



(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)



1-0027038

(51)⁷ A01N 63/00; A01P 3/00; A01P 1/00

(13) B

(21) 1-2013-03189

(22) 09/04/2012

(86) PCT/EP2012/056384 09/04/2012

(87) WO2012/136830 11/10/2012

(30) 11161609.0 08/04/2011 EP

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/12/2013 309A

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

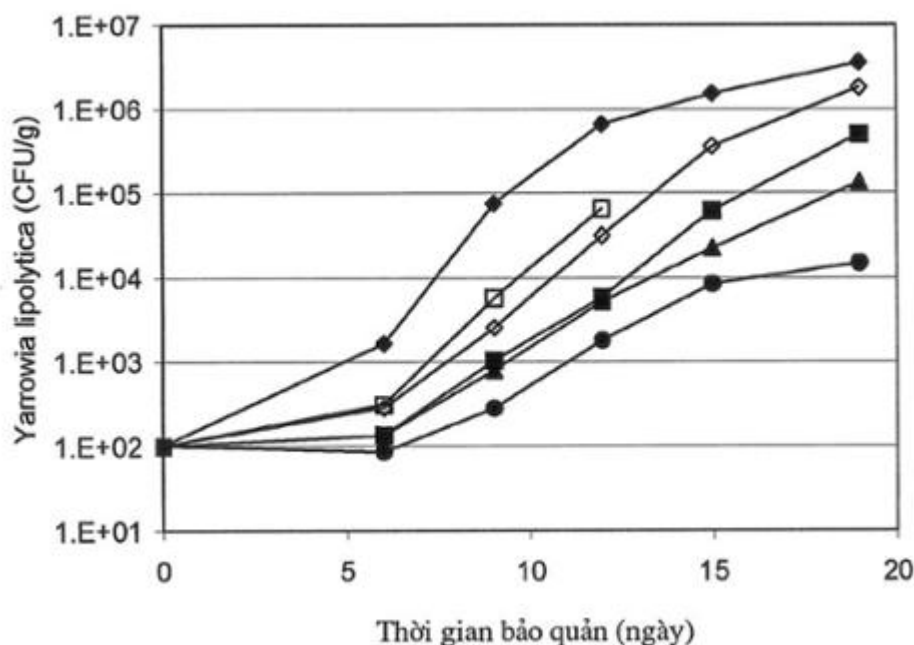
Bøge Allé 10-12, DK-2970 Hørsholm, Denmark

(72) HORNBAEK Tina (DK); LISBERG Maike (DK); DIEMER Silja Kej (DK).

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

(54) CHẾ PHẨM KHÁNG KHUẨN, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỰC PHẨM HOẶC DƯỢC PHẨM, CÁC CHỦNG *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* VÀ *LACTOBACILLUS PARACASEI*

(57) Sáng chế liên quan đến lĩnh vực bảo quản sinh học, cụ thể là đề cập đến chế phẩm kháng khuẩn chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* và/hoặc chủng *Lactobacillus paracasei*. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến thực phẩm và dược phẩm chứa chế phẩm kháng khuẩn này, phương pháp sản xuất thực phẩm và dược phẩm này và phương pháp làm giảm lượng vi sinh vật không mong muốn trong thực phẩm và dược phẩm này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực bảo quản sinh học, cụ thể là sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng khuẩn chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* và/hoặc chủng *Lactobacillus paracasei*. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật và dược phẩm chứa chế phẩm kháng khuẩn này, phương pháp sản xuất thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật và dược phẩm này và phương pháp làm giảm lượng vi sinh vật không mong muốn trong thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật và dược phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chất bảo quản sinh học được sử dụng làm chất thay thế cho chất bảo quản hóa học nhiều ứng dụng thực phẩm khác nhau. Ở các sản phẩm sữa, việc nhiễm nấm men và nấm mốc có thể làm rút ngắn thời hạn sử dụng các sản phẩm sữa. Một nhóm sản phẩm thường bị nhiễm nấm men và nấm mốc đáng kể là phô mát tươi.

Nhiều dung dịch bảo quản sinh học để khắc phục các vấn đề này đã được phát triển trong ngành công nghiệp sữa. Một số dung dịch bảo quản sinh học kháng khuẩn được biết đến nhiều nhất và chắc là được sử dụng phổ biến nhất là môi trường nuôi cấy HOLDBAC™ YM-b và HOLDBAC™ YM-C của Danisco, các môi trường này đều chứa hỗn hợp gồm các loài phụ của *Propionibacteria* và *Lactobacillus*.

Việc sử dụng vi khuẩn axit propionic cùng với vi khuẩn axit lactic để ức chế vi sinh vật đã được mô tả trong US 2005/0095318 và WO 2004/041305.

Tin rằng *Propionibacteria* ssp. tạo ra được hoạt tính kháng nấm chủ yếu là nhờ quá trình sản xuất axit propionic và cả quá trình sản xuất axit axetic và các chất chuyển hóa khác.

Tuy nhiên, để sản xuất trên quy mô công nghiệp thì các loài này lại đắt tiền và quá trình sản xuất axit propionic có thể tạo ra các đặc tính cảm quan không mong muốn cho các sản phẩm sữa thành phẩm.

Các dung dịch bảo quản sinh học kháng khuẩn khác dùng cho các sản phẩm sữa đang bán trên thị trường bao gồm Lyofast LPRA của SACCO cũng như Aroma-Prox®RP80 của BIOPROX. Cả hai sản phẩm này đều chứa hỗn hợp của *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus rhamnosus*.

Tharmaraj và Shah (2009) đã mô tả việc sàng lọc các ứng viên vi khuẩn

axit lactic có tính bảo quản sinh học để làm nước sốt trên cơ sở pho mát. Tất cả các chủng *Lactobacillus rhamnosus* và *Lactobacillus paracasei* được thử nghiệm dưới dạng các chủng đơn lẻ có hiệu quả ức chế tối đa đối với nấm men và nấm mốc. Tuy nhiên, vẫn chưa có thử nghiệm đối với hỗn hợp của *Lactobacillus rhamnosus* và *Lactobacillus paracasei*.

Do vậy, có nhu cầu phát triển dung dịch bảo quản sinh học cải tiến không chứa *Propionibacteria* ssp. mà vẫn không làm giảm hiệu lực kháng nấm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã xác định được chủng vi khuẩn axit lactic mới có hiệu quả ức chế đáng kể sự sinh trưởng của vi khuẩn và nấm đã biết dưới dạng các tạp chất trong sữa và các sản phẩm sữa. Các tác giả sáng chế còn phát hiện ra rằng một số nhóm vi khuẩn axit lactic khi được kết hợp với nhóm vi khuẩn axit lactic khác thì có hiệu quả kháng khuẩn hiệp đồng đáng kể. Điều bất ngờ là, hiệu quả kháng khuẩn của hai nhóm vi khuẩn này kết hợp lớn hơn tổng hiệu quả riêng biệt của hai nhóm vi khuẩn.

Do vậy, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm kháng khuẩn chứa ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei*. Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm kháng khuẩn này chứa:

- ít nhất một chủng *Lactobacillus* được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 và *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 và thể đột biến của chúng; và
- ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 và chủng đột biến của chúng.

Theo phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề xuất chế phẩm kháng khuẩn chứa ít nhất một chủng được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226, chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777, và chủng đột biến của chúng, trong đó chủng đột biến này được tạo ra bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu ban đầu.

Chế phẩm theo sáng chế có thể ức chế được vi sinh vật không mong muốn được chọn từ nấm, vi khuẩn và hỗn hợp của chúng, ví dụ, trên thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật và dược phẩm và ở người và động vật. Việc ngăn ngừa và/hoặc ức chế sự sinh trưởng của nấm như nấm men và nấm mốc, được đặc biệt ưu tiên. Vì vậy, theo một phương án được ưu tiên, thuật ngữ "kháng khuẩn" được hiểu là "kháng nấm".

Tiếp theo, sáng chế mô tả việc sử dụng một trong số các chế phẩm kháng

khuẩn theo khía cạnh thứ nhất để sản xuất thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc dược phẩm.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng một trong số các chế phẩm kháng khuẩn của khía cạnh thứ nhất để ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật không mong muốn được chọn từ nhóm bao gồm nấm, vi khuẩn và hỗn hợp của chúng. Cụ thể, chế phẩm theo sáng chế sẽ được sử dụng để ức chế và/hoặc ngăn ngừa sự sinh trưởng của nấm và vi khuẩn là các tạp chất đã biết thông thường trong các quy trình của ngành công nghiệp sữa như quy trình lên men sữa.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng một trong số các chế phẩm kháng khuẩn của khía cạnh thứ nhất làm dược phẩm. Tốt hơn là, dược phẩm này dùng để điều trị cho đối tượng bị nhiễm khuẩn hoặc nấm, tốt hơn nữa nếu là nấm mốc.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc dược phẩm bao gồm một trong số các chế phẩm kháng khuẩn theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc dược phẩm theo khía cạnh thứ năm của sáng chế, phương pháp này bao gồm việc bổ sung một trong số các chế phẩm kháng khuẩn theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế để sản xuất thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc dược phẩm. Khi phương pháp này bao gồm việc bổ sung chế phẩm kháng khuẩn chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* cùng với chủng *Lactobacillus paracasei*, thì chế phẩm này được bổ sung để sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* ít nhất là 1×10^6 cfu/g, tốt hơn nếu là 5×10^6 cfu/g, hoặc ít nhất là 1×10^6 cfu/ml, tốt hơn nếu là 5×10^6 cfu/ml thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc dược phẩm, hoặc ít nhất là 1×10^5 cfu/cm², tốt hơn nếu là 1×10^7 cfu/cm², của bề mặt của thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc dược phẩm, và các thông số của quá trình sản xuất được kiểm soát trong quá trình sản xuất để nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* tăng hoặc duy trì không đổi.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24616, hoặc chủng đột biến của nó, trong đó chủng đột biến này được tạo ra bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu ban đầu.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24652, hoặc chủng đột biến của nó,

trong đó chủng đột biến này được tạo ra bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu ban đầu.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24651, hoặc chủng đột biến của nó, trong đó chủng đột biến này được tạo ra bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu ban đầu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện sự sinh trưởng của nấm men và nấm mốc trên các đĩa thu được từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động (tham khảo cột thứ nhất), cùng với *Lb. rhamnosus* CHCC12697 (cột thứ hai), cùng với *Lb. paracasei* CHCC12777 (cột thứ ba) hoặc cùng với hỗn hợp của *Lb. rhamnosus* CHCC12697 và *Lb. paracasei* CHCC12777 (cột thứ tư). Các tạp chất đích được bổ sung ở các nồng độ được đề cập trong bản mô tả lần lượt từ trái sang phải: *K. marxianus*, *P. fermentans*, *Y. lipolytica* và *C. sake*, ở các hàng đĩa trên cùng. Trên hàng đĩa thứ hai, *P. nalgiovense* được bổ sung ở phía trên, *Cladosporium* spp. được bổ sung phía dưới vào bên trái và *P. commune* được bổ sung phía dưới vào bên phải. Trên các hàng đĩa cuối, chỉ có *Mucor* ssp. được bổ sung. Các đĩa được ủ ở $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 17 ngày.

Fig. 2 thể hiện đồ thị số lượng tế bào của thể phân lập *Yarrowia lipolytica* được bổ sung vào sữa béo hoàn toàn chỉ được cấy môi trường khởi động CHN-19 (hình thoi đen) hoặc cùng với các chủng sau: HOLDBACTM YM-B (hình vuông trắng), HOLDBACTM YM-C (hình thoi trắng), *Lb. paracasei* CHCC12777 (hình vuông đen), *Lb. rhamnosus* CHCC12697 (hình tam giác đen) hoặc hỗn hợp của *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC12697 (hình tròn kín), tất cả được bổ sung trước khi lên men ở $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ cho đến khi đạt đến độ pH $4,65\pm 0,05$.

Fig. 3 thể hiện sự sinh trưởng của nấm men và nấm mốc trên các đĩa thu được từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động (tham khảo, cột thứ nhất), cùng với *Lb. rhamnosus* CHCC14226 (cột thứ hai), cùng với *Lb. paracasei* CHCC12777 (cột thứ ba) hoặc cùng với hỗn hợp của *Lb. rhamnosus* CHCC14226 và *Lb. paracasei* CHCC12777 (cột thứ tư). Các tạp chất đích được bổ sung vào ở các nồng độ được đề cập trong bản mô tả lần lượt từ trái sang phải: *K. marxianus*, *P. fermentans*, *Y. lipolytica* và *C. sake* ở hàng đĩa trên cùng. Trên hàng đĩa dưới cùng *P. nalgiovense* được bổ sung vào ở phía trên, *Cladosporium* spp. được bổ sung phía dưới vào bên trái và *P. commune* được bổ sung phía dưới vào bên phải. Các đĩa được ủ ở $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 ngày.

Fig. 4 thể hiện đồ thị về số lượng tế bào của thể phân lập *Klyveromyces marxianus* được bổ sung vào sữa béo hoàn toàn chỉ được cấy môi trường khởi động CHN-19 (hình thoi đen) hoặc cùng với các chủng sau: HOLDBAC™ YM-B (hình vuông trắng), HOLDBAC™ YM-C (hình thoi trắng), *Lb. paracasei* CHCC12777 (hình vuông đen), *Lb. rhamnosus* CHCC14226 (hình tam giác đen) hoặc hỗn hợp của *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 (hình tròn đen), tất cả được bổ sung trước khi lên men ở $29\pm 1^\circ\text{C}$ cho đến khi đạt đến độ pH $4,65\pm 0,05$.

Fig. 5 thể hiện sự sinh trưởng của nấm mốc trên các đĩa thu được từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động (tham khảo, hình ảnh thứ nhất), cùng với *Lb. paracasei* CHCC14676 (hình ảnh thứ hai), cùng với *Lb. rhamnosus* CHCC5366 (hình ảnh thứ ba) hoặc cùng với hỗn hợp của *Lb. paracasei* CHCC14676 và *Lb. rhamnosus* CHCC5366 (hình ảnh thứ tư). Các tạp chất đích được bổ sung vào ở các nồng độ được đề cập trong bản mô tả lần lượt từ bên trái phía trên đến bên phải phía dưới: *Penicillium nalgiovese*, *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* và *Penicillium crustosum*. Các đĩa được ủ ở $7\pm 1^\circ\text{C}$ trong 12 ngày.

Fig. 6 thể hiện sự sinh trưởng của nấm mốc trên các đĩa thu được từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động (tham khảo, hình ảnh thứ nhất), cùng với *Lb. paracasei* CHCC14676 (hình ảnh thứ hai), cùng với *Lb. rhamnosus* CHCC14226 (hình ảnh thứ ba) hoặc cùng với hỗn hợp của *Lb. paracasei* CHCC14676 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 (hình ảnh thứ tư). Các tạp chất đích được bổ sung vào ở các nồng độ được đề cập trong bản mô tả từ bên trái phía trên đến bên phải phía dưới: *Penicillium nalgiovese*, *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* và *Penicillium crustosum*. Các đĩa được ủ ở $7\pm 1^\circ\text{C}$ trong 12 ngày.

Fig. 7 thể hiện sự sinh trưởng của nấm mốc trên các đĩa được điều chế từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động (tham khảo, hình ảnh thứ nhất), cùng với *Lb. paracasei* CHCC12777 (hình ảnh thứ hai), cùng với *Lb. rhamnosus* CHCC14226 (hình ảnh thứ ba) hoặc cùng với hỗn hợp của *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 (hình ảnh thứ tư). Các tạp chất đích được bổ sung vào ở các nồng độ được đề cập trong bản mô tả lần lượt từ bên trái phía trên đến bên phải phía dưới: *Penicillium nalgiovese*, *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* và *Penicillium crustosum*. Các đĩa được ủ ở $7\pm 1^\circ\text{C}$ trong 12 ngày.

Fig. 8 thể hiện kết quả nghiên cứu gây nhiễm kem chua bằng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777. Đã chứng minh được rằng *P. commune*

(M6), *A. versicolor* (M7), *P. brevicompactum* (M1), *P. crustosum* (M10) và *P. glabrum* (M8) sinh trưởng tốt trên kem chua được làm từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động (hàng trên cùng) hoặc bằng môi trường khởi động và môi trường nuôi cấy HOLDBAC™ YM-B (hàng ở giữa). Ngược lại, khi *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 có mặt trong quá trình lên men sữa (hàng dưới cùng) sự sinh trưởng của tất cả được nấm mốc thử nghiệm bị ức chế.

Fig. 9 thể hiện kết quả nghiên cứu gây nhiễm tvarog bằng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697. Đã chứng minh được rằng *Mucor* ssp. sinh trưởng tốt trên tvarog được làm từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động CHN-19 (Ref.). Nấm mốc cũng sinh trưởng tốt trên tvarog được làm từ sữa được lên men bằng môi trường khởi động và môi trường nuôi cấy HOLDBAC™ YM-B và ở mức độ kém hơn trên tvarog được làm từ sữa được lên men bằng môi trường khởi động và môi trường nuôi cấy HOLDBAC™ YM-C. Tuy nhiên, khi chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 có mặt trong quá trình lên men sữa, quan sát được sự sinh trưởng của *Mucor* ssp. bị ức chế hơn đáng kể.

Fig. 10 thể hiện kết quả nghiên cứu gây nhiễm sữa chua bằng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226. *P. brevicompactum* (M1), *P. commune* (M6), *A. versicolor* (M7) và *P. crustosum* (M10) sinh trưởng tốt trên sữa chua được làm từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động YF-L901 (hàng trên cùng) hoặc bằng môi trường khởi động và môi trường nuôi cấy HOLDBAC™ YM-B (hàng ở giữa). Ngược lại, khi *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 có mặt trong quá trình lên men sữa (hàng dưới cùng), sự sinh trưởng của tất cả nấm mốc thử nghiệm đều bị ức chế.

Fig. 11 thể hiện đồ thị xác định định lượng hiệu quả ức chế *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 và *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 đối với *K. lactis* trong tvarog. Đã chứng minh được rằng sự sinh trưởng của *K. lactis* bị ức chế với sự có mặt của chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 và với sự có mặt của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 khi được cấy cùng với môi trường khởi động CHN-19 trước khi lên men. Cả hai chủng, chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 và chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, đều gây ức chế cao hơn đáng kể so với môi trường nuôi cấy thương phẩm, HOLDBAC™ YM-B.

Fig. 12 thể hiện đồ thị xác định định lượng hiệu quả ức chế *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 đối với *Debaromyces hansenii* trong sữa chua. Sự sinh trưởng của *D. hansenii* bị ức chế với sự có mặt của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 khi được cấy cùng với môi trường khởi động YF-

L901 trước khi lên men. Chúng này gây ức chế cao hơn đáng kể so với môi trường nuôi cấy thương phẩm, HOLDBAC™ YM-B.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Theo sáng chế, thuật ngữ "vi khuẩn axit lactic" chỉ vi khuẩn gram dương, vi yếm khí hoặc kỵ khí, lên men đường bằng cách sản xuất axit bao gồm axit lactic làm axit thu được chiếm ưu thế, axit axetic và axit propionic. Vi khuẩn axit lactic hữu ích nhất trong công nghiệp được tìm thấy ở Bộ "Lactobacillales" bao 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, tức là *Bifidobacterium* spp., thường chứa trong nhóm vi khuẩn axit lactic. Chúng được sử dụng thường xuyên làm môi trường nuôi cấy thực phẩm hoặc kết hợp với vi khuẩn axit lactic khác.

Vi khuẩn axit lactic, bao gồm vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus* spp. và *Streptococcus thermophilus*, thường được cung cấp cho ngành công nghiệp sữa dưới dạng môi trường đông lạnh hoặc môi trường đông khô để nhân giống men khối hoặc được gọi là môi trường nuôi cấy "Direct Vat Set" (DVS), được dự định để cấy trực tiếp vào bình hoặc thùng lên men để sản xuất sản phẩm sữa, như sản phẩm sữa lên men hoặc pho mát. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn axit lactic như vậy thường được gọi là "môi trường nuôi cấy khởi động" hoặc "môi trường khởi động".

Thuật ngữ "vi sinh vật ưa nhiệt độ trung bình" theo sáng chế chỉ các vi sinh vật phát triển mạnh nhất ở các nhiệt độ vừa phải (nằm trong khoảng từ 15°C đến 40°C). Vi khuẩn chịu nhiệt trung bình hữu ích nhất trong công nghiệp bao gồm *Lactococcus* spp. và *Leuconostoc* spp. Thuật ngữ "quá trình lên men chịu nhiệt trung bình" theo sáng chế chỉ quá trình lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 12°C đến 35°C. Thuật ngữ "sản phẩm sữa chịu nhiệt trung bình" dùng để chỉ sản phẩm sữa được điều chế bằng cách lên men chịu nhiệt trung bình môi trường khởi động chịu nhiệt trung bình và bao gồm các sản phẩm sữa như bơ sữa, sữa chua, sữa được nuôi cấy, váng sữa, kem chua và pho mát tươi, như quark, tvarog và pho mát kem.

Thuật ngữ "vi sinh vật chịu nhiệt" theo sáng chế chỉ các vi sinh vật phát triển mạnh nhất ở nhiệt độ trên 43°C. Hữu ích nhất trong công nghiệp vi khuẩn chịu nhiệt bao gồm *Streptococcus* spp. và *Lactobacillus* spp. Thuật ngữ "quá trình lên men chịu nhiệt" theo sáng chế chỉ quá trình lên men ở nhiệt độ trên

35°C. Thuật ngữ "sản phẩm sữa chịu nhiệt" dùng để chỉ sản phẩm sữa được điều chế bằng cách lên men chịu nhiệt môi trường khởi động chịu nhiệt và bao gồm các sản phẩm sữa như sữa chua.

Thuật ngữ "sữa" được hiểu là phần tiết sữa thu được bằng cách vắt sữa từ 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 protein/dung dịch béo được làm 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 xử lý bất kỳ có thể được lên men theo phương pháp theo sáng chế. Do đó, các cơ chất sữa hữu ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch/huyền phù của sữa bất kỳ hoặc các sản phẩm giống sữa bao gồm protein, như sữa nguyên kem hoặc sữa chứa hàm lượng chất béo thấp, sữa không kem, bơ sữa, sữa bột hoàn nguyên, sữa đặc, sữa khô, nước sữa, váng sữa, lactoza, nước cái từ kết tinh lactoza, chất cô đặc nước sữa protein, hoặc kem. Rõ ràng là, cơ chất sữa này có thể có nguồn gốc từ động vật có vú bất kỳ, ví dụ, là sữa của động vật hầu như tinh khiết, hoặc sữa bột hoàn nguyên.

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

"Làm đồng nhất" được sử dụng theo sáng chế nghĩa là việc trộn mạnh để thu được nhũ tương hoặc huyền phù hòa tan được. Nếu quá trình làm đồng nhất được thực hiện trước khi lên men, việc làm đồng nhất có thể được thực hiện để chất béo sữa vỡ ra thành các kích cỡ nhỏ hơn để nó không còn tách ra khỏi sữa. Điều này có thể thực hiện được bằng cách tạo áp lực sữa ở áp suất cao qua các vòi phun nhỏ.

"Tiệt trùng" theo sáng chế nghĩa là việc xử lý cơ chất sữa này để làm giảm hoặc khử bỏ sự có mặt của các sinh vật sống như các vi sinh vật. Tốt hơn là, việc tiệt trùng đạt được bằng cách duy trì nhiệt độ cụ thể trong khoảng thời gian cụ thể. Nhiệt độ cụ thể này thường đạt được bằng cách làm nóng. Nhiệt độ và khoảng thời gian này có thể được chọn lọc 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 carbohydrat thành rượu hoặc axit nhờ sự 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 trong sản xuất sản phẩm sữa là đã biết và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách

chọn lọc các điều kiện quy trình thích hợp như nhiệt độ, oxy, lượng và đặc tính của vi sinh vật và thời gian quy trình. Rõ ràng là, các điều kiện lên men được chọn lọc để hỗ trợ đạt được mục đích theo sáng chế, tức là để thu được sản phẩm sữa ở dạng rắn (như pho mát) hoặc dạng lỏng (như sản phẩm sữa lên men).

Thuật ngữ "vi sinh vật không mong muốn" theo sáng chế chỉ vi sinh vật như vi khuẩn và nấm như nấm men, gây bệnh và/hoặc có thể làm hư hỏng thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc dược phẩm.

Các thuật ngữ "đề ức chế" và "ức chế" liên quan đến vi sinh vật không mong muốn nghĩa là, ví dụ, sự sinh trưởng hoặc số lượng hoặc nồng độ của vi sinh vật không mong muốn, ví dụ, trong thực phẩm và/hoặc trên bề mặt của thực phẩm chứa chế phẩm kháng khuẩn, thấp hơn trong thực phẩm và/hoặc trên bề mặt của thực phẩm không chứa chế phẩm kháng khuẩn này.

Theo sáng chế, thuật ngữ "thể đột biến" được hiểu là chủng có nguồn gốc từ chủng theo sáng chế được xử lý bằng, ví dụ, kỹ thuật di truyền, phóng xạ, ánh sáng UV, và/hoặc xử lý bằng hóa học và/hoặc các phương pháp làm biến đổi bộ gen. Tốt hơn, nếu thể đột biến là thể đột biến tương đương về mặt chức năng, ví dụ, thể đột biến có các đặc tính hầu như giống, hoặc được cải thiện (ví dụ, về mức tạo ra diacetyl, độ nhớt, độ cứng gel, lớp phủ ngoài, hương vị, sau axit hóa, tốc độ axit hóa, và/hoặc tính ổn định của thể thực khuẩn) so với chủng bố mẹ. Thể đột biến như vậy là một phần của sáng chế. Đặc biệt, thuật ngữ "thể đột biến" dùng để chỉ chủng thu được bằng cách xử lý chủng theo sáng chế nhờ phương pháp gây đột biến bất kỳ được sử dụng thông thường bao gồm xử lý bằng cách gây đột biến nhờ hóa chất như etan metan sulphonat (EMS) hoặc N-metyl-N'-nitro-N-nitroguanidin (NTG), ánh sáng UV hoặc đột biến xảy ra một cách tự phát. Thể đột biến có thể được thực hiện một số xử lý bằng cách gây đột biến (một xử lý phải được hiểu là bao gồm một bước gây đột biến sau bước sàng lọc/chọn lọc), nhưng tốt hơn là không quá 20, hoặc không quá 10, hoặc không quá 5, xử lý (hoặc bước sàng lọc/chọn lọc) được thực hiện. Theo 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 dịch chuyển với nucleotit khác, hoặc được gây khuyết đoạn, so với chủng bố mẹ.

Việc sử dụng các thuật ngữ số ít trong phiên bản tiếng Anh "a," "an," và "the" và các dạng tương tự trong nội dung bản mô tả (đặc biệt trong nội dung của yêu cầu bảo hộ dưới đây) được hiểu để bao hàm cả số ít và số nhiều, trừ khi có quy định rõ ràng trong bản mô tả hoặc có mâu thuẫn một cách rõ ràng trong nội dung. Các thuật ngữ "bao gồm", "có", "gồm" và "chứa" được hiểu

dưới dạng các thuật ngữ có kết thúc mở (tức là có nghĩa “bao gồm” nhưng không chỉ giới hạn ở đó,") trừ khi có quy định khác. Việc nêu các khoảng giá trị trong bản mô tả chỉ nhằm dùng như một phương pháp tốc ký để đề cập riêng đến từng giá trị riêng biệt nằm trong khoảng này, trừ khi có quy định trong bản mô tả, và mỗi giá trị riêng biệt này được đưa vào bản mô tả như thể nó được nêu riêng biệt trong bản mô tả. Tất cả các phương pháp được đề cập trong bản mô tả có thể được thực hiện theo trình tự bất kỳ trừ khi có quy định trong bản mô tả hoặc có mâu thuẫn một cách rõ ràng trong nội dung. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ ví dụ (ví dụ, "như") được đề xuất trong bản mô tả, chỉ nhằm minh họa rõ hơn sáng chế và không giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi có yêu cầu khác. Cách thể hiện trong bản mô tả không nên hiểu là mô tả dấu hiệu loại trừ yếu tố không được yêu cầu bảo hộ đối với thực tiễn sáng chế.

Thực hiện và các khía cạnh theo sáng chế

Các tác giả sáng chế đã tiến hành sàng lọc và nghiên cứu chi tiết để thu được chế phẩm kháng khuẩn chứa một hoặc hỗn hợp của hai chủng vi khuẩn axit lactic khác nhau có hiệu quả đối với vi sinh vật không mong muốn như nấm mốc và nấm men.

Các tác giả sáng chế đã sàng lọc trong số 200 ứng cử viên *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus rhamnosus* để tìm ra một chủng hoặc hỗn hợp của hai chủng hiệu quả nhất đối với nhiều loại vi sinh vật như nấm men và nấm mốc. Các sàng lọc được thực hiện trên thử nghiệm mô hình giả sản phẩm sữa đã lên men chịu nhiệt trung bình nhiều nhất có thể trong môi trường trên cơ sở sữa mà môi trường khởi động thích hợp được bổ sung vào có hoặc không có các ứng cử viên bảo quản sinh học và được lên men trong các điều kiện thích hợp với sản phẩm sữa đã lên men chịu nhiệt trung bình. Các sinh vật đích được tách ra từ sản phẩm sữa đã lên men chịu nhiệt trung bình. Cả vi khuẩn axit lactic được tinh chế từ môi trường nuôi cấy HOLDBAC™ của Danisco A/S, Đan Mạch, cũng như các môi trường nuôi cấy đầy đủ HOLDBAC™ YM-B và HOLDBAC™ YM-C chứa cả vi khuẩn axit lactic lẫn vi khuẩn axit propionic được sử dụng làm mẫu chuẩn.

Phát hiện được mười bảy ứng cử viên trong số *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus rhamnosus* thường ức chế 12 nấm chỉ thị bằng hoặc tốt hơn so với vi khuẩn axit lactic mẫu chuẩn khi được thử nghiệm ở 25°C. Do vậy, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm kháng khuẩn chứa ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* hoặc *Lactobacillus paracasei*.

Chính trong số các chủng ứng cử viên đã xác định cũng có hoạt tính trong

cùng khoảng như vi khuẩn axit lactic mẫu chuẩn khi được thử nghiệm trong các điều kiện lạnh và cụ thể là ba chủng đã thể hiện rất hiệu quả: *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 với số truy cập DSM24651, *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 với số truy cập DSM24616 và *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 với số truy cập DSM24652. Ba chủng này được lưu giữ tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ).

Đã cho thấy các chủng đơn này có hiệu quả tốt hơn hoặc tương đương đối với các nấm men khác nhau, khi được thử nghiệm trong cái gọi là thử nghiệm bình so với môi trường nuôi cấy HOLDBAC™. Do vậy, các chủng đơn này rất thích hợp để dùng làm chất kháng khuẩn. Vì vậy, theo khía cạnh được ưu tiên, sáng chế đề xuất phẩm kháng khuẩn chứa ít nhất một chủng được chọn từ nhóm bao gồm:

Lactobacillus rhamnosus CHCC12697 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24616,

Lactobacillus rhamnosus CHCC14226 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24652,

Lactobacillus paracasei CHCC12777 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24651, và

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, chế phẩm kháng khuẩn theo sáng chế chứa một trong số các chủng hoặc thể đột biến của chúng nêu trên làm chất duy nhất tạo ra hoạt tính kháng khuẩn.

Ngoài ba chủng trên đây, sáng chế cũng đề xuất thể đột biến có nguồn gốc từ các chủng này, tức là chúng thu được bằng cách sử dụng một trong số các chủng được lưu giữ CHCC12777, CHCC12697 hoặc CHCC14226 làm nguyên liệu ban đầu. Chủng đột biến này có thể có nguồn gốc từ một trong số các chủng này, ví dụ, bằng phương pháp sử dụng kỹ thuật di truyền, phóng xạ, tia cực tím, xử lý bằng hóa học và/hoặc các phương pháp gây biến đổi bộ gen. Thể đột biến theo sáng chế sẽ ức chế và/hoặc ngăn ngừa sự sinh trưởng của một số vi khuẩn hoặc nấm, tốt hơn là nấm mốc. Tốt hơn là, thể đột biến có hầu như ít nhất 80% hoặc cao hơn, ít nhất 90% hoặc cao hơn, ít nhất 95% hoặc cao hơn, hoặc thậm chí lên đến 100% hoặc cao hơn hiệu quả kháng khuẩn, ví dụ, kháng nấm, so với chủng bố mẹ của nó khi được xác định, ví dụ, trong thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 2 bằng cách sử dụng một trong số các nấm men *K. marxianus*, *P. fermentas*, *Y. lipolytica* hoặc *C. sake* làm tạp chất.

Hiệu quả ức chế của các chủng này đối với vi sinh vật không mong muốn có thể được xác định bằng cách bảo quản các chai ở nhiệt độ thích hợp trong thời gian bảo quản thích hợp như được mô tả trong các Ví dụ dưới đây.

Nói chung, nhiệt độ thích hợp mà tại đó phương pháp này cần được thực hiện phụ thuộc vào nhiệt độ mà tại đó thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc dược phẩm đặc biệt thường được bảo quản và/hoặc được sản xuất. Nhiệt độ mà tại đó các chai thường được bảo quản nằm trong khoảng từ 5°C đến 26°C, tốt hơn nếu nhiệt độ này là khoảng 8°C.

Thời gian bảo quản ở nhiệt độ phụ thuộc vào khoảng thời gian mà thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật, hoặc dược phẩm thường bảo quản (thời hạn sử dụng). Thời gian bảo quản thường nằm trong khoảng từ 7 đến 28 ngày, tốt hơn nếu thời gian bảo quản là khoảng 21 ngày.

Khi được thử nghiệm trong hỗn hợp gồm 2 chủng, đã bắt ngờ phát hiện ra rằng hỗn hợp của các chủng đơn hiệu quả nhất, thậm chí còn tốt hơn một trong hai chủng ngay cả khi tổng nồng độ tế bào được bổ sung vào là bằng nhau đối với các chủng đơn và hỗn hợp gồm 2 chủng thử nghiệm. Các hỗn hợp của *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 và *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 hoặc *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 và *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 dường như hiệu quả hơn so với các môi trường mẫu chuẩn HOLDBAC™ YM-B và HOLDBAC™ YM-C của Danisco, Đan Mạch.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất chế phẩm kháng khuẩn chứa ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei*, trong đó ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 với số truy cập DSM24616, *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 với số truy cập DSM24652 và chủng đột biến của chúng, trong đó chủng đột biến này được tạo ra bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu ban đầu.

Theo phương án được ưu tiên khác, ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 với số truy cập DSM24651 và chủng đột biến của chúng, trong đó chủng đột biến này được tạo ra bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu ban đầu.

Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm kháng khuẩn, và tốt hơn nữa là chế phẩm kháng nấm, chứa ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei*, trong đó:

ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* được chọn từ nhóm bao gồm

Lactobacillus rhamnosus CHCC12697 với số truy cập DSM24616, *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 với số truy cập DSM24652 và chủng đột biến của chúng, trong đó chủng đột biến này được tạo ra bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu ban đầu; và

ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 với số truy cập DSM24651 và chủng đột biến của chúng, trong đó chủng đột biến này được tạo ra bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu ban đầu.

Chế phẩm kháng khuẩn chứa ít nhất *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 và *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 được đặc biệt ưu tiên. Tương tự, chế phẩm kháng khuẩn chứa ít nhất *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 và *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 được đặc biệt ưu tiên theo sáng chế.

Chế phẩm kháng khuẩn thường chứa vi khuẩn ở dạng cô đặc bao gồm dạng cô đặc đông lạnh, khô hoặc đông khô thường có nồng độ tế bào sống, nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^{12} cfu (đơn vị tạo thành khuẩn lạc) cho mỗi gam chế phẩm chứa ít nhất là 10^4 cfu cho mỗi gam chế phẩm, như ít nhất là 10^5 cfu/g, ví dụ, ít nhất là 10^6 cfu/g, như ít nhất là 10^7 cfu/g, ví dụ, ít nhất là 10^8 cfu/g, như ít nhất là 10^9 cfu/g, ví dụ, ít nhất là 10^{10} cfu/g, như ít nhất là 10^{11} cfu/g. Tốt hơn là, do vậy, chế phẩm kháng khuẩn theo sáng chế có mặt ở dạng đông lạnh, dạng khô hoặc dạng đông khô, ví dụ, dưới dạng môi trường nuôi cấy Direct Vat Set (DVS). Tuy nhiên, theo sáng chế, chế phẩm kháng khuẩn cũng có thể là dạng lỏng thu được sau khi tạo huyền phù dạng tế bào cô đặc đông lạnh, khô hoặc đông khô trong môi trường lỏng như nước hoặc dung dịch đệm PBS. Khi chế phẩm kháng khuẩn theo sáng chế là huyền phù, nồng độ của tế bào sống nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^{12} cfu (đơn vị tạo thành khuẩn lạc) cho mỗi ml chế phẩm chứa ít nhất là 10^4 cfu cho mỗi ml chế phẩm, như ít nhất là 10^5 cfu/ml, ví dụ, ít nhất là 10^6 cfu/ml, như ít nhất là 10^7 cfu/ml, ví dụ, ít nhất là 10^8 cfu/ml, như ít nhất là 10^9 cfu/ml, ví dụ, ít nhất là 10^{10} cfu/ml, như ít nhất là 10^{11} cfu/ml.

Chế phẩm có thể chứa thêm các hợp phần khác là chất bảo quản đông lạnh và/hoặc các chất phụ gia thông thường bao gồm các chất dinh dưỡng như cao nấm men, đường và vitamin, ví dụ, vitamin A, C, D, K hoặc vitamin của nhóm vitamin B. Chất bảo quản đông lạnh thích hợp có thể được bổ sung vào chế phẩm theo sáng chế là các hợp phần làm tăng mức dung nạp lạnh vi sinh vật như manitol, sorbitol, natri tripolyphosphat, xylitol, glyxerol, raffinôsi, maltodextrin, erythritol, threitol, trehaloza, glucoza và fructoza. Các chất phụ

gia khác có thể bao gồm, ví dụ, hydratcacbon, chất tạo hương, khoáng chất, enzym (ví dụ, men dịch vị, lactaza và/hoặc phospholipaza).

Chế phẩm kháng khuẩn theo sáng chế chứa chủng *Lactobacillus rhamnosus* và chủng *Lactobacillus paracasei*, tỷ lệ giữa chủng *Lactobacillus rhamnosus* và chủng *Lactobacillus paracasei*, ví dụ, tỷ lệ giữa nồng độ hoặc số lượng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* và nồng độ hoặc số lượng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei*, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 1:100 đến 100:1, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1:10 đến 10:1.

Chế phẩm kháng khuẩn theo sáng chế có thể được sử dụng với thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật và dược phẩm bất kỳ miễn cảm với sự suy biến vi khuẩn và/hoặc nhiễm nấm men và nấm mốc. Các thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật và dược phẩm này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, quả và thực vật bao gồm các sản phẩm có nguồn gốc từ quả và thực vật, hạt và sản phẩm có nguồn gốc từ hạt, các sản phẩm sữa, thịt, gia cầm, và hải sản. Theo các phương án được đặc biệt ưu tiên, chế phẩm được sử dụng cho sản phẩm sữa và/hoặc thịt và gia cầm. Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế để dùng làm chất phụ gia để sản xuất các sản phẩm sữa, như sữa chua, tvarog, kem chua, pho mát kem và các sản phẩm tương tự.

Chế phẩm kháng khuẩn theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để ức chế vi sinh vật không mong muốn được chọn từ nhóm bao gồm nấm và vi khuẩn và hỗn hợp của chúng. Chế phẩm theo sáng chế đặc biệt hữu ích để ức chế và/hoặc ngăn ngừa sự sinh trưởng của nấm và vi khuẩn là các tạp chất đã biết thông thường trong các quy trình của ngành công nghiệp sữa như trong các quy trình lên men sữa.

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

trưởng của loài *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Peniciffium nalgiovense*, *Cladosporium* ssp., *Peniciffium commune*, *Mucor* ssp., *Peniciffium brevicompactum*, *Aspergillus versicolor*, *Peniciffium crustosum*, *Kluyveromyces lactis*, và/hoặc *Debaromyces hansenii*.

Chế phẩm kháng khuẩn theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế cũng có thể được sử dụng làm dược phẩm để điều trị nấm gây bệnh, tốt hơn là nấm men gây bệnh.

Như nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc dược phẩm chứa chế phẩm kháng khuẩn của khía cạnh thứ nhất theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm quả và các sản phẩm có nguồn gốc từ quả, thực vật và sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật, hạt và các sản phẩm có nguồn gốc từ hạt, các sản phẩm sữa, thịt, gia cầm và hải sản và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, thực phẩm là sản phẩm sữa, tốt hơn nếu là sản phẩm sữa chịu nhiệt trung bình hoặc sữa chịu nhiệt như pho mát tươi, sữa chua, kem chua hoặc tvarog.

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

Theo một phương án được ưu tiên, dược phẩm là sản phẩm hữu ích để dùng cho chế phẩm kháng khuẩn theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế cho người hoặc động vật để ức chế vi sinh vật gây bệnh và làm thuyên giảm các triệu chứng liên quan đến vi sinh vật gây bệnh. Ví dụ về các triệu chứng như vậy bao gồm các triệu chứng liên quan đến nhiễm nấm men. Theo một phương án, dược phẩm có thể là dạng đơn vị liều lượng chứa chế phẩm kháng khuẩn. Tốt hơn, nếu dạng đơn vị liều lượng là viên nang hoặc viên nén. Tuy nhiên, dạng đơn vị liều lượng cũng có thể thích hợp để dùng cho niêm mạc hoặc da và, do đó, ở dạng bột nhão, kem, thuốc mỡ và các dạng tương tự.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc dược phẩm theo khía cạnh thứ năm của sáng chế bao gồm bước bổ sung chế phẩm kháng khuẩn theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế trong quá trình sản xuất thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật, hoặc dược phẩm.

Theo một phương án được ưu tiên, nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* hoặc *Lactobacillus paracasei* ít nhất là 1×10^6 cfu/g, tốt hơn nếu ít nhất là 5×10^6 cfu/g, tốt nhất nếu ít nhất là 1×10^8 cfu/g, hoặc ít nhất là 1×10^6 cfu/ml, tốt hơn nếu ít nhất là 5×10^6 cfu/ml, tốt nhất nếu ít nhất là 1×10^8 cfu/ml, thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc dược phẩm, hoặc ít

nhất là 1×10^5 cfu/cm², tốt hơn nếu ít nhất là 1×10^5 cfu/cm², tốt nhất nếu ít nhất là 1×10^7 cfu/cm², bề mặt của thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc được phẩm.

Khi thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc được phẩm được sản xuất bằng cách bổ sung chế phẩm chứa ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei*, nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* ít nhất là 1×10^6 cfu/g hoặc ít nhất là 1×10^6 cfu/ml thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc được phẩm, hoặc ít nhất là 1×10^5 cfu/cm² bề mặt của thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc được phẩm. Tốt hơn là, nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* ít nhất là 5×10^6 cfu/g hoặc ít nhất là 5×10^6 cfu/ml thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc được phẩm, hoặc ít nhất là 5×10^5 cfu/cm² bề mặt của thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc được phẩm. Theo phương án khác, nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* ít nhất là 1×10^8 cfu/g hoặc ít nhất là 1×10^8 cfu/ml thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc được phẩm, hoặc ít nhất là 1×10^7 cfu/cm² bề mặt của thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc được phẩm.

Theo một phương án được ưu tiên, các thông số của quá trình sản xuất được kiểm soát trong quá trình sản xuất sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* tăng hoặc duy trì không đổi.

Chế phẩm kháng khuẩn theo sáng chế được sử dụng dễ dàng nhất bằng cách trộn với và/hoặc đưa lên thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc được phẩm trộn được, nhưng cũng phải có tác dụng xử lý bề mặt của thực phẩm rắn, hoặc phía trong của các sản phẩm này, ví dụ, bằng cách tiêm. Theo các phương án khác nữa, chế phẩm có thể được dùng dưới dạng nước sốt, breeding, ướp gia vị, nước bóng, hỗn hợp tạo màu, và các dạng tương tự, nguyên tắc quan trọng đó là chế phẩm kháng khuẩn có thể dùng cho bề mặt bị suy biến vi khuẩn và nhiễm nấm men và nấm mốc. Theo các phương án khác nữa, chế phẩm có thể được đặt tiếp xúc gián tiếp với bề mặt thực phẩm bằng cách đưa chế phẩm vào bao gói thực phẩm và sau đó đưa bao gói này lên bề mặt thực phẩm. Lượng tối ưu được sử dụng sẽ phụ thuộc vào chế phẩm của thực phẩm cụ thể cần được xử lý và phương pháp được sử dụng để đưa chế phẩm lên bề mặt thực phẩm, nhưng có thể được xác định bằng thử nghiệm đơn giản.

Theo nhiều phương án được ưu tiên, phương pháp này bao gồm một hoặc

nhiều bước lên men và chế phẩm kháng khuẩn có thể được bổ sung vào thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc được phẩm trước khi, trong khi hoặc sau một hoặc nhiều bước lên men này.

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

Theo khía cạnh cuối, sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24616, hoặc chủng đột biến của nó, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24652, hoặc chủng đột biến của nó và chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24651, hoặc chủng đột biến của nó, trong đó chủng đột biến này được tạo ra bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu ban đầu.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu ban đầu, bằng kỹ thuật gây đột biến hoặc phân lập lại thông thường, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thu được thể đột biến khác hoặc các dẫn xuất của chúng vẫn giữ lại các dấu hiệu và ưu điểm liên quan được mô tả ở đây. Do đó, thuật ngữ "thể đột biến của chúng" của khía cạnh thứ nhất đề cập đến chủng đột biến được tạo ra bằng cách sử dụng chủng được lưu giữ làm nguyên liệu ban đầu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Xác định bán định lượng hiệu quả ức chế *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC12697 riêng biệt và kết hợp với các tạp chất nấm men và nấm mốc khác nhau.

Đối với việc kiểm tra bán định lượng hiệu quả ức chế *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC12697 riêng biệt và kết hợp, thử nghiệm thạch được sử dụng, tương tự quy trình sản xuất và sản phẩm pho mát tươi:

Sữa nguyên béo được làm đồng nhất (3,5% khối lượng/thể tích) được xử lý bằng nhiệt ở $79 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 20 giây và làm nguội ngay. Môi trường khởi động thương phẩm (F-DVS CHN-19 mua từ Chr. Hansen A/S, Đan Mạch)

được cấy ở nồng độ 0,1 u/L, và sữa đã cấy được phân bố vào các chai dung tích 220 ml. Các chai khác nhau này được cấy *Lb. paracasei* CHCC12777 và/hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC12697 ở tổng nồng độ là 5×10^6 CFU/ml, và một chai được sử dụng làm mẫu tham chiếu và chỉ được cấy môi trường khởi động. Hơn nữa, 5% chất chỉ thị pH chứa bromocresol màu tím và bromocresol xanh lá cây được bổ sung vào để thu được chỉ dấu về tốc độ axit hóa, và thu được môi trường có màu xanh da trời/xanh lá cây giúp có thể dò được một cách dễ dàng hơn sự sinh trưởng của nấm men và nấm mốc đích sau đó. Tất cả các chai được ủ trong bể nước ở $29 \pm 1^\circ\text{C}$ và được lên men ở các điều kiện này cho đến khi độ pH đạt $4,60 \pm 0,1$. Sau khi lên men, các chai này được làm nguội ngay trên đá và lắc mạnh để phá vỡ khối kết tụ. Sau đó, sữa đã lên men được làm ấm đến nhiệt độ 40°C và được bổ sung vào 40ml dung dịch thạch vô trùng 5% đã được làm nóng chảy và làm nguội đến 60°C . Dung dịch của sữa đã lên men và thạch sau đó được rót vào các đĩa petri vô trùng và các đĩa này được làm khô trên bàn thí nghiệm LAF trong 30 phút.

Nấm men và nấm mốc đã chọn được chấm ở các nồng độ 10^4 , 10^3 và 10^2 CFU/chấm lần lượt đối với nấm men *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Yarrowia lipolytica* và *Candida sake*. Huyền phù chứa bào tử sinh trưởng đầy đủ được pha loãng 1000, 100, 10 lần hoặc được sử dụng không pha loãng với lần lượt nấm mốc *Penicillium nalgiovense*, *Mucor* ssp., *Penicillium commune* và *Cladosporium* ssp.. Các đĩa này được ủ ở $7 \pm 1^\circ\text{C}$ và được thử nghiệm đều đặn về sự sinh trưởng của nấm men và nấm mốc.

Kết quả về thử nghiệm thạch được thể hiện trên Fig. 1, cho thấy tất cả các nấm men và nấm mốc được thử nghiệm đều sinh trưởng rất tốt trên các đĩa thạch được làm từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động (mẫu tham chiếu). Tuy nhiên, khi *Lb. paracasei* CHCC12777 hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC12697 có mặt trong quá trình lên men sữa các đĩa thu được ngăn ngừa sự sinh trưởng của *K. marxianus* và *Y. lipolytica* được bổ sung ở tất cả các nồng độ. Hơn nữa, quan sát được sự ức chế đáng kể đối với toàn bộ nấm mốc được chấm lên các đĩa khi *Lb. paracasei* CHCC12777 hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC12697 có mặt trong suốt quá trình lên men sữa. Cả khi *Lb. paracasei* CHCC12777 lẫn *Lb. rhamnosus* CHCC12697 đều không được bổ sung vào dưới dạng chủng đơn vì chúng dường như gây ra hiệu quả ức chế bất kỳ đối với chủng *P. fermentans* hoặc *C. sake*. Tuy nhiên, khi *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC12697 đều có mặt trong quá trình lên men sữa, quan sát được sự ức chế sinh trưởng *P. fermentans* khi được chấm ở các nồng độ thấp hơn là 10^2 và 10^3 CFU/chấm, và nấm mốc *Cladosporium* ssp. cũng như

Mucor ssp. bị ức chế hơn so với khi chủng *Lb. paracasei* CHCC12777 hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC12697 được bổ sung riêng biệt. Các kết quả này minh họa một số hiệu quả kháng nấm hiệp đồng của hai chủng *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC12697.

Ví dụ 2: Xác định định lượng hiệu quả ức chế *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC12697 riêng biệt và kết hợp đối với *Yarrowia lipolytica*.

Để kiểm tra định lượng hiệu quả ức chế *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC12697 riêng biệt và kết hợp, một thử nghiệm được sử dụng, tương tự quy trình sản xuất và sản phẩm phô mát tươi:

Sữa nguyên béo đã nghiền đồng nhất (3,5%, khối lượng/thể tích) được xử lý bằng nhiệt ở $79 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 20 giây và làm nguội ngay. Môi trường khởi động thương phẩm (F-DVS CHN-19 mua từ Chr. Hansen A/S, Đan Mạch) được cấy ở 0,1 u/L, và sữa đã cấy được phân bố vào các chai dung tích 1L. Các chai khác nhau được cấy *Lb. paracasei* CHCC12777 và/hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC12697 ở tổng nồng độ là 5×10^6 CFU/ml, và một chai được sử dụng làm mẫu tham chiếu và chỉ được cấy môi trường khởi động. Hơn nữa, 2 chai được cấy HOLDBAC™ YM-B (50DCU/100L; Danisco A/S, Đan Mạch) hoặc HOLDBAC™ YM-C (20 DCU/100L; Danisco A/S, Đan Mạch) cùng với môi trường khởi động CHN-19. Tất cả các chai được ủ trong bể nước ở $29 \pm 1^\circ\text{C}$ và được lên men ở các điều kiện này cho đến khi đạt đến độ pH là $4,65 \pm 0,05$. Sau khi lên men, các chai được làm nguội ngay trên đá và lắc mạnh để phá vỡ khối kết tụ.

Thành phần của mỗi chai được phân bố vào cốc nhựa có dung tích nhỏ hơn để cấy chủng nấm men *Yarrowia lipolytica* được phân lập trước đó dưới dạng tạp chất từ sản phẩm phô mát tươi. Hai cốc riêng biệt được cấy trong thể tích là 1% (thể tích/khối lượng) để đạt được mức nhiễm cuối *Y. lipolytica* trong sữa đã lên men sản phẩm là khoảng 1×10^2 CFU/g. Các cốc nhựa này được gắn kín và bảo quản ở $8 \pm 1^\circ\text{C}$. Sản phẩm sữa đã lên men được lấy mẫu đều đặn về mức nhiễm *Y. lipolytica* bằng cách dàn dung dịch pha loãng 10 lần thích hợp điều chế được từ dung dịch nước muối pepton lên thạch glucoza chloramphenicol nấm men (YGC), tiếp đó là ủ hiếu khí trong 5 ngày ở 25°C . Hơn nữa, độ pH của các mẫu sữa đã lên men khác nhau được đo đều đặn trong suốt quá trình bảo quản. Như minh họa trên Fig. 2, sự sinh trưởng của *Y. lipolytica* bị ức chế với sự có mặt của cả hai chủng *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC12697 khi được sử dụng dưới dạng chủng đơn cùng với môi trường khởi động CHN-19 trước khi lên men. Cả hai chủng gây ức chế cao hơn đáng kể so với HOLDBAC™ YM-B và HOLDBAC™ YM-C. Hơn

nữa, phát hiện được hiệu quả ức chế hiệp đồng khi *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC12697 được sử dụng kết hợp so với hiệu quả ức chế từng chủng được sử dụng riêng biệt. Khi được sử dụng kết hợp, chủng *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC12697 tác động mạnh mẽ đối với cả pha lag cũng như số lượng tế bào tối đa thu được đối với *Y. lipolytica* trong sản phẩm sữa đã lên men và hiệu quả hiệp đồng này có thể làm kéo dài thời hạn sử dụng cho các loại sản phẩm này.

Ví dụ 3: Xác định bán định lượng hiệu quả ức chế *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 riêng biệt và kết hợp đối với các tạp chất nấm men và nấm mốc khác nhau.

Để kiểm tra bán định lượng hiệu quả ức chế *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 riêng biệt và kết hợp, thử nghiệm thạch được sử dụng, tương tự quy trình sản xuất và sản phẩm pho mát tươi:

Sữa nguyên béo được làm đồng nhất (3,5% khối lượng/thể tích) được xử lý bằng nhiệt ở $79\pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 20 giây và làm nguội ngay. Môi trường khởi động thương phẩm (F-DVS CHN-19) được cấy ở 0,1 u/L, và sữa đã cấy được phân bố vào các chai dung tích 220 ml. Các chai khác nhau được cấy *Lb. paracasei* CHCC12777 và/hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC14226 ở tổng nồng độ là 5×10^6 CFU/ml, và một chai được sử dụng làm mẫu tham chiếu và chỉ được cấy môi trường khởi động. Hơn nữa, 5% chất chỉ thị pH chứa bromocresol màu tía và bromocresol xanh lá cây được bổ sung vào để thu được chỉ thị về tốc độ axit hóa, và để thu được môi trường có màu xanh da trời/xanh lá cây để giúp có thể dò được một cách dễ dàng hơn sự sinh trưởng sau đó của nấm men và nấm mốc đích. Tất cả các chai được ủ trong bể nước ở $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ và được lên men ở các điều kiện này cho đến khi độ pH đạt $4,60\pm 0,1$. Sau khi lên men, các chai được làm nguội ngay trên đá và lắc mạnh để phá vỡ khối kết tụ. Sau đó, sữa đã lên men được làm ấm đến nhiệt độ 40°C và được bổ sung vào 40ml dung dịch thạch vô trùng 5% đã được làm nóng chảy và làm nguội đến 60°C . Dung dịch của sữa đã lên men và thạch sau đó được rót vào các đĩa petri vô trùng và các đĩa này được làm khô trên bàn thí nghiệm LAF trong 30 phút.

Nấm men và nấm mốc đã chọn được chấm ở các nồng độ 10^4 , 10^3 và 10^2 CFU/chấm lần lượt đối với nấm men *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Yarrowia lipolytica* và *Candida sake*. Huyền phù chứa bào tử sinh trưởng đầy đủ được pha loãng 1000, 100, 10 lần hoặc được sử dụng không pha loãng với lần lượt nấm mốc *Penicillium nalgiovense*, *Mucor* ssp., *Penicillium commune* và *Cladospodium* ssp.. Các đĩa này được ủ ở $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ và được thử nghiệm đều đặn về sự sinh trưởng của nấm men và nấm mốc.

Kết quả về thử nghiệm thạch được thể hiện trên Fig. 3, cho thấy tất cả các nấm men và nấm mốc được thử nghiệm sinh trưởng rất tốt trên các đĩa thạch được làm từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động (mẫu tham chiếu). Tuy nhiên, khi *Lb. paracasei* CHCC12777 có mặt trong quá trình lên men sữa các đĩa thu được ngăn ngừa sự sinh trưởng của *K. marxianus* và *Y. lipolytica* được bổ sung ở tất cả các nồng độ. Đối với *Lb. rhamnosus* CHCC14226, các đĩa thu được cũng ngăn ngừa sự sinh trưởng của *K. marxianus* ở tất cả các nồng độ được bổ sung, cũng như hai nồng độ thấp nhất của *Y. lipolytica* được bổ sung. Khi *Lb. paracasei* CHCC12777 hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC14226 được bổ sung vào dưới dạng chủng đơn, dường như chúng cũng gây ra hiệu quả ức chế yếu với các nồng độ thấp hơn của *P. fermentans* được bổ sung. Tuy nhiên, khi *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 đều có mặt trong quá trình lên men sữa, sự sinh trưởng của *P. fermentans* được ngăn ngừa khi được bổ sung ở nồng độ thấp nhất là 10^2 CFU/chấm. Đối với nấm mốc, quan sát được sự ức chế đáng kể khi *Lb. paracasei* CHCC12777 hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC14226 có mặt trong quá trình lên men sữa. Khi sử dụng kết hợp *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226, sự sinh trưởng của *Cladosporium* ssp. bị ức chế nhiều hơn so với khi chủng *Lb. paracasei* CHCC12777 hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC14226 được bổ sung riêng biệt. Các kết quả này minh họa một số hiệu quả kháng nấm hiệp đồng của hai chủng *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226.

Ví dụ 4: Xác định định lượng hiệu quả ức chế *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 riêng biệt và kết hợp đối với *Kluyveromyces marxianus*.

Để kiểm tra hiệu quả ức chế *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 riêng biệt và kết hợp, một thử nghiệm được sử dụng, tương tự quy trình sản xuất và sản phẩm phô mát tươi:

Sữa nguyên béo đã nghiền đồng nhất (3,5%, khối lượng/thể tích) được xử lý bằng nhiệt ở $79 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 20 giây và làm nguội ngay. Môi trường khởi động thương phẩm (F-DVS CHN-19) được cấy ở 0,1 u/L, và sữa đã cấy được phân bố vào các chai dung tích 1 L. Các chai khác nhau được cấy *Lb. paracasei* CHCC12777 và/hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC14226 ở tổng nồng độ là 5×10^6 CFU/ml, và một chai được sử dụng làm mẫu tham chiếu và chỉ được cấy môi trường khởi động. Hơn nữa, 2 chai được cấy HOLDBACTM YM-B (50DCU/100L) hoặc HOLDBACTM YM-C (20 DCU/100L) cùng với môi trường khởi động CHN-19. Tất cả các chai được ủ trong bể nước ở $29 \pm 1^\circ\text{C}$ và

được lên men ở các điều kiện này cho đến khi đạt đến độ pH là $4,65 \pm 0,05$. Sau khi lên men, các chai được làm nguội ngay trên đá và lắc mạnh để phá vỡ khối kết tụ.

Thành phần trong mỗi chai được phân bố vào cốc nhựa có dung tích nhỏ hơn để cấy chủng nấm men *Klyveromyces marxianus* được phân lập trước đó dưới dạng tạp chất từ sản phẩm pho mát tươi. Hai cốc riêng biệt được cấy với thể tích là 1% (thể tích/khối lượng) để đạt được mức nhiễm cuối *K. marxianus* trong sản phẩm sữa đã lên men là khoảng 1×10^2 CFU/g. Các cốc nhựa này được gắn kín và bảo quản ở $8 \pm 1^\circ\text{C}$. Sản phẩm sữa đã lên men được lấy mẫu đều đặn về mức nhiễm *K. marxianus* bằng cách dàn dung dịch pha loãng 10 lần thích hợp điều chế được từ dung dịch nước muối pepton lên thạch glucoza chloramphenicol nấm men (YGC), tiếp đó là ủ hiếu khí trong 3-5 ngày ở 25°C . Hơn nữa, độ pH của các mẫu sữa đã lên men khác nhau được đo đều đặn trong suốt quá trình bảo quản.

Như minh họa trên Fig. 4, sự sinh trưởng của *K. marxianus* bị ức chế với sự có mặt của cả hai chủng *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 khi được sử dụng dưới dạng chủng đơn cùng với môi trường khởi động CHN-19 trước khi lên men. Như quan sát trong ví dụ 2, *Lb. paracasei* CHCC12777 cũng gây ức chế cao hơn đáng kể *K. marxianus* so với môi trường nuôi cấy HOLDBAC™ YM-B và HOLDBAC™ YM-C, trong khi đó đã thấy rằng mức ức chế gây ra bởi *Lb. rhamnosus* CHCC14226 là bằng với mức ức chế trong môi trường nuôi cấy HOLDBAC™. Hiệu quả ức chế hiệp đồng phát hiện được khi *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 được sử dụng kết hợp so với hiệu quả ức chế từng chủng được sử dụng riêng biệt. Khi được sử dụng kết hợp, chủng *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 dẫn đến sự sinh trưởng của *K. marxianus* chậm hơn trong sản phẩm sữa đã lên men và vì vậy có thể làm kéo dài thời hạn sử dụng đối với dạng sản phẩm này.

Ví dụ 5: Xác định bán định lượng hiệu quả ức chế *Lb. paracasei* CHCC14676 và *Lb. rhamnosus* CHCC5366 riêng biệt và kết hợp đối với các tạp chất nấm mốc khác nhau.

Để kiểm tra bán định lượng *Lb. paracasei* CHCC14676 và *Lb. rhamnosus* CHCC5366 riêng biệt và kết hợp, thử nghiệm thạch được sử dụng, tương tự quy trình sản xuất và sản phẩm sữa chua:

Sữa được làm đồng nhất (1,5% chất béo khối lượng/thể tích) được xử lý bằng nhiệt ở 95°C trong 5 phút và làm nguội ngay. Môi trường khởi động thương phẩm (F-DVS YC-350 mua từ Chr. Hansen A/S, Đan Mạch) được cấy

ở 0,02%, và sữa được phân bố vào các chai dung tích 220 ml. Các chai này được cấy tiếp lần lượt *Lb. paracasei* CHCC14676, *Lb. rhamnosus* CHCC5366 và hỗn hợp của hai chủng ở tổng nồng độ là 1×10^7 CFU/ml. Một chai không được cấy tiếp ngoài môi trường khởi động được sử dụng làm mẫu tham chiếu. Hơn nữa, 5% chất chỉ thị pH chứa bromocresol màu tía và bromocresol xanh lá cây được bổ sung vào tất cả các chai để thu được chỉ thị về tốc độ axit hóa, và để thu được môi trường màu xanh da trời/xanh lá cây để giúp có thể dò được một cách dễ dàng hơn sự sinh trưởng sau đó của nấm men và nấm mốc đích. Tất cả các chai được ủ trong bể nước ở $43 \pm 1^\circ\text{C}$ và được lên men ở các điều kiện này cho đến khi độ pH đạt $4,60 \pm 0,1$. Sau khi lên men, các chai được làm nguội ngay trên đá và lắc mạnh để phá vỡ khối kết tụ. Sau đó sữa đã lên men được làm ấm đến nhiệt độ 40°C và được bổ sung vào 40ml dung dịch thạch vô trùng 5% đã được làm nóng chảy và làm nguội đến 60°C . Sau đó, dung dịch này được rót vào các đĩa petri vô trùng và các đĩa này được làm khô trên bàn thí nghiệm LAF trong 30 phút.

Huyền phù chứa bào tử sinh trưởng đầy đủ ở các mức pha loãng thích hợp của nấm mốc đã chọn *Penicillium nalgiovese* (10x), *Penicillium commune* (100x), *Aspergillus versicolor* (100x) và *Penicillium crustosum* (100x) được chấm lên các đĩa. Các đĩa được ủ ở 7°C và được thử nghiệm về sự sinh trưởng của nấm mốc ở các khoảng thời gian đều đặn, thích hợp.

Kết quả về thử nghiệm thạch được thể hiện trên Fig. 5, cho thấy tất cả các nấm mốc được thử nghiệm sinh trưởng rất tốt trên các đĩa thạch từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động (mẫu tham chiếu). Tuy nhiên, khi *Lb. paracasei* CHCC14676 hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC5366 có mặt trong quá trình lên men sữa, các đĩa thu được ngăn ngừa sự sinh trưởng của tất cả nấm mốc. Hơn nữa, khi *Lb. paracasei* CHCC14676 và *Lb. rhamnosus* CHCC5366 có mặt kết hợp trong suốt quá trình lên men sữa, quan sát được mức ức chế đáng kể đối với *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* và *Penicillium crustosum* được chấm lên các đĩa.

Ví dụ 6: Xác định bán định lượng hiệu quả ức chế *Lb. paracasei* CHCC14676 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 riêng biệt và kết hợp đối với các tạp chất nấm mốc khác nhau.

Để kiểm tra bán định lượng *Lb. paracasei* CHCC14676 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 riêng biệt và kết hợp, thử nghiệm thạch được sử dụng, tương tự quy trình sản xuất và sản phẩm sữa chua:

Sữa được làm đồng nhất (1,5% chất béo khối lượng/thể tích) được xử lý bằng nhiệt ở 95°C trong 5 phút và làm nguội ngay. Môi trường khởi động

thương phẩm (F-DVS Yoflexd Mild mua từ Chr. Hansen A/S, Đan Mạch) được cấy ở 0,02%, và sữa được phân bố vào các chai dung tích 220 ml. Các chai này được cấy tiếp lần lượt *Lb. paracasei* CHCC14676, *Lb. rhamnosus* CHCC14226 và hỗn hợp của hai chủng ở tổng nồng độ là 1×10^7 CFU/ml. Một chai không được cấy tiếp ngoài môi trường khởi động được sử dụng làm mẫu tham chiếu. Hơn nữa, 5% chất chỉ thị pH chứa bromocresol màu tía và bromocresol xanh lá cây được bổ sung vào tất cả các chai để thu được chỉ thị về tốc độ axit hóa, và để thu được môi trường màu xanh da trời/xanh lá cây để giúp có thể dò được một cách dễ dàng hơn sự sinh trưởng sau đó của nấm men và nấm mốc đích. Tất cả các chai được ủ trong bể nước ở $43 \pm 1^\circ\text{C}$ và được lên men ở các điều kiện này cho đến khi độ pH đạt $4,60 \pm 0,1$. Sau khi lên men, các chai này được làm nguội ngay trên đá và lắc mạnh để phá vỡ khối kết tụ. Sau đó, sữa đã lên men được làm ấm đến nhiệt độ 40°C và được bổ sung vào 40ml dung dịch thạch vô trùng 5% đã được làm nóng chảy và làm nguội đến 60°C . Sau đó, dung dịch này được rót vào các đĩa petri vô trùng và các đĩa này được làm khô trên bàn thí nghiệm LAF trong 30 phút.

Huyền phù chứa bào tử sinh trưởng đầy đủ ở các mức pha loãng thích hợp của nấm mốc đã chọn *Penicillium nalgiovese* (10x), *Penicillium commune* (100x), *Aspergillus versicolor* (100x) và *Penicillium crustosum* (100x) được chấm lên các đĩa. Các đĩa được ủ ở 7°C và được thử nghiệm về sự sinh trưởng của nấm mốc ở các khoảng thời gian đều đặn, thích hợp.

Kết quả về thử nghiệm thạch được thể hiện trên Fig. 6, cho thấy tất cả các nấm mốc được thử nghiệm sinh trưởng rất tốt trên các đĩa thạch từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động (mẫu tham chiếu). Tuy nhiên, khi *Lb. paracasei* CHCC14676 hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC14226 có mặt trong quá trình lên men sữa, các đĩa thu được ngăn ngừa sự sinh trưởng của tất cả nấm mốc. Hơn nữa, khi *Lb. paracasei* CHCC14676 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 có mặt kết hợp trong suốt quá trình lên men sữa, quan sát được sự ức chế đáng kể đối với *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* và *Penicillium crustosum* được chấm lên các đĩa.

Ví dụ 7: Xác định bán định lượng hiệu quả ức chế *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 riêng biệt và kết hợp đối với các tạp chất nấm mốc khác nhau.

Để kiểm tra bán định lượng *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 riêng biệt và kết hợp, thử nghiệm thạch được sử dụng, tương tự quy trình sản xuất và sản phẩm sữa chua:

Sữa được làm đồng nhất (1,5% chất béo khối lượng/thể tích) được xử lý

bằng nhiệt ở 95°C trong 5 phút và làm nguội ngay. Môi trường khởi động thương phẩm (F-DVS YC-350 mua từ Chr. Hansen A/S, Đan Mạch) được cấy ở 0,02%, và sữa được phân bố vào các chai dung tích 220 ml. Các chai này được cấy tiếp lần lượt *Lb. paracasei* CHCC12777, *Lb. rhamnosus* CHCC14226 và hỗn hợp của hai chủng ở tổng nồng độ là 1×10^7 CFU/ml. Một chai không được cấy tiếp ngoài môi trường khởi động được sử dụng làm mẫu tham chiếu. Hơn nữa, 5% chất chỉ thị pH chứa bromocresol màu tím và bromocresol xanh lá cây được bổ sung vào tất cả các chai để thu được chỉ thị về tốc độ axit hóa, và để thu được môi trường màu xanh da trời/xanh lá cây để giúp có thể dò được một cách dễ dàng hơn sự sinh trưởng sau đó của nấm men và nấm mốc đích. Tất cả các chai được ủ trong bể nước ở $43 \pm 1^\circ\text{C}$ và được lên men ở các điều kiện này cho đến khi độ pH đạt $4,60 \pm 0,1$. Sau khi lên men, các chai được làm nguội ngay trên đá và lắc mạnh để phá vỡ khối kết tụ. Sau đó, sữa đã lên men được làm ấm đến nhiệt độ 40°C và được bổ sung vào 40ml dung dịch thạch vô trùng 5% đã được làm nóng chảy và làm nguội đến 60°C. Sau đó, dung dịch này được rót vào các đĩa petri vô trùng và các đĩa này được làm khô trên bàn thí nghiệm LAF trong 30 phút.

Huyền phù chứa bào tử sinh trưởng đầy đủ ở các mức pha loãng thích hợp của nấm mốc đã chọn *Penicillium nalgiovese* (10x), *Penicillium commune* (100x), *Aspergillus versicolor* (100x) và *Penicillium crustosum* (100x) được chấm lên các đĩa. Các đĩa được ủ ở 7°C và được thử nghiệm về sự sinh trưởng của nấm mốc ở các khoảng thời gian đều đặn, thích hợp.

Kết quả về thử nghiệm thạch được thể hiện trên Fig. 7, cho thấy tất cả các nấm mốc được thử nghiệm sinh trưởng rất tốt trên các đĩa thạch từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động (mẫu tham chiếu). Tuy nhiên, khi *Lb. paracasei* CHCC12777 hoặc *Lb. rhamnosus* CHCC14226 có mặt trong quá trình lên men sữa, các đĩa thu được ngăn ngừa sự sinh trưởng của tất cả nấm mốc. Hơn nữa, khi *Lb. paracasei* CHCC12777 và *Lb. rhamnosus* CHCC14226 có mặt kết hợp trong suốt quá trình lên men sữa, quan sát được mức ức chế đáng kể đối với tất cả nấm mốc được chấm lên các đĩa.

Ví dụ 8: Nghiên cứu gây nhiễm kem chua bằng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777.

Để kiểm tra bằng trực quan hiệu quả ức chế chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 dưới dạng chủng đơn trên nấm mốc khác nhau *P. commune*, *A. versicolor*, *P. brevicompactum*, *P. crustosum* và *P. glabrum*, kem chua được điều chế:

Sữa chứa hàm lượng chất béo cao đã tiệt trùng được cấy môi trường khởi

động thương phẩm lên men hỗn tạp (F-DVS DSG-2000 mua từ Chr. Hansen A/S, Đan Mạch) ở 0,01%. Sữa được cấy tiếp HOLDBACTM YM-B (10DCU/100L) hoặc chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12777 (5×10^6 CFU/g) và một mẻ được sử dụng làm mẫu tham chiếu và chỉ được cấy môi trường khởi động.

Sữa được lên men ở $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ cho đến khi đạt được độ pH là $4,60 \pm 0,05$ và kem chua được xử lý sau. Kem chua được khuấy và được làm nguội đến $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ và bảo quản ở $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Một ngày sau khi điều chế kem chua, nấm mốc khác nhau được cấy dưới dạng các tạp chất bề mặt trong hai sữa chua giống nhau với một chấm trên bề mặt của sữa chua với đích là 100 bào tử/chấm. Sự sinh trưởng của nấm mốc được đánh giá bằng trực quan sau khi bảo quản trong 45 ngày ở $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trên kem chua được làm từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động (hàng trên cùng) hoặc bằng môi trường khởi động và môi trường nuôi cấy HOLDBACTM YM-B (hàng ở giữa). Ngược lại, khi *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 có mặt trong quá trình lên men sữa (hàng dưới cùng) sự sinh trưởng của tất cả nấm mốc được thử nghiệm bị ức chế.

Ví dụ 9: Nghiên cứu gây nhiễm tvarog bằng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697.

Để kiểm tra bằng trực quan hiệu quả ức chế chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 dưới dạng chủng đơn trên *Mucor* ssp., tvarog được điều chế:

Sữa chứa hàm lượng chất béo thấp đã tiệt trùng được cấy môi trường khởi động thương phẩm (F-DVS CHN-19 mua từ Chr. Hansen A/S, Đan Mạch) ở 0,01%. Sữa được cấy tiếp HOLDBACTM YM-B (5DCU/100L) hoặc chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (5×10^6 CFU/g) và một mẻ được sử dụng làm mẫu tham chiếu và chỉ được cấy môi trường khởi động.

Sữa được lên men ở $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ cho đến khi độ pH là $4,60 \pm 0,05$ đạt được. Nhiệt độ hâm nóng nằm trong khoảng từ 38 đến 40°C . Sau khi rút nước phần sữa đông được ép trong 30 phút ở áp suất 100.000 Pa (1 bar).

Một ngày sau khi điều chế tvarog, *Mucor* ssp. được cấy dưới dạng tạp chất bề mặt hai lần bằng cách hút bằng pipet ba chấm trên bề mặt của tvarog (100 g) với đích là 100 bào tử/chấm. Sự sinh trưởng của nấm mốc được đánh giá bằng trực quan sau khi bảo quản trong 18 ngày ở $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Kết quả của thử nghiệm tvarog được thể hiện trên Fig. 9, cho thấy *Mucor* ssp. sinh trưởng tốt trên tvarog được làm từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động CHN-19 (Ref.). Nấm mốc cũng sinh trưởng tốt trên tvarog

được làm từ sữa được lên men bằng môi trường khởi động và môi trường nuôi cấy HOLDBAC™ YM-B và ở mức độ kém hơn trong tvarog được làm từ sữa được lên men bằng môi trường khởi động và môi trường nuôi cấy HOLDBAC™ YM-C. Tuy nhiên, khi chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 có mặt trong quá trình lên men sữa, quan sát được sự ức chế sinh trưởng *Mucor* ssp. rõ rệt hơn đáng kể.

Ví dụ 10: Nghiên cứu gây nhiễm sữa chua bằng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226.

Để kiểm tra bằng trực quan hiệu quả ức chế chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 dưới dạng chủng đơn trên nấm mốc khác nhau, *P. brevicompactum*, *P. commune*, *A. versicolor* và *P. crustosum*, sữa chua chứa 1,5% chất béo được điều chế:

Sữa được làm đồng nhất (1,5% chất béo) được xử lý bằng nhiệt ở $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 5 phút trong các chai có dung tích 1 L trong bể nước và làm nguội ngay. Môi trường khởi động thương phẩm (F-DVS YF-L901 mua từ Chr. Hansen A/S, Đan Mạch) được cấy ở 0,02%. Sữa được cấy tiếp HOLDBAC™ YM-B (20DCU/100L) hoặc *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 (1×10^7 CFU/ml) và một chai được sử dụng làm mẫu tham chiếu và chỉ được cấy môi trường khởi động.

Sữa được lên men ở nhiệt độ $43^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ cho đến khi đạt được độ pH là $4,60 \pm 0,05$. Sữa chua thu được được rót vào các cốc (100 g) và bảo quản ở $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Một ngày sau khi điều chế sữa chua nấm mốc khác nhau được cấy dưới dạng các tạp chất bề mặt trong hai sữa chua giống nhau với một chấm trên bề mặt của sữa chua với đích là 100 bào tử/chấm. Sự sinh trưởng của nấm mốc được đánh giá bằng trực quan sau khi bảo quản trong 45 ngày ở $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Kết quả của thử nghiệm sữa chua được thể hiện trên Fig. 10, cho thấy *P. brevicompactum* (M1), *P. commune* (M6), *A. versicolor* (M7) và *P. crustosum* (M10) sinh trưởng tốt trên sữa chua được làm từ sữa được lên men chỉ bằng môi trường khởi động YF-L901 (hàng trên cùng) hoặc bằng môi trường khởi động và môi trường nuôi cấy HOLDBAC™ YM-B (hàng ở giữa). Ngược lại, khi *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 có mặt trong quá trình lên men sữa (hàng dưới cùng) sự sinh trưởng của tất cả nấm mốc được thử nghiệm bị ức chế.

Ví dụ 11: Xác định định lượng hiệu quả ức chế *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 đối với *K. lactis* in tvarog.

Để kiểm tra định lượng hiệu quả ức chế chủng *Lactobacillus paracasei*

CHCC12777 dưới dạng chủng đơn trên *K. lactis*, tvarog được điều chế:

Sữa chứa hàm lượng chất béo thấp đã tiệt trùng được cấy môi trường khởi động thương phẩm (F-DVS CHN-19 mua từ Chr. Hansen A/S, Đan Mạch) ở 0,01%. Sữa được cấy tiếp HOLDBAC™ YM-B (20DCU/100L) hoặc chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12777 (5×10^5 CFU/g) và một mẻ được sử dụng làm mẫu tham chiếu và chỉ được cấy môi trường khởi động.

Sữa được lên men ở $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ cho đến khi đạt được độ pH là $4,60 \pm 0,05$. Nhiệt độ hâm nóng nằm trong khoảng từ 38 đến 40°C . Sau khi rút nước phần sữa đông được ép trong 30 phút ở áp suất 100.000 Pa (1 bar).

Một ngày sau khi điều chế tvarog, các khối tvarog mẫu khoảng 10 g được cắt ra và đặt vào các túi ni lông. Các khối này sau đó được cấy hai lần bằng 0,1 ml dịch nuôi cấy nấm men ở mật độ 10.000 CFU/ml bằng cách phun nấm men vào bên trong tvarog bằng đầu kim mảnh. Các túi này được bọc quanh tvarog và buộc chặt lại.

Các mẫu này được bảo quản ở $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ và được phân tích ở các khoảng thời gian thích hợp về mức nhiễm *K. lactis* bằng cách dàn 1 g tvarog và pha loãng tiếp 1 lần trong dung dịch nước muối pepton lên thạch glucoza chloramphenicol nấm men (YGC), tiếp đó là ủ hiếu khí trong 5 ngày ở 25°C .

Như minh họa trên Fig. 11, sự sinh trưởng của *K. lactis* bị ức chế với sự có mặt của chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 khi được cấy cùng với môi trường khởi động CHN-19 trước khi lên men. Chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 gây ức chế cao hơn đáng kể so với môi trường nuôi cấy thương phẩm, HOLDBAC™ YM-B.

Ví dụ 12: Xác định định lượng hiệu quả ức chế *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 đối với *K. lactis* trong tvarog.

Để kiểm tra định lượng hiệu quả ức chế *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 dưới dạng chủng đơn trên *K. lactis*, tvarog được điều chế:

Sữa chứa hàm lượng chất béo thấp đã tiệt trùng được cấy môi trường khởi động thương phẩm (F-DVS CHN-19 mua từ Chr. Hansen A/S, Đan Mạch) ở 0,01%. Sữa được cấy tiếp HOLDBAC™ YM-B (5DCU/100L) hoặc chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (5×10^6 CFU/g) và một mẻ được sử dụng làm mẫu tham chiếu và chỉ được cấy môi trường khởi động.

Sữa được lên men ở $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ cho đến khi đạt được độ pH là $4,60 \pm 0,05$. Nhiệt độ hâm nóng nằm trong khoảng từ 38 đến 40°C . Sau khi rút nước phần sữa đông được ép trong 30 phút ở áp suất 100.000 Pa (1 bar).

Một ngày sau khi điều chế tvarog, các khối tvarog mẫu khoảng 10 g được cắt ra và đặt vào các túi ni lông. Các khối này sau đó được cấy hai lần bằng 0,1

ml dịch nuôi cấy nấm men ở mật độ 10,000 CFU/ml bằng cách phun nấm men vào bên trong tvarog bằng đầu kim mảnh. Các túi này được bọc quanh tvarog và buộc chặt lại.

Các mẫu này được bảo quản ở $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và được phân tích ở các khoảng thời gian thích hợp về mức nhiễm *K. lactis* bằng cách dàn 1 g tvarog và pha loãng tiếp 1 lần trong dung dịch nước muối pepton lên thạch glucoza chloramphenicol nấm men (YGC), tiếp đó là ủ hiếu khí trong 5 ngày ở 25°C .

Như minh họa trên Fig. 11, sự sinh trưởng của *K. lactis* bị ức chế với sự có mặt của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 khi được cấy cùng với môi trường khởi động CHN-19 trước khi lên men. Chủng gây ức chế cao hơn đáng kể so với môi trường nuôi cấy thương phẩm, HOLDBACTM YM-B.

Để kiểm tra định lượng hiệu quả ức chế *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 dưới dạng chủng đơn trên *D. hansenii*, sữa chua được điều chế như sau:

Sữa được làm đồng nhất (1,5% chất béo) được xử lý bằng nhiệt $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 5 phút trong các chai có dung tích 1 L trong bể nước và làm nguội ngay. Môi trường khởi động thương phẩm (F-DVS YF-L901 mua từ Chr. Hansen A/S, Đan Mạch) được cấy ở 0,02%. Sữa được cấy tiếp HOLDBACTM YM-B (20DCU/100L) hoặc *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 (1×10^7 CFU/g) và một chai được sử dụng làm mẫu tham chiếu và chỉ được cấy môi trường khởi động.

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

Một ngày sau khi điều chế sữa chua, các cốc được cấy hai lần bằng 1,00 ml/cốc nấm men ở đích là 20 CFU/g. Nấm men được phân tán bằng nhau trong sữa chua. Các cốc được bảo quản cho đến khi nắp là $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và được phân tích ở các khoảng thời gian thích hợp về mức nhiễm *D. hansenii* bằng cách dàn 1 g sữa chua và pha loãng tiếp 1 lần trong dung dịch nước muối pepton lên thạch glucoza chloramphenicol nấm men (YGC), tiếp đó là ủ hiếu khí trong 5 ngày ở 25°C .

Như minh họa trên Fig. 12, sự sinh trưởng của *D. hansenii* bị ức chế với sự có mặt của chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 khi được cấy cùng với môi trường khởi động YF-L901 trước khi lên men. Chủng gây ức chế cao hơn đáng kể so với môi trường nuôi cấy thương phẩm, HOLDBACTM YM-B.

Nộp lưu mẫu sinh học

Người nộp đơn yêu cầu cho đến ngày được cấp patent các mẫu vi sinh

vật được lưu giữ được nêu dưới đây chỉ có thể được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 được nộp lưu ngày 01/03/2011 tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig với số truy cập: DSM24616.

Chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 được nộp lưu ngày 15/03/2011 tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig với số truy cập: DSM24652.

Chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 được nộp lưu ngày 15/03/2011 tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig với số truy cập: DSM24651.

Việc lưu giữ này tuân theo Hiệp ước Budapest về việc công nhận quốc tế về việc nộp lưu giữ mẫu vi sinh nhằm mục đích xử lý tiến trình patent.

Tài liệu tham khảo

US 2005/0095318 (Schwenninger et al.)

WO 2004/041305 (Valio Ltd)

Tharmaraj, N. & Shah, N.P. (2009) Antimicrobial effects of probiotic bacteria against selected species of yeasts and molds in cheese-based dips. *International Journal of Food Science & Technology*. 44: 1916-1926.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm kháng khuẩn để sản xuất thực phẩm hoặc dược phẩm, trong đó chế phẩm này chứa ít nhất một chủng được chọn từ nhóm bao gồm:

Lactobacillus rhamnosus CHCC12697 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24616,

Lactobacillus rhamnosus CHCC14226 được nộp lưu trong Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24652, và

Lactobacillus paracasei CHCC12777 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24651.

2. Chế phẩm kháng khuẩn theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei*.

3. Chế phẩm kháng khuẩn theo điểm 2, trong đó ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* được chọn từ chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 với số truy cập DSM24651.

4. Thực phẩm chứa chế phẩm kháng khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

5. Thực phẩm theo điểm 4, trong đó thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm quả và sản phẩm có nguồn gốc từ quả, thực vật và sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật, hạt và các sản phẩm có nguồn gốc từ hạt, các sản phẩm sữa, thịt, gia cầm và hải sản và hỗn hợp của chúng.

6. Dược phẩm chứa chế phẩm kháng khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

7. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó dược phẩm này là dạng đơn vị liều lượng chứa chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

8. Phương pháp sản xuất thực phẩm hoặc dược phẩm, cụ thể là thực phẩm hoặc dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 7, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung chế phẩm kháng khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 vào thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc dược phẩm.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) bổ sung chế phẩm kháng khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 trong quá trình sản xuất thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc

được phẩm sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* ít nhất là 1×10^6 cfu/g hoặc ít nhất là 1×10^6 cfu/ml thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc được phẩm, hoặc ít nhất là 1×10^5 cfu/cm² bề mặt của thực phẩm, thức ăn dùng cho động vật hoặc được phẩm, và

(b) kiểm soát các thông số sản xuất trong quá trình sản xuất sao cho nồng độ của ít nhất một chủng *Lactobacillus rhamnosus* và ít nhất một chủng *Lactobacillus paracasei* tăng hoặc duy trì không đổi.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 9, trong đó phương pháp này bao gồm một hoặc nhiều bước lên men.

11. Chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24616.

12. Chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24652.

13. Chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 được nộp lưu tại Bộ sưu tập vi sinh vật và môi trường nuôi cấy tế bào của Đức (DSMZ) với số truy cập DSM24651.

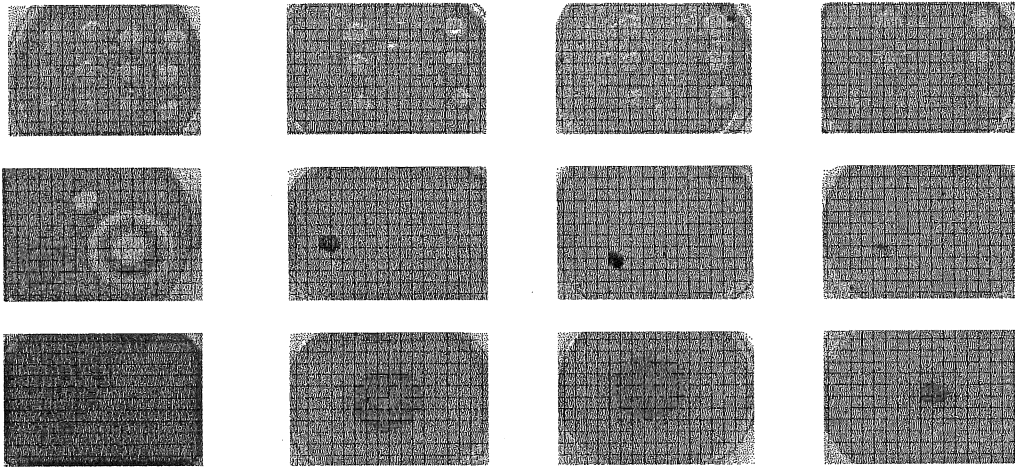


Fig. 1

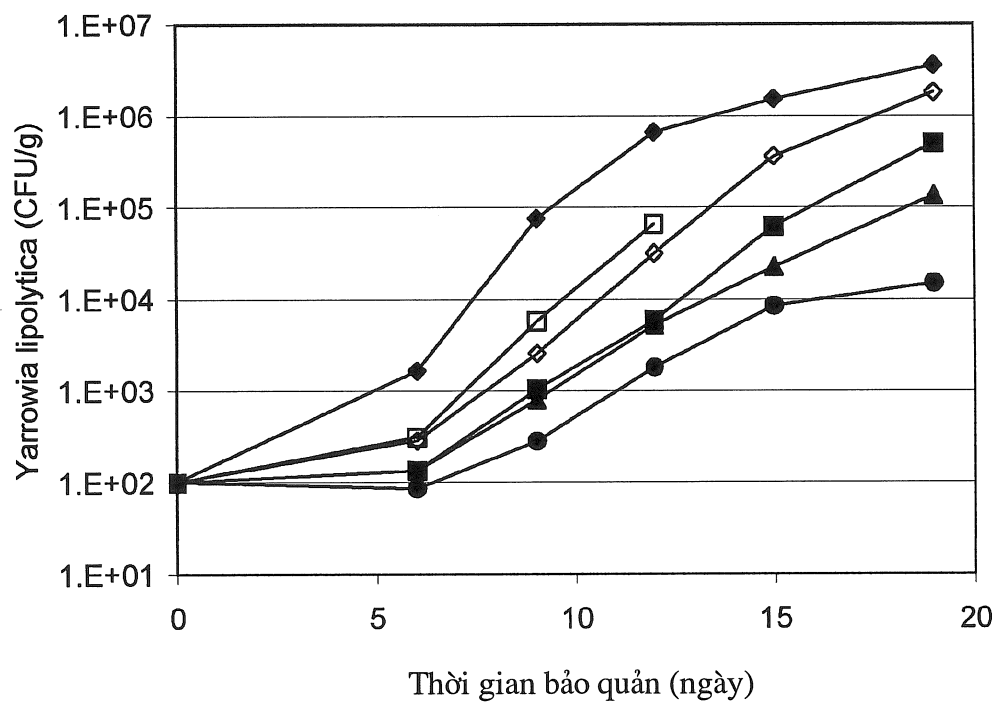


Fig. 2

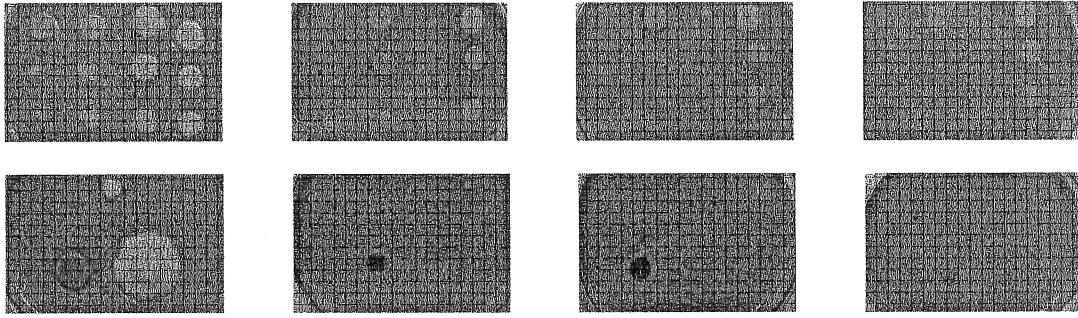


Fig. 3

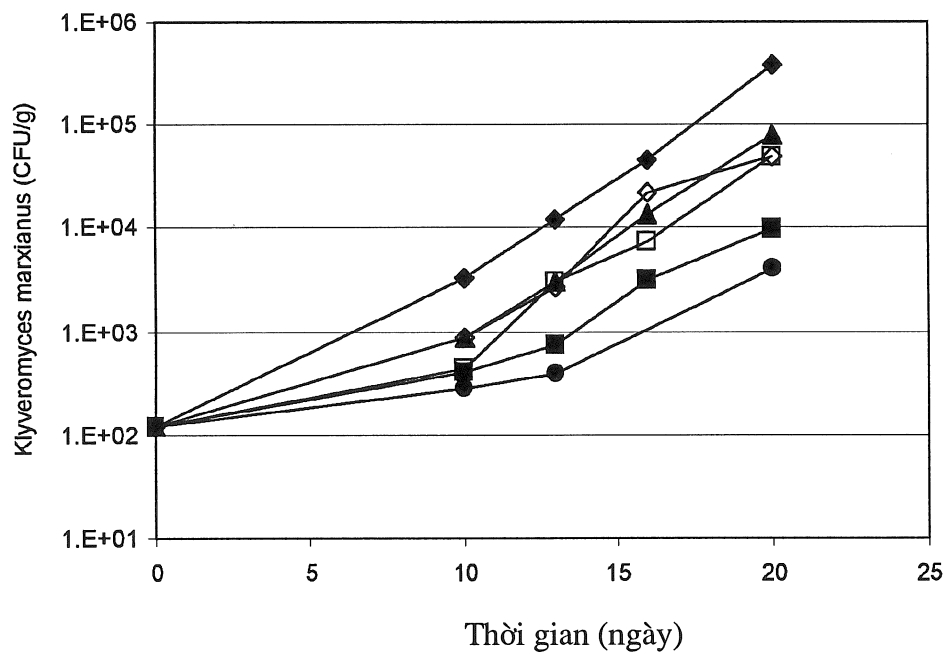


Fig. 4

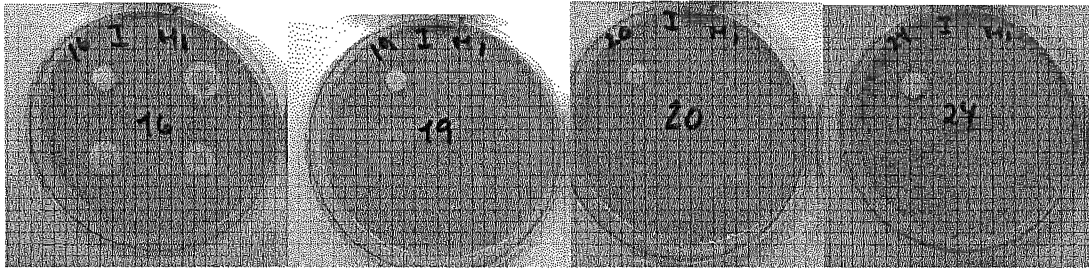


Fig. 5

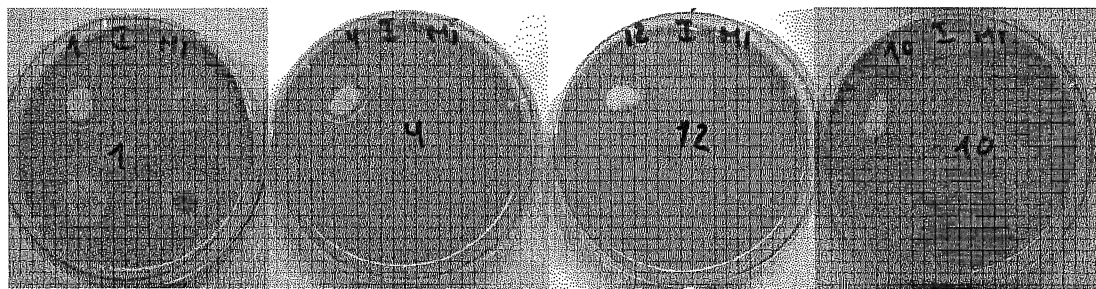


Fig. 6

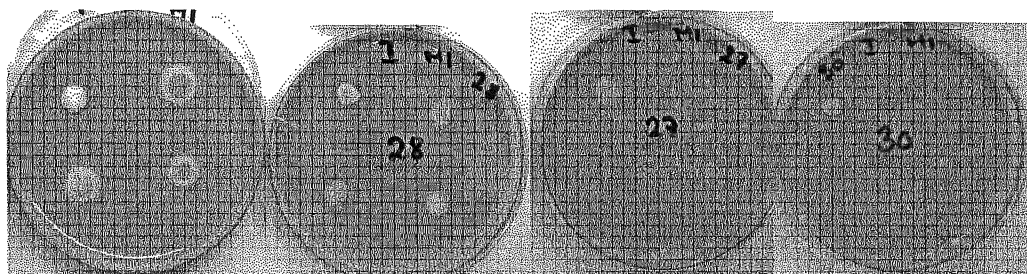


Fig. 7

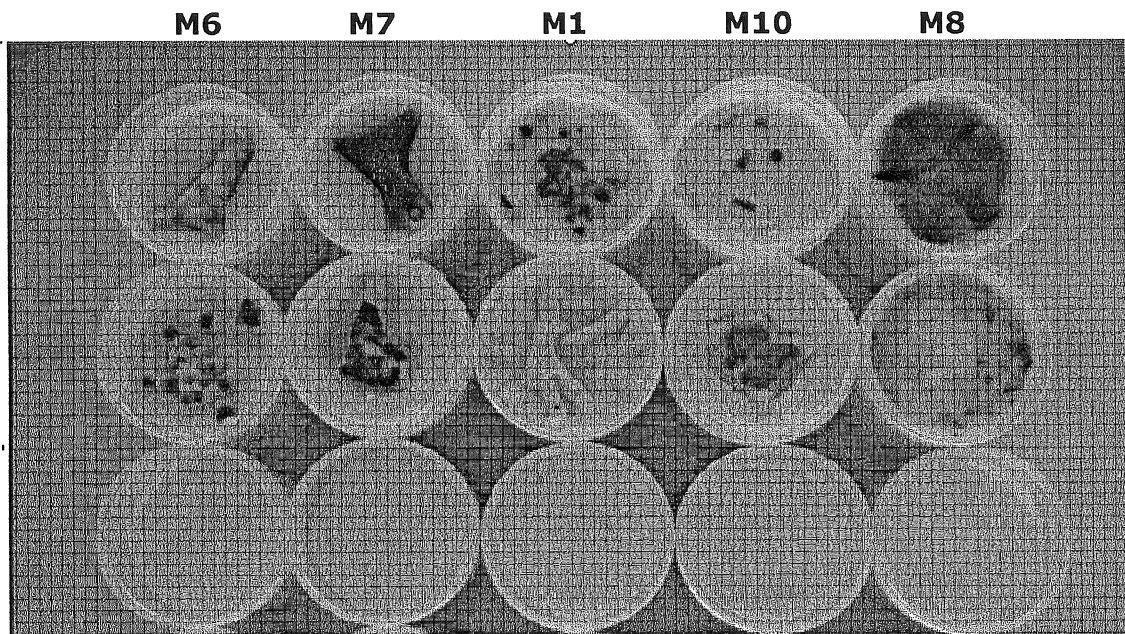


Fig. 8

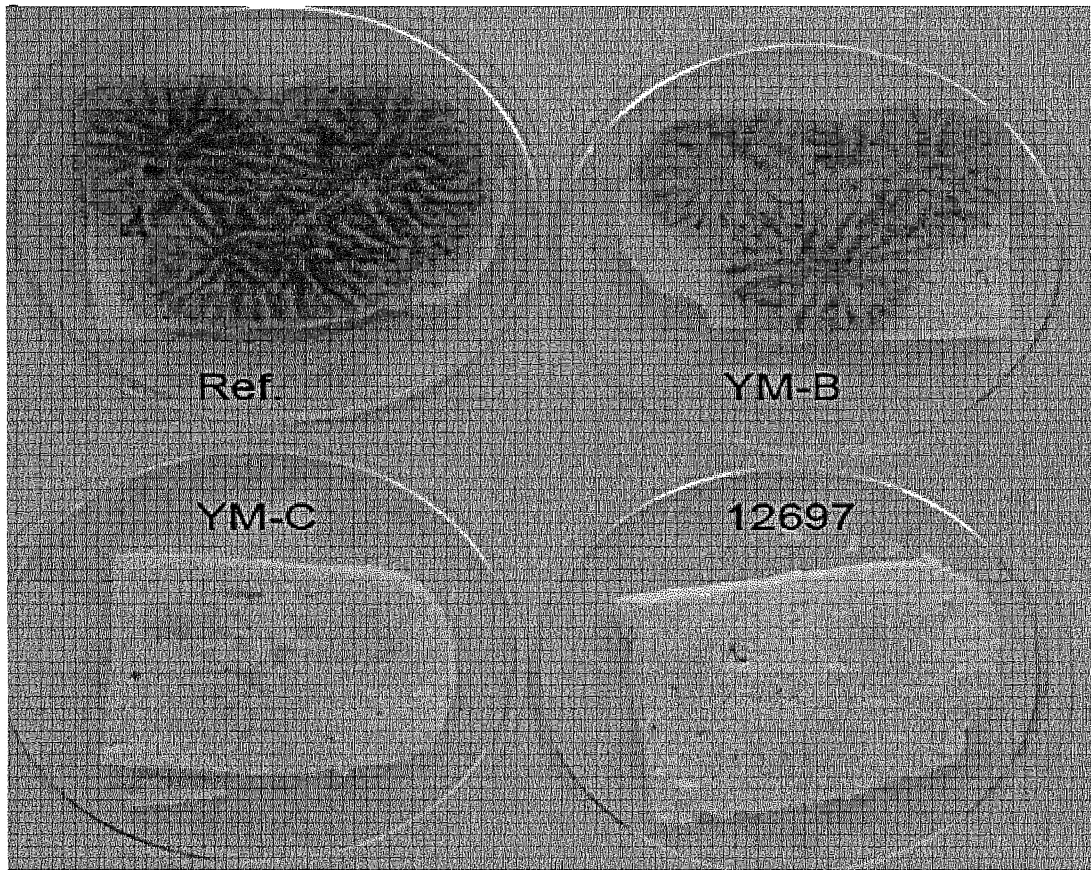


Fig. 9

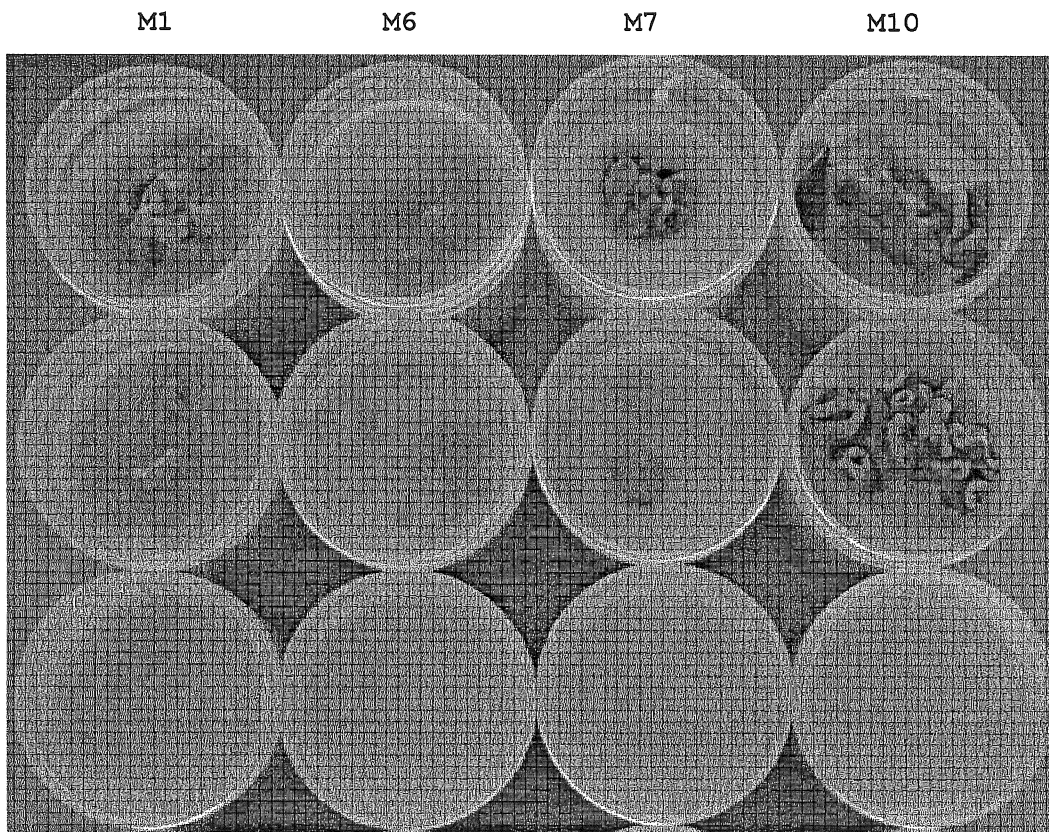


Fig. 10

