là nhìn chung ức chế 12 nấm chỉ thị tốt hoặc tốt hơn vi khuẩn axit lactic chuẩn so sánh khi được thử nghiệm ở nhiệt độ 25°C.

Khi được thử nghiệm trên sữa chua một chủng *Lactobacillus rhamnosus*, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu giữ tại Cơ quan lưu giữ giống cây vi sinh vật và tế bào của Đức (DSMZ) với số hiệu lưu giữ DSM23035 cho thấy là ức chế nấm men và nấm mốc tốt hơn đáng kể chủng có tác dụng bảo vệ sinh học có trên thị trường.

Tác dụng ức chế của chủng này đối với nấm men và nấm mốc có thể được xác định bằng cách bảo quản sản phẩm sữa được lên men ở nhiệt độ thích hợp trong thời gian bảo quản thích hợp như mô tả trong phần Ví dụ sau đây.

Nhìn chung, nhiệt độ thích hợp mà tại đó phương pháp này cần được thực hiện phụ thuộc vào nhiệt độ mà tại đó sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc được phẩm cụ thể thường được bảo quản và/hoặc được sản xuất. Nhiệt độ mà tại đó sản phẩm thường được bảo quản là nằm trong khoảng từ 5°C đến 26°C, tốt hơn nếu nhiệt độ là vào khoảng 8°C.

Thời gian bảo quản ở nhiệt độ phụ thuộc vào thời gian mà trong đó sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc, hoặc được phẩm thường được bảo quản (thời hạn sử

dụng). Thời gian bảo quản thông thường là 5-65, tốt hơn nếu 7-60 ngày, tốt hơn nữa nếu 7-28 ngày, và còn tốt hơn nữa nếu thời gian bảo quản vào khoảng 21 ngày.

Theo đó, khía cạnh thứ nhất của sáng chế đề cập đến chủng *Lactobacillus rhamnosus* được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu giữ tại Cơ quan lưu giữ giống cây vi sinh vật và tế bào của Đức (DSMZ) với số hiệu lưu giữ DSM23035 và các chủng đột biến thu được từ chủng này.

Do đó, ngoài chủng được lưu giữ được đề cập nêu trên, sáng chế còn đề cập đến các thể đột biến đã thu được từ chủng này, tức là các chủng đã thu được bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ CHCC5366 làm nguyên liệu. Chủng đột biến có thể thu được từ chủng được lưu giữ, ví dụ, nhờ kỹ thuật di truyền, bức xạ, chiếu tia UV, xử lý bằng hóa chất và/hoặc các phương pháp để gây ra thay đổi của hệ gen. Thể đột biến theo sáng chế sẽ ức chế và/hoặc ngăn cản sự sinh trưởng của một số vi khuẩn hoặc nấm, tốt hơn nếu là nấm mốc. Tốt hơn nếu thể đột biến này có tác dụng chống nấm về cơ bản ít nhất 80% hoặc cao hơn, ít nhất 90% hoặc cao hơn, ít nhất 95% hoặc cao hơn, hoặc thậm chí lên đến 100% hoặc cao hơn so với tác dụng chống nấm của chủng gốc khi được xác định, ví dụ, trong thử nghiệm như mô tả ở Ví dụ 1 bằng cách sử dụng một trong số các nấm mốc *P. brevicompactum*, *P. commune*, *A. versicolor*, *D. hansenii* hoặc *P. crustosum* làm sinh vật đối chứng bị ức chế sinh trưởng.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ ràng là bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu, độc giả có chuyên môn bằng các kỹ thuật gây đột biến gen hoặc tái phân lập thông thường có thể thu nhận các thể đột biến hoặc các dẫn xuất của chúng mà vẫn giữ được các đặc điểm và các ưu điểm liên quan được mô tả trong bản mô tả này. Theo đó, thuật ngữ “các chủng đột biến thu được từ chủng này” theo khía cạnh thứ nhất đề cập đến các chủng đột biến thu được bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu.

Khía cạnh thứ hai đề cập đến chế phẩm chống nấm chứa ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo khía cạnh thứ nhất theo sáng chế, tốt hơn nếu là chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366.

Khi thử nghiệm chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 kết hợp với các chủng *Lactobacillus paracasei* khác nhau, đã bất ngờ phát hiện ra rằng các kết hợp này còn tốt hơn từng chủng đơn lẻ ngay cả khi tổng nồng độ tế bào là giống hệt. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến sự tổ hợp của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC12777. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến sự tổ hợp của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676. Các sự kết hợp này tỏ ra là hữu hiệu hơn chủng chuẩn so sánh HOLDBAC™ YM-B và HOLDBAC™ YM-C từ Danisco, Denmark.

Theo đó, theo một phương án được ưu tiên sáng chế đề cập đến chế phẩm diệt vi sinh vật và tốt hơn nữa nếu dùng để chống nấm chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu giữ tại Cơ quan lưu giữ giống cây vi sinh vật và tế bào của Đức (DSMZ) với số hiệu lưu giữ DSM23035 hoặc thể đột biến thu được từ chủng này và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei*. Tốt hơn nếu, chủng là ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 có số hiệu lưu giữ DSM25612, chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 có số hiệu lưu giữ DSM24651 và các chủng đột biến thu được từ các chủng được lưu giữ này.

Do đó theo một khía cạnh sáng chế đề xuất chế phẩm diệt vi sinh vật và tốt hơn nữa nếu chế phẩm chống nấm chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 hoặc thể đột biến thu được từ chủng này và chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 hoặc thể đột biến thu được từ chủng này. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm diệt vi sinh vật và tốt hơn nữa nếu là chế phẩm chống nấm chứa ít nhất chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 hoặc thể đột biến thu được từ chủng này và chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 hoặc thể đột biến thu được

từ chủng này. Tốt hơn nếu, tổ hợp của chủng *Lactobacillus paracasei* và chủng *Lactobacillus rhamnosus* trong chế phẩm theo sáng chế có tác dụng hiệp đồng về hoạt tính diệt vi sinh vật và/hoặc hoạt tính chống nấm.

Chế phẩm chống nấm thường chứa vi khuẩn ở dạng cô đặc bao gồm dạng cô đặc làm đông lạnh, làm khô hoặc làm đông khô thông thường có nồng độ tế bào sống, nằm trong khoảng 10^4 đến 10^{12} cfu (đơn vị khuẩn lạc) cho một gam chế phẩm bao gồm ít nhất 10^4 cfu cho một gam chế phẩm, như ít nhất 10^5 cfu/g, chẳng hạn ít nhất 10^6 cfu/g, như ít nhất 10^7 cfu/g, ví dụ ít nhất 10^8 cfu/g, như ít nhất 10^9 cfu/g, ví dụ ít nhất 10^{10} cfu/g, như ít nhất 10^{11} cfu/g. Do đó, tốt hơn nếu chế phẩm theo sáng chế có mặt ở dạng làm đông lạnh, làm khô hoặc làm đông khô, ví dụ chủng làm đông trực tiếp trong hũ “Direct Vat Set” (DVS). Tuy nhiên, như được sử dụng ở bản mô tả này chế phẩm cũng có thể ở dạng lỏng thu được sau khi tạo huyền phù dạng đông đặc tế bào làm đông lạnh, làm khô hoặc làm đông khô trong môi trường lỏng như nước hoặc dung dịch đệm PBS. Khi chế phẩm theo sáng chế là huyền phù, nồng độ của tế bào sống nằm trong khoảng 10^4 đến 10^{12} cfu (đơn vị khuẩn lạc) cho mỗi ml chế phẩm bao gồm ít nhất 10^4 cfu cho mỗi ml chế phẩm, như ít nhất 10^5 cfu/ml, ví dụ ít nhất 10^6 cfu/ml, như ít nhất 10^7 cfu/ml, ví dụ ít nhất 10^8 cfu/ml, như ít nhất 10^9 cfu/ml, ví dụ ít nhất 10^{10} cfu/ml, như ít nhất 10^{11} cfu/ml.

Chế phẩm có thể còn chứa các thành phần khác như chất bảo vệ đông lạnh và/hoặc các chất phụ gia thông thường bao gồm các đường chất như dịch chiết nấm men, các đường và các vitamin, ví dụ vitamin A, C, D, K hoặc các vitamin thuộc nhóm vitamin B. Các chất bảo vệ đông lạnh thích hợp mà có thể được cho vào chế phẩm theo sáng chế là các thành phần giúp cải thiện khả năng chịu lạnh của vi sinh vật, như manitol, sorbitol, natri tripolyphosphat, xylitol, glyxerol, rafinoza, maltodextrin, erythritol, threitol, trehaloza, glucoza và fructoza. Các chất phụ gia khác có thể bao gồm, ví dụ, hydrat cacbon, các chất tạo hương vị, các chất khoáng, enzym (ví dụ rennet, lactaza và/hoặc phospholipaza).

Trong các chế phẩm theo sáng chế mà chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và chủng *Lactobacillus paracasei*, thì tỷ lệ giữa chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và chủng *Lactobacillus paracasei*, ví dụ tỷ lệ về nồng độ hoặc số lượng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* so với nồng độ hoặc số lượng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei*, tốt hơn nếu với lượng nằm trong khoảng từ 1:100 đến 100:1, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 1:10 đến 10:1.

Chế phẩm chống nấm theo sáng chế có thể được sử dụng cho sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc và dược phẩm bất kỳ dễ bị vi sinh vật làm giảm chất lượng và/hoặc bị nhiễm nấm men và nấm mốc. Các sản phẩm này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, quả và rau bao gồm các sản phẩm của chúng, hạt cây trồng và các sản phẩm thu được từ hạt cây trồng, các sản phẩm sữa, thịt, gia cầm, và hải sản. theo các phương án được ưu tiên đặc biệt, chế phẩm được sử dụng cho sản phẩm sữa và/hoặc thịt và gia cầm. Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế được dùng làm chất phụ gia trong quá trình sản xuất các sản phẩm sữa, như sữa chua, pho mát tvarog, kem chua (sour cream), pho mát kem (cream cheese) và các sản phẩm tương tự.

Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế được sử dụng để chống nấm, như nấm men và nấm mốc. Điều này có nghĩa là chế phẩm này được sử dụng để ức chế và/hoặc ngăn ngừa sự sinh trưởng của nấm gây nhiễm các quy trình sản xuất sữa công nghiệp, đặc biệt là các quy trình lên men sữa. Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng, ví dụ, để ức chế và/hoặc ngăn ngừa sự sinh trưởng của nấm men, như nấm men thuộc giống *Klyveromyces* (ví dụ, *K. marxianus*, *K. lactis*), *Pichia* (ví dụ, *P. fermentans*), *Yarrowia* (ví dụ, *Y. lipolytica*), *Candida* (ví dụ, *C. sake*), và các nấm men tương tự; hoặc nấm mốc, như nấm mốc thuộc giống *Penicillium* (ví dụ, *P. nalgiovense*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. brevicompactum*, *P. glabrum*), *Mucor* spp., *Cladospodium* ssp., *Aspergillus* (ví dụ, *A. versicolor*), *Debaryomyces* (ví dụ, *D. hansenii*), và các nấm mốc tương tự. Đặc biệt ưu tiên sử dụng chế phẩm theo sáng chế để ức chế và/hoặc ngăn sự sinh trưởng của các loài *Klyveromyces marxianus*,

Yarrowia lipolytica, *Penicillium nalgiovense*, *Cladosporium* ssp., *Penicillium commune*, *Mucor* ssp., *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium crustosum*, *Kluyveromyces lactis*, và/hoặc *Debaryomyces hansenii*.

Chế phẩm chống nấm theo khía cạnh thứ hai của sáng chế cũng có thể được dùng làm sản phẩm dược phẩm, tốt hơn nếu là sản phẩm là để điều trị nhiễm nấm có khả năng sinh bệnh, như nấm men có khả năng sinh bệnh.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo khía cạnh thứ nhất theo sáng chế hoặc chế phẩm chống nấm theo khía cạnh thứ hai của sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm là thực phẩm.

Theo một phương án được ưu tiên hơn, sản phẩm thực phẩm như vậy được chọn từ nhóm bao gồm quả và các sản phẩm thu được từ quả, rau và các sản phẩm từ rau, hạt cây trồng và các sản phẩm thu được từ hạt cây trồng, các sản phẩm sữa, thịt, gia cầm và hải sản và các hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, sản phẩm thực phẩm này là sản phẩm sữa, tốt hơn nếu là sản phẩm sữa lên men bằng vi sinh vật ưa ấm hoặc ưa nhiệt, như pho mát tươi, sữa chua, kem chua (sour cream) hoặc pho mát tvarog.

Theo một phương án được ưu tiên khác, sản phẩm thực phẩm này là thịt hoặc gia cầm.

Theo một phương án được ưu tiên, sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm là sản phẩm dược phẩm.

Tốt hơn nếu, sản phẩm dược phẩm này là sản phẩm hữu ích để cấp chế phẩm chống nấm theo khía cạnh thứ hai của sáng chế cho người hoặc động vật để ức chế vi

sinh vật có khả năng sinh bệnh và làm thuyên giảm triệu chứng liên quan đến vi sinh vật có khả năng sinh bệnh. Ví dụ về các triệu chứng như vậy bao gồm triệu chứng liên quan đến nhiễm nấm men. Theo một phương án, sản phẩm được phẩm này có thể ở dạng phân liều đơn vị chứa chế phẩm chống nấm. Tốt hơn nếu, dạng phân liều đơn vị này là viên nang hoặc viên nén. Tuy nhiên, dạng phân liều đơn vị cũng có thể thích hợp để đưa lên niêm mạc hoặc da và, do đó, ở dạng bột nhão, kem, dạng thuốc mỡ và các dạng tương tự.

Khía cạnh thứ tư của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm theo khía cạnh thứ ba của sáng chế bao gồm bước bổ sung ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo khía cạnh thứ nhất hoặc chế phẩm chống nấm theo khía cạnh thứ hai của sáng chế trong quá trình sản xuất sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm. Tốt hơn nếu, phương pháp còn bao gồm bước không chế các thông số sản xuất trong quá trình sản xuất sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* là không đổi hoặc tăng lên.

Theo một phương án được ưu tiên nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* ít nhất là 1×10^6 cfu/g hoặc mỗi chủng ít nhất là 1×10^6 cfu/ml sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm, hoặc mỗi chủng ít nhất là 1×10^5 cfu/cm² bề mặt của sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm. Tốt hơn nếu, nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* ít nhất là 5×10^6 cfu/g hoặc mỗi chủng ít nhất là 5×10^6 cfu/ml sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm, hoặc mỗi chủng ít nhất là 5×10^5 cfu/cm² bề mặt của sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm, như ít nhất là 1×10^7 cfu/g hoặc mỗi chủng ít nhất là 1×10^7 cfu/ml sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm, hoặc mỗi chủng ít nhất là 1×10^6 cfu/cm² bề mặt của sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm, như ít nhất là 5×10^7 cfu/g hoặc mỗi chủng ít nhất là 5×10^7 cfu/ml sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm, hoặc mỗi chủng ít nhất là 5×10^6 cfu/cm² bề mặt của sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm.

Khi sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm được sản xuất bằng cách bổ sung chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 hoặc thể đột biến thu được từ chủng này và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei*, nồng độ của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 hoặc thể đột biến này thu được từ chủng này và/hoặc nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* mỗi chủng ít nhất là 1×10^6 cfu/g hoặc mỗi chủng ít nhất là 1×10^6 cfu/ml sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm, hoặc mỗi chủng ít nhất là 1×10^5 cfu/cm² bề mặt của sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm. Tốt hơn nếu, nồng độ của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 hoặc thể đột biến này thu được từ chủng này và/hoặc nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* mỗi chủng ít nhất là 5×10^6 cfu/g hoặc mỗi chủng ít nhất là 5×10^6 cfu/ml sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm, hoặc mỗi chủng ít nhất là 5×10^5 cfu/cm² bề mặt của sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm. Theo một phương án khác, nồng độ của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 hoặc thể đột biến này thu được từ chủng này và/hoặc nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* mỗi chủng ít nhất là 1×10^8 cfu/g hoặc mỗi chủng ít nhất là 1×10^8 cfu/ml sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm, hoặc mỗi chủng ít nhất là 1×10^7 cfu/cm² bề mặt của sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm.

Theo một phương án được ưu tiên, các thông số sản xuất được không chế trong quá trình sản xuất sao cho nồng độ của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (hoặc thể đột biến này thu được từ chủng này) và chủng là ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* gia tăng hoặc là không đổi.

Chế phẩm chống nấm theo sáng chế được sử dụng một cách dễ dàng nhất bằng cách trộn với và/hoặc đưa lên sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm ở dạng có thể trộn lẫn, nhưng chế phẩm cũng có thể hữu hiệu để xử lý bề mặt của sản phẩm thực phẩm rắn, hoặc bên trong của các sản phẩm này, ví dụ bằng cách phun. Theo các phương án khác nữa, chế phẩm có thể được dùng dưới dạng nước sốt, hỗn hợp phủ, xát gia vị, hỗn hợp láng bề mặt, chất màu hỗn hợp, và các dạng tương tự, tiêu

chuẩn quan trọng là chế phẩm chống nấm sẽ có trên bề mặt chịu sự phân hủy của vi khuẩn và sự nhiễm nấm men và nấm mốc. Theo các phương án khác nữa, chế phẩm có thể được đưa gián tiếp tiếp xúc với bề mặt sản phẩm thực phẩm bằng cách đưa chế phẩm lên bao gói sản phẩm thực phẩm và sau đó đưa bao gói này lên bề mặt sản phẩm thực phẩm. Lượng tối ưu được sử dụng sẽ phụ thuộc vào thành phần của sản phẩm thực phẩm cụ thể sẽ được xử lý và phương pháp áp dụng để đưa chế phẩm này lên bề mặt sản phẩm thực phẩm, nhưng có thể được xác định bằng thử nghiệm đơn giản.

Theo một phương án rất được ưu tiên, phương pháp này bao gồm một hoặc nhiều bước lên men và chủng là ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* hoặc chế phẩm chống nấm có thể được cho vào sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc được phẩm trước, trong hoặc sau một hoặc nhiều bước lên men như vậy.

Tốt hơn nữa, phương pháp bao gồm bước lên men cơ chất, như cơ chất sữa, với sự có mặt của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo sáng chế trong khoảng thời gian đủ để có hoạt tính chống nấm của chủng là ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo sáng chế. Hoạt tính chống nấm này có tác dụng ức chế sự phát triển của nấm men và/hoặc nấm mốc trong sản phẩm được lên men bằng chủng là ít nhất một chủng nêu trên.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, phương pháp này bao gồm bước lên men cơ chất sữa bằng chủng khởi động chứa ít nhất một chủng của giống được chọn từ *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* và *Leuconostoc*, như ít nhất một chủng *Lactobacillus bulgaricus* và ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* hoặc như ít nhất một chủng *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ít nhất một chủng *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* và ít nhất một chủng *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.

Khía cạnh thứ năm của sáng chế đề cập đến sản phẩm thực phẩm thu được bằng phương pháp theo khía cạnh thứ tư của sáng chế.

Khía cạnh thứ sáu của sáng chế đề cập đến việc sử dụng chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo khía cạnh thứ nhất hoặc chế phẩm chống nấm theo khía cạnh thứ hai để tạo ra sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm. Tốt hơn nữa, sản phẩm thực phẩm tạo ra bằng cách sử dụng chủng *Lactobacillus paracasei* theo khía cạnh thứ nhất hoặc chế phẩm chống nấm theo khía cạnh thứ hai là pho mát, như pho mát Cottage, Feta, Cheddar, Parmesan, Mozzarella, Emmentaler, Danbo, Gouda, Edam, pho mát loại Feta, pho mát đốm xanh, pho mát ngâm muối, Camembert hoặc Brie.

Khía cạnh cuối của sáng chế đề cập đến sử dụng chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo khía cạnh thứ nhất hoặc chế phẩm chống nấm theo khía cạnh thứ hai để ức chế sự sinh trưởng của nấm men và nấm mốc, đặc biệt là trong sản phẩm thực phẩm và thức ăn gia súc.

Các phương án của sáng chế được mô tả sau đây, nhưng không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Nghiên cứu gây cảm nhiễm đối với sữa chua bằng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366.

Để theo dõi bằng mắt tác dụng ức chế của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 đến các nấm mốc khác nhau, *P. brevicompactum*, *P. commune*, *A. versicolor* và *P. crustosum*, chuẩn bị sữa chua có 1,5% chất béo:

Sữa đã đồng nhất hoá (1,5% chất béo) được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 5 phút trong các chai có dung tích 1 lít trong bể nước và làm lạnh ngay. Chủng khởi động thương mại (F-DVS YF-L901 nhận được từ Chr. Hansen A/S, Denmark) được cấy ở nồng độ 0,02%. Sữa này được cấy tiếp bằng HOLDBAC™

YM-B (20DCU/100L) hoặc *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 CFU/ml) và một chai được sử dụng làm mẫu đối chứng và chỉ được cấy bằng chủng khởi động.

Lên men sữa này ở nhiệt độ $43^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ cho đến khi đạt đến độ pH $4,60 \pm 0,1$. Sữa chua thu được được rót vào các cốc (100 g) và được bảo quản ở nhiệt độ $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Một ngày sau khi điều chế sữa chua, cấy các nấm mốc khác nhau làm tạp khuẩn trên bề mặt trong hai cốc sữa chua giống nhau bằng một đốm trên bề mặt của sữa chua với lượng đích 100 bào tử/đốm. Sự sinh trưởng của nấm mốc được đánh giá bằng mắt sau khi bảo quản trong thời gian 45 ngày ở nhiệt độ $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

Kết quả của thử nghiệm sữa chua được trình bày trong Fig. 1, cho thấy là *P. brevicompactum* (M1), *P. commune* (M6), *A. versicolor* (M7) và *P. crustosum* (M10) phát triển tốt trên sữa chua làm từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động YF-L901 (hàng trên cùng) hoặc bằng chủng khởi động và chủng HOLDBAC™ YM-B (hàng giữa). Ngược lại, khi *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 có mặt trong sữa lên men (hàng cuối cùng) sự sinh trưởng của tất cả nấm mốc được thử nghiệm bị ức chế.

Ví dụ 2: Xác định định lượng về tác dụng ức chế của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 đối với *Debaryomyces hansenii*.

Để kiểm tra về mặt định lượng tác dụng ức chế của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 trên *D. hansenii*, sữa chua được làm như sau:

Sữa đã đồng nhất hoá (1,5% chất béo) được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ $95^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong thời gian 5 phút trong các chai có dung tích 1 lít trong bể nước. Làm nguội ngay sữa. Mỗi chai được cấy chủng khởi động thương mại (F-DVS YF-L901 nhận được từ Chr. Hansen A/S, Denmark) với lượng 0,02%. Sữa này được cấy tiếp bằng HOLDBAC™ YM-B (20 DCU/100L) hoặc HOLDBAC™ YM-C (10

DCU/100L) hoặc *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 CFU/g) và một chai được sử dụng làm đối chứng và chỉ được cấy bằng chủng khởi động.

Lên men sữa này ở nhiệt độ $43^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ cho đến khi đạt được độ pH bằng $4,60 \pm 0,05$. Sữa chua thu được được rót vào các cốc (vào khoảng 75 ml) và được bảo quản ở nhiệt độ $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Ngày sau khi chế biến sữa chua, các cốc được cấy lặp lại hai lần 0,75 ml/cốc nấm men đến mức đích 20 CFU/g. Nấm men này được phân tán đều trong sữa chua. Các cốc được bảo quản trong điều kiện có nắp đậy ở nhiệt độ $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ và được phân tích ở khoảng thời gian thích hợp về mức nhiễm tạp *D. hansenii* bằng cách cấy 1 ml sữa chua và các pha loãng 1 lần thích hợp nữa được thực hiện trong pepton muối trên thạch Nấm men Glucoza Chloramphenicol (Yeast Glucose Chloramphenicol: YGC) tiếp đó là ủ trong điều kiện ưa khí trong thời gian 5 ngày ở nhiệt độ 25°C .

Như được minh hoạ trên Fig. 2, sự sinh trưởng của *D. hansenii* bị ức chế khi có mặt chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 khi được cấy cùng với chủng khởi động YF-L901 trước khi lên men. Chủng này có tác dụng ức chế cao hơn đáng kể chủng thương mại, HOLDBAC™ YM-B và HOLDBAC™ YM-C.

Ví dụ 3: Xác định bán định lượng tác dụng ức chế của *Lb. paracasei* CHCC14676 và *Lb. rhamnosus* CHCC5366 đơn lẻ và dùng kết hợp đối với nấm mốc tạp khác nhau.

Để kiểm tra bán định lượng *Lb. paracasei* CHCC14676 và *Lb. rhamnosus* CHCC5366 dùng đơn lẻ và kết hợp, sử dụng thử nghiệm trên thạch, giống quy trình sản xuất và sản phẩm sữa chua:

Sữa đã đồng nhất hoá (1,5% chất béo khối lượng/thể tích) được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ 95°C trong thời gian năm phút và được làm lạnh ngay. Chủng khởi động thương mại (F-DVS YC-350 nhận được từ Chr. Hansen A/S, Denmark) được cấy

với lượng 0,02%, và chia sữa vào các bình 220 ml. Các bình này được cấy tiếp lần lượt *Lb. paracasei* CHCC14676, *Lb. rhamnosus* CHCC5366 và tổ hợp của hai chủng này, với tổng nồng độ 1×10^7 CFU/ml. Một chai mà không được cấy thêm ngoài chủng khởi động được sử dụng làm mẫu đối chứng. Ngoài ra, 5% chất chỉ thị pH là bromcresol tím (bromcresol purple) và bromcresol xanh (bromcresol green) được cho vào tất cả các chai để có biểu thị của tốc độ axit hóa, và để thu được môi trường màu xanh/xanh lá cây để làm cho sự sinh trưởng sau đó của nấm men và nấm mốc đích được phát hiện dễ dàng hơn. Tất cả các chai được ủ trong bể nước ở nhiệt độ $43 \pm 1^\circ\text{C}$ và được lên men ở các điều kiện này cho đến khi đạt được độ pH bằng $4,60 \pm 0,1$. Sau khi lên men, các bình này được làm lạnh ngay trên đá và được lắc mạnh để phá vỡ khối đông tụ. Sau đó, sữa đã lên men này được làm ấm tới nhiệt độ 40°C và được cho vào 40 ml dung dịch thạch vô trùng 5% đã được làm nóng chảy và làm lạnh xuống nhiệt độ 60°C . Sau đó, dung dịch này được rót vào các hộp Petri vô trùng và các đĩa này được làm khô trên ghế LAF trong thời gian 30 phút.

Huyền phù bào tử ở giai đoạn phát triển nhanh hoàn toàn trong các dung dịch pha loãng thích hợp của nấm mốc lựa chọn *Penicillium nalgiovense* (10x), *Penicillium commune* (100x), *Aspergillus versicolor* (100x) và *Penicillium crustosum* (100x) được chấm trên các đĩa này. Các đĩa này được ủ ở nhiệt độ 7°C và được kiểm tra về sự sinh trưởng của nấm mốc ở các khoảng thời gian đều đặn thích hợp.

Các kết quả của thử nghiệm trên thạch được trình bày trên Fig. 3, cho thấy là tất cả các nấm mốc được thử nghiệm phát triển rất tốt trên các đĩa thạch từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động (đối chứng). Tuy nhiên, khi *Lb. paracasei* CHCC14676 hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC5366 có mặt trong sữa lên men, các đĩa thu được đã giảm mạnh sự sinh trưởng của tất cả các loại nấm mốc. Ngoài ra, khi *Lb. paracasei* CHCC14676 và *Lb. rhamnosus* CHCC5366 cùng kết hợp có mặt trong sữa lên men, thì phát hiện được tác dụng ức chế thậm chí còn mạnh hơn với *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* và *Penicillium crustosum* được chấm trên các đĩa này.

Ví dụ 4: Nghiên cứu gây cảm nhiễm bằng *Lb. rhamnosus* CHCC5366 và kali sorbat.

Sữa được tiệt trùng chứa 0,17% chất béo được sử dụng để tạo ra ba mẻ sữa chua khác nhau bằng cách sử dụng chủng khởi động thương mại được nêu trong ở Ví dụ 1. Chủng khởi động được cấy ở lượng 0,013%. Trước khi lên men, cho kali sorbat (0,023%) vào mẻ thứ nhất, *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 CFU/g) được cho vào mẻ thứ hai, còn mẻ thứ ba được sử dụng làm đối chứng chỉ chứa chủng khởi động. Quá trình lên men được thực hiện ở nhiệt độ 43°C cho đến khi đạt được đến độ pH 4,55. Sau khi đạt đến độ pH 4,55, sữa chua được bảo quản ở nhiệt độ 7°C.

Ba loại sữa chua khác nhau được cho vào các cốc nhỏ có khoảng 100 g trong mỗi cốc và bề mặt được cấy bằng mỗi trong số các nấm mốc sau được phân lập từ trước từ các sản phẩm sữa được lên men hỏng để đạt được nồng độ cấy đích vào khoảng 1000 bào tử/cốc:

Penicillium solitum,

Penicillium palitans,

Penicillium discolor,

Penicillium spathulatum,

Penicillium commune,

Penicillium crustosum,

Penicillium paneum,

Penicillium roqueforti,

Các sữa chua này được ủ ở nhiệt độ 7°C trong thời gian 60 ngày, và sự sinh trưởng mạnh của các nấm mốc khác nhau được theo dõi bằng mắt bằng cách chụp ảnh vào cuối thời gian 60 ngày.

Các kết quả thể hiện trên Fig. 4 cho thấy là sự có mặt của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 làm giảm rõ rệt sự phát triển nhanh và sự tạo thành màu xanh lá cây/xanh da trời đặc trưng của các nấm mốc khác nhau trong sữa chua trong thời gian bảo quản 60 ngày ở nhiệt độ 7°C. Tác dụng ức chế của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 đến quy mô sự phát triển nhanh và sự tạo màu của nấm mốc được nhận thấy là mạnh hơn đáng kể tác dụng thu được khi thêm 0,023% kali sorbat.

Ví dụ 5: Nghiên cứu gây cảm nhiễm trên sữa chua Hy Lạp có kết hợp *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Để theo dõi bằng mắt tác dụng ức chế của tổ hợp *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 đối với *Mucor* ssp. Sữa chua Hy Lạp được làm về cơ bản như sau:

Cấy sữa tiệt trùng có hàm lượng 1,5% chất béo chủng khởi động thương mại (F-DVS YF-L901 nhận được từ Chr. Hansen A/S, Denmark) với lượng 0,02%. Một mẻ chỉ được cấy bằng chủng khởi động được sử dụng làm mẫu đối chứng. Một mẻ nữa được cấy tiếp bằng tổ hợp của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 CFU/g) và chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 CFU/g).

Lên men sữa này ở nhiệt độ $43^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ đến độ pH cuối bằng 4,55 (6-7 giờ). Sau đó, sữa chua được làm nguội xuống nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ với áp suất hút 2 bar và được bảo quản ở nhiệt độ $6^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Một ngày sau khi làm sữa chua, cấy *Mucor* ssp. là tạp khuẩn bề mặt trong hai cốc sữa chua giống nhau bằng cách đưa một vết cấy trên bề mặt của sữa chua với nồng

độ cấy đích 100 bào tử/đốm. Sự sinh trưởng của nấm mốc được đánh giá bằng mắt sau khi bảo quản trong thời gian 15 ngày ở nhiệt độ $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Các kết quả của thử nghiệm sữa chua Hy Lạp được trình bày trong Fig. 5, cho thấy là *Mucor* ssp. phát triển tốt trên sữa chua làm từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động (cốc bên trái). Ngược lại, khi *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 có mặt trong sữa lên men (cốc bên phải) sự sinh trưởng của *Mucor* ssp. bị ức chế.

Ví dụ 6: Nghiên cứu gây cảm nhiễm thứ cấp trên sữa chua Hy Lạp có tổ hợp của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Để theo dõi bằng mắt tác dụng ức chế của tổ hợp giữa *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 trên nấm mốc bánh mỳ đen *Rhizopus stolonifer*, sữa chua Hy Lạp được làm về cơ bản như sau:

Sữa tiệt trùng có 1,5% chất béo được cấy chủng khởi động thương mại (F-DVS YF-L901 nhận được từ Chr. Hansen A/S, Denmark) với lượng 0,02%. Sữa này được cấy tiếp bằng HOLDBACTM YM-B (10 DCU/100 l), bằng chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 CFU/g), hoặc bằng tổ hợp của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 CFU/g) và chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 CFU/g). Một mẻ được dùng làm đối chứng và chỉ được cấy bằng chủng khởi động.

Lên men sữa này ở nhiệt độ $43^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ đến độ pH cuối 4,55 (6-7 giờ). Sau đó, sữa chua được làm nguội xuống nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ với áp suất hút 2 bars và được bảo quản ở nhiệt độ $6^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Một ngày sau khi làm sữa chua, *Rhizopus stolonifer* được cấy làm tạp khuẩn bề mặt trong hai cốc sữa chua giống nhau bằng cách đưa một vết cấy trên bề mặt của

sữa chua với mức nhiễm tạp đích 100 bào tử/đốm. Sự sinh trưởng của nấm mốc đánh giá bằng mắt sau thời gian bảo quản 42 ngày ở nhiệt độ $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Kết quả của thử nghiệm sữa chua Hy Lạp được trình bày ở Fig. 6, cho thấy là *Rhizopus stolonifer* phát triển tốt trên sữa chua làm từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động ("R", tức là đối chứng) hoặc bằng chủng khởi động và chủng HOLDBAC™ YM-B (YM-B). Tuy nhiên, khi có mặt *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366), sự sinh trưởng của *Rhizopus stolonifer* bị ức chế đáng kể. Khi cả hai chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 có mặt trong quá trình lên men sữa (5366+14676) sự sinh trưởng của *Rhizopus stolonifer* bị ức chế gần như hoàn toàn.

Ví dụ 7: Nghiên cứu gây cảm nhiễm trên pho mát trắng ngâm muối (white brine cheese) bằng tổ hợp của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Để kiểm tra về mặt định lượng tác dụng ức chế của tổ hợp *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 với *Saccharomyces cerevisiae*, làm pho mát trắng ngâm muối như sau:

Sữa được tiệt trùng và chuẩn hóa được cấy chủng khởi động thương mại (FD-DVS SafeIT-1 nhận được từ Chr. Hansen A/S, Denmark) với lượng 40 U cho 1000 l sữa. Sữa này được cấy tiếp bằng HOLDBAC™ YM-B (10 DCU/100 l) hoặc tổ hợp của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 CFU/g) và chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 CFU/g). Một mẻ được dùng làm đối chứng và chỉ được cấy bằng chủng khởi động. Sữa này được xử lý bằng rennet ở nhiệt độ $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ bằng cách sử dụng Chy-Max plus (nhận được từ Chr. Hansen A/S, Denmark) với 220 ml cho 1000 l trong thời gian 90 phút trước khi cắt. Ở độ pH 6,0 cục vón được bơm vào nấm mốc và được để tách nước đến độ pH cuối 4,8-4,7 (20-24 giờ). Pho mát được cho vào lon có nước muối lạnh (8%) và được bảo quản ở nhiệt độ $5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Một ngày sau khi làm pho mát trắng ngâm muối, các lon này được cấy lặp lại hai lần nấm men đến mức đích 20 CFU/ml. Nấm men này được phân tán đều trong nước muối. Các cốc được bảo quản trong điều kiện có nắp đậy ở nhiệt độ $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian lên đến 40 ngày và 10 g được phân tích ở khoảng thời gian thích hợp về mức nhiễm tạp *Saccharomyces cerevisiae* bằng cách cấy các dung dịch pha loãng 1 lần thích hợp trong nước muối pepton trên thạch nấm men glucoza chloramphenicol (YGC) tiếp đó là ủ trong điều kiện ưa khí trong thời gian 5 ngày ở nhiệt độ 25°C .

Như được minh hoạ trên Fig. 7, sự sinh trưởng của *Saccharomyces cerevisiae* bị ức chế khi có mặt kết hợp *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 khi được cấy cùng với chủng khởi động SafeIT-1. Các chủng này gây tác dụng ức chế cao hơn đáng kể so với các chủng có trên thị trường, HOLDBACTM YM-B.

Ví dụ 8: Nghiên cứu gây cảm nhiễm thứ hai trên pho mát trắng ngâm muối bằng tổ hợp của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Để kiểm tra về mặt định lượng tác dụng ức chế của tổ hợp *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 đối với *Kluyveromyces marxianus*, pho mát trắng ngâm muối được làm như mô tả ở Ví dụ 1, chỉ khác là các lon này được cấy *Kluyveromyces marxianus* làm nấm men tạp.

Như được minh hoạ trên Fig. 8, sự sinh trưởng của *Kluyveromyces marxianus* bị ức chế khi có mặt kết hợp *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 khi được cấy cùng với chủng khởi động SafeIT-1. Các chủng này tạo ra tác dụng ức chế cao hơn đáng kể chủng có trên thị trường HOLDBACTM YM-B.

Ví dụ 9: Nghiên cứu gây cảm nhiễm thứ ba trên pho mát trắng ngâm muối bằng tổ hợp của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Để theo dõi bằng mắt tác dụng ức chế của tổ hợp *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 đối với *P. commune*, pho mát trắng ngâm muối được làm như mô tả ở Ví dụ 1.

7 ngày sau khi làm pho mát trắng ngâm muối, pho mát này được lấy ra khỏi nước muối và cấy *P. commune* làm tạp khuẩn bề mặt trên pho mát lặp lại hai lần với ba đốm cấy trên bề mặt của pho mát với lượng đích 100 bào tử/đốm. Sự sinh trưởng của hai thể phân lập *P. Commune* khác nhau được đánh giá bằng mắt sau thời gian bảo quản 12 ngày ở nhiệt độ $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ và, sau đó, trong thời gian 16 ngày ở nhiệt độ $12^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$

Kết quả của mẫu thử nghiệm ngâm muối trắng được trình bày trên Fig. 9 cho thấy là hai thể phân lập *P. commune* phát triển tốt trên pho mát trắng ngâm muối được làm từ sữa được cấy chỉ bằng chủng khởi động (bên trái). Ngược lại, khi *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 có mặt trong quá trình sản xuất pho mát (bên phải) sự sinh trưởng của *P. commune* bị ức chế mạnh.

Ví dụ 10: Nghiên cứu gây cảm nhiễm trên pho mát trắng ngâm muối (white brine cheese) bằng *Lactobacillus paracasei* CHCC5366

Để theo dõi bằng mắt tác dụng ức chế của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 đối với *P. crustosum*, pho mát trắng ngâm muối được làm như sau:

Sữa tiêu chuẩn tiệt trùng được cấy chủng khởi động thương mại (FD-DVS SafeIT-1 nhận được từ Chr. Hansen A/S, Denmark) với lượng 40 U cho 1000 l sữa. Sữa này được cấy tiếp bằng HOLDBACTM YM-B (10 DCU/100 l) hoặc chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 CFU/g). Một mẻ được dùng làm đối

chứng và chỉ được cấy bằng chủng khởi động. Sữa được xử lý bằng rennet ở nhiệt độ $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ bằng cách sử dụng Chy-Max plus (nhận được từ Chr. Hansen A/S, Denmark) với lượng 220 ml cho 1000 l trong thời gian 90 phút trước khi cắt. Ở độ pH 6,0 cục vón được bơm vào nắm mốc và được để tách nước đến độ pH cuối bằng 4,8-4,7 (20-24 giờ). Pho mát được cho vào lon có nước muối lạnh (8%) và được bảo quản ở nhiệt độ $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

7 ngày sau khi làm pho mát trắng ngâm muối, pho mát được lấy ra khỏi nước muối và *P. crustosum* được cấy làm tạp khuẩn bề mặt trên hai mẫu pho mát bằng ba đốm cấy trên bề mặt pho mát với lượng đích 100 bào tử/đốm. Sự sinh trưởng của thể phân lập *P. crustosum* đánh giá bằng mắt sau thời gian bảo quản 11 ngày ở nhiệt độ $12^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, và, sau đó 16 ngày ở nhiệt độ $12^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Kết quả của mẫu thử trắng ngâm muối được trình bày trên Fig. 10 cho thấy là thể phân lập *P. crustosum* phát triển tốt trên pho mát trắng ngâm muối làm từ sữa được cấy chỉ bằng chủng khởi động (bên trái). Ngược lại, khi có mặt *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 trong quá trình sản xuất pho mát (bên phải) sự sinh trưởng của *P. crustosum* bị ức chế.

Ví dụ 11: Nghiên cứu gây cảm nhiễm trên sữa chua bằng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và CHCC14676 đối với *Penicillium paneum*

Để theo dõi bằng mắt tác dụng ức chế của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 ở dạng đơn lẻ hoặc kết hợp với *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 đến nắm mốc *P. paneum*, sữa chua có 1,5% chất béo được làm như sau:

Sữa đã đồng nhất hoá (1,5% chất béo) được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 5 phút trong các chai có dung tích 1 lít trong bể nước và được làm lạnh ngay. Chủng khởi động thương mại (F-DVS YF-L901 nhận được từ Chr. Hansen A/S, Denmark) được cấy với lượng 0,02%. Sữa này được cấy tiếp bằng HOLDBAC™ YM-B (20DCU/100L), với *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366

(1×10^7 CFU/ml) đơn lẻ, hoặc với tổ hợp của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 CFU/ml) và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 CFU/ml). Một chai được dùng làm đối chứng và chỉ được cấy bằng chủng khởi động.

Lên men sữa này ở nhiệt độ $43^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ cho đến khi đạt độ pH $4,60 \pm 0,1$. Rót sữa chua thu được vào các cốc (100 g) và bảo quản ở nhiệt độ $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Một ngày sau khi làm sữa chua, các nấm mốc khác nhau được cấy làm tạp khuẩn trên bề mặt trong hai cốc sữa chua giống nhau bằng một vết cấy trên bề mặt của sữa chua với lượng đích 100 bào tử/đốm. Sự sinh trưởng của nấm mốc được đánh giá bằng mắt sau thời gian bảo quản 28 ngày ở nhiệt độ $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

Kết quả của thử nghiệm sữa chua được trình bày trên Fig. 11 cho thấy là *P. paneum* phát triển tốt trên sữa chua làm từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động YF-L901 hoặc bằng chủng khởi động và chủng HOLDBAC™ YM-B. Ngược lại, khi *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 có mặt trong quá trình lên men sữa, sự sinh trưởng của *P. paneum* bị giảm mạnh, và kết hợp giữa *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 còn gây ức chế *P. Paneum* mạnh hơn nữa.

Ví dụ 12: Nghiên cứu gây cảm nhiễm trên sữa chua bằng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và CHCC14676 ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau

Để theo dõi bằng mắt tác dụng ức chế của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 ở dạng đơn lẻ hoặc kết hợp với *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 lên nấm mốc *P. crustosum* ở nhiệt độ bảo quản khác nhau, sữa chua có 1,5% chất béo được làm:

Sữa đã đồng nhất hoá (1,5% chất béo) được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ $95^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong thời gian 5 phút trong các chai có dung tích 1 lít trong bể nước và được làm lạnh ngay. Chủng khởi động thương mại (F-DVS YF-L901 nhận được từ

Chr. Hansen A/S, Denmark) được cấy với lượng 0,02%. Sữa này được cấy tiếp bằng HOLDBAC™ YM-B (20 DCU/100L), bằng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 CFU/ml) đơn lẻ, hoặc bằng tổ hợp của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 CFU/ml) và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 CFU/ml). Một chai được dùng làm đối chứng và chỉ được cấy bằng chủng khởi động.

Lên men sữa này ở nhiệt độ $43^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ cho đến độ pH $4,60 \pm 0,1$. Sữa chua thu được được rót vào các cốc (100 g) và được bảo quản ở nhiệt độ $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Một ngày sau khi làm sữa chua, cấy *Penicillium crustosum* làm tạp khuẩn bề mặt trong hai cốc sữa chua giống nhau bằng một vết cấy trên bề mặt của sữa chua với lượng đích 100 bào tử/đốm. Sự sinh trưởng của nấm mốc được đánh giá bằng mắt sau khi bảo quản trong thời gian 36 ngày ở nhiệt độ $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $12^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ hoặc $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Kết quả của thử nghiệm sữa chua được trình bày trên Fig. 12 cho thấy là *P. crustosum* phát triển tốt trên sữa chua làm từ sữa được lên men chỉ bằng chủng khởi động YF-L901 hoặc bằng chủng khởi động và chủng HOLDBAC™ YM-B ở tất cả các nhiệt độ bảo quản. Ngược lại, khi *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 ở dạng đơn lẻ hoặc kết hợp với *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 có mặt trong sữa lên men, sự sinh trưởng của *P. crustosum* bị ngăn cản hoàn toàn khi bảo quản ở cả nhiệt độ $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ và $12^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong thời gian 36 ngày. Khi bảo quản ở nhiệt độ $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ sự sinh trưởng của *P. crustosum* bị giảm mạnh khi có mặt *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và thậm chí mạnh hơn khi có mặt tổ hợp của *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Nộp lưu và giải pháp người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này

Người nộp đơn yêu cầu rằng các mẫu vi sinh vật được lưu giữ được nêu sau đây chỉ được bộc lộ cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chỉ đến khi bằng sáng chế được cấp.

Chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu giữ là ngày 14/10/2009 tại Cơ quan lưu giữ giống cây vi sinh vật và tế bào của Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig và có số hiệu lưu giữ: DSM23035.

Chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 được lưu giữ ngày 15/03/2011 tại Cơ quan lưu giữ giống cây vi sinh vật và tế bào của Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig và có số hiệu lưu giữ: DSM24651.

Chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 được lưu giữ ngày 02/02/2012 tại Cơ quan lưu giữ giống cây vi sinh vật và tế bào của Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig và có số hiệu lưu giữ: DSM25612.

Việc lưu giữ được thực hiện theo hiệp ước Budapest về công nhận quốc tế nộp lưu vi sinh vật cho mục đích đăng ký và bảo hộ patent.

Tài liệu tham khảo

EP0221499

EP0576780

EP1442113

US5,378,458

EP11161609.0

Kosikowski, F.V. and Mistry, V.V., "Cheese and Fermented Milk Foods", 1997, 3rd Ed. F.V. Kosikowski, L.L.C. Westport, CT

Yêu cầu bảo hộ

1. Chủng *Lactobacillus rhamnosus* được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu giữ tại Cơ quan lưu giữ giống cây vi sinh vật và tế bào của Đức (DSMZ) có số hiệu lưu giữ DSM23035 và các chủng đột biến thu được từ chủng này, trong đó các chủng đột biến này có đặc tính chống nấm về cơ bản tương tự hoặc được cải thiện như chủng được nộp lưu có số hiệu lưu giữ DSM23035.
2. Chế phẩm chống nấm chứa ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo điểm 1.
3. Chế phẩm chống nấm chứa ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo điểm 2, trong đó chế phẩm này còn chứa ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei*.
4. Chế phẩm chống nấm theo điểm 3, trong đó ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 có số hiệu lưu giữ DSM24651 và *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 có số hiệu lưu giữ DSM25612 và các chủng đột biến thu được từ chủng này, trong đó các chủng đột biến này có đặc tính chống nấm về cơ bản tương tự hoặc được cải thiện như một trong số các chủng được nộp lưu có số hiệu lưu giữ là DSM24651 hoặc DSM25612.
5. Sản phẩm thực phẩm chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo điểm 1.
6. Sản phẩm thực phẩm chứa chế phẩm chống nấm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4.
7. Thức ăn gia súc chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo điểm 1.
8. Thức ăn gia súc chứa chế phẩm chống nấm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4.

9. Dược phẩm chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo điểm 1.
10. Dược phẩm chứa chế phẩm chống nấm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4.
11. Sản phẩm thực phẩm theo điểm 5 hoặc 6, trong đó sản phẩm này chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo điểm 1 với lượng hữu hiệu mang lại đặc tính chống nấm cho sản phẩm thực phẩm.
12. Sản phẩm thực phẩm theo điểm 5 hoặc 6 hoặc 11, trong đó sản phẩm thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm quả và các sản phẩm thu được từ quả, rau và các sản phẩm từ rau, hạt cây trồng và các sản phẩm thu được từ hạt cây trồng, các sản phẩm sữa, thịt, gia cầm và hải sản và hỗn hợp của các sản phẩm này.
13. Sản phẩm thực phẩm theo điểm 12, trong đó sản phẩm thực phẩm này là sản phẩm sữa và sản phẩm sữa này là sản phẩm sữa lên men bằng vi sinh vật ưa ấm hoặc ưa nhiệt, như sữa chua.
14. Phương pháp sản xuất sản phẩm thực phẩm bao gồm bước bổ sung ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo điểm 1 vào sản phẩm thực phẩm trong quá trình sản xuất và không chế các thông số sản xuất trong quá trình sản xuất sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* là không đổi hoặc tăng lên.
15. Phương pháp sản xuất sản phẩm thực phẩm bao gồm bước bổ sung chế phẩm chống nấm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4 vào sản phẩm thực phẩm trong quá trình sản xuất và không chế các thông số sản xuất trong quá trình sản xuất sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* là không đổi hoặc tăng lên.

16. Phương pháp sản xuất thức ăn gia súc bao gồm bước bổ sung ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo điểm 1 vào thức ăn gia súc trong quá trình sản xuất và không chế các thông số sản xuất trong quá trình sản xuất sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* là không đổi hoặc tăng lên.

17. Phương pháp sản xuất thức ăn gia súc bao gồm bước bổ sung chế phẩm chống nấm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4 vào thức ăn gia súc trong quá trình sản xuất và không chế các thông số sản xuất trong quá trình sản xuất sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* là không đổi hoặc tăng lên.

18. Phương pháp sản xuất dược phẩm bao gồm bước bổ sung ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* theo điểm 1 vào dược phẩm trong quá trình sản xuất và không chế các thông số sản xuất trong quá trình sản xuất sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* là không đổi hoặc tăng lên.

19. Phương pháp sản xuất dược phẩm bao gồm bước bổ sung chế phẩm chống nấm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4 vào dược phẩm trong quá trình sản xuất và không chế các thông số sản xuất trong quá trình sản xuất sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* là không đổi hoặc tăng lên.

20. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 19, trong đó nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* là ít nhất là 1×10^6 cfu/g hoặc mỗi chủng ít nhất là 1×10^6 cfu/ml sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm, hoặc ít nhất là 1×10^5 cfu/cm² bề mặt của sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm.

21. Phương pháp theo điểm 15, 17 hoặc 19, bao gồm bước:

(a) bổ sung chế phẩm chống nấm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4 trong quá trình sản xuất sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và/hoặc ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* mỗi chủng ít nhất là 1×10^6 cfu/g hoặc ít nhất là 1×10^6 cfu/ml sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm, hoặc ít nhất là 1×10^5 cfu/cm² bề mặt của sản phẩm thực phẩm, thức ăn gia súc hoặc dược phẩm, và

(b) không chế các thông số sản xuất trong quá trình sản xuất sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và/hoặc ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* tăng lên hoặc là không đổi.

22. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 21, trong đó phương pháp này bao gồm một hoặc nhiều bước lên men.

23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó phương pháp này bao gồm bước lên men cơ chất sữa bằng chủng khởi động bao gồm ít nhất một chủng của giống được chọn từ *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* và *Leuconostoc*.

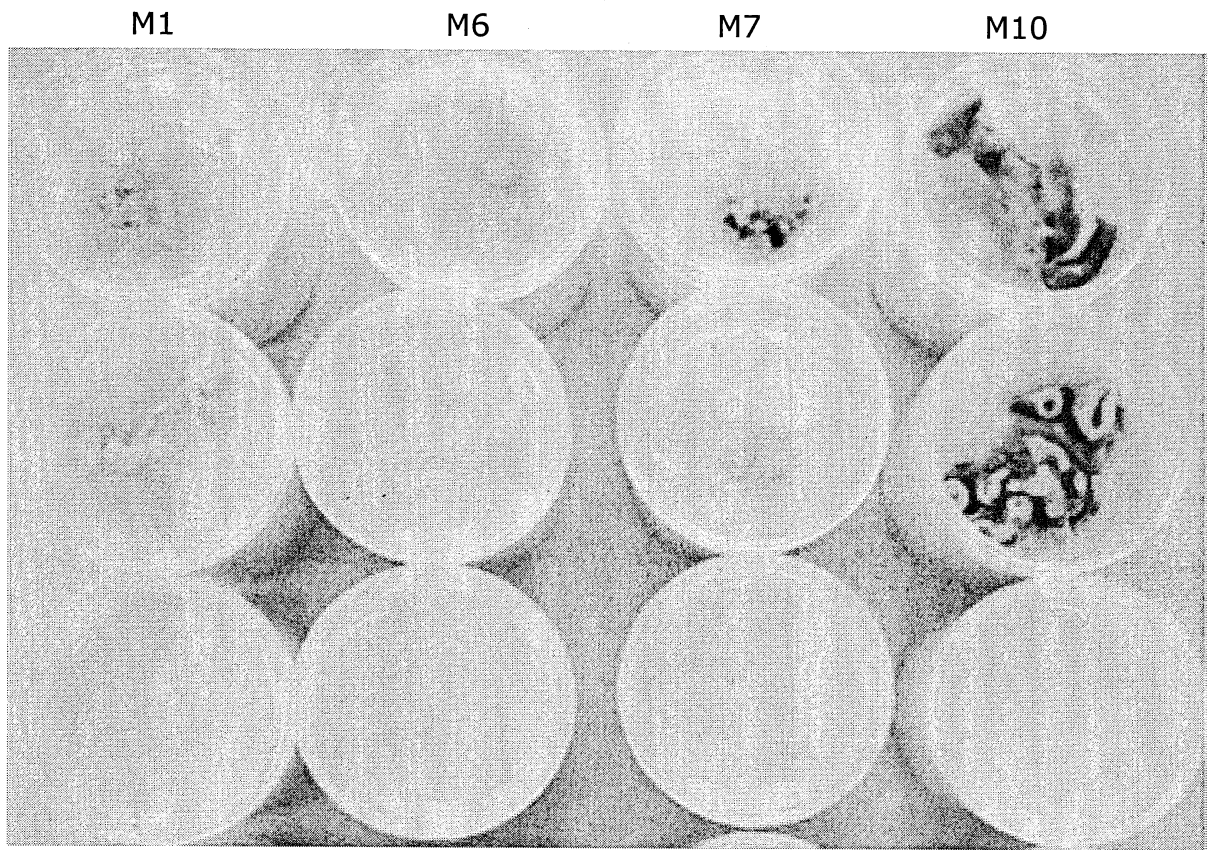


Fig. 1

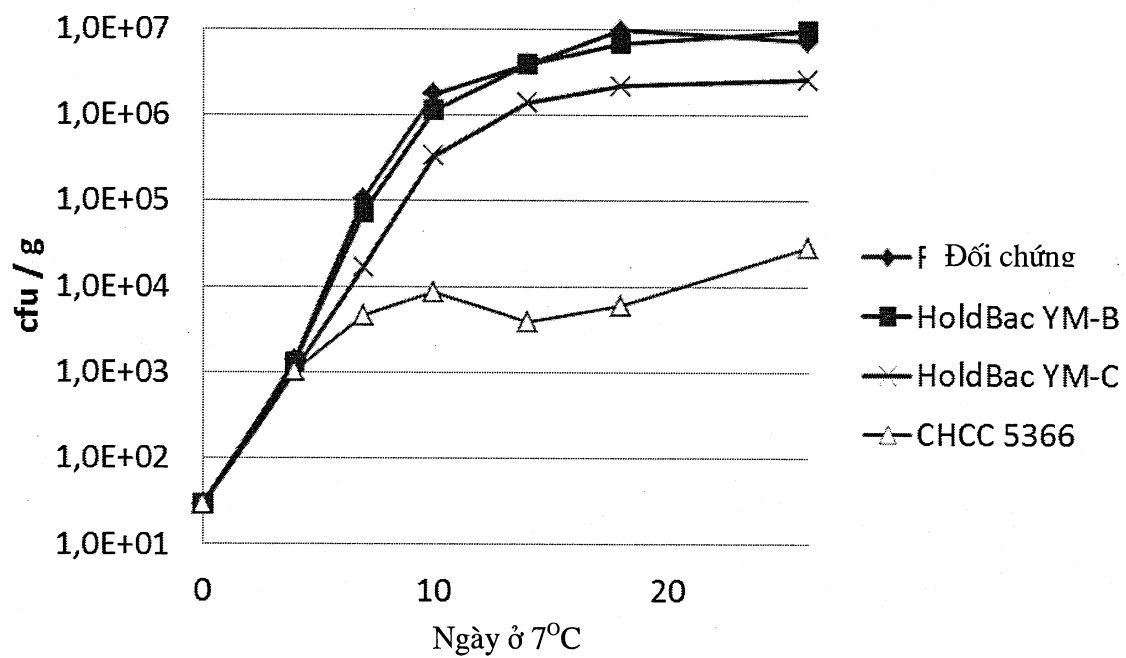


Fig. 2

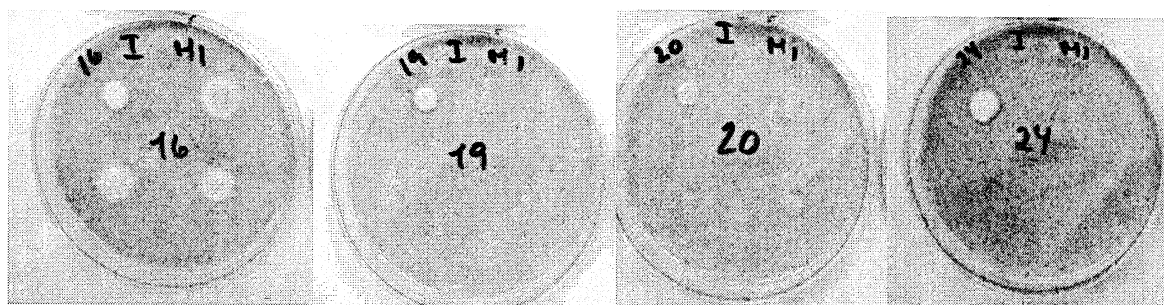
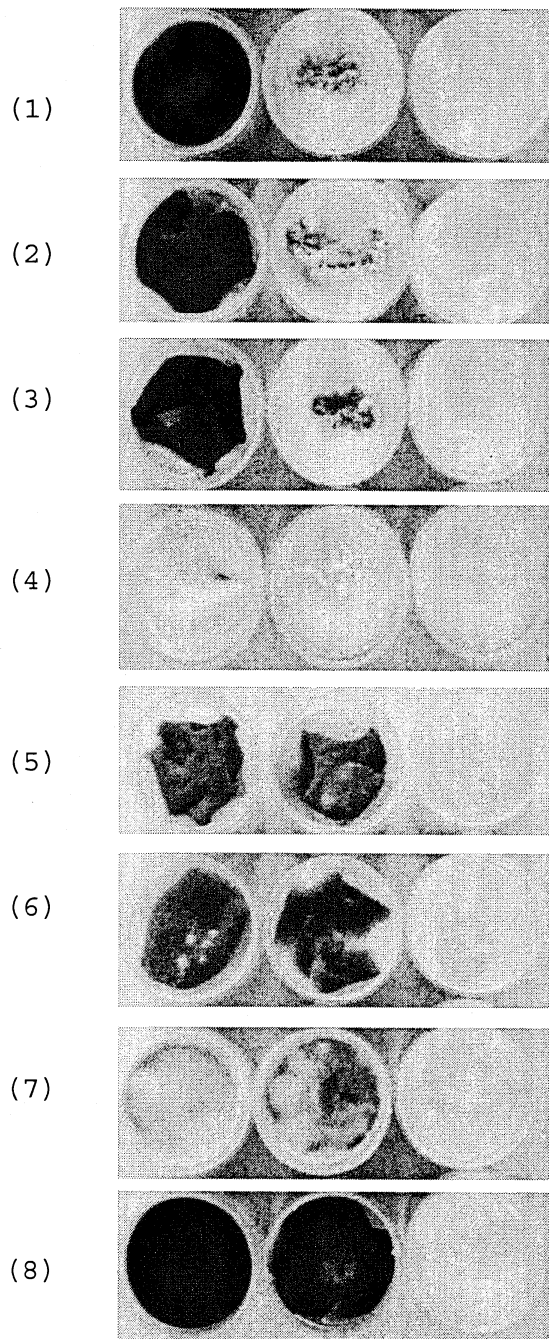


Fig. 3

**Fig. 4**

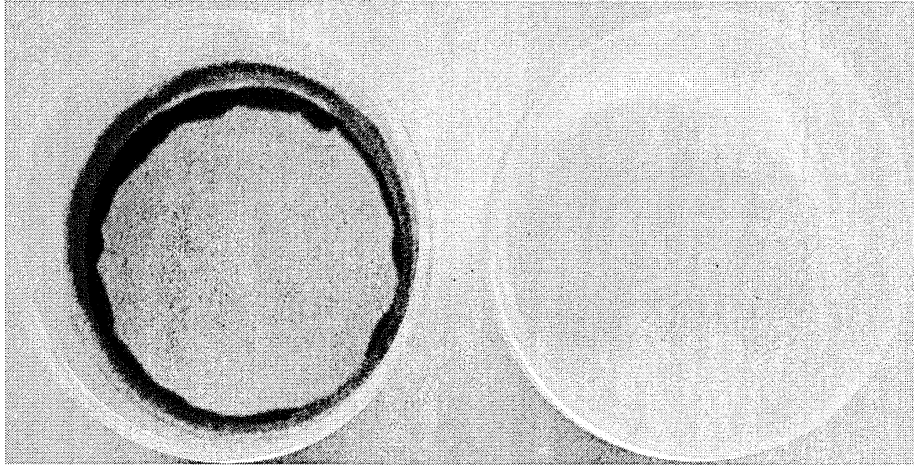


Fig. 5

R

YM-B

5366

5366+14676

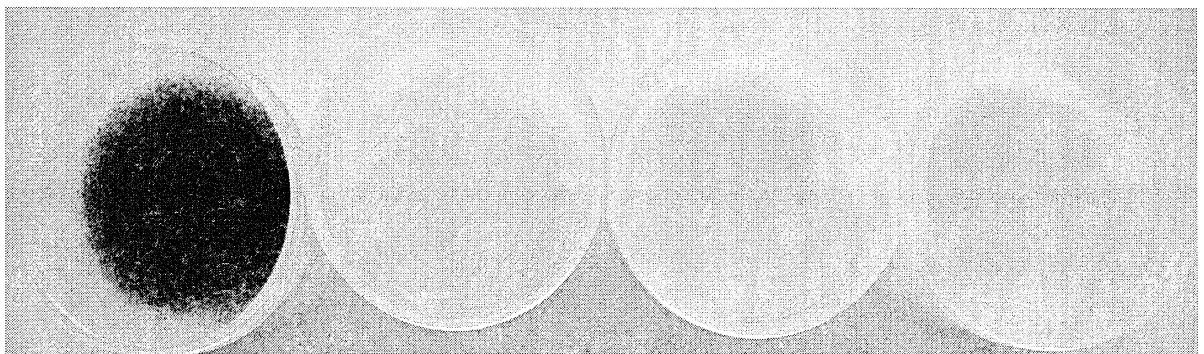


Fig. 6

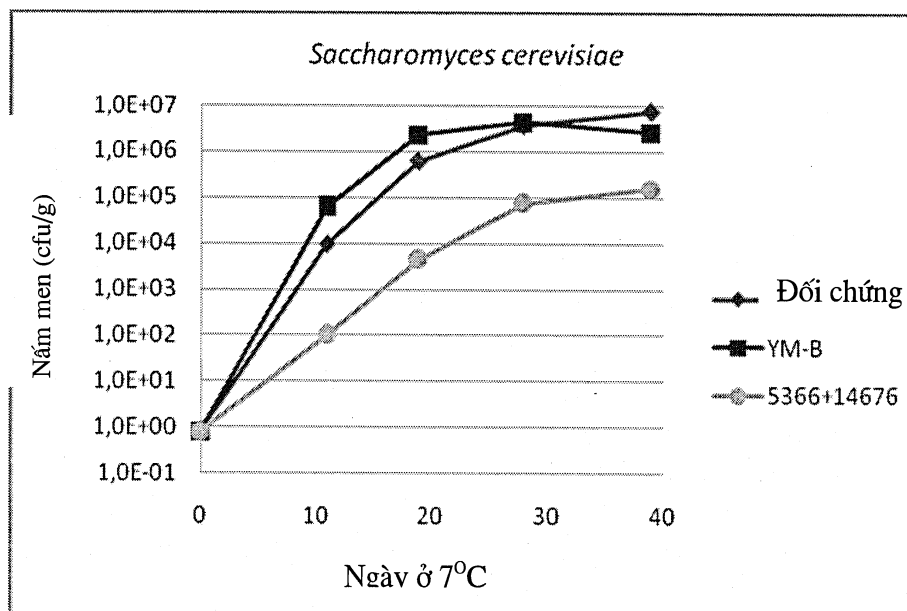


Fig. 7

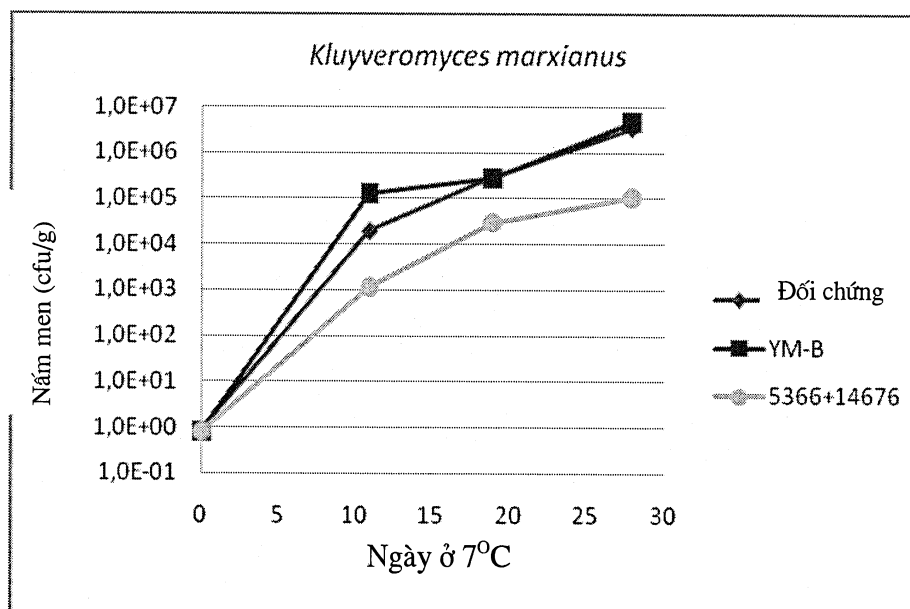


Fig. 8

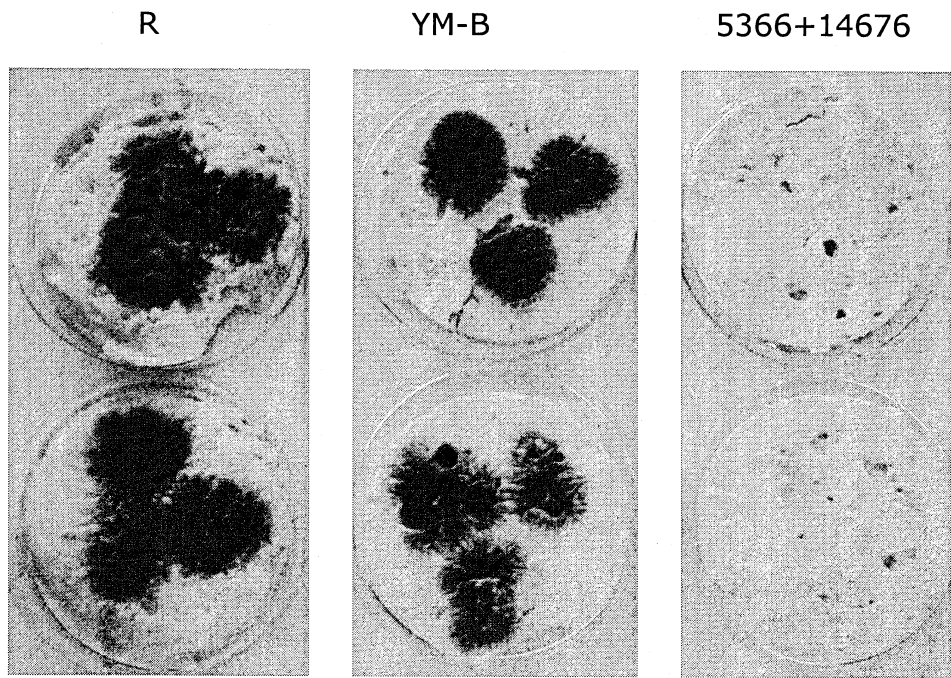


Fig. 9

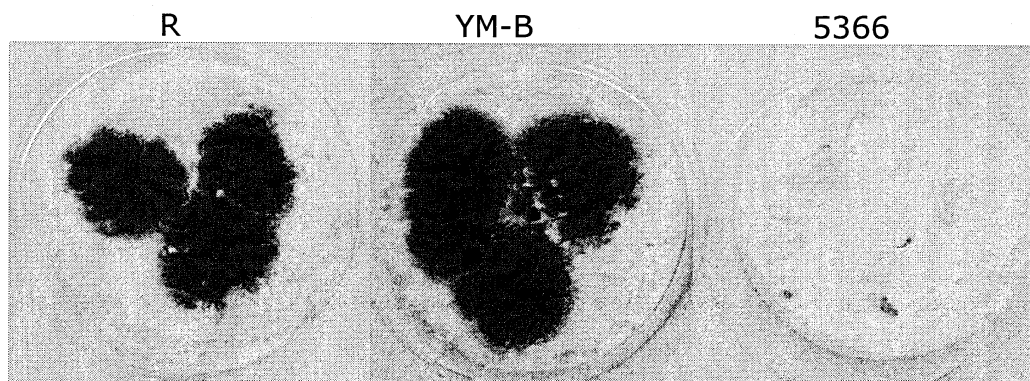


Fig. 10

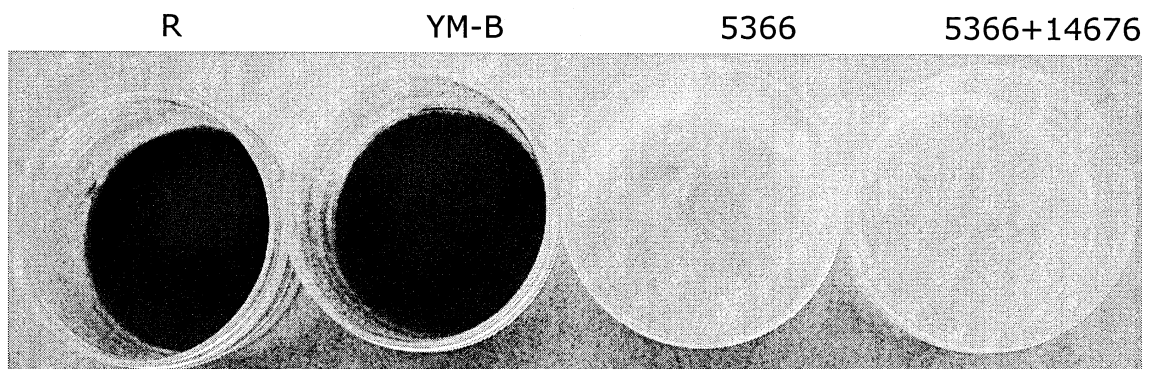


Fig. 11

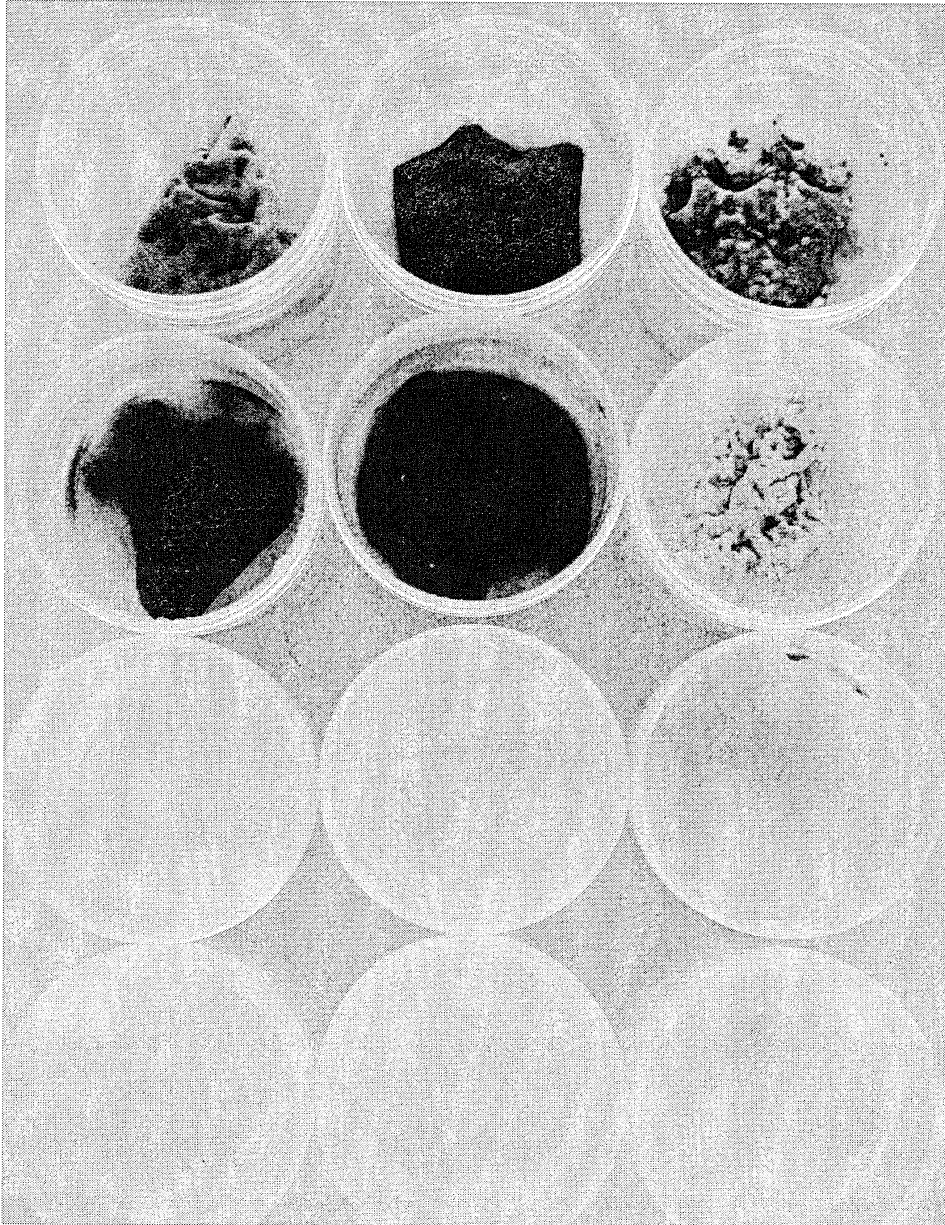


Fig. 12