



(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)



1-0026574

(51)⁷ C12N 1/20; A23C 9/127; C12R 1/46;
C12N 15/01; C12R 1/225; A23C 9/123

(13) B

(21) 1-2013-00004

(22) 21/06/2011

(86) PCT/EP2011/060302 21/06/2011

(87) WO2011/161085 29/12/2011

(30) 10166614.7 21/06/2010 EP

(45) 25/12/2020 393

(43) 25/03/2013 300A

(73) CHR. HANSEN A/S (DK)

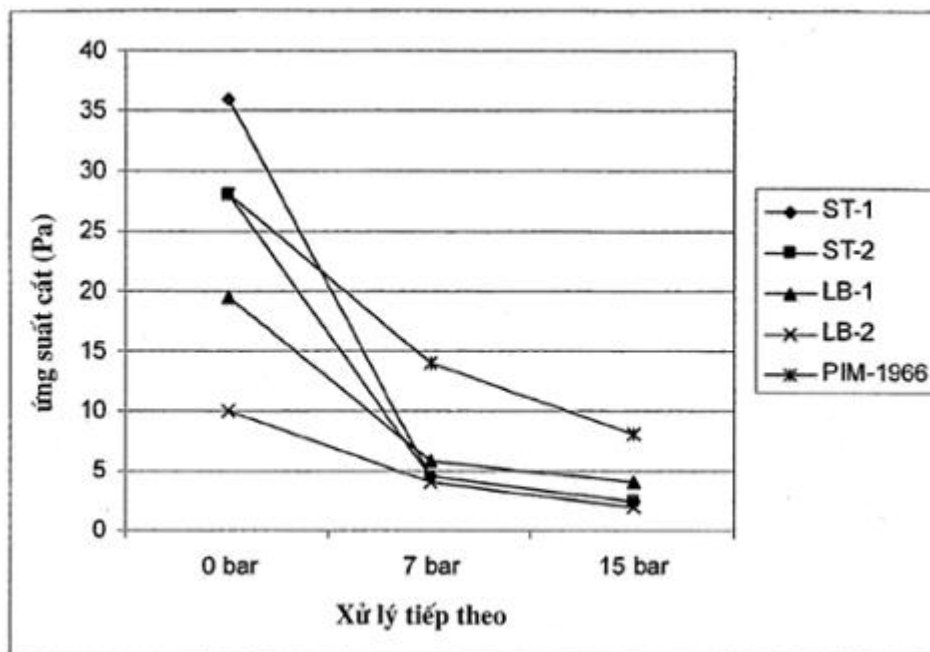
Boege Alle 10-12, DK-2970 Hoersholm, Denmark

(72) FOLKENBERG, Ditte Marie (DK); GILLELADEN, Christian (DK); GULDAGER, Helle Skov (DK).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHỦNG VI KHUẨN AXIT LACTIC DÙNG CHO SỮA CHUA, PHƯƠNG PHÁP CHẾ BIẾN SẢN PHẨM SỮA LÊN MEN SỬ DỤNG CHỦNG VI KHUẨN NÀY VÀ SẢN PHẨM SỮA LÊN MEN THU ĐƯỢC

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra chủng vi khuẩn axit lactic có khả năng tạo ra tính chịu cắt cơ học cao cho các sản phẩm được lên men bằng chủng này và chủng vi khuẩn có thể được tạo ra theo phương pháp này. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic tạo ra tính chịu cắt cơ học cao cho các sản phẩm được lên men bằng các chủng này hoặc thể đột biến và các biến dị của nó. Độ ổn định được cải thiện của cấu trúc này có thể được xác định qua sự giảm lắng cặn ở sữa chua uống và sự giảm đông đặc ở sữa chua truyền thống. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp chế biến sản phẩm sữa lên men, như sữa chua, bằng chủng vi khuẩn axit lactic này và sản phẩm sữa lên men thu được.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra chủng vi khuẩn axit lactic có khả năng tạo ra cấu trúc có tính chịu cắt cơ học cao cho sản phẩm được lên men bằng chủng này và các chủng vi khuẩn thu được theo phương pháp này. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng các chủng này để chế biến các sản phẩm sữa lên men và sản phẩm sữa lên men thu được, như sữa chua uống hoặc sữa chua truyền thống (set-type yoghurt), có tính chịu cắt cơ học cao.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngành công nghiệp thực phẩm sử dụng nhiều vi khuẩn, đặc biệt là vi khuẩn axit lactic (lactic acid bacteria - LAB), không những để cải thiện vị và cấu trúc của thực phẩm mà còn để kéo dài thời hạn sử dụng của những thực phẩm này. Trong ngành công nghiệp chế biến sữa, vi khuẩn axit lactic được sử dụng một cách rộng rãi không những để axit hóa sữa (bằng cách lên men) mà còn để tạo cấu trúc cho sản phẩm mà chúng được đưa vào.

Trong số các vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, có thể kể đến các giống *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* và *Bifidobacterium*. Vi khuẩn axit lactic thuộc các giống này được sử dụng một cách rộng rãi ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp với các vi khuẩn khác để sản xuất các sản phẩm thực phẩm, cụ thể là các sản phẩm lên men. Đặc biệt, chúng được sử dụng trong pha chế men để dùng trong sản xuất sữa lên men, ví dụ sữa chua. Một số vi khuẩn trong số chúng đóng vai trò chi phối sự phát triển cấu trúc của sản phẩm lên men. Đặc tính này có liên quan mật thiết với quá trình sản sinh polysaccharit.

Đồ uống sữa lên men, ví dụ, sữa chua uống, chiếm một thị phần đáng kể và ngày càng gia tăng và thường đóng vai trò môi trường cho các thành phần chức năng như pre- và probiotic. Có sự khác biệt đáng kể yêu cầu về cấu trúc giữa phân đoạn sữa chua khuấy và phân đoạn đồ uống lên men từ sữa. Đối với đồ uống lên men từ sữa, bước xử lý với lực cắt cao sau khi lên men thường được áp dụng để phá vỡ mạng lưới protein nhằm thu được sản phẩm mịn, đồng nhất và có thể uống được.

Tuy nhiên, việc xử lý này làm giảm đáng kể cảm giác ngon miệng của đồ uống lên men từ sữa. Sự cân bằng giữa một bên là độ mịn và tính đồng nhất và bên kia là

cảm giác ngon miệng khiến cho rất khó có thể thu được dữ kiện cảm quan tối ưu. WO 2008/092458 đề cập đến sữa chua uống với tỷ lệ casein:protein nước sữa nằm trong khoảng từ 4:96 đến 12:88 (khối lượng/khối lượng) có thể được chế biến mà không tạo thành khối đông tụ sau khi lên men. Do không tạo ra khối đông tụ nên không cần thiết phải đồng hóa để phá vỡ khối đông tụ casein này.

Các giống vi khuẩn axit lactic hiện có trên thị trường thường không tạo ra được độ nhớt có khả năng chịu được quá trình xử lý cắt ở cường độ cao. Kết quả là, chất làm đặc ví dụ như tinh bột thường được đưa vào đồ uống lên men từ sữa để gia tăng cảm giác ngon miệng.

Theo cách khác, có thể thu được cảm giác ngon miệng ở mức độ chấp nhận được bằng cách sử dụng nguyên liệu chính là sữa nguyên kem, nhưng xu hướng chung là mong muốn có được các sản phẩm có hàm lượng chất béo thấp với 'nhãn sạch', nghĩa là không bổ sung các chất làm ổn định, nên cần phải có một giải pháp khác. Do vậy, cần phải có các giống vi khuẩn dùng cho đồ uống lên men từ sữa có hàm lượng chất béo thấp thay thế cho tác dụng của tinh bột.

Các giống vi khuẩn như vậy phải tạo ra cấu trúc có tính chịu cắt có thể qua được bước xử lý cắt (ví dụ, lên tới áp suất đối kháng là 7 bar (700KPa)) và vẫn giữ được cảm giác ngon miệng cần có cùng với cấu trúc mịn và đồng nhất.

Rất nhiều các sản phẩm từ sữa có hàm lượng chất béo thấp và không chứa chất béo ví dụ như sữa chua truyền thống đã được tung ra thị trường trong những năm gần đây. Tuy nhiên, việc giảm hàm lượng chất béo có ảnh hưởng lớn đến các đặc tính cảm quan và vật lý của sữa chua. Một yếu tố bị ảnh hưởng mạnh nhất là các đặc tính cấu trúc. Do việc làm yếu gel sữa chua gây ra bởi tổng hàm lượng chất rắn là thấp hơn nên pha lỏng sẽ tách ra và tạo ra một lớp ở bên trên sữa chua. Hiện tượng này được gọi là hiện tượng đông đặc và được coi là nhược điểm của sản phẩm. Có thể thực hiện các bước khác nhau để làm giảm sự đông đặc khi tổng lượng chất rắn gia tăng bằng cách bổ sung nhiều protein hơn và/hoặc bổ sung chất làm đặc ở dạng tinh bột và gelatin. Tuy nhiên, các giải pháp này không phải là rất có giá trị và có nhãn thân thiện với môi trường. Do đó, việc làm giảm hiện tượng đông đặc do giống vi khuẩn này sẽ là tối ưu và rất mong muốn.

Do đó, cần có phương pháp tạo ra các vi khuẩn axit lactic khác có thể làm tăng độ ổn định thể hiện qua sự giảm đông đặc trong sữa chua uống và sự giảm đông đặc trong sữa chua truyền thống. Các vi khuẩn axit lactic như vậy có thể được sử dụng để

sản xuất sản phẩm sữa lên men, như sữa chua, đặc biệt là các sản phẩm từ sữa có hàm lượng chất béo thấp hoặc không chứa chất béo với lượng chất làm đặc bổ sung, như tinh bột và pectin là giảm hoặc không chứa chất làm đặc.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một mục đích của sáng chế là nhằm đề xuất phương pháp tạo ra vi khuẩn axit lactic tạo ra tính chống cắt cơ học tăng đáng kể và độ ổn định được cải thiện cho các sản phẩm được lên men bằng chủng này.

Một mục đích khác của sáng chế là nhằm đề xuất vi khuẩn axit lactic tạo ra tính chống cắt cơ học tăng đáng kể và độ ổn định được cải thiện có khả năng thay thế tác dụng của chất làm đặc, như tinh bột và pectin, đồng thời duy trì cảm giác ngon miệng cần có cùng với độ mịn và các đặc tính cấu trúc mong muốn. Hơn nữa, một mục đích của sáng chế là nhằm đề xuất phương pháp chế biến sản phẩm sữa lên men có mức lắng cặn và mức đông đặc giảm và độ mịn được cải thiện.

Các mục đích khác sẽ được làm rõ hơn ở phần mô tả dưới đây và các mục đích khác nữa sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có liên quan đến sáng chế.

Theo khía cạnh thứ nhất, các tác giả sáng chế đã tiến hành sàng lọc và nghiên cứu sâu rộng để đạt được các mục đích nêu trên và giải quyết các vấn đề đặt ra bằng cách đề xuất phương pháp tạo ra chủng vi khuẩn axit lactic tạo ra tính chống chịu cao đối với việc xử lý cắt cơ học, bao gồm các bước:

a) xử lý bằng nhiệt nguyên liệu sữa gầy (sữa đã được tách kem) (0,1% chất béo, 3,2% protein) trong các điều kiện thích hợp, như ở 90°C trong 20 phút;

b) làm nguội sữa đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 43°C;

c) cấy vào sữa này vi khuẩn axit lactic với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,03% F-DVS (nằm trong khoảng từ 1×10^6 CFU/g đến 3×10^6 CFU/g);

d) lên men chủng vi khuẩn axit lactic này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 43°C đến độ pH = 4,55;

e) xử lý tiếp sữa đã lên men thu được từ bước d) trong thiết bị xử lý tiếp bao gồm thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm và van áp suất đối kháng trong đó thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm được điều chỉnh để làm mát sữa chua đi qua hệ thống thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm/van áp suất đối kháng đến 25°C trong thời gian ngắn hơn 10 giây và

van áp suất đối kháng được điều chỉnh để tạo ra áp suất đối kháng là 7 bar (700KPa), trong đó sữa đã lên men được cho qua hệ thống thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm/van áp suất đối kháng trong khoảng thời gian ngắn hơn 10 giây sao cho sữa chua được làm nguội đến 25°C;

f) đo ứng suất cắt sau khi xử lý tiếp; và

g) chọn chủng vi khuẩn axit lactic này nếu sau khi xử lý tiếp ở áp suất đối kháng 7 bar (700KPa) ứng suất cắt có giá trị ít nhất là khoảng 12 Pa.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn axit lactic có thể được thu nhận bằng phương pháp theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, cũng như các giống thuần khiết sinh học và các phân đoạn giống chứa chủng vi khuẩn này.

Cụ thể, các tác giả sáng chế đã xác định được chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966 và chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC-11977 tạo ra tính chống chịu cao trong bước xử lý cắt cơ học và độ ổn định được cải thiện. Tính chịu cắt cao của cấu trúc này cho phép sản xuất sữa chua uống và tạo ra độ nhót cao hấp dẫn ngay cả sau quy trình xử lý tiếp. Độ ổn định cải thiện có thể được xác định qua sự giảm lắng cặn ở sữa chua uống và sự giảm đông đặc ở sữa chua truyền thống.

Một lợi thế khác của các chủng này là ở chỗ có thể sử dụng chúng làm nguyên liệu ban đầu để thu được chủng đột biến tạo ra tính chống chịu quá trình xử lý cắt cơ học thậm chí là cao hơn. Các thể đột biến và các biến dị của chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966 và *Streptococcus thermophilus* CHCC-11977 tạo ra tính chống chịu quá trình xử lý cắt cơ học cũng là một phần của sáng chế này.

Do đó, theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn axit lactic mới được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966 với số hiệu lưu giữ DSM 23590 và chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC-11977 với số hiệu lưu giữ DSM 22935, và thể đột biến và các biến dị của các chủng này, tạo ra tính chịu cắt cơ học cao.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp chế biến sản phẩm sữa lên men bao gồm các bước:

a) cấy chủng vi khuẩn axit lactic theo khía cạnh thứ hai hoặc thứ ba của sáng chế, hoặc thể đột biến hoặc biến dị của nó vào sữa;

b) lên men sữa ở trên bằng chủng vi khuẩn axit lactic này trong các điều kiện thuận lợi;

- c) tùy ý bổ sung các vi sinh vật và/hoặc các phụ gia khác vào sữa này;
- d) tùy ý xử lý tiếp sữa này; và
- e) tùy ý đóng gói sản phẩm sữa lên men.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất sản phẩm sữa lên men có thể được thu nhận bằng cách thực hiện phương pháp theo khía cạnh thứ tư của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất sản phẩm sữa lên men chứa ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966 với số hiệu lưu giữ DSM 23590 và chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC-11977 với số hiệu lưu giữ DSM 22935, và thể đột biến và các biến dị của các chủng này.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất hệ men axit lactic chứa vi khuẩn axit lactic theo khía cạnh thứ hai hoặc thứ ba của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 mô tả sự thay đổi ứng suất cắt theo áp suất đối kháng trong quá trình xử lý tiếp của 5 chủng LAB.

Fig. 2 mô tả sự thay đổi mức lắng cặn trong quá trình xử lý tiếp đối với sữa chua uống được chế biến từ 4 chủng LAB khác nhau. Mức lắng cặn được đo sau 21 ngày bảo quản.

Fig. 3 mô tả sự thay đổi ứng suất cắt theo áp suất đối kháng trong quá trình xử lý tiếp của 5 chủng *Streptococcus thermophilus*.

Fig. 4 mô tả sự thay đổi ứng suất cắt theo áp suất đối kháng trong quá trình xử lý tiếp của 5 chủng *Lactobacillus bulgaricus*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Khi được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ "vi khuẩn axit lactic" để chỉ vi khuẩn gram dương, vi yếm khí hoặc kỵ khí, lên men đường kết hợp sản sinh axit bao gồm axit lactic là axit được tạo ra chủ yếu, axit axetic và axit propionic. Đã phát hiện ra rằng vi khuẩn axit lactic hữu ích nhất trong công nghiệp thuộc bộ "Lactobacillales" gồm *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp.

và *Propionibacterium* spp. Ngoài ra, vi khuẩn sản xuất axit lactic thuộc nhóm vi khuẩn kỵ khí nghiêm ngặt, bifidobacteria, nghĩa là *Bifidobacterium* spp., thường chứa trong nhóm vi khuẩn axit lactic. Chúng thường xuyên được sử dụng ở dạng các giống vi khuẩn dùng cho thực phẩm ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp với vi khuẩn axit lactic khác. Vi khuẩn axit lactic, bao gồm vi khuẩn của các loài *Lactobacillus* spp. và *Streptococcus thermophilus*, thường được cung cấp cho ngành công nghiệp chế biến sữa ở dạng giống đông lạnh hoặc đông khô để nhân giống men cái với số lượng lớn hoặc còn được gọi là các giống "Frozen Direct Vat Set" (F-DVS), dự định để cấy trực tiếp vào bình hoặc thùng lên men để sản xuất sản phẩm sữa, như sản phẩm sữa lên men. Các giống như vậy được gọi chung là "giống khởi động" hoặc "men cái".

Thuật ngữ "sữa" được hiểu là chất được tiết ra ở dạng sữa thu được bằng cách vắt sữa động vật có vú bất kỳ, như bò, cừu, dê, trâu hoặc lạc đà. Theo một phương án được ưu tiên, sữa này là sữa bò. Thuật ngữ sữa cũng bao gồm dung dịch protein/chất béo được tạo ra từ nguyên liệu thực vật, ví dụ, sữa đậu nành.

Thuật ngữ "cơ chất sữa" có thể là nguyên liệu sữa thô và/hoặc đã chế biến có thể được đưa đi lên men theo phương pháp theo sáng chế. Do vậy, cơ chất sữa có thể sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch/huyền phù của sữa hoặc sản phẩm giống sữa bất kỳ chứa protein, như sữa nguyên kem hoặc sữa có hàm lượng chất béo thấp, sữa gầy, nước sữa còn lại sau khi tách bơ ra khỏi sữa, sữa bột hoàn nguyên, sữa đặc, sữa bột, nước sữa, váng sữa hòa tan, lactoza, nước cái từ quá trình kết tinh lactoza, dịch đặc protein nước sữa, hoặc kem.

Hiển nhiên là, cơ chất sữa có thể có nguồn gốc từ động vật có vú bất kỳ, ví dụ, là sữa hầu như tinh khiết của động vật có vú, hoặc sữa bột hoàn nguyên.

Trước khi lên men, cơ chất sữa có thể được đồng hoá và được thanh trùng theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực.

"Đồng hóa" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là trộn kỹ để thu được huyền phù hoặc nhũ tương có thể hòa tan. Nếu bước đồng hóa được thực hiện trước khi lên men, nó có thể được thực hiện sao cho chất béo sữa được phá vỡ thành các kích cỡ nhỏ hơn để nó không còn tách riêng ra khỏi sữa. Bước này có thể được thực hiện bằng cách cho sữa đi qua các vòi phun nhỏ ở áp suất cao.

"Tiệt trùng bằng phương pháp Pasteur" như được sử dụng trong bản mô tả này nghĩa là xử lý cơ chất sữa để làm giảm hoặc loại bỏ sự có mặt của các sinh vật sống

như các vi sinh vật. Tốt hơn là, tiệt trùng bằng phương pháp Pasteur đạt được bằng cách duy trì nhiệt độ cụ thể trong khoảng thời gian cụ thể. Nhiệt độ cụ thể thường đạt được bằng cách đun nóng. Nhiệt độ và khoảng thời gian có thể được chọn để tiêu diệt hoặc làm bất hoạt một số vi khuẩn như vi khuẩn có hại. Bước làm lạnh nhanh có thể được thực hiện sau đó.

“Quá trình lên men” trong các phương pháp theo sáng chế nghĩa là quá trình chuyển hóa hydrat cacbon thành rượu hoặc axit nhờ tác động của vi sinh vật.

Tốt hơn là, quá trình lên men trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm quá trình chuyển hóa lactoza thành axit lactic.

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

Thuật ngữ "sản phẩm dạng khuấy" để chỉ cụ thể sản phẩm sữa lên men vẫn duy trì xử lý cơ học sau khi lên men, dẫn đến phá vỡ cấu trúc và hóa lỏng khối đông tụ tạo thành trong giai đoạn lên men. Xử lý cơ học thường, nhưng không chỉ giới hạn ở, thu được bằng cách khuấy, bơm, lọc hoặc đồng hóa gel, hoặc bằng cách trộn nó với các thành phần khác. Các sản phẩm dạng khuấy thường có, nhưng không phải chỉ giới hạn ở, hàm lượng chất rắn không béo trong sữa nằm trong khoảng từ 9 đến 15%.

Thuật ngữ "sản phẩm dạng tĩnh" và "sữa chua truyền thống" bao gồm sản phẩm và sữa chua, tương ứng, trên cơ sở sữa đã được cấy giống men cái và được đóng gói tiếp sau bước cấy truyền và sau đó được lên men trong gói này.

Thuật ngữ "sản phẩm có thể uống được" bao gồm các đồ uống như "sữa chua uống" và các đồ uống tương tự. Thuật ngữ "sữa chua uống" thường bao hàm sản phẩm sữa được sản xuất bằng cách lên men bởi hỗn hợp gồm loài *Lactobacillus* và *Streptococcus thermophilus*. Sữa chua uống thường có hàm lượng chất rắn không béo trong sữa là 8% hoặc cao hơn. Hơn nữa, số lượng sinh vật sống cho sữa chua uống thường ít nhất là 10^6 đơn vị tạo thành tế bào (CFU) trong một ml.

"Xử lý tiếp bằng cơ học" được thực hiện trong thiết bị xử lý tiếp bao gồm thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm và van áp suất đối kháng. Sữa chua đi qua hệ thống thiết bị

trao đổi nhiệt dạng tấm/van áp suất đối kháng trong < 10 giây. Thiết bị xử lý tiếp có thể vận hành ở các nhiệt độ khác nhau (trong trường hợp này 25°C được áp dụng) và áp suất đối kháng khác nhau (trong trường hợp này 0, 7 và 15 bar (1500KPa) được áp dụng tương ứng). Trước khi xử lý, khối đông tụ sữa chua được phá vỡ thành sữa chua lỏng bằng cách khuấy.

"Xử lý cắt ở áp suất cao" trong sáng chế dùng để chỉ xử lý cắt cơ học với áp suất đối kháng cao hơn áp suất thích hợp để khuấy sữa chua, nghĩa là cao hơn khoảng 3 bar (300KPa).

Trong sáng chế này, thuật ngữ "ứng suất cắt" xác định độ nhót. Độ nhót (đơn vị là Pa s) được định nghĩa là ứng suất cắt (Pa)/tốc độ cắt (1/s).

Trị số ứng suất cắt được báo cáo ở dạng tiêu chuẩn trong sáng chế ở tốc độ cắt = 300 1/s. Các thử nghiệm cảm quan đã chỉ ra rằng (dữ liệu không được chỉ ra) tương quan tốt nhất giữa phép đo lưu biến và độ nhót cảm quan /độ đặc khi nuốt được phát hiện khi sử dụng độ nhót đo ở tốc độ cắt 300 1/s.

Thuật ngữ "độ mịn" trong bản mô tả này dùng để chỉ sự không thô của cấu trúc và được xác định bằng điểm cảm quan độ mịn được cho bởi nhóm đánh giá cảm quan đã qua huấn luyện như được nêu làm ví dụ trong Ví dụ 2. "Độ mịn mong muốn" dùng để chỉ cấu trúc có điểm cảm quan độ mịn cao hơn 7.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể đột biến" cần phải hiểu là chủng thu được từ chủng theo sáng chế bằng, ví dụ, kỹ thuật di truyền, xử lý bằng phóng xạ và/hoặc hóa chất. Tốt hơn là, thể đột biến là thể đột biến tương đương về mặt chức năng, ví dụ, thể đột biến có các đặc tính (ví dụ, liên quan đến độ nhót, độ cứng gel, hậu vị, hương vị, quá trình axit hóa sau đó, tốc độ axit hóa, và/hoặc độ khỏe của thể thực khuẩn) về cơ bản giống, hoặc được cải thiện, so với chủng bố mẹ. Thể đột biến như vậy là một phần của sáng chế. Đặc biệt, thuật ngữ "thể đột biến" để chỉ chủng thu được bằng cách cho chủng theo sáng chế qua bước xử lý đột biến theo cách thông thường bao gồm xử lý bằng hóa chất gây đột biến như etan metan sulphonat (EMS) hoặc N-metyl-N'-nitro-N-nitroguanidin (NTG), ánh sáng UV hoặc để quá trình đột biến xảy ra một cách tự phát. Thể đột biến có thể được cho qua một số bước xử lý đột biến (một bước xử lý cần phải hiểu là một bước gây đột biến, tiếp theo là bước sàng lọc/chọn lọc), nhưng tốt hơn là không lớn hơn 20, hoặc không lớn hơn 10, hoặc không lớn hơn 5, bước xử lý (hoặc bước sàng lọc/chọn lọc) được thực hiện. Ở thể đột biến được ưu tiên theo sáng chế, ít hơn 5%, hoặc ít hơn 1% hoặc thậm chí ít hơn 0,1% nucleotit trong bộ gen vi

khuẩn đã được thay bằng nucleotit khác, hoặc bị khuyết, so với chủng bố mẹ.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "biến dị" cần phải hiểu là chủng tương đương về mặt chức năng với chủng theo sáng chế, ví dụ, có các đặc tính (ví dụ, liên quan đến độ nhớt, độ cứng gel, hậu vị, hương vị, và/hoặc quá trình axit hóa sau đó) về cơ bản giống hoặc cải tiến so với chủng theo sáng chế. Các biến dị biến dị này, có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật sàng lọc thích hợp, là một phần của sáng chế.

Việc sử dụng thuật ngữ "một" và các từ tương tự trong nội dung của bản mô tả sáng chế (đặc biệt là trong nội dung của phần yêu cầu bảo hộ kèm theo) được hiểu là bao hàm cả số ít lẫn số nhiều, trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả hoặc mâu thuẫn một cách rõ ràng với nội dung bản mô tả. Các thuật ngữ "bao gồm", "có", "gồm" và "chứa" được hiểu như là thuật ngữ không giới hạn (tức là, có nghĩa "bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,") trừ khi có chỉ dẫn khác. Việc nêu các trị số riêng rẽ nằm trong khoảng này, trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả, và mỗi giá trị riêng rẽ được kết hợp vào bản mô tả như thể nó được nêu một cách riêng rẽ 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 có chỉ dẫn khác trong bản mô tả hoặc mâu thuẫn một cách rõ ràng với nội dung bản mô tả. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ được lấy làm ví dụ (ví dụ, "như") được nêu trong bản mô tả này, chỉ nhằm minh họa rõ hơn sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi có chỉ dẫn khác. Không có cách diễn đạt nào trong bản mô tả được hiểu là chỉ ra yếu tố không được bảo hộ bất kỳ cần thiết để thực hiện sáng chế.

Thực hiện và các khía cạnh của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ xác định được rằng một số vi khuẩn axit lactic tạo ra cấu trúc có tính chống chịu cao đối với quá trình xử lý tiếp bằng cơ học dẫn đến khả năng tạo ra sản phẩm sữa lên men, như sữa chua uống hoặc sữa chua truyền thống, có độ nhớt cao, mức độ ngon miệng cao, sự lắng cặn giảm, sự đông đặc giảm và độ mịn mong muốn mà không cần bổ sung chất làm ổn định, như tinh bột và pectin.

Trong quá trình làm việc theo cách cảm quan, các tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp tạo ra vi khuẩn axit lactic tạo ra tính chịu cắt cơ học cao. Phương pháp này bao gồm quy trình sàng lọc trong đó vi khuẩn axit lactic được sử dụng để cấy cho sữa gầy và để lên men trong các điều kiện lên men tiêu chuẩn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 43°C đến độ pH = 4,55. Sau khi xử lý tiếp, sữa đã lên men thu được được xử lý cắt ở áp suất đối kháng 7 bar (700KPa) và làm nguội đến 25°C, độ

nhớt được xác định như là ứng suất cắt đo được. Chủng vi khuẩn lactic thích hợp theo sáng chế được lựa chọn nếu ứng suất cắt của sữa đã lên men ít nhất là ở ngưỡng khoảng 12Pa.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra chủng vi khuẩn axit lactic tạo ra tính chịu cắt cơ học cao, bao gồm các bước:

a) xử lý bằng nhiệt nguyên liệu sữa gầy (0,1% chất béo, 3,2% protein) trong các điều kiện thích hợp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, như ở 90°C trong 20 phút;

b) làm nguội sữa đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 43°C;

c) cấy vi khuẩn axit lactic đã nêu vào sữa với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,02% F-DVS (nằm trong khoảng từ $\sim 1 \times 10^6$ CFU/g đến $\sim 3 \times 10^6$ CFU/g);

d) lên men sữa này với chủng vi khuẩn axit lactic đã nêu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 43°C đến độ pH = 4,55;

e) xử lý tiếp sữa đã lên men thu được từ bước d) trong thiết bị xử lý tiếp chứa thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm và van áp suất đối kháng trong đó thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm được điều chỉnh để làm mát sữa chua đi qua hệ thống thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm/van áp suất đối kháng đến 25°C trong khoảng thời gian ngắn hơn 10 giây và van áp suất đối kháng được điều chỉnh để thu được áp suất đối kháng là 7 bar (700KPa), trong đó sữa đã lên men được cho qua hệ thống thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm/van áp suất đối kháng trong khoảng thời gian ngắn hơn 10 giây sao cho sữa chua được làm lạnh đến 25°C;

f) đo ứng suất cắt sau khi xử lý tiếp; và

g) chọn chủng vi khuẩn axit lactic này nếu ứng suất cắt sau khi xử lý tiếp ở áp suất đối kháng 7 bar (700KPa) ít nhất là khoảng 12Pa.

Theo một phương án được ưu tiên, ứng suất cắt sau khi xử lý tiếp ở áp suất đối kháng là 7 bar (700KPa) ít nhất là khoảng 13Pa, như ít nhất là khoảng 14Pa.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn axit lactic có thể thu nhận được bằng phương pháp theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, cũng như các giống thuần khiết sinh học và các phân đoạn của các giống của chủng vi khuẩn lactic này.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn axit lactic được chọn

từ nhóm bao gồm *Lactobacillus bulgaricus* chủng PIM-1966 với số hiệu lưu giữ DSM 23590 và *Streptococcus thermophilus* chủng CHCC-11977 với số hiệu lưu giữ DSM 22935, và thể đột biến và các biến dị của các chủng này tạo ra các đặc tính chịu ứng suất cắt của chủng DSM 23590 hoặc DSM 22935 đã được nộp lưu tương ứng.

Tốt hơn là, thể đột biến hoặc biến dị tạo ra tính chịu ứng suất cắt ít nhất là khoảng 5-40 Pa, tốt hơn là 10-20 Pa. Ví dụ, thể đột biến hoặc biến dị có thể có tính chịu ứng suất cắt bằng khoảng 12 Pa, 13 Pa, 14 Pa, 15 Pa, 16 Pa, 17 Pa, 18 Pa hoặc 19 Pa.

Chủng LAB theo sáng chế tạo ra tính chống chịu cao đối với quá trình xử lý cắt cơ học đặc biệt thích hợp để điều chế sản phẩm sữa lên men như sữa chua. Cụ thể, trong các ứng dụng sữa chua uống, sữa chua dạng khuấy, và sữa chua truyền thống, các chủng này có thể làm giảm nhu cầu bổ sung chất làm ổn định, như tinh bột và pectin.

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp chế biến sản phẩm sữa lên men bao gồm bước cấy chủng vi khuẩn axit lactic tạo ra cấu trúc có tính chịu cắt cơ học cao vào sữa, và lên men sữa trong các điều kiện thuận lợi.

Như đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, nhiều sản phẩm sữa lên men có thể thu được bằng cách lên men sữa bằng nhiều vi khuẩn axit lactic khác nhau. Theo một phương án được ưu tiên, sản phẩm sữa đã lên men là sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm sữa chua, sữa chua uống, sữa chua dạng khuấy, sữa chua truyền thống và đồ uống tương tự sữa chua, sữa đắng, bơ sữa, kem chua, phomát tươi và phomát.

Theo một phương án được ưu tiên, sản phẩm sữa lên men là sữa chua uống.

Theo một phương án được ưu tiên khác, sản phẩm sữa lên men là sữa chua truyền thống.

Nói chung, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ các điều kiện lên men thích hợp để lên men sữa với các vi khuẩn thích đáng nêu trong bản mô tả, ví dụ, *Lactobacillus bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*. Các điều kiện thích hợp theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, điều kiện trong đó sữa được cấy vi khuẩn và lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 38°C đến 43°C, cho đến khi đạt độ pH nằm trong khoảng từ 4,4 đến 4,6 (sau khoảng 8 giờ). Làm lạnh sữa đến +6°C để dừng quá trình lên men và phát triển.

Các điều kiện lên men tiêu chuẩn có thể được cải biến nếu cần thiết bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, dựa trên kiến thức chung và, có thể sau khi thử nghiệm theo cách thông thường. Môi trường nuôi cấy là môi trường thích hợp để nuôi cấy chủng liên quan.

Theo một phương án được ưu tiên, chủng vi khuẩn axit lactic được sử dụng để cấy vào sữa được chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966 với số hiệu lưu giữ DSM 23590 và chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC-11977 với số hiệu lưu giữ DSM 22935, và thể đột biến và các biến dị của các chủng này.

Chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966, và thể đột biến và các biến dị của nó, và chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC-11977, và thể đột biến và các biến dị của nó, được cấy với lượng từ 1×10^4 đến 1×10^7 CFU (đơn vị tạo khuẩn lạc) vi khuẩn trên một ml cơ chất sữa.

Việc xác định số lượng tế bào sống sót được thực hiện bằng cách định lượng số đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU) của vi khuẩn trong dung dịch pah loãng theo bậc bằng cách đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch, theo phương pháp tiêu chuẩn đã biết. Môi trường thích hợp và các điều kiện ủ là đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và được nêu trong phần ví dụ dưới đây.

Nếu cần, có thể bổ sung thêm các vi khuẩn (ví dụ, thêm chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966) ở một số thời điểm quan tâm (ví dụ, sau khi hoàn tất lên men).

Sữa ở bước a) có thể được cấy ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic khác. Cần phải hiểu rằng sữa này có thể được cấy riêng rẽ/lần lượt mỗi loài vi khuẩn, hoặc đồng thời hai hoặc nhiều hơn hai loài vi khuẩn. Tốt hơn là, sữa được cấy với tất cả các loài vi khuẩn ở cùng một thời điểm. Điều này được thực hiện thuận tiện bằng cách cấy giống men cái chứa các loài vi khuẩn này vào sữa.

Theo một phương án được ưu tiên, ít nhất một chủng vi khuẩn là một hoặc nhiều vi khuẩn thuộc giống *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pseudoleuconostoc*, *Pediococcus*, *Brevibacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*.

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên của sáng chế, ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic khác bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* và/hoặc ít nhất một chủng *Lactobacillus bulgaricus*.

Theo sáng chế, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* có thể là chủng

Streptococcus thermophilus thích hợp bất kỳ (ví dụ, chủng hiện có trên thị trường). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng, chủng này có thể được cấy với lượng thích hợp để thu được lượng *Streptococcus thermophilus* thích hợp trong sản phẩm sữa lên men cuối cùng.

Theo sáng chế, ít nhất một chủng *Lactobacillus bulgaricus* có thể là chủng *Lactobacillus bulgaricus* thích hợp bất kỳ (ví dụ, chủng hiện có trên thị trường). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng, chủng này có thể được cấy lượng thích hợp để thu được lượng *Lactobacillus bulgaricus* thích hợp trong sản phẩm sữa lên men cuối cùng.

Theo một phương án được ưu tiên, sữa được cấy ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* với lượng nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^7 CFU trên một ml cơ chất sữa và/hoặc ít nhất một chủng *Lactobacillus bulgaricus* với lượng nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^7 CFU trên một ml cơ chất sữa.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, sữa được xử lý tiếp bằng cách xử lý với lực cắt cao trong thiết bị xử lý tiếp bao gồm thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm được điều chỉnh để làm nguội đến 25°C và van áp suất đối kháng được điều chỉnh để thu được áp suất đối kháng thích hợp. Sữa chua đi qua hệ thống thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm/van áp suất đối kháng trong < 10 giây.

Theo một phương án được ưu tiên, xử lý cắt ở áp suất cao là xử lý ở áp suất đối kháng nằm trong khoảng từ 3 bar (300KPa) đến 15 bar (1500KPa). Theo một phương án được ưu tiên hơn, xử lý ở áp suất cao là xử lý ở áp suất đối kháng nằm trong khoảng từ 6 bar (600KPa) đến 8 bar (800KPa). Tốt hơn là, xử lý ở áp suất cao là xử lý ở áp suất đối kháng khoảng 7 bar (700KPa).

Theo một phương án khác, sữa không được xử lý tiếp mà được để yên sau khi lên men.

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, không có chất làm ổn định nào được bổ sung vào sữa.

Theo một phương án của sáng chế, sản phẩm sữa lên men được đóng gói thuận tiện trong một bao gói kín chứa từ 10-5000ml sản phẩm, như từ 25 đến 3000ml hoặc từ 50 đến 1000ml. Ví dụ, các bao gói có thể chứa 10-300ml, 20-200ml hoặc 30-100ml.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sản phẩm sữa lên men có thể thu được theo phương pháp chế biến sản phẩm sữa lên men này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sản phẩm sữa lên men chứa ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic theo khía cạnh thứ hai hoặc thứ ba của sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, sản phẩm sữa lên men là sữa chua. Tốt hơn, nếu là sữa chua uống hoặc sữa chua truyền thống.

Sản phẩm sữa lên men như nêu trong bản mô tả cũng có thể được sử dụng làm phụ gia cho, ví dụ, được đưa vào các sản phẩm thực phẩm ăn được khác, như sữa đông dùng làm pho mát, sôcôla, nước quả, các sản phẩm thịt và sản phẩm sữa dùng cho trẻ sơ sinh (sữa dành cho trẻ sơ sinh).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hệ men lactic chứa ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic theo khía cạnh thứ hai hoặc thứ ba của sáng chế, hoặc thể đột biến hoặc biến dị của nó.

Theo một phương án được ưu tiên, hệ men lactic này bao gồm chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966 hoặc thể đột biến hoặc biến dị của nó. Theo một phương án ưu tiên khác, hệ men lactic bao gồm chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC-11977 hoặc thể đột biến hoặc biến dị của nó.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất hệ men lactic ở dạng đông lạnh, đông khô hoặc dạng lỏng.

Các phương án của sáng chế được mô tả dưới đây nhằm mục đích ví dụ mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Phát triển thể đột biến kháng thể thực khuẩn từ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB-1 có các đặc tính cấu trúc được cải thiện.

Thể đột biến kháng thể thực khuẩn được phân lập từ chủng bố mẹ LB-1 như sau.

Thể đột biến được chọn lọc từ đĩa thạch MRS chứa 10mM CaCl_2 /10_{MM} MgCl_2 sau khi cấy 0,1ml giống LB-1 qua đêm cùng với 0,1ml dịch dung giải thể thực khuẩn CHPC658 chứa 10^6 hạt thể thực khuẩn trong một ml và được ủ kỵ khí trong hai ngày ở 37°C.

Ba mươi thể đột biến được phân lập và được thử nghiệm trong thử nghiệm cấy thành đường vuông góc đối với chủng thể thực khuẩn CHPC658. Hai mươi chín thể

đốt biến có tính kháng trong thử nghiệm cấy thành đường vuông góc, và sau đó được tinh sạch ba lần bằng cách phân lập khuẩn lạc trên đĩa thạch MRS.

29 thể đốt biến được thử nghiệm trong các đĩa vi chuẩn độ về dữ kiện axit hóa và tính kháng thể thực khuẩn. Hai đĩa vi chuẩn độ được chuẩn bị bằng sữa và mỗi đĩa được cấy 2% thể đốt biến tương ứng. Ở một đĩa, dịch pha loãng chứa 2% pepton trong muối (mẫu đối chứng) được bổ sung vào mỗi lỗ, và ở đĩa vi chuẩn độ còn lại 2% chủng thể thực khuẩn CHPC658 chứa 10^6 hạt thể thực khuẩn trong một ml được bổ sung vào. Hai đĩa được ủ ở 37°C trong hai ngày, và độ pH của mỗi lỗ được ghi lại 12 phút một lần.

Phần lớn các thể đốt biến kháng thể thực khuẩn có dữ kiện axit hóa được so sánh với chủng bố mẹ (độ pH xấp xỉ 5,5 sau 24 giờ). Tất cả các thể đốt biến đều kháng thể thực khuẩn so với chủng bố mẹ LB-1, bị tấn công bởi chủng thể thực khuẩn CHPC658.

Thể đốt biến, LB-4 được chọn để kiểm tra tính chống chịu quá trình xử lý cắt ở áp suất cao dựa trên dữ kiện axit hóa (tương tự chủng bố mẹ) và các thông số độ nhớt của chủng này.

Ví dụ 2

Tính chịu cắt đối với quá trình xử lý tiếp bằng cơ học của cấu trúc của sữa đã lên men được chế biến với một số chủng vi khuẩn axit lactic được nghiên cứu ở ứng dụng sữa chua uống bằng cách sử dụng 3 mức xử lý tiếp khác nhau (áp suất đối kháng là 0 bar, 7 bar (700KPa) và 15 bar (1500KPa)). ST-1 và ST-2 là chủng *Streptococcus thermophilus* trong khi LB-1, LB-2 và PIM-1966 là chủng *Lactobacillus bulgaricus*.

Thí nghiệm

Nghiên cứu này được thực hiện trong hai bản sao và trị số trung bình được tính toán. Tất cả các chủng được lên men cùng với các chủng trợ giúp để thu được thời gian lên men có thể so sánh được đối với tất cả các mẫu (xem Bảng 1).

Sản xuất

4l sữa chua của mỗi giống được tạo ra bằng cách sử dụng nguyên liệu sữa gầy (0,1% chất béo, 3,2% protein, 8% sucroza). Sữa được xử lý bằng nhiệt trong 20 phút ở 90°C và được làm lạnh đến nhiệt độ lên men 43°C . Tiếp theo, sữa được cấy với tổng lượng 0,02% giống F-DVS theo Bảng 1. Chủng trợ giúp được sử dụng để đạt được thời gian lên men tương tự. CHCC-7018 là chủng *Streptococcus thermophilus* phân

giải protein không sản sinh exopolysaccharit (EPS), nghĩa là tham gia vào việc axit hóa 'nhẹ' mà không tham gia vào cấu trúc. CHCC-4351 là chủng *Lactobacillus bulgaricus* không sản sinh EPS, nghĩa là tham gia vào việc axit hóa mà không tham gia vào cấu trúc.

Sữa được lên men đến độ pH 4,55. Tiếp theo, sữa chua được chế biến tiếp theo và được làm nguội đến 25°C trong thiết bị xử lý tiếp (PTU). Đối với mỗi loại sữa chua, các mẫu được lấy sau khi xử lý tiếp ở áp suất đối kháng tương ứng là 0 bar, 7 bar (700KPa) và 15 bar (1500KPa).

Bảng 1. Giống nuôi cấy, nhiệt độ lên men và các quá trình xử lý tiếp được áp dụng

Loài	Hàm lượng chủng thử nghiệm	Chủng trợ giúp St-7018	Chủng trợ giúp Lb-4351	Nhiệt độ lên men	Xử lý tiếp
<i>Streptococcus thermophilus</i>	90%	5%	5%	43	0 bar; 7 bar (700KPa); 15 bar (1500KPa)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	90%	10%		43	0 bar; 7 bar (700KPa); 15 bar (1500KPa)

Phân tích

Sữa chua được mô tả đặc trưng về mặt:

Lưu biến học: đo bằng lưu biến kế Anton Paar MCR được lắp với bộ phận thay đổi mẫu tự động (Anton Paar, Austria) bằng cách sử dụng sữa chua uống được cài đặt với hệ thống đo BOB/COP. Đường cong dòng chảy đo ứng suất cắt dưới dạng hàm số của tốc độ cắt (0 1/s - 300 1/s - 0 1/s) được thu hồi.

Các đặc tính cảm quan: các mẫu được xử lý tiếp bằng áp suất đối kháng 7 bar (700KPa) được đánh giá cảm quan trong phòng thí nghiệm bởi 'nhóm người có hiểu biết trung bình'. Điểm về độ mịn (thang điểm 0-9) được ghi lại.

Độ ổn định đối với sự lắng đọng: được nghiên cứu bằng cách sử dụng Turbiscan.

Kết quả

Bảng 2 là kết quả từ lần lặp lại I và II, tương ứng.

Bảng 2. Thời gian lên men, ứng suất cắt và điểm độ mịn trung bình sau hai lần lặp lại.

	Xử lý tiếp (bar)	Thời gian để đạt độ pH 4,55 (phút)	Ứng suất cắt (Pa)	Điểm cảm quan đối với độ mịn (thang điểm 0-9)
ST-1	0	365	36,0	không được đánh giá
ST-1	7	365	4,5	4
ST-1	15	365	2,5	không được đánh giá
ST-2	0	375	28	không được đánh giá
ST-2	7	375	4,5	2
ST-2	15	375	2,5	không được đánh giá
LB-1	0	370	19,5	không được đánh giá
LB-1	7	370	6,0	8
LB-1	15	370	4,0	không được đánh giá
PIM-1966	0	360	28,0	không được đánh giá
PIM-1966	7	360	14,0	9
PIM-1966	15	360	8,0	không được đánh giá
LB-2	0	410	10,0	không được đánh giá
LB-2	7	410	4,0	4
LB-2	15	410	2,0	không được đánh giá

Hình 1 là ứng suất cắt dưới dạng hàm số của áp suất đối kháng xử lý tiếp ở mỗi mẫu thí nghiệm lặp lại trong hai thử nghiệm.

Hình 2 là mức lắng cặn dưới dạng hàm số của quá trình xử lý tiếp đối với sữa chua uống được chế biến từ 4 chủng khác nhau. Mức lắng cặn được đo sau 21 ngày bảo quản.

Thảo luận

Tính chịu cắt:

Rõ ràng từ Bảng 2 và Hình 1, có một sự khác biệt lớn về mức cấu trúc ban đầu (xử lý tiếp ở 0 bar) từ 10-36 Pa. Tuy nhiên, sau khi xử lý tiếp ở áp suất đối kháng 7 bar (700KPa), khoảng cách này giảm xuống đến 4-14 Pa. Sau khi xử lý tiếp ở 15 bar (1500KPa), khoảng này là 2-8 Pa. Hiển nhiên là, chủng PIM-1966 tạo ra cấu trúc có tính chống chịu đáng kể đối với quá trình xử lý tiếp bằng cơ học so với cấu trúc thu được từ các chủng khác. Mặc dù sự có mặt của PIM-1966 không tạo ra một ứng suất

cắt đặc biệt cao trước khi xử lý tiếp (mẫu xử lý ở 0 bar), cấu trúc này nhót hơn đáng kể so với cấu trúc của các chủng bất kỳ khác sau khi xử lý tiếp ở áp suất tương ứng là 7 bar (700KPa) và 15 bar (1500KPa).

Độ ổn định:

Thông thường xử lý tiếp ở áp suất cao hơn tạo ra độ ổn định kém hơn (lắng cặn nhiều hơn).

Độ ổn định tốt nhất được tìm thấy trong sữa chua uống được sản xuất bằng PIM-1966 có mức lắng cặn thấp nhất sau 21 ngày dự trữ - điều này đúng với quá trình xử lý tiếp ở 7 bar (700KPa) và 15.

Đánh giá cảm quan:

Sữa chua uống được chế biến bằng PIM-1966 được đánh giá là có độ mịn cực cao bởi nhóm người có hiểu biết trung bình cảm quan (đạt 9 điểm trên thang điểm 9).

Kết luận

Kết luận là, chủng PIM-1966 là đáng chú ý do tạo ra tính chống chịu cao đối với điều kiện stress do cắt cơ học, nó cũng tạo ra độ mịn cao và độ ổn định đối với sự lắng cặn ở sữa chua uống so với chủng LAB tạo ra ứng suất cắt dưới 12 Pa sau khi xử lý tiếp ở áp suất đối kháng là 7 bar (700KPa).

Ví dụ 3

Để nhận biết các chủng LAB khác tạo ra tính chống chịu cao đối với stress do cắt cơ học, một số chủng được sàng lọc theo sáng chế dựa trên ứng suất cắt cao hơn khoảng 12 Pa sau khi xử lý tiếp ở áp suất đối kháng 7 bar (700KPa) ở sữa chua uống. PIM-1966 cũng được sử dụng làm mẫu đối chứng dương tính.

Thí nghiệm

Nghiên cứu này được thực hiện làm hai bản sao lặp lại. Tất cả các chủng được lên men cùng với chủng trợ giúp để đạt được thời gian lên men có thể so sánh được đối với tất cả các mẫu (xem Bảng 1). ST-1, ST-2, ST-4, ST-5, ST-6, ST-7 và CHCC-11977 là các chủng *Streptococcus thermophilus* trong khi LB-1, LB-4, LB-5 và PIM-1966 là các chủng *Lactobacillus bulgaricus*.

Tiến hành sản xuất như trong Ví dụ 1.

Phân tích

Sữa chua được mô tả đặc trưng về mặt lưu biến học:

Để thử nghiệm, tác giả sáng chế đã đo ứng suất cắt dưới dạng hàm số của tốc độ cắt kéo dài từ 0 đến 300 1/s - điều này tạo ra cái gọi là đường cong dòng chảy.

Thiết bị này là một lưu biến kế Anton Paar MCR được lắp với một bộ thay đổi mẫu tự động (Anton Paar, Austria) bằng cách sử dụng sữa chua uống được thiết lập với hệ thống đo lường BOB/COP. Đường cong dòng chảy đo ứng suất cắt dưới dạng hàm số của tốc độ cắt (0 1/s - 300 1/s - 0 1/s) được thu hồi.

Bảng 3: Ứng suất cắt dưới dạng hàm số của áp suất đối kháng trong quá trình xử lý tiếp tính trung bình trên 2 mẫu lặp lại.

Áp suất đối kháng	0 bar	7 bar (700KPa)	15 bar (1500KPa)
ST-1	36	4,5	2,5
ST-2	28	4,5	2,5
CHCC-11977	41,6	13,1	4,9
ST-4	37,5	10	4
ST-5	36,5	7,5	3
ST-6	35	11,5	4,2
ST-7	29	7,8	3,9
LB-1	19	8,4	6
PIM-1966	35	18,5	14,6
LB-3	34	22	16,6
LB-4	23	12	9,9
LB-5	14	4,6	3,4

Kết quả

Các hình 3 và 4 chỉ ra ứng suất cắt dưới dạng hàm số của áp suất đối kháng trong quá trình xử lý tiếp ở các mẫu lặp trong hai thử nghiệm. Hình 3 mô tả chủng *Streptococcus thermophilus* và Hình 4 mô tả chủng *Lactobacillus bulgaricus*.

Kết luận

Thế đột biến của PIM-1966 là LB-3 được nhận thấy là thậm chí còn tạo ra tính chống chịu đối với quá trình xử lý cắt cơ học cao hơn và độ nhớt cao hơn so với PIM-1966. Ngoài ra, chủng *Streptococcus thermophilus*, CHCC-11977, được nhận thấy là cũng tạo ra tính chống chịu đối với quá trình xử lý cắt cơ học theo sáng chế. ST-11977 tạo ra độ nhớt cao và độ mịn cao trong sữa chua uống.

Nội dung và giải pháp chuyên môn

Người nộp đơn yêu cầu rằng mẫu vi sinh vật được lưu giữ nêu dưới đây chỉ có thể được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình, cho đến khi đơn sáng chế này được cấp bằng.

Chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966 được nộp lưu vào ngày 6/5/2010 tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig (DSMZ) và có số truy nhập là DSM 23590. Chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC11977 được nộp lưu vào ngày 8/9/2009 tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig (DSMZ) và có số truy nhập là DSM 22935.

Việc nộp lưu được thực hiện theo hiệp ước Budapest về Nhận dạng lưu giữ vi sinh vật quốc tế cho mục đích xử lý sáng chế (the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure).

Tài liệu viện dẫn

WO 2008/092458

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn axit lactic, trong đó chủng vi khuẩn axit lactic này được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966 đã được nộp lưu tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen với số hiệu lưu giữ DSM 23590, và các thể đột biến của nó tương đương về mặt chức năng có tính chịu cắt cơ học của bố mẹ.
2. Phương pháp chế biến sản phẩm sữa lên men bao gồm các bước:
 - a) cấy chủng vi khuẩn axit lactic theo điểm 1 vào sữa;
 - b) lên men sữa bằng chủng vi khuẩn axit lactic này;
 - c) tùy ý bổ sung các vi sinh vật và/hoặc các phụ gia khác vào sữa này;
 - d) tùy ý xử lý tiếp sữa này; và
 - e) tùy ý đóng gói sản phẩm sữa lên men này.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bước a) còn bao gồm bước cấy ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic khác vào sữa.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic khác bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* và/hoặc ít nhất một chủng *Lactobacillus bulgaricus*.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó bước a) bao gồm bước cấy chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC11977 đã được nộp lưu tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen với số hiệu lưu giữ DSM 22935, hoặc thể đột biến hoặc biến dị của nó, và chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966 đã được nộp lưu tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen với số hiệu lưu giữ DSM 23590, hoặc thể đột biến của nó vào sữa đã nêu.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó sữa đã nêu được xử lý tiếp bằng cách xử lý với lực cắt cao.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó xử lý với lực cắt cao là xử lý tiếp với áp suất đối kháng nằm trong khoảng từ 3 bar (300KPa) đến 15 bar (1500KPa).
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó sữa đã nêu không được xử lý tiếp mà được để yên sau khi lên men.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 8, trong đó các chất làm

ổn định, như tinh bột và pectin, không được bổ sung vào sữa này.

10. Sản phẩm sữa lên men chứa ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966 đã được nộp lưu tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen với số hiệu lưu giữ DSM 23590, và thể đột biến của nó.

11. Sản phẩm sữa lên men theo điểm 10, trong đó sản phẩm sữa lên men này là sữa chua.

12. Sản phẩm sữa lên men theo điểm 11, trong đó sữa chua là sữa chua uống.

13. Sản phẩm sữa lên men theo điểm 11, trong đó sữa chua là sữa chua truyền thống.

14. Hệ men lactic chứa ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus bulgaricus* PIM-1966 đã được nộp lưu tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen với số hiệu lưu giữ DSM 23590, và thể đột biến của nó.

15. Phương pháp sàng lọc và thu nhận chủng vi khuẩn axit lactic, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) xử lý bằng nhiệt nguyên liệu sữa gầy (0,1% chất béo, 3,2% protein);

b) làm nguội sữa đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 43°C;

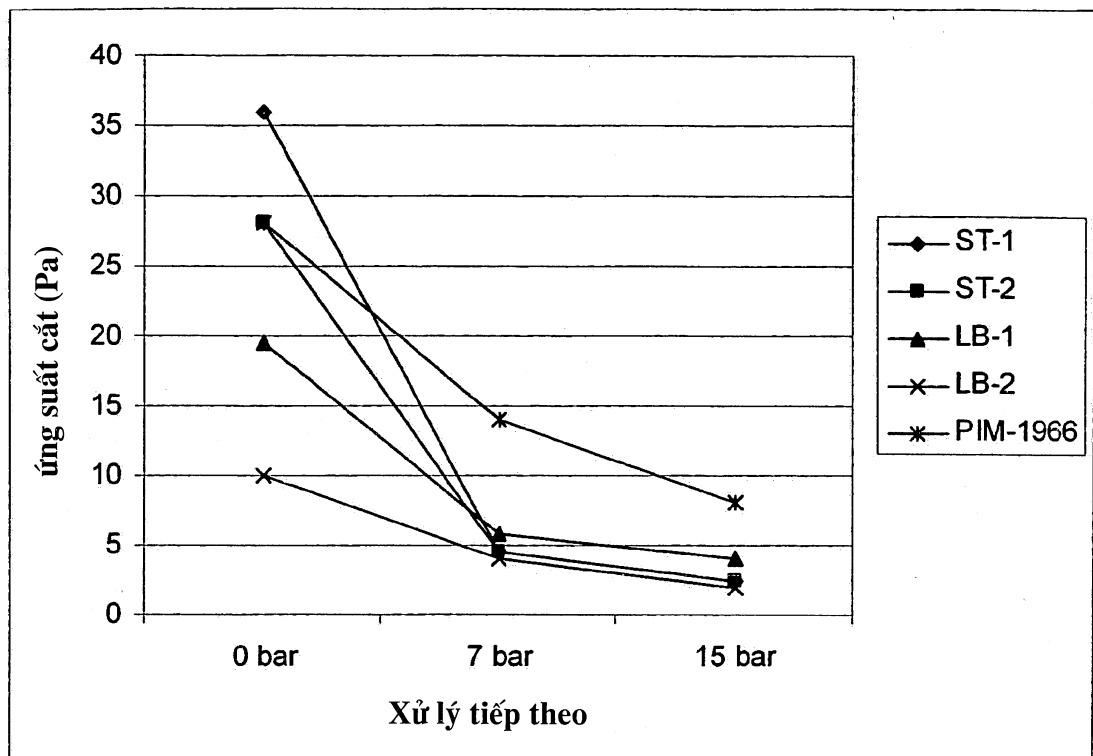
c) cấy vi khuẩn axit lactic đã nêu với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,03% F-DVS (nằm trong khoảng từ $\sim 1 \times 10^6$ CFU/g đến $\sim 3 \times 10^6$ CFU/g) vào sữa này;

d) lên men sữa bằng chủng vi khuẩn axit lactic đã nêu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 43°C đến độ pH = 4,55;

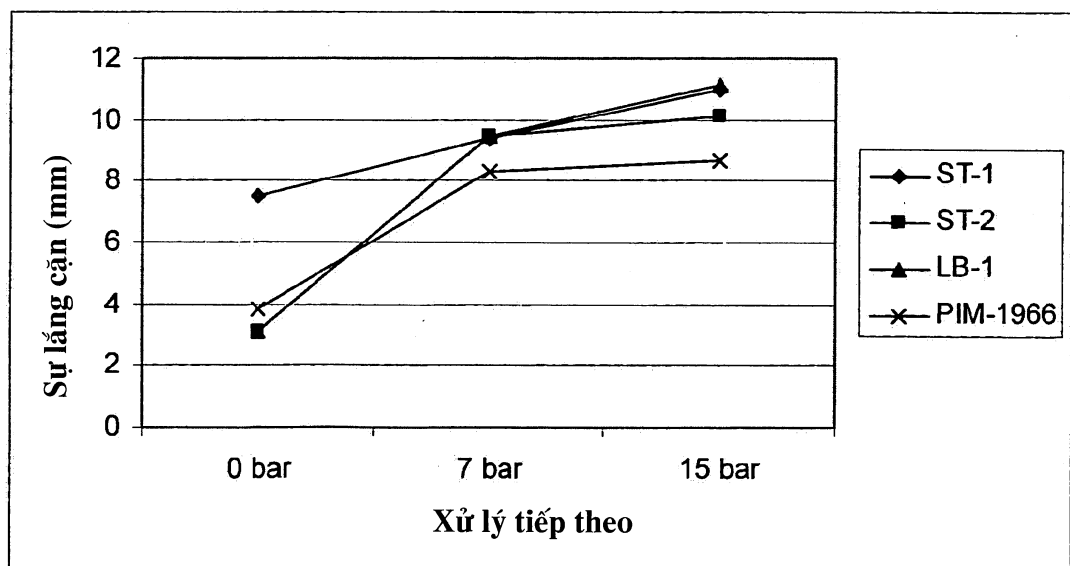
e) xử lý tiếp sữa đã lên men thu được từ bước d) trong thiết bị xử lý tiếp bao gồm thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm và van áp suất đối kháng, trong đó thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm được điều chỉnh để làm mát sữa chua đi qua hệ thống thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm/van áp suất đối kháng đến 25°C trong khoảng thời gian ngắn hơn 10 giây và van áp suất đối kháng được điều chỉnh để thu được áp suất đối kháng là 7 bar (700KPa), trong đó sữa đã lên men được cho qua hệ thống thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm/van áp suất đối kháng trong khoảng thời gian ngắn hơn 10 giây sao cho sữa chua được làm nguội đến 25°C;

f) đo ứng suất cắt sau khi xử lý tiếp; và

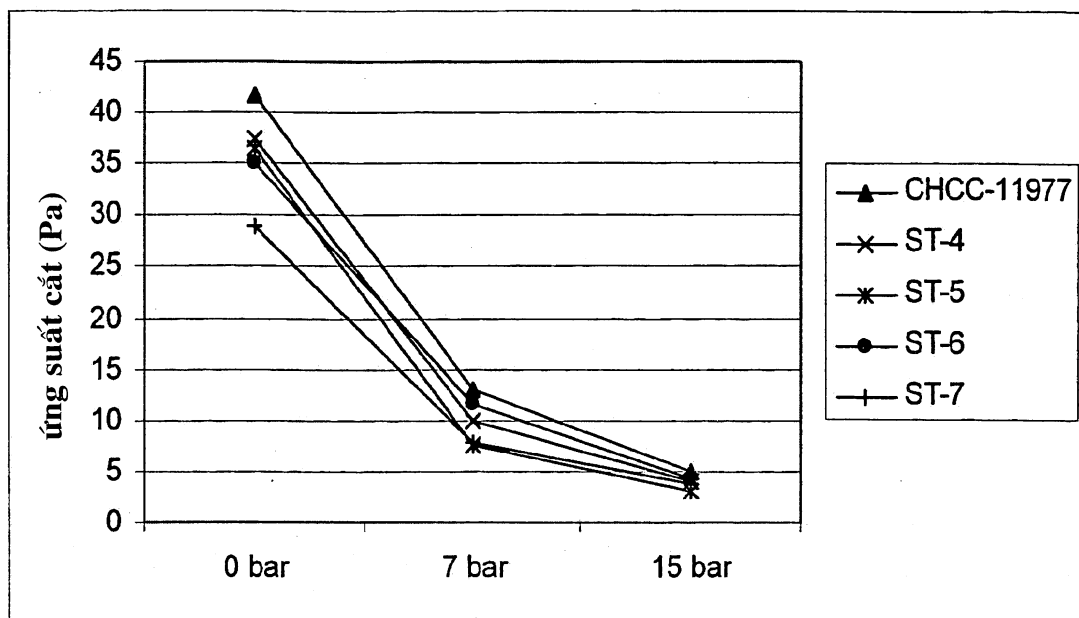
g) chọn lấy chủng vi khuẩn axit lactic này nếu sau khi xử lý tiếp ở áp suất đối kháng 7 bar (700KPa) ứng suất cắt đo được có giá trị ít nhất là khoảng 12Pa.



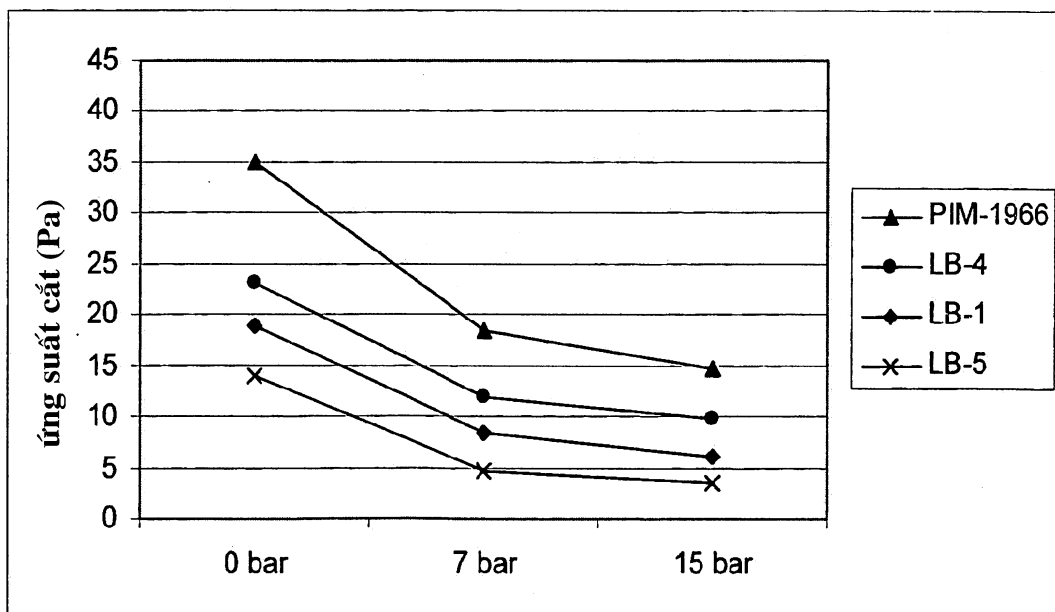
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4