



(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)



1-0026999

(51)⁷ A23L 1/30; C12N 1/20; A23C 9/123

(13) B

(21) 1-2014-02182

(22) 06/12/2012

(86) PCT/JP2012/081702 06/12/2012

(87) WO 2013/085009 A1 13/06/2013

(30) 2011-266827 06/12/2011 JP

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/09/2014 318A

(73) MEGMILK SNOW BRAND CO., Ltd. (JP)

1-1, Naebocho 6-chome, Higashi-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 065-0043 Japan

(72) FUJIMOTO, Yosuke (JP); MIURA, Mari (JP); TESHIMA, Tamaki (JP);
HARAGUCHI, Yumiko (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) THỰC PHẨM VÀ ĐỒ UỐNG CHỨA LACTOBACILLUS GASSERI CÓ KHẢ NẰNG SỐNG CAO, VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT THỰC PHẨM VÀ ĐỒ UỐNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống có độ pH thấp và hàm lượng đường cao trong đó *L. gasseri* có khả năng sống cao sau khi bảo quản trong thời gian dài. Sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống như vậy đạt được bằng cách bổ sung vi khuẩn axit lactic đặc trưng vào sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống có độ pH thấp và hàm lượng đường cao và chứa *L. gasseri*. Vi khuẩn axit lactic đặc trưng là vi khuẩn axit lactic mà có thể làm giảm độ pH tới giá trị định trước ở các điều kiện độ pH thấp và hàm lượng đường cao. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống trong đó *Lactobacillus gasseri* (cũng được gọi đơn giản là *L. gasseri*) có khả năng sống cao. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống gồm bước trộn *L. gasseri* với vi khuẩn axit lactic đặc trưng không phải là *L. gasseri*, sao cho *L. gasseri* có khả năng sống cao trong sản phẩm. Sáng chế cũng đề cập đến sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống chứa *L. gasseri* được sản xuất bằng quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các vi khuẩn axit lactic và các vi khuẩn bifidobacterium làm giảm độ pH của các thực phẩm được lên men khác nhau và cải thiện vị của chúng bởi sự lên men axit lactic. Cũng đã phát hiện ra rằng các vi khuẩn axit lactic và các vi khuẩn bifidobacterium thể hiện các hoạt tính sinh học khác nhau, như là cải thiện môi trường đường ruột và kích thích miễn dịch khi các vi khuẩn này đi vào sống trong ruột. Sữa chua, đồ uống dạng sữa được lên men, và các thực phẩm khác thể hiện chức năng nhận được từ các vi sinh vật hữu ích như là các vi khuẩn axit lactic và các vi khuẩn bifidobacterium đã được sản xuất với số lượng ngày càng nhiều, và nhu cầu đối với các thực phẩm và các đồ uống như vậy được mong muốn gia tăng với tính nổi bật liên quan đến sức khỏe.

Một thực phẩm dành riêng sử dụng trong y tế cần thể hiện bằng chứng khoa học dựa trên các thực nghiệm để được chấp thuận. Đối với các thực phẩm dành riêng sử dụng trong y tế chứa các vi sinh vật hữu ích, số lượng tế bào có thể sống được cần được đảm bảo chức năng được công bố của thực phẩm cần được nêu rõ. Yêu cầu cơ bản đối với thực phẩm như vậy là ở chỗ số lượng tế bào

định trước hoặc nhiều hơn sẽ sống được trong thực phẩm trong phạm vi tốt nhất trước thời hạn sử dụng. Ngay cả trong các thực phẩm không phải là các thực phẩm dành riêng sử dụng trong y tế, sự kiểm soát chất lượng để duy trì số lượng tế bào có thể sống được trong thực phẩm là rất quan trọng.

Tuy nhiên, một số vi khuẩn có thể bị ảnh hưởng bởi môi trường trong thực phẩm, như là độ pH và áp suất thẩm lọc, dễ dàng chết trong khi bảo quản thực phẩm. Điều này thường dẫn đến những khó khăn trong việc duy trì và kiểm soát số lượng tế bào có thể sống được.

Đã biết rằng các vi khuẩn bifidobacterium, chẳng hạn, dễ bị ảnh hưởng bởi hàm lượng oxy trong thực phẩm và độ pH của nó. Để cải thiện khả năng sống của chúng, các phương pháp dưới đây được sử dụng. Theo một phương pháp, chất chiết không chứa tế bào của vi sinh vật dương tính catalaza không gây hại về mặt vệ sinh được bổ sung vào thực phẩm dạng lỏng hoặc nhão để ngăn chặn sự giảm về số lượng các vi khuẩn bifidobacterium trong khi bảo quản thực phẩm (xem tài liệu sáng chế 1). Theo phương pháp khác, các vi khuẩn bifidobacterium được trộn với *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, và hỗn hợp được ủ để sản xuất sữa được lên men (xem tài liệu sáng chế 2).

L. gasseri là một trong số các vi khuẩn axit lactic mà là các vi sinh vật hữu ích được sử dụng cho các thực phẩm, cũng như các vi khuẩn bifidobacterium. Tương tự các vi khuẩn bifidobacterium, *L. gasseri* cũng dễ chết trong một số điều kiện môi trường trong thực phẩm, và sự cải thiện về khả năng sống cũng cần thiết. Theo phương pháp đã biết để cải thiện khả năng sống của *L. gasseri*, *L. gasseri* được trộn với vi khuẩn axit lactic có khả năng chống oxy hóa cao, và hỗn hợp được ủ để tăng cường khả năng sống của *L. gasseri* sau khi thực phẩm được bảo quản ở các nhiệt độ thấp (xem tài liệu phi sáng chế 1).

Tài liệu liên quan trong lĩnh vực kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm số 61-52253

Tài liệu sáng chế 2: Patent Nhật Bản số 3068484

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: "Sanzo Sutoresuni Chakumokushita Nyuusankin Teionseizonsei Koujono Kokoromi (Attempts to Improve Low-Temperature Survivability of Lactic Acid Bacteria Focusing on Oxygen Stress)", The 2010 Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry, 2AOp04

Tuy nhiên, sự giảm về độ pH, áp suất thẩm lọc, và sự mất cân bằng oxy hóa tác động tổng hợp lên các thực phẩm như là sữa được lên men, và khả năng sống của *L. gasseri* không thể được cải thiện đầy đủ chỉ bằng cách loại bỏ sự mất cân bằng oxy hóa bằng cách trộn *L. gasseri* với vi khuẩn axit lactic có khả năng chống oxy hóa cao và nuôi cấy hỗn hợp.

Bảng 1 thể hiện các kết quả kiểm tra về hiệu quả của việc loại bỏ sự mất cân bằng oxy hóa đối với khả năng sống khi bảo quản của *L. gasseri*. Bảng 1 chỉ ra số lượng của *L. gasseri* (CFU/g) trong huyền phù của các tế bào *L. gasseri* được rửa trong dung dịch đệm glucoza 1% và axit lactic 0,3M ở độ pH là 3,7 bằng với số lượng *L. gasseri* (CFU/g) trong huyền phù của các đồ uống sữa được lên men, huyền phù chứa L-xystein hydroclorua là tác nhân khử để loại bỏ sự mất cân bằng oxy hóa, và trong huyền phù khác có cùng hợp phần nhưng không chứa L-xystein hydroclorua, sau khi bảo quản ở 10°C.

Các kết quả chứng minh rằng huyền phù có sự mất cân bằng oxy hóa giảm đi bằng sự bổ sung L-xystein hydroclorua thể hiện khả năng sống của *L. gasseri* được cải thiện chút ít so với huyền phù không có sự mất cân bằng oxy hóa giảm đi. Số lượng *L. gasseri* sống sót chỉ là $2,6 \times 10^3$ CFU/g sau khi bảo quản trong 21 ngày. Số lượng như vậy là không đủ để *L. gasseri* thể hiện hiệu

quả của nó như là vi sinh vật hữu ích.

Bảng 1

	Ngày bảo quản			
	Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 21
L-xystein hydroclorua 0,05% không được bổ sung	$1,4 \times 10^8$	$3,5 \times 10^6$	$9,2 \times 10^4$	$8,5 \times 10^2$
L-xystein hydroclorua 0,05% được bổ sung	$1,4 \times 10^8$	$5,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	$2,6 \times 10^3$

Số lượng vi khuẩn *L. gasseri* (CFU/g)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Cách thức giải quyết vấn đề

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống có độ pH thấp và hàm lượng đường cao và thể hiện khả năng sống cao của *L. gasseri* ngay cả sau khi bảo quản trong thời gian dài.

Sáng chế bao gồm các khía cạnh dưới đây.

(1) Quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống chứa *Lactobacillus gasseri*,

sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống có độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 4,5 và hàm lượng đường nằm trong khoảng từ 5% đến 15%,

quy trình này bao gồm bước trộn *Lactobacillus gasseri* với vi khuẩn axit lactic đặc trưng,

trong đó vi khuẩn axit lactic đặc trưng có thể làm giảm độ pH của môi trường nuôi cấy khoảng 0,1 hoặc nhiều hơn sau khi vi khuẩn axit lactic được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chứa 3% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 10% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza và có độ pH là 4,0, và được nuôi cấy tĩnh ở 10°C trong 21 ngày.

(2) Quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo khía cạnh (1), trong đó vi khuẩn axit lactic đặc trưng là chủng được lựa chọn từ *Lactobacillus*

paracasei, *Lactobacillus plantarum*, và *Lactobacillus buchneri*.

(3) Quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo khía cạnh (1) hoặc (2), trong đó *Lactobacillus paracasei* là chủng được lựa chọn từ SBT0327 (NITE ABP-1129), SBT2105 (NITE P-1130), SBT2203 (NITE ABP-1131), SBT2215 (NITE ABP-1132), SBT11408 (NITE ABP-1133), và ATCC25598, *Lactobacillus plantarum* là chủng được lựa chọn từ SBT1534 (FERM ABP-11518), SBT0624 (FERM P-11920), ATCC43199, và ATCC8014, và *Lactobacillus buchneri* là chủng được lựa chọn từ SBT2028 (FERM P-11921) và JCM1115,

(4) Quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ (1) đến (3), trong đó sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống này chứa sữa được lên men và các đồ uống sữa được lên men.

(5) Sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm *Lactobacillus gasseri* và vi khuẩn axit lactic đặc trưng và có độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 4,5 và hàm lượng đường nằm trong khoảng từ 5% đến 15%,

trong đó vi khuẩn axit lactic đặc trưng có thể làm giảm độ pH của môi trường nuôi cấy 0,1 hoặc nhiều hơn sau khi vi khuẩn axit lactic được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chứa 3% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 10% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza và có độ pH là 4,0, và được nuôi cấy tĩnh ở 10°C trong 21 ngày.

(6) Sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo khía cạnh (5), trong đó *Lactobacillus gasseri* sau khi bảo quản trong 21 ngày có số lượng tế bào có thể sống được là 1×10^6 CFU/g hoặc cao hơn.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế có thể tạo ra sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống có độ pH thấp và hàm lượng đường cao và thể hiện khả năng sống cao đáng kể của *L. gasseri* ngay cả sau khi bảo quản trong thời gian dài. Do đó, thực phẩm giữ được đầy đủ

chức năng của *L. gasseri* như là vi sinh vật hữu ích.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế, những người đã tiến hành nghiên cứu kỹ lưỡng để giải quyết các vấn đề nêu trên, đã phát hiện ra rằng việc trộn *L. gasseri* với vi khuẩn axit lactic đặc trưng có thể tăng cường khả năng sống của *L. gasseri* trong sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống có độ pH thấp và hàm lượng đường cao trong khi bảo quản và đã hoàn thành sáng chế.

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống, bao gồm bước bổ sung vi khuẩn axit lactic đặc trưng vào thực phẩm chứa *L. gasseri* có độ pH thấp và hàm lượng đường cao và trộn chúng lại. Vi khuẩn axit lactic có thể làm giảm độ pH của thực phẩm khoảng 0,1 hoặc nhiều hơn sau khi vi khuẩn axit lactic được bổ sung vào 3% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên có độ pH là 4,0 và 10% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza, và được lưu giữ ở 10°C trong 21 ngày.

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống chứa *Lactobacillus gasseri*, trong đó vi khuẩn axit lactic đặc trưng được trộn với *L. gasseri* trong thực phẩm có độ pH thấp và hàm lượng đường cao.

“Độ pH thấp” của sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế là nằm trong khoảng từ 3,5 đến 4,5, và “hàm lượng đường cao” là từ 5% đến 15%. Độ pH ưu tiên là từ 3,6 đến 4,2, ưu tiên hơn là từ 3,7 đến 4,0, và ưu tiên nhất là 3,8. Hàm lượng đường là từ 10% đến 15%, ưu tiên hơn là 12% đến 14%, và ưu tiên nhất là 12,7%.

Sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế có thể là bất kỳ sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống có độ pH thấp và hàm lượng đường cao nằm trong khoảng này. Sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sữa, các sản phẩm sữa, các sản phẩm sữa được lên men, các đồ uống làm từ rau, và các đồ uống làm từ trái cây. Trong số các sản phẩm này, được ưu

tiên là sữa được lên men và các đồ uống dạng sữa được lên men, chẳng hạn, được nêu trong tài liệu Quy định về các tiêu chuẩn tổng hợp liên quan đến sữa và các sản phẩm sữa (Ministerial Ordinance on Milk and Milk products Concerning Compositional Standards).

L. gasseri trong sáng chế có thể là bất kỳ chủng nào thuộc loài *Lactobacillus gasseri*, và các ví dụ về chúng bao gồm SBT2055 (FERM BP-10953), SBT2056 (FERM BP-11038), SBT0274 (FERM BP-11039), SBT1703 (FERM P-17785), SBT10239 (FERM P-16639), và SBT10241 (FERM P-17786).

Theo sáng chế, vi khuẩn axit lactic đặc trưng được trộn với *L. gasseri* có thể là bất kỳ vi khuẩn axit lactic để cải thiện khả năng sống của *L. gasseri*. Các ví dụ về vi khuẩn axit lactic như vậy bao gồm các vi khuẩn axit lactic mà có thể làm giảm độ pH của môi trường nuôi cấy 0,1 hoặc nhiều hơn sau khi vi khuẩn axit lactic được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chứa 3% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 10% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza ở độ pH là 4,0, và được nuôi cấy tĩnh ở 10°C trong 21 ngày. Các vi khuẩn axit lactic có các đặc trưng như vậy có thể thu được bằng cách sàng lọc các vi khuẩn axit lactic mà có thể làm giảm độ pH của môi trường nuôi cấy 0,1 hoặc nhiều hơn sau khi vi khuẩn axit lactic được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chứa 3% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 10% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza ở độ pH là 4,0, và được nuôi cấy tĩnh ở 10°C trong 21 ngày. Các ví dụ cụ thể về chúng bao gồm *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, và *Lactobacillus buchneri*. Như được thể hiện trong Ví dụ 2 được mô tả dưới đây, tỷ lệ giảm độ pH thu được từ sự chuyển hóa là tỷ lệ nghịch với khả năng sống của *L. gasseri* nếu số lượng của các vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* cần được bổ sung thay đổi. Điều này gợi ý rằng ưu tiên là số lượng các vi khuẩn axit lactic đặc trưng được trộn với *Lactobacillus*

gasseri lớn hơn. Khả năng sống của *L. gasseri* có thể được cải thiện bằng cách trộn *L. gasseri* với 0,001% vi khuẩn axit lactic đặc trưng của *L. gasseri* hoặc nhiều hơn, ưu tiên là 0,01% hoặc nhiều hơn, chẳng hạn. Không có hiệu quả có lợi nào đạt được bởi các tế bào chết của *Lactobacillus paracasei*, điều này gợi ý rằng hiệu quả cải thiện khả năng sống của *L. gasseri* tương quan với hoạt động chuyển hóa ở các điều kiện mất cân bằng, đó là, nhiệt độ thấp, độ pH thấp, và hàm lượng đường cao. Cách thức sàng lọc bằng cách sử dụng một chỉ số để xem vi khuẩn axit lactic đặc trưng có làm giảm độ pH với mức định trước hoặc nhiều hơn ở các điều kiện chứa 3% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 10% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza ở độ pH là 4,0 hay không.

Các ví dụ về vi khuẩn axit lactic đặc trưng được trộn với *Lactobacillus gasseri* bao gồm, nhưng không giới hạn ở *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, và *Lactobacillus buchneri*. Vi khuẩn axit lactic đặc trưng có thể là bất kỳ vi khuẩn axit lactic mà có thể làm giảm độ pH của môi trường nuôi cấy khoảng 0,1 hoặc nhiều hơn sau khi vi khuẩn axit lactic được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chứa 3% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 10% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza ở độ pH là 4,0, và được nuôi cấy tĩnh ở 10°C trong 21 ngày.

Các ví dụ về *Lactobacillus paracasei* bao gồm SBT0327 (NITE ABP-1129), SBT2105 (NITE P-1130), SBT2203 (NITE ABP-1131), SBT2215 (NITE ABP-1132), SBT11408 (NITE ABP-1133), và ATCC25598. Các ví dụ về *Lactobacillus plantarum* bao gồm SBT1534 (FERM ABP-11518), SBT0624 (FERM P-11920), ATCC43199, và ATCC8014. Các ví dụ về *Lactobacillus buchneri* bao gồm SBT2028 (FERM P-11921) và JCM1115,

Trong quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế, các ví dụ về bước trộn *L. gasseri* với vi khuẩn axit lactic đặc trưng bao

gồm:

(1) Bổ sung *L. gasseri* vào môi trường nuôi cấy là sữa chưa được lên men để tiến hành lên men, và bổ sung vi khuẩn axit lactic đặc trưng vào sản phẩm được lên men;

(2) Bổ sung vi khuẩn axit lactic đặc trưng vào môi trường nuôi cấy là sữa chưa được lên men để tiến hành lên men, và bổ sung *L. gasseri* vào sản phẩm được lên men;

(3) Bổ sung đồng thời hoặc lần lượt *L. gasseri* và vi khuẩn axit lactic đặc trưng vào môi trường nuôi cấy là sữa chưa được lên men để tiến hành lên men; và

(4) Bổ sung đồng thời hoặc lần lượt *L. gasseri* và vi khuẩn axit lactic đặc trưng vào sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống không phải là sản phẩm được lên men bằng vi khuẩn axit lactic.

Sự cải thiện về khả năng sống của *L. gasseri* theo sáng chế đạt được trong sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống được sản xuất bởi bước trộn bất kỳ nêu trên. Trong số các bước này, các bước (2) và (4) là được ưu tiên. Đối với sự bổ sung *L. gasseri* và vi khuẩn axit lactic đặc trưng vào sản phẩm sữa được lên men, các ví dụ về vi khuẩn axit lactic được sử dụng để lên men có thể bao gồm *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus* được ưu tiên sử dụng.

Phương án khác theo sáng chế là sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống được sản xuất bởi quy trình sản xuất. Sản phẩm chứa *L. gasseri* và vi khuẩn axit lactic đặc trưng và có độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 4,5 và hàm lượng đường nằm trong khoảng từ 5% đến 15%. Số lượng các vi khuẩn *L. gasseri* còn sống trong sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế là lớn hơn đáng kể so với số lượng các vi khuẩn *L. gasseri* còn sống trong sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống không chứa vi khuẩn axit lactic đặc trưng, và sự gia tăng về số

lượng của các vi khuẩn *L. gasseri* còn sống trong hai trường hợp đạt 10 lần sau một tuần, từ 1000 tới 10000 lần sau hai tuần, và từ 1000 tới 10000 lần sau ba tuần. Số lượng của các vi khuẩn *L. gasseri* còn sống trong sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống là 1×10^6 CFU/g hoặc nhiều hơn sau khi *L. gasseri* được bổ sung vào sản phẩm và sản phẩm này được bảo quản trong 21 ngày.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây dựa trên các Ví dụ về sản phẩm sữa được lên men, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó.

Ví dụ thử nghiệm 1: Sàng lọc các vi khuẩn axit lactic được trộn với *L. gasseri* (1)

Thử nghiệm sàng lọc được thực hiện để chọn lọc vi khuẩn axit lactic được trộn với *L. gasseri* trong sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế.

(1) Quy trình

Bột sữa tách béo và glucoza được hòa tan trong nước để tạo ra môi trường nuôi cấy chứa 3% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 10% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza. Môi trường nuôi cấy được tiệt trùng ở nhiệt độ 115°C trong 20 phút. Axit lactic được tiệt trùng bằng cách lọc được bổ sung vào môi trường nuôi cấy được tiệt trùng, và độ pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh tới khoảng 4,0 để tạo ra môi trường nuôi cấy cho sự sàng lọc. Các môi trường nuôi cấy mầm 3% (được thể hiện trên Bảng 2) được nuôi cấy trong các môi trường nuôi cấy là sữa được cấy lần lượt vào các phần môi trường nuôi cấy để sàng lọc, và các chủng được nuôi cấy tĩnh ở 10°C trong 21 ngày. Độ pH của môi trường nuôi cấy để sàng lọc được đo, và các chủng làm giảm độ pH khoảng 0,1 hoặc nhiều hơn được lựa chọn.

(2) Các kết quả

Số lượng ban đầu của mỗi vi khuẩn axit lactic và độ pH của môi trường

nuôi cấy sau khi bảo quản được thể hiện trên Bảng 2. Bảng 2 chỉ ra rằng độ pH của môi trường nuôi cấy chứa *Lactobacillus paracasei* giảm 0,1 hoặc nhiều hơn. Ngược lại, chủng đối chứng, tức là, *L. delbreuckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, và *Lactobacillus rhamnosus* không làm giảm độ pH đi 0,1 hoặc nhiều hơn. Trong số các vi khuẩn này, *Lactobacillus paracasei* được lựa chọn là vi khuẩn axit lactic cần được trộn với *L. gasseri*.

Bảng 2

	Số lượng tế bào sống vào ngày 0 [CFU/g]	Độ pH vào ngày 0 trong quá trình bảo quản (pH ₀)	Độ pH vào ngày 21 trong quá trình bảo quản (pH ₂₁)	pH ₀ - pH ₂₁
<i>L. paracasei</i> SBT0327	3,5 x 10 ⁷	4,04	3,92	0,12
<i>L. paracasei</i> SBT2203	3,8 x 10 ⁷	4,03	3,91	0,12
<i>L. delbreuckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i> (NBRC P-13953)	2,9 x 10 ⁷	4,01	3,99	0,02
<i>L. helveticus</i> (NBRC P-15019)	2,9 x 10 ⁷	3,96	3,89	0,07
<i>L. johnsonii</i> (ATCC 33200)	1,6 x 10 ⁷	4,01	3,99	0,02
<i>L. rhamnosus</i> (NBRC P-3425)	2,1 x 10 ⁷	4,08	4,05	0,03

Ví dụ thử nghiệm 2: Sàng lọc vi khuẩn axit lactic được trộn với *L. gasseri* (1)

Ngoài Ví dụ thử nghiệm 1, thử nghiệm sàng lọc khác được thực hiện đối với các vi khuẩn axit lactic mà có thể làm giảm độ pH của môi trường nuôi cấy khoảng 0,1 hoặc nhiều hơn sau khi vi khuẩn axit lactic được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở độ pH 4,0 chứa 3% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 10% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza, và được nuôi cấy tĩnh ở 10°C trong 21 ngày. *Lactobacillus paracasei* ATCC25598, *Lactobacillus plantarum* ATCC43199, *Lactobacillus plantarum* ATCC8014, và

Lactobacillus buchneri JCM1115 được lựa chọn. Số lượng ban đầu của mỗi vi khuẩn axit lactic và độ pH của môi trường nuôi cấy sau khi bảo quản được thể hiện trên Bảng 3. Sự sàng lọc được thực hiện bằng cách thức tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 1.

Bảng 3

	Số lượng tế bào sống vào ngày 0 [CFU/g]	Độ pH vào ngày 0 trong quá trình bảo quản (pH ₀)	Độ pH vào ngày 21 trong quá trình bảo quản (pH ₂₁)	pH ₀ - pH ₂₁
<i>L. paracasei</i> ATCC25598	3,5 x 10 ⁷	4,04	3,92	0,12
<i>L. plantarum</i> ATCC43199	3,7 x 10 ⁷	4,01	3,88	0,13
<i>L. plantarum</i> ATCC8014	3,6 x 10 ⁷	3,96	3,85	0,11
<i>L. buchneri</i> JCM1115	3,7 x 10 ⁷	4,01	3,89	0,12
<i>L. delbreuckii</i> ssp. Bulgaricus NBRC P-13953	2,9 x 10 ⁷	4,02	4,00	0,02

Ví dụ 1: Kiểm tra khả năng sống được cải thiện của *L. gasseri* trong hỗn hợp với *Lactobacillus paracasei*

Lactobacillus paracasei được lựa chọn trong thử nghiệm sàng lọc trong Ví dụ thử nghiệm 1 được trộn với *L. gasseri* để kiểm tra sự gia tăng khả năng sống của *L. gasseri*.

(1) Sản xuất các đồ uống sữa được lên men theo sáng chế

Bột sữa tách béo và glucoza được hòa tan trong nước để tạo ra môi trường nuôi cấy chứa 16% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 3% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza. Môi trường nuôi cấy được tiệt trùng ở 95°C trong 120 phút. Môi trường nuôi cấy được tiệt trùng được làm nguội tới 37°C, và 3% (thể tích/thể tích) các môi trường nuôi cấy mầm của

Lactobacillus paracasei (SBT0327, SBT2105, SBT2203, SBT2215, và SBT11408) được bổ sung lần lượt vào các phần của môi trường nuôi cấy. Các chủng được nuôi cấy ở 37°C đến khi độ pH đạt khoảng 3,7. Các sản phẩm được lên men *Lactobacillus paracasei* được tạo ra.

3% (trọng lượng/trọng lượng) sirô đường được đồng phân hóa và 14% (trọng lượng/trọng lượng) sirô đường được tinh luyện được điều chế với nước, và được tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút để tạo ra sirô đường (hàm lượng đường: 16%).

Sirô đường thu được (36g), sản phẩm được lên men *Lactobacillus paracasei* (9g), và huyền phù huyền phù tế bào được cô đặc (0,5g) của *L. gasseri* SBT2055 được trộn để sản xuất các đồ uống dạng sữa được lên men từ 1 tới 5 theo sáng chế có độ pH là 3,8 và hàm lượng đường là 12,7%.

(2) Sản xuất đồ uống sữa được lên men đối chứng

Đồ uống sữa được lên men đối chứng chỉ chứa *L. gasseri* và không được trộn với *Lactobacillus paracasei* được tạo ra. Axit lactic được tiệt trùng bằng cách lọc được bổ sung vào môi trường nuôi cấy được tiệt trùng trong phần (1), và độ pH được điều chỉnh đến khoảng 3,7. Sản phẩm được sử dụng dưới dạng sữa được lên men nhân tạo. Sữa được lên men nhân tạo (9g), sirô đường (36g) được sản xuất trong phần (1), và huyền phù huyền phù tế bào được cô đặc (0,5 g) của *L. gasseri* SBT2055 sau đó được trộn để sản xuất đồ uống sữa được lên men đối chứng.

(3) Đo tỷ lệ sống và các kết quả

Các đồ uống sữa được lên men từ 1 tới 5 theo sáng chế và mỗi đồ uống sữa được lên men đối chứng được đặt trong hộp chứa bằng nhựa, và được bảo quản ở 10°C trong 21 ngày. Các số lượng tế bào có thể sống được của *L. gasseri* và *Lactobacillus paracasei* của các đồ uống tương ứng được đo theo thời gian. Số lượng tế bào có thể sống được ở ngày 21 được chia cho số lượng tế bào có

thể sống được ở ngày 0 để xác định tỷ lệ sống (tương tự như trong thử nghiệm dưới đây). Các kết quả được thể hiện trên Bảng 4.

Các kết quả cho thấy rằng tất cả các đồ uống sữa được lên men từ 1 tới 5 theo sáng chế chứa *L. gasseri* và *Lactobacillus paracasei* chứa số lượng các vi khuẩn *L. gasseri* còn sống lớn hơn so với trong đồ uống sữa được lên men đối chứng chỉ chứa *L. gasseri* và không được trộn với *Lactobacillus paracasei*. Số lượng tế bào có thể sống được của *Lactobacillus gasseri* sau khi bảo quản trong 21 ngày là 1×10^6 CFU/g hoặc nhiều hơn trong tất cả các đồ uống dạng sữa được lên men từ 1 tới 5.

Các kết quả này chỉ ra rằng khả năng sống của *L. gasseri* được cải thiện đáng kể bằng cách được trộn với vi khuẩn axit lactic mà có thể làm giảm độ pH của môi trường nuôi cấy 0,1 hoặc nhiều hơn sau khi vi khuẩn axit lactic được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chứa 3% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 10% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza ở độ pH là 4,0, và được nuôi cấy ở 10°C trong 21 ngày.

Bảng 4

		Ngày bảo quản (CFU/g)				Tỷ lệ sống
		Ngày 0	Ngày 7	Ngày 16	Ngày 21	Ngày 21
Đối chứng	<i>L. gasseri</i>	$1,8 \times 10^8$	$1,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$ hoặc ít hơn	0,0006% hoặc ít hơn
	<i>L. paracasei</i>	-	-	-	-	-
Đồ uống dạng sữa được lên men 1	<i>L. gasseri</i>	$1,7 \times 10^8$	$6,2 \times 10^7$	$2,7 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	2,5%
	<i>L. paracasei</i> SBT0327	$4,2 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	-

Đồ uống dạng sữa được lên men 2	<i>L. gasseri</i>	$1,8 \times 10^8$	$5,7 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	1,4%
	<i>L. paracasei</i> SBT2105	$6,3 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$6,4 \times 10^8$	-
Đồ uống dạng sữa được lên men 3	<i>L. gasseri</i>	$1,8 \times 10^8$	$5,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$3,6 \times 10^6$	2,0%
	<i>L. paracasei</i> SBT2203	$4,2 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$4,9 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	-
Đồ uống dạng sữa được lên men 4	<i>L. gasseri</i>	$1,3 \times 10^8$	$7,0 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	4,3%
	<i>L. paracasei</i> SBT2215	$4,5 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	-
Đồ uống dạng sữa được lên men 5	<i>L. gasseri</i>	$1,6 \times 10^8$	$6,3 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$7,9 \times 10^6$	4,9%
	<i>L. paracasei</i> SBT11408	$4,5 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	-

Ví dụ 2: Kiểm tra khả năng sống được cải thiện của *L. gasseri* trong hỗn hợp với *Lactobacillus paracasei*

Các hiệu quả của *Lactobacillus paracasei* đối với khả năng sống của *L. gasseri* được kiểm tra trong hai trường hợp dưới đây: (1) Các số lượng khác biệt của các vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* được trộn với *L. gasseri*, và (2) các tế bào chết của *Lactobacillus paracasei* được trộn với *L. gasseri*.

(1) Sản xuất các đồ uống sữa được lên men theo sáng chế

Bột sữa tách béo và glucoza được hòa tan trong nước để tạo ra môi trường nuôi cấy chứa 16% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 3% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza. Môi trường nuôi cấy

được tiệt trùng ở 95°C trong 120 phút. Axit lactic được tiệt trùng bằng lọc được bổ sung vào môi trường nuôi cấy được tiệt trùng, và độ pH được điều chỉnh tới xấp xỉ 4,0 để tạo ra sữa được lên men nhân tạo. Các tế bào *Lactobacillus paracasei* SBT11408 được rửa được tạo huyền phù trong sữa được lên men nhân tạo. Sữa được lên men nhân tạo được pha loãng 10 lần, 100 lần, và 1000 lần để tạo ra ba loại sữa được lên men nhân tạo từ 1 tới 3 chứa *Lactobacillus paracasei* và có các số lượng các vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* khác biệt. Các tế bào *L. gasseri* SBT2055 được rửa được tạo huyền phù trong sữa tách chất béo được hoàn nguyên 12,6%, và huyền phù được sử dụng.

3% (trọng lượng/trọng lượng) sirô đường được đồng phân hóa và 14% (trọng lượng/trọng lượng) sirô đường được tinh luyện được tạo ra bằng nước, và được tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút để tạo ra sirô đường (hàm lượng đường: 16%).

Mỗi loại (9g) sữa được lên men nhân tạo từ 1 tới 3 sau đó được trộn với sirô đường (36g) và các tế bào được rửa (0,5g) của *L. gasseri* SBT2055 để sản xuất các đồ uống dạng sữa được lên men từ 5 tới 7 theo sáng chế có độ pH là 3,8 và hàm lượng đường là 12,7%, và chứa các số lượng khác biệt *Lactobacillus paracasei*.

(2) Sản xuất các đồ uống sữa được lên men đối chứng

Sữa được lên men nhân tạo (9g) được sản xuất trong phần (1), sirô đường (36g), và các tế bào được rửa (0,5g) của *L. gasseri* SBT2055 được trộn để sản xuất đồ uống dạng sữa được lên men không chứa *Lactobacillus paracasei* (đối chứng 1).

Sữa được lên men nhân tạo chứa xấp xỉ 1×10^7 CFU/g *Lactobacillus paracasei* được tiệt trùng ở 80°C hoặc nhiều hơn trong 30 phút để sản xuất đồ uống dạng sữa được lên men (đối chứng 2).

(3) Đo tỷ lệ sống và các kết quả

Các đồ uống sữa được lên men từ 5 tới 7 theo sáng chế và các đồ uống dạng sữa được lên men đối chứng (các mẫu đối chứng 1 và 2) mỗi loại được đặt trong hộp chứa bằng nhựa, và được bảo quản ở 10°C trong 21 ngày. Các số lượng tế bào có thể sống được của *L. gasseri* và *Lactobacillus paracasei* được đo theo thời gian. Các kết quả được thể hiện trên Bảng 5.

Các kết quả cho thấy rằng khả năng sống của *L. gasseri* được cải thiện đáng kể trong các đồ uống sữa được lên men theo sáng chế chứa 1×10^7 CFU/g hoặc nhiều hơn *Lactobacillus paracasei*. Các đồ uống sữa được lên men theo sáng chế thể hiện các hiệu quả có lợi ở độ pH là 4,0 trong khi các tế bào chết *Lactobacillus paracasei* không đạt được hiệu quả nào.

Bảng 5

	Ngày 0 trong quá trình bảo quản			Ngày 21 trong quá trình bảo quản			
	Số lượng <i>L. paracasei</i>	Số lượng <i>L. gasseri</i>	Độ pH	Số lượng <i>L. paracasei</i>	Số lượng <i>L. gasseri</i>	Độ pH	Tỷ lệ sống
Đối chứng 1	-	$7,1 \times 10^7$	4,03	-	$2,6 \times 10^4$	3,97	0,04%
Đối chứng 2	- (các tế bào chết)	$5,2 \times 10^7$	4,01	- (các tế bào chết)	$1,8 \times 10^4$	3,98	0,04%
Đồ uống sữa được lên men 5	$4,9 \times 10^5$	$3,8 \times 10^7$	4,02	$2,5 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$	3,99	0,06%
Đồ uống sữa được lên men 6	$3,5 \times 10^6$	$4,2 \times 10^7$	4,01	$2,8 \times 10^6$	$8,8 \times 10^4$	3,92	0,21%
Đồ uống sữa được lên men 7	$4,0 \times 10^7$	$7,7 \times 10^7$	4,06	$1,8 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	3,77	1,60%

Số lượng các tế bào (CFU/g)

Ví dụ 3: Kiểm tra khả năng sống được cải thiện của *L. gasseri* trong hỗn hợp với *Lactobacillus paracasei* trong sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống có hàm lượng đường là từ 5 tới 15%

(1) Sản xuất các đồ uống dạng sữa được lên men theo sáng chế

Bột sữa tách béo và glucoza được hòa tan trong nước để tạo ra môi trường nuôi cấy 16% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên. Môi trường nuôi cấy được tiệt trùng ở 115°C trong 20 phút. Axit lactic được tiệt trùng bằng lọc được bổ sung vào môi trường nuôi cấy được tiệt trùng, và độ pH được điều chỉnh tới xấp xỉ 3,5 để tạo ra sữa được lên men nhân tạo. Các tế bào *Lactobacillus paracasei* SBT11408 đã rửa được bổ sung vào sữa được lên men nhân tạo để tạo ra sữa được lên men nhân tạo chứa *Lactobacillus paracasei*. Các tế bào *L. gasseri* SBT2055 đã rửa được tạo huyền phù với 12,6% sữa tách chất béo được hoàn nguyên, và huyền phù được sử dụng. Các dung dịch nước glucoza có hàm lượng đường cuối cùng là 5%, 10%, và 15%, tương ứng, được sản xuất, và được tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút để tạo ra các sirô đường. Sữa được lên men nhân tạo chứa *Lactobacillus paracasei* (9g), sirô đường (36g), và các tế bào được rửa (0,5 g) của *L. gasseri* SBT2055 sau đó được trộn để sản xuất các đồ uống sữa được lên men từ 8 tới 10 theo sáng chế có các hàm lượng glucoza khác nhau.

(2) Sản xuất các đồ uống sữa được lên men đối chứng

Sữa được lên men nhân tạo (9g) được sản xuất trong phần (1), các tế bào được rửa (0,5 g) của *L. gasseri* SBT2055, và sirô đường (hàm lượng đường cuối cùng: 5%, 10%, và 15%) được trộn để sản xuất các đồ uống sữa được lên men đối chứng.

(3) Đo tỷ lệ sống và các kết quả

Các đồ uống sữa được lên men từ 8 đến 10 theo sáng chế và các đồ uống sữa được lên men đối chứng, mỗi loại được cho vào trong hộp chứa bằng nhựa, và được bảo quản ở 10°C trong 21 ngày. Số lượng tế bào sống sót của *L. gasseri* và *Lactobacillus paracasei* được đo theo thời gian. Các kết quả được thể hiện trên Bảng 6.

Các đồ uống sữa được lên men theo sáng chế có các hàm lượng glucoza

từ 5% đến 15%, tương ứng, và chứa 1×10^7 CFU/g hoặc nhiều hơn *Lactobacillus paracasei* có khả năng sống được cải thiện của *Lactobacillus gasseri*. Số lượng tế bào có thể sống được của *Lactobacillus gasseri* sau khi bảo quản trong 21 ngày là 1×10^6 CFU/g hoặc nhiều hơn. Hiệu quả là đáng chú ý ở hàm lượng glucoza là 10% hoặc nhiều hơn.

Bảng 6

	Ngày 0 trong quá trình bảo quản			Ngày 21 trong quá trình bảo quản			
	Số lượng <i>L. paracasei</i>	Số lượng <i>L. gasseri</i>	Độ pH	Số lượng <i>L. paracasei</i>	Số lượng <i>L. gasseri</i>	Độ pH	Tỷ lệ sống
Đối chứng 1 với 5% glucoza	-	$2,3 \times 10^8$	3,50	-	$8,5 \times 10^5$	3,51	1,09%
Đồ uống sữa được lên men 8 với 5% glucoza	$9,7 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	3,53	$3,9 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	3,50	2,00%
Đối chứng 2 với 10% glucoza	-	$4,1 \times 10^8$	3,51	-	$1,5 \times 10^5$	3,51	0,04%
Đồ uống sữa được lên men 9 với 10% glucoza	$9,8 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	3,52	$3,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	3,50	1,13%
Đối chứng 3 với 15% glucoza	-	$2,1 \times 10^8$	3,47	-	$2,4 \times 10^4$	3,50	0,01%
Đồ uống sữa được lên men 10 với 15% glucoza	$9,2 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	3,49	$2,8 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	3,50	1,09%

Số lượng các tế bào (CFU/g)

Ví dụ 4

Bột sữa tách béo và glucoza được hòa tan trong nước để tạo ra môi trường nuôi cấy chứa 16% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 3% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza. Môi trường nuôi cấy được tiệt trùng ở 95°C trong 120 phút. Môi trường nuôi cấy đã tiệt trùng được

làm nguội tới 37°C, và 3% (thể tích/thể tích) môi trường nuôi cấy mầm của *Lactobacillus buchneri* SBT2028 được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được nuôi cấy ở 37°C cho đến khi độ pH đạt khoảng 4,0. Sản phẩm được lên men *Lactobacillus buchneri* được sản xuất.

3% (trọng lượng/trọng lượng) sirô đường được đồng phân hóa và 14% (trọng lượng/trọng lượng) sirô đường được tinh luyện được điều chế với nước, và được tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút để tạo ra sirô đường (hàm lượng đường: 16%).

Sirô đường (36g), sản phẩm được lên men *Lactobacillus buchneri* (9g), và huyền phù tế bào được cô (0,5g) của *L. gasseri* SBT1703 được trộn để sản xuất đồ uống sữa được lên men theo sáng chế có độ pH là 3,8 và hàm lượng đường là 12,7%.

Đồ uống sữa được lên men được bảo quản trong 21 ngày ở điều kiện chứa $1,9 \times 10^9$ CFU/g của *Lactobacillus gasseri* và $4,8 \times 10^8$ CFU/g của *Lactobacillus buchneri*. Số lượng tế bào sống sót của *Lactobacillus gasseri* là $5,0 \times 10^6$ CFU/g.

Ví dụ 5

Bột sữa tách béo và glucoza được hòa tan trong nước để tạo ra môi trường nuôi cấy chứa 16% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 3% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza. Môi trường nuôi cấy được tiệt trùng ở 95°C trong 120 phút. Môi trường nuôi cấy đã tiệt trùng được làm nguội tới 37°C, và 3% (thể tích/thể tích) của môi trường nuôi cấy mầm của *Lactobacillus plantarum* SBT1534 và 3% (thể tích/thể tích) của môi trường nuôi cấy mầm của *Lactobacillus gasseri* SBT10241 được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được lên men ở 37°C đến khi độ pH đạt khoảng 4,0.

3% (trọng lượng/trọng lượng) sirô đường được đồng phân hóa và 14%

(trọng lượng/trọng lượng) sirô đường được tinh luyện được điều chế với nước, và được tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút để sản xuất sirô đường (hàm lượng đường: 16%).

Sirô đường (36g) và sản phẩm được lên men (9,5 g) chứa *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus gasseri* được trộn để sản xuất đồ uống sữa được lên men theo sáng chế có độ pH là 3,8 và hàm lượng đường là 12,7%.

Đồ uống dạng sữa được lên men được bảo quản trong 21 ngày ở điều kiện chứa $2,0 \times 10^9$ CFU/g của *Lactobacillus gasseri* và $5,4 \times 10^8$ CFU/g *Lactobacillus plantarum*. Số lượng tế bào sống sót của *Lactobacillus gasseri* là 12×10^6 CFU/g.

Ví dụ 6: Kiểm tra khả năng sống được cải thiện của *L. gasseri* trong hỗn hợp với *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, hoặc *Lactobacillus buchneri*

Các vi khuẩn axit lactic được lựa chọn bằng thử nghiệm sàng lọc trong Ví dụ thử nghiệm 2, mỗi loại được trộn với *L. gasseri* để kiểm tra sự cải thiện về khả năng sống của *L. gasseri*.

Các đồ uống sữa được lên men theo sáng chế và các đồ uống sữa được lên men đối chứng được sản xuất như trong Ví dụ 1. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 và *Lactobacillus gasseri* JCM1131 là chủng đối chứng được sử dụng được bổ sung vào *L. gasseri*. *Lactobacillus paracasei* ATCC25598, *Lactobacillus plantarum* ATCC43199, *Lactobacillus plantarum* ATCC8014, và *Lactobacillus buchneri* JCM1115 mỗi chủng được trộn với *L. gasseri*. *L. bulgaricus* (NBRC P-13953) được trộn với *L. gasseri* để tạo ra đồ uống sữa được lên men làm đồ uống sữa được lên men đối chứng.

Tỷ lệ sống sót của *L. gasseri* và vi khuẩn axit lactic được trộn trong các đồ uống sữa được lên men thu được được đo như trong Ví dụ 1. Các kết quả được thể hiện trên Bảng 7.

Bảng 7

		Ngày bảo quản (CFU/g)				Tỷ lệ sống sót
		Ngày 0	Ngày 7	Ngày 16	Ngày 21	Ngày 21
Đối chứng	<i>L. gasseri</i> SBT2055	$1,7 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$ hoặc ít hơn	0,0006% hoặc ít hơn
	<i>L. gasseri</i> JCM1131	$1,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$ hoặc ít hơn	0,0006% hoặc ít hơn
Đồ uống sữa được lên men 11	<i>L. gasseri</i> SBT2055	$1,8 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	2,7%
	<i>L. paracasei</i> ATCC25598	$4,3 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	-
Đồ uống sữa được lên men 12	<i>L. gasseri</i> SBT2055	$1,7 \times 10^8$	$5,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$3,8 \times 10^6$	2,2%
	<i>L. plantarum</i> ATCC43199	$4,4 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	-
Đồ uống sữa được lên men 13	<i>L. gasseri</i> SBT2055	$1,5 \times 10^8$	$8,2 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$	3,1%
	<i>L. plantarum</i> ATCC8014	$4,5 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	-
Đồ uống sữa được lên men 14	<i>L. gasseri</i> SBT2055	$1,7 \times 10^8$	$5,3 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$7,2 \times 10^6$	4,2%
	<i>L. buchneri</i> JCM1115	$4,4 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	-
Đồ uống sữa được lên men 15	<i>L. gasseri</i> JCM1131	$1,9 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$	$3,1 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	2,4%
	<i>L. paracasei</i> ATCC25598	$4,1 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	-
Đồ uống sữa được lên men 16	<i>L. gasseri</i> JCM1131	$2,0 \times 10^8$	$6,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$4,9 \times 10^6$	2,5%
	<i>L. plantarum</i> ATCC43199	$4,7 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	-

Đồ uống sữa được lên men 17	<i>L. gasseri</i> JCM1131	$1,6 \times 10^8$	$6,8 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$	2,9%
	<i>L. plantarum</i> ATCC8014	$4,3 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	-
Đồ uống sữa được lên men 18	<i>L. gasseri</i> JCM1131	$1,3 \times 10^8$	$5,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$6,8 \times 10^6$	5,2%
	<i>L. buchneri</i> JCM1115	$4,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	-
Đối chứng	<i>L. gasseri</i> SBT2055	$1,9 \times 10^8$	$1,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$ hoặc ít hơn	0,0006% hoặc ít hơn
	<i>L. bulgaricus</i> NBRC P-13953	$4,2 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	-
Đối chứng	<i>L. gasseri</i> JCM1131	$1,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$ hoặc ít hơn	0,0006% hoặc ít hơn
	<i>L. bulgaricus</i> NBRC P-13953	$4,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	-

Các kết quả cho thấy rằng số lượng của vi khuẩn *L. gasseri* còn sống trong các đồ uống sữa được lên men theo sáng chế chứa *L. gasseri* và một trong số *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, và *Lactobacillus buchneri* lớn hơn nhiều so với số lượng của *L. gasseri* còn sống trong các đồ uống sữa được lên men đối chứng. Số lượng tế bào có thể sống được của *Lactobacillus gasseri* sau khi bảo quản trong 21 ngày là 1×10^6 CFU/g hoặc nhiều hơn trong tất cả các đồ uống sữa được lên men từ 11 đến 18.

Ngược lại, không có sự cải thiện về khả năng sống sót của *L. gasseri* được nhận thấy trong các đồ uống sữa được lên men chứa *L. delbreuckii* ssp. *bulgaricus*. Tỷ lệ sống sót của *Lactobacillus gasseri* sau khi bảo quản trong 21

ngày là 0,00006% hoặc nhỏ hơn.

Khả năng sống của *L. gasseri* được cải thiện đáng kể bằng cách trộn *L. gasseri* với vi khuẩn axit lactic mà có thể làm giảm độ pH của môi trường nuôi cấy khoảng 0,1 hoặc nhiều hơn sau khi vi khuẩn axit lactic được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở độ pH 4,0 chứa 3% (trọng lượng/trọng lượng) sữa tách chất béo được hoàn nguyên và 10% (trọng lượng/trọng lượng) glucoza, và được nuôi cấy tĩnh ở 10°C trong 21 ngày.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế có thể tạo ra sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống có độ pH thấp và hàm lượng đường cao và có khả năng sống cao đáng kể của *L. gasseri* ngay cả sau khi bảo quản trong thời gian dài. Do đó, sáng chế có thể tạo ra thực phẩm mà có thể giữ được đầy đủ chức năng của *L. gasseri* là vi sinh vật hữu ích.

Tham khảo nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

(1) *Lactobacillus gasseri* SBT2055

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,

Chuuou Dai 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, Japan (zip code: 305-8566)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

27/03/1996 (ngày lưu giữ ban đầu)

26/02/2008 (ngày chuyển từ lưu giữ ban đầu sang lưu giữ theo hiệp ước Budapest)

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A

FERM BP-10953

(2) *Lactobacillus gasseri* SBT2056

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

Xem mục (1)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

22/04/1986 (ngày lưu giữ ban đầu)

9/10/2008 (ngày chuyển từ ngày lưu giữ ban đầu sang lưu giữ theo hiệp ước Budapest)

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A

FERM BP-11038

(3) *Lactobacillus gasseri* SBT0274

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

Xem mục (1)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

15/03/2000 (ngày lưu giữ ban đầu)

9/10/2008 (ngày chuyển từ ngày lưu giữ ban đầu sang lưu giữ theo hiệp ước Budapest)

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A

FERM BP-11039

(4) *Lactobacillus gasseri* SBT1703

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

Kogyo Gijutsuin Seimei Kogaku Gijutsu Kenkyuujo,

1-1-3 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, Japan (zip code: 305-8566)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

15/03/2000

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A

FERM P-17785

(5) *Lactobacillus gasseri* SBT10239

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

Xem mục (4)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

17/02/1998

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A

FERM P-16639

(6) *Lactobacillus gasseri* SBT10241

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

Xem mục (4)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

15/03/2000

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A

FERM P-17786

(7) *Lactobacillus paracasei* SBT0327

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms
Depositary,

2-5-8 Kazusa Kamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan (zip code: 292-0818)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

18/08/2011

6/12/2012 (ngày chuyển từ lưu giữ ban đầu sang lưu giữ theo hiệp ước
Budapest)

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A (Số truy cập)

NITE ABP-1129

(8) *Lactobacillus paracasei* SBT2105

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

Xem mục (7)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

18/08/2011

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A

NITE P-1130

(9) *Lactobacillus paracasei* SBT2203

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

Xem mục (7)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

18/08/2011

6/12/2012 (ngày chuyển từ lưu giữ ban đầu sang lưu giữ theo hiệp ước Budapest)

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A (Số truy cập)

NITE ABP-1131

(10) *Lactobacillus paracasei* SBT2215

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

Xem mục (7)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

18/08/2011

6/12/2012 (ngày chuyển từ lưu giữ ban đầu sang lưu giữ theo hiệp ước

Budapest)

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A (Số truy cập)

NITE ABP-1132

(11) *Lactobacillus paracasei* SBT11408

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

Xem mục (7)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

18/08/2011

6/12/2012 (ngày chuyển từ lưu giữ ban đầu sang lưu giữ theo hiệp ước

Budapest)

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A (Số truy cập)

NITE ABP-1133

(12) *Lactobacillus plantarum* SBT1534

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

Xem mục (4)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

10/07/1991

6/12/2012 (ngày chuyển từ lưu giữ ban đầu sang lưu giữ theo hiệp ước

Budapest, được chuyển từ số truy cập quốc gia FERM P-12351)

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A (Số truy cập)

FERM ABP-11518

(13) *Lactobacillus casei* subsp. pseudoplantarum SBT0624

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

Xem mục (4)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

20/12/1990

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A

FERM P-11920

(14) *Lactobacillus buchneri* SBT2028

A: tên và địa chỉ của cơ quan lưu giữ trong đó nguồn vật liệu sinh học được lưu giữ

Xem mục (4)

B: ngày lưu giữ nguồn vật liệu sinh học tại Cơ quan lưu giữ A

20/12/1990

C: số truy cập được cấp cho mẫu lưu giữ bởi Cơ quan lưu giữ A

FERM P-11921

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm chứa *Lactobacillus gasseri*,
sản phẩm thực phẩm này có độ pH từ 3,5 đến 4,5 và hàm lượng đường từ 5% đến 15%,
quy trình này bao gồm bước trộn *Lactobacillus gasseri* với vi khuẩn axit lactic cụ thể,
trong đó vi khuẩn axit lactic cụ thể là *Lactobacillus paracasei* hoặc *Lactobacillus buchneri*.
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó *Lactobacillus paracasei* là vi khuẩn được chọn từ SBT0327 (NITE ABP-1129), SBT2105 (NITE P-1130), SBT2203 (NITE ABP-1131), SBT2215 (NITE ABP-1132), SBT11408 (NITE ABP-1133), và ATCC25598, và
Lactobacillus buchneri là SBT2028 (FERM P-11921) hoặc JCM1115.
3. Quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm chứa *Lactobacillus gasseri*,
sản phẩm thực phẩm này có độ pH từ 3,5 đến 4,5 và hàm lượng đường từ 5% đến 15%,
quy trình này bao gồm bước trộn *Lactobacillus gasseri* với vi khuẩn axit lactic cụ thể,
trong đó vi khuẩn axit lactic cụ thể là *Lactobacillus plantarum*, và *Lactobacillus plantarum* là vi khuẩn được chọn từ SBT1534 (FERM ABP-11518), SBT0624 (FERM P-11920), ATCC43199, và ATCC8014.
4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó sản phẩm thực phẩm chứa sữa lên men và đồ uống sữa lên men.
5. Quy trình sản xuất sản phẩm đồ uống chứa *Lactobacillus gasseri*,
sản phẩm đồ uống này có độ pH từ 3,5 đến 4,5 và hàm lượng đường từ 5% đến 15%,

quy trình này bao gồm bước trộn *Lactobacillus gasseri* với vi khuẩn axit lactic cụ thể,

trong đó vi khuẩn axit lactic cụ thể là *Lactobacillus paracasei* hoặc *Lactobacillus buchneri*.

6. Quy trình theo điểm 5, trong đó *Lactobacillus paracasei* là vi khuẩn được chọn từ SBT0327 (NITE ABP-1129), SBT2105 (NITE P-1130), SBT2203 (NITE ABP-1131), SBT2215 (NITE ABP-1132), SBT11408 (NITE ABP-1133), và ATCC25598, và

Lactobacillus buchneri là SBT2028 (FERM P-11921) hoặc JCM1115.

7. Quy trình sản xuất sản phẩm đồ uống chứa *Lactobacillus gasseri*,

sản phẩm đồ uống này có độ pH từ 3,5 đến 4,5 và hàm lượng đường từ 5% đến 15%,

quy trình này bao gồm bước trộn *Lactobacillus gasseri* với vi khuẩn axit lactic cụ thể,

trong đó vi khuẩn axit lactic cụ thể là *Lactobacillus plantarum*, và *Lactobacillus plantarum* là vi khuẩn được chọn từ SBT1534 (FERM ABP-11518), SBT0624 (FERM P-11920), ATCC43199, và ATCC8014.

8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, trong đó sản phẩm đồ uống chứa sữa lên men và đồ uống sữa lên men.

9. Sản phẩm thực phẩm chứa *Lactobacillus gasseri* và vi khuẩn axit lactic cụ thể và có độ pH từ 3,5 đến 4,5 và hàm lượng đường từ 5% đến 15%,

trong đó vi khuẩn axit lactic cụ thể là *Lactobacillus paracasei* hoặc *Lactobacillus buchneri*.

10. Sản phẩm thực phẩm theo điểm 9, trong đó *Lactobacillus paracasei* là vi khuẩn được chọn từ SBT0327 (NITE ABP-1129), SBT2105 (NITE P-1130), SBT2203 (NITE ABP-1131), SBT2215 (NITE ABP-1132), SBT11408 (NITE

ABP-1133), và ATCC25598,

Lactobacillus buchneri là SBT2028 (FERM P-11921) hoặc JCM1115.

11. Sản phẩm đồ uống chứa *Lactobacillus gasseri* và vi khuẩn axit lactic cụ thể và có độ pH từ 3,5 đến 4,5 và hàm lượng đường từ 5% đến 15%,

trong đó vi khuẩn axit lactic cụ thể là *Lactobacillus paracasei* hoặc *Lactobacillus buchneri*.

12. Sản phẩm đồ uống theo điểm 11, trong đó *Lactobacillus paracasei* là vi khuẩn được chọn từ SBT0327 (NITE ABP-1129), SBT2105 (NITE P-1130), SBT2203 (NITE ABP-1131), SBT2215 (NITE ABP-1132), SBT11408 (NITE ABP-1133), và ATCC25598,

Lactobacillus buchneri là SBT2028 (FERM P-11921) hoặc JCM1115.

13. Sản phẩm thực phẩm chứa *Lactobacillus gasseri* và vi khuẩn axit lactic cụ thể và có độ pH từ 3,5 đến 4,5 và hàm lượng đường từ 5% đến 15%,

trong đó vi khuẩn axit lactic cụ thể là *Lactobacillus plantarum*,

Lactobacillus plantarum là vi khuẩn được chọn từ SBT1534 (FERM ABP-11518), SBT0624 (FERM P-11920), ATCC43199, và ATCC8014.

14. Sản phẩm đồ uống chứa *Lactobacillus gasseri* và vi khuẩn axit lactic cụ thể và có độ pH từ 3,5 đến 4,5 và hàm lượng đường từ 5% đến 15%,

trong đó vi khuẩn axit lactic cụ thể là *Lactobacillus plantarum*,

Lactobacillus plantarum là vi khuẩn được chọn từ SBT1534 (FERM ABP-11518), SBT0624 (FERM P-11920), ATCC43199, và ATCC8014.

15. Sản phẩm thực phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9, 10 và 13,

trong đó *Lactobacillus gasseri* sau khi bảo quản trong 21 ngày có số lượng tế bào sống sót là 1×10^6 CFU/g hoặc lớn hơn.

16. Sản phẩm đồ uống theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11, 12 và 14, trong đó *Lactobacillus gasseri* sau khi bảo quản trong 21 ngày có số lượng tế bào sống sót là 1×10^6 CFU/g hoặc lớn hơn.