



(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)



1-0038943

(51)<sup>2006.01</sup> A23C 9/12; C12N 9/38; C12N 15/56

(13) B

(21) 1-2018-05343

(22) 07/06/2017

(86) PCT/EP2017/063814 07/06/2017

(87) WO2017/216000 21/12/2017

(30) 16174288.7 14/06/2016 EP; 16194075.4 17/10/2016 EP

(45) 26/02/2024 431

(43) 25/03/2019 372A

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

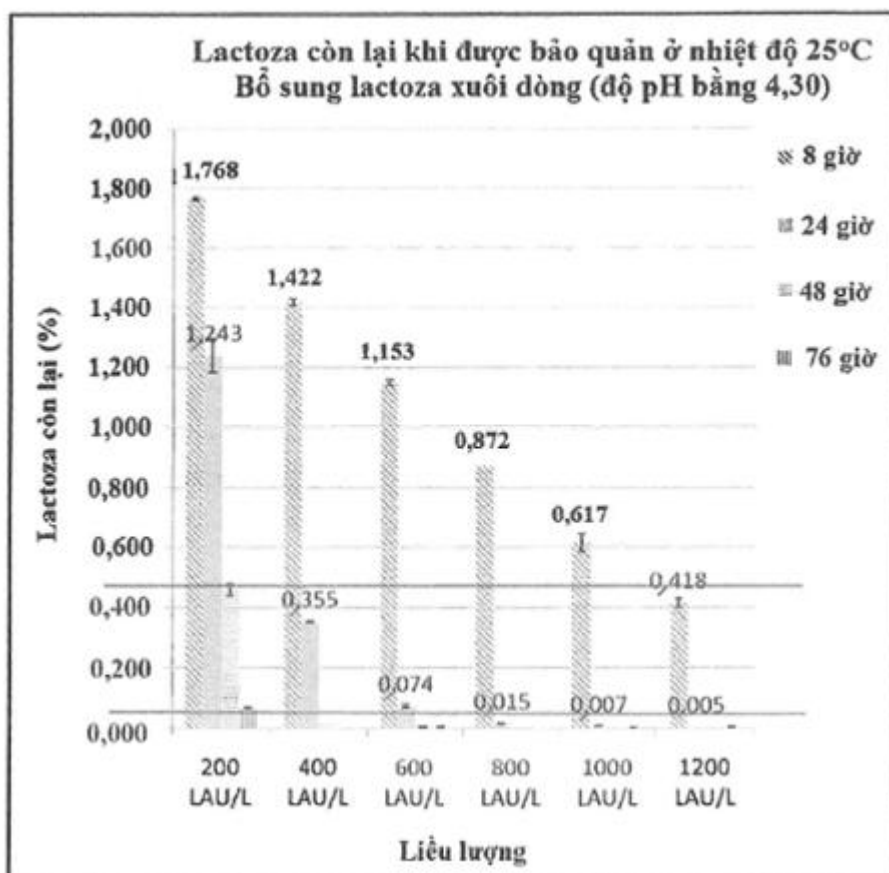
Boege Alle 10-12, 2970 Hoersholm, Denmark

(72) RIIS Soeren Ng (DK); VOJINOVIC Vojislav (RS); GILLELADEN Christian (DK).

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

(54) SẢN PHẨM SỮA ĐƯỢC AXIT HÓA VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT SẢN PHẨM SỮA ĐƯỢC AXIT HÓA

(57) Sáng chế đề cập đến sản phẩm sữa được axit hóa, có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 và hàm lượng lactoza ít nhất bằng 1,5mg/mL, trong đó sản phẩm này chứa lactaza mà duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza; quy trình sản xuất sản phẩm sữa được axit hóa; và quy trình sản xuất sản phẩm sữa lên men.



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến sản phẩm sữa được axit hóa có hàm lượng lactoza giảm.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

WO2009/071539 đề cập đến lactaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium bifidum*, có khả năng thủy phân rất hiệu quả trong sữa, và có hoạt tính trong khoảng độ pH rộng, bao gồm độ pH thấp, ví dụ, độ pH thấp hơn 5. Lactaza có thể được sử dụng trong quy trình sản xuất sữa và sản phẩm sữa lên men, như pho mát, sữa chua, bơ, bơ sữa, kem chua v.v., để làm giảm hàm lượng lactoza.

WO2013/160413 đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng sự kết hợp của chủng vi khuẩn axit lactic âm tính với glucoza và lactaza thông thường nhằm mục đích làm giảm hàm lượng lactoza trong sản phẩm sữa lên men trong khi làm tăng hàm lượng của glucoza.

EP-A1-2 957 180 đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng sự kết hợp của giống khởi động và lactaza thông thường nhằm mục đích làm giảm hàm lượng lactoza và mức sau axit hóa trong sản phẩm sữa lên men.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là đề cập đến sản phẩm sữa được axit hóa cải thiện có hàm lượng lactoza giảm.

Mục đích của sáng chế đạt được bằng sản phẩm sữa được axit hóa, có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 và hàm lượng lactoza ít nhất bằng 1,5mg/mL, trong đó sản phẩm này chứa lactaza, duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza.

Sáng chế cũng đề cập đến khả năng cải biến sản phẩm thực phẩm chứa lactoza với độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 trong pha bảo quản ở nhiệt độ môi trường, tức là không cần phải làm lạnh, sau khi hoàn thành sản xuất ở địa điểm sản xuất, ví dụ, trong quá trình vận chuyển và bảo quản tại cửa hàng bán lẻ, để làm giảm nồng độ lactoza. Sáng chế dựa trên việc nhận thức được rằng đối với sản phẩm có độ pH thấp và dự định để vận

chuyển và bảo quản ở nhiệt độ môi trường, ví dụ, sản phẩm sữa lên men sau thanh trùng, có thể thực hiện việc làm giảm hàm lượng lactoza sau khi hoàn thành sản xuất ở địa điểm sản xuất bằng bổ sung lactaza có hoạt tính ở độ pH thấp sau khi quy trình sản xuất thực phẩm thông thường đã hoàn thành và cho phép lactaza chuyển hóa lactoza thành galactoza và glucoza trong quá trình pha sử dụng tiếp đó của sản phẩm cho đến khi người tiêu dùng cuối tiêu thụ hết nó. Do đó, sáng chế cho phép thu được bước chuyển hoá lactoza theo cách đơn giản và hiệu quả về chi phí bên ngoài địa điểm sản xuất, và do đó quy trình sản xuất sản phẩm sữa lên men ở địa điểm sản xuất có thể được đơn giản hóa bằng cách không bao gồm bước hoàn thành chuyển hoá lactoza, nhờ đó tiết kiệm được thời gian và công suất thiết bị sản xuất.

Hơn nữa, khi lactaza được bổ sung sau khi xử lý nhiệt sản phẩm sữa lên men, có thể sử dụng lượng lactaza nhỏ hơn so với khi lactaza có hoạt tính trong quá trình lên men, vì lactaza có thể được phép có hoạt tính trong một khoảng thời gian dài, trong khi trong quy trình lên men trong sản xuất mong muốn thực hiện quy trình càng nhanh càng tốt để làm giảm chi phí. Phần lớn lactaza sẽ bị bất hoạt trong quá trình xử lý nhiệt và do đó sẽ không còn hoạt tính sau khi xử lý nhiệt. Do đó, sáng chế đề cập đến khả năng làm giảm lượng lactaza cần để loại bỏ được hàm lượng lactoza của sản phẩm sữa lên men. Ngoài ra, khi lactaza được bổ sung sau khi xử lý nhiệt sản phẩm sữa lên men, mức phản ứng Maillard gây ra bởi bước xử lý nhiệt sản phẩm sữa lên men được giảm, vì lactoza làm tăng phản ứng Maillard ít hơn so với chất chuyển hóa hydrat cacbon của lactoza. Cuối cùng, khi lactaza được bổ sung sau khi xử lý nhiệt sản phẩm sữa lên men, có thể tránh được tác dụng phụ bất lợi của vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong lên men đối với hoạt tính của lactaza.

Trên toàn thế giới, một lượng lớn người tiêu dùng không dung nạp hoặc nhạy với lactoza. Vì vậy, có nhu cầu lớn về các sản phẩm sữa, bao gồm sản phẩm sữa lên men, có hàm lượng lactoza giảm hoặc về cơ bản không chứa lactoza. Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm như vậy theo cách đơn giản và tiết kiệm về chi phí.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1 thể hiện nồng độ lactoza còn lại trong các mẫu đã được xử lý bằng lactaza được bổ sung vào sữa chua thành phẩm thu được sau thanh trùng cho nồng độ lactaza nằm trong khoảng từ 1000, 2000 đến 3000 LAU/L.

Fig.2 thể hiện nồng độ lactoza còn lại trong các mẫu đã được xử lý bằng lactaza được bổ sung vào sữa chua thành phẩm thu được sau thanh trùng cho nồng độ lactaza nằm trong khoảng từ 200, 400, 600, 800, 1000 đến 1200 LAU/L ở 8, 24, 48 và 76 giờ.

Fig.3 thể hiện dữ liệu của Fig.2 chỉ ở 48 giờ.

Fig.4 thể hiện dữ liệu của Fig.2 chỉ ở 76 giờ.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

#### **Lactaza**

Lactaza của sản phẩm sữa lên men theo sáng chế có thể là lactaza bất kỳ, duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza.

Liên quan đến sáng chế, hoạt tính trong LAU của lactaza được đo như được nêu trong phần “Định nghĩa” dưới đây.

Theo phương án ưu tiên, lactaza duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 10 %, tốt hơn ít nhất là 20%, tốt hơn nữa ít nhất là 30%, tốt hơn nữa ít nhất là 40%, tốt hơn nữa ít nhất là 50%, tốt hơn nữa ít nhất là 60%, tốt hơn nữa ít nhất là 70%, và tốt nhất nếu ít nhất là 80%, so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza.

Theo phương án ưu tiên, lactaza duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 4,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5%, tốt hơn ít nhất bằng 10%, tốt hơn nữa ít nhất là 20%, tốt hơn nữa ít nhất là 30%, tốt hơn nữa ít nhất là 40%, tốt hơn nữa ít nhất là 50%, tốt hơn nữa ít nhất là 60%, tốt hơn nữa ít nhất là 70%, và tốt nhất nếu ít nhất là 80%, so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza.

Theo phương án ưu tiên, lactaza duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 3,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5%, tốt hơn ít nhất bằng 10%, tốt hơn nữa ít nhất là 20 %, tốt hơn nữa ít nhất là 30%, tốt hơn nữa ít nhất là 40%, tốt hơn nữa ít nhất là 50%, tốt hơn nữa ít nhất là 60%, tốt hơn nữa ít nhất là 70%, và tốt nhất nếu ít nhất là 80%, so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza.

Liên quan đến sáng chế, độ pH tối ưu của lactaza được xác định bằng cách đo hoạt tính lactaza ở độ pH khác nhau bằng cách sử dụng phương pháp được nêu trong phần

“Định nghĩa” dưới đây và xác định độ pH với hoạt tính tối ưu. Đặc biệt, hoạt tính lactaza ở độ pH khác nhau được đo trong dung dịch đệm M và ở nhiệt độ 37°C. Theo cách khác, hoạt tính lactaza được nêu trong đơn sáng chế là tỷ lệ phần trăm của hoạt tính ở độ pH tối ưu của lactaza thay vì xem là tỷ lệ phần trăm của hoạt tính lactaza ở độ pH 6,5.

Theo phương án ưu tiên, lactaza duy trì được hoạt tính của nó ở nhiệt độ 10°C và độ pH bằng 6,0 ở mức ít nhất bằng 10% so với hoạt tính của nó ở nhiệt độ tối ưu của lactaza. Tốt hơn nữa, lactaza duy trì được hoạt tính của nó ở nhiệt độ 10°C và độ pH bằng 6,0 ở mức ít nhất bằng 20%, tốt hơn nữa ít nhất là 30%, tốt hơn nữa ít nhất là 40 %, tốt hơn nữa ít nhất là 50%, tốt hơn nữa ít nhất là 60%, tốt hơn nữa ít nhất là 70%, và tốt nhất nếu ít nhất là 80%, so với hoạt tính của nó ở nhiệt độ tối ưu của lactaza.

Liên quan đến sáng chế, nhiệt độ tối ưu của lactaza được xác định bằng cách đo hoạt tính lactaza ở các nhiệt độ khác nhau bằng cách sử dụng phương pháp được nêu trong phần “Định nghĩa” dưới đây và xác định nhiệt độ với hoạt tính tối ưu. Theo cách khác, hoạt tính lactaza được nêu trong đơn sáng chế là tỷ lệ phần trăm của hoạt tính ở nhiệt độ tối ưu của lactaza thay vì xem là tỷ lệ phần trăm của hoạt tính lactaza ở nhiệt độ 37°C.

Theo một phương án được ưu tiên, lactaza để được sử dụng trong sản phẩm theo sáng chế có hoạt tính lactaza ở nhiệt độ 37°C đến độ pH 5 ít nhất là 55%, như ít nhất là 60%, ít nhất là 65%, ít nhất là 70% hoặc ít nhất là 75%, của hoạt tính lactaza của nó ở nhiệt độ 37°C và độ pH 6.

Theo một phương án được ưu tiên khác, lactaza để được sử dụng trong sản phẩm theo sáng chế có hoạt tính lactaza ở nhiệt độ 37°C và độ pH 4,5 ít nhất bằng 10%, như ít nhất là 20%, ít nhất là 30%, ít nhất là 35% hoặc ít nhất là 40%, của hoạt tính lactaza của nó ở nhiệt độ 37°C và độ pH 6.

Theo một phương án được ưu tiên khác, lactaza để được sử dụng trong sản phẩm theo sáng chế có mức tối ưu độ pH của hoạt tính lactaza ở nhiệt độ 37°C là cao hơn 5,5.

Theo một phương án được ưu tiên khác, lactaza để được sử dụng trong sản phẩm theo sáng chế có hoạt tính lactaza ở nhiệt độ là 52°C và độ pH bằng 6,5 ít nhất là 50%, như ít nhất là 55%, ít nhất là 60%, ít nhất là 65%, ít nhất là 70%, ít nhất là 75% hoặc ít nhất là 80%, của hoạt tính lactaza của nó ở nhiệt độ là 38°C và độ pH bằng 6,5.

Theo một phương án ưu tiên,  $K_m$  (hằng số Michaelis) của lactaza ở nhiệt độ 5°C là nhỏ hơn 25 mM, như nhỏ hơn 20 mM, nhỏ hơn 15 mM hoặc nhỏ hơn 10 mM. Theo một phương án được ưu tiên khác,  $K_m$  của lactaza ở nhiệt độ 37°C là nhỏ hơn 25 mM, như nhỏ hơn 20 mM hoặc nhỏ hơn 15 mM. Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách xác định  $K_m$  đối với hoạt tính lactaza ở nhiệt độ cụ thể.  $K_m$  có thể được xác định bằng phương pháp được mô tả trong WO2009/071539.

Theo một phương án được ưu tiên khác, enzym khi thủy phân lactoza trong sản phẩm sữa có tỷ lệ giữa hoạt tính lactaza và transgalactosylaza là lớn hơn 1:1, như lớn hơn 2:1 hoặc lớn hơn 3:1. Theo một phương án được ưu tiên khác, bước xử lý enzym được thực hiện trong các điều kiện có hoạt tính lactaza của enzym là cao hơn so với hoạt tính transgalactosylaza, như cao hơn ít nhất hai lần hoặc cao hơn ít nhất ba lần.

Tỷ lệ giữa hoạt tính lactaza và transgalactosylaza trong sản phẩm sữa có thể, ví dụ, được xác định bằng phân tích HPLC. Theo một phương án được ưu tiên khác, bước xử lý enzym được thực hiện trong các điều kiện trong đó ít nhất 50% (% khối lượng/khối lượng) của lactoza đã thủy phân được chuyển hóa thành galactoza tự do. Theo một phương án được ưu tiên khác, bước xử lý enzym được thực hiện trong các điều kiện trong đó lactoza đã thủy phân được chuyển hóa thành lượng glucoza tự do và galactoza tự do bằng nhau.

Lactaza theo sáng chế là glycosit hydrolaza có khả năng thủy phân disaccarit lactoza thành các monome galactoza và glucoza thành phần. Nhóm lactaza mà bao gồm lactaza theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, enzym thuộc lớp phụ EC 3.2.1.108. Enzym thuộc các lớp phụ khác như, ví dụ, EC 3.2.1.23, cũng có thể là lactaza theo sáng chế. Lactaza theo sáng chế có thể có các hoạt tính khác ngoài hoạt tính lactoza thủy phân, ví dụ, hoạt tính transgalactosyl hóa. Trong nội dung sáng chế, hoạt tính lactoza thủy phân của lactaza còn có thể được gọi là hoạt tính lactaza hoặc hoạt tính beta-galactosidaza.

Enzym có hoạt tính lactaza được sử dụng trong phương pháp sáng chế có thể có nguồn gốc động vật, thực vật hoặc vi sinh vật. Lactaza được ưu tiên có nguồn gốc vi sinh vật, cụ thể là từ nấm dạng sợi hoặc nấm men, hoặc vi khuẩn.

Enzym có thể, ví dụ, có nguồn gốc từ chủng *Agaricus*, ví dụ, *A. bisporus*;

*Ascovaginospora*; *Aspergillus*, ví dụ, *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. oryzae*; *Candida*; *Chaetomium*; *Chaetotomastia*; *Dictyostelium*, ví dụ, *D. discoideum*; *Kluveromyces*, ví dụ, *K. fragilis*, *K. lactis*; *Mucor*, ví dụ, *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, ví dụ, *N. crassa*; *Rhizomucor*, ví dụ, *R. pusillus*; *Rhizopus*, ví dụ, *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, ví dụ, *S. libertiana*; *Torula*; *Torulopsis*; *Trichophyton*, ví dụ, *T. rubrum*; *Whetzelinia*, ví dụ, *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, ví dụ, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. novalis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis*; *Bifidobacterium*, ví dụ, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis*; *Chryseobacterium*; *Citrobacter*, ví dụ, *C. freundii*; *Clostridium*, ví dụ, *C. perfringens*; *Diplodia*, ví dụ, *D. gossypina*; *Enterobacter*, ví dụ, *E. aerogenes*, *E. cloacae* *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, ví dụ, *E. herbicola*; *Escherichia*, ví dụ, *E. coli*; *Klebsiella*, ví dụ, *K. pneumoniae*; *Miriococcum*; *Myrothesium*; *Mucor*; *Neurospora*, ví dụ, *N. crassa*; *Proteus*, ví dụ, *P. vulgaris*; *Providencia*, ví dụ, *P. stuartii*; *Pycnopus*, ví dụ, *Pycnopus cinnabarinus*, *Pycnopus sanguineus*; *Ruminococcus*, ví dụ, *R. torques*; *Salmonella*, ví dụ, *S. typhimurium*; *Serratia*, ví dụ, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, ví dụ, *S. flexneri*; *Streptomyces*, ví dụ, *S. antibioticus*, *S. castaneoglobisporus*, *S. violeceoruber*; *Trametes*; *Trichoderma*, ví dụ, *T. reesei*, *T. viride*; *Yersinia*, ví dụ, *Y. enterocolitica*.

Theo một phương án được ưu tiên, lactaza có nguồn gốc từ vi khuẩn, ví dụ, từ họ Bifidobacteriaceae, như từ giống *Bifidobacterium*, như từ chủng *B. bifidum*, *B. animalis* hoặc *B. longum*. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, lactaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium bifidum*.

Theo một phương án được ưu tiên, enzym có hoạt tính lactaza để được sử dụng trong sản phẩm theo sáng chế chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 50% so với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin 28-1931 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, các axit amin 28-1331 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4 và các mảnh hoạt tính lactaza của chúng. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, enzym chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 60%, như ít nhất bằng 70%, ít nhất bằng 80%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95% hoặc ít nhất bằng 98% so với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin 28-1931 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, các axit amin 28-1331 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2,

SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4 và các mảnh hoạt tính lactaza của chúng.

Enzym được ưu tiên là lactaza có trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 50%, như ít nhất 60%, ít nhất bằng 70%, ít nhất bằng 80%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95% hoặc ít nhất bằng 98% với các axit amin 28-1931 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc với mảnh hoạt tính lactaza của chúng. Mảnh hoạt tính lactaza như vậy có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 có thể là mảnh bất kỳ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 có hoạt tính lactaza. Mảnh hoạt tính lactaza có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 có thể là, ví dụ, các axit amin 28-979, các axit amin 28-1170, các axit amin 28-1323, các axit amin 28-1331, hoặc các axit amin 28-1600 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1.

Theo một phương án được ưu tiên, enzym có hoạt tính lactaza để được sử dụng trong sản phẩm theo sáng chế chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 50% với các axit amin 28-1331 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, enzym chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 60%, như ít nhất bằng 70%, ít nhất bằng 80%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95% hoặc ít nhất bằng 98% với các axit amin 28-1331 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo phương án khác, enzym có hoạt tính lactaza được sử dụng trong sản phẩm theo sáng chế có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 50% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3. Tốt hơn nữa, enzym có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 60%, như ít nhất bằng 70%, ít nhất bằng 80%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95% hoặc ít nhất bằng 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3.

Theo phương án khác, enzym có hoạt tính lactaza để được sử dụng trong sản phẩm theo sáng chế có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 50% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4. Tốt hơn nữa, enzym có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 60%, như ít nhất bằng 70%, ít nhất bằng 80%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95% hoặc ít nhất bằng 98% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4.

Nhằm mục đích sáng chế, độ tương đồng giữa hai trình tự axit amin được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453) như được thực hiện trong chương trình Needle của gói EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al. (2000) Trends in Genetics 16: 276-277), tốt hơn nữa phiên bản 3.0.0 hoặc mới hơn. Các thông số

tùy chọn được sử dụng là điểm phạt mở cho khoảng trống bằng 10, điểm phạt mở rộng cho khoảng trống bằng 0,5, và ma trận thay thế EBLOSUM62 (phiên bản EMBOSS của BLOSUM62). Đầu ra của “độ tương đồng dài nhất” đã dán nhãn Needle (thu được bằng cách sử dụng tùy chọn ngắn -no) được sử dụng làm tỷ lệ phần trăm tương đồng và được tính toán như sau:  $(\text{Góc tương đồng} \times 100) / (\text{Chiều dài sắp hàng} - \text{tổng số khoảng trống trong sắp hàng})$

Lactaza thương phẩm cụ thể thích hợp để dùng theo sáng chế là Lactaza F “Amano” 100SD sẵn có từ Amano Enzyme Europe.

Lactaza được sử dụng trong phương pháp sáng chế có thể là ngoại bào. Chúng có thể có trình tự tín hiệu ở đầu tận cùng N của chúng, mà bị cắt đứt trong quá trình tiết.

Lactaza được sử dụng trong phương pháp sáng chế có thể có nguồn gốc từ nguồn bất kỳ trong số các nguồn được đề cập ở đây. Thuật ngữ “có nguồn gốc” trong bản mô tả này có nghĩa là enzym có thể đã được tách ra từ sinh vật mà ở đó nó có mặt nguyên thể, tức là độ tương đồng của trình tự axit amin của enzym là giống với enzym nguyên thể. Thuật ngữ “có nguồn gốc” cũng có nghĩa là enzym có thể đã được tạo ra bằng tái tổ hợp trong sinh vật chủ, enzym được tạo ra bằng tái tổ hợp có trình tự axit amin tương đồng với enzym nguyên thể hoặc có trình tự axit amin cải biến, ví dụ, có một hoặc nhiều axit amin được khuyết đoạn, cài xen và/hoặc được thế, tức là enzym được tạo ra bằng tái tổ hợp là thể đột biến và/hoặc mảnh của trình tự axit amin nguyên thể. Trong nghĩa của enzym nguyên thể bao gồm các biến thể tự nhiên. Hơn nữa, thuật ngữ “có nguồn gốc” bao gồm enzym được tạo ra bằng tổng hợp bằng, ví dụ, peptit tổng hợp. Thuật ngữ “có nguồn gốc” cũng bao gồm enzym đã được cải biến, ví dụ, bằng cách glycosyl hóa, phosphoryl hoá v.v., dù là *in vivo* hay *in vitro*. Đối với enzym được tạo ra bằng tái tổ hợp, thuật ngữ “có nguồn gốc từ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ độ tương đồng của enzym và không phải là độ tương đồng của sinh vật chủ trong đó nó được tạo ra bằng tái tổ hợp.

Lactaza có thể thu được từ vi sinh vật bằng cách sử dụng kỹ thuật thích hợp bất kỳ. Ví dụ, chế phẩm enzym lactaza có thể thu được bằng cách lên men vi sinh vật thích hợp và tiếp theo là phân lập chế phẩm lactaza từ canh thịt đã lên men thu được hoặc vi sinh vật bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Lactaza cũng có thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Phương pháp như vậy thường bao

gồm nuôi cấy tế bào vật chủ đã biến nạp bằng vật truyền ADN tái tổ hợp chứa trình tự ADN mã hóa lactaza đang nghi ngờ và trình tự ADN được liên kết có điều khiển với tín hiệu biểu hiện thích hợp để nó có khả năng biểu hiện lactaza trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện cho phép biểu hiện enzym và thu hồi enzym từ môi trường nuôi cấy. Trình tự ADN cũng có thể được đưa vào bộ gen của tế bào vật chủ. Trình tự ADN có thể có nguồn gốc từ bộ gen, cADN hoặc tổng hợp hoặc các tổ hợp bất kỳ của chúng, và có thể được phân lập hoặc tổng hợp theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Lactaza được sử dụng trong phương pháp sàng chế có thể được tinh chế. Thuật ngữ “được tinh chế” như được sử dụng trong bản mô tả này bao hàm protein enzym lactaza về cơ bản không chứa các hợp phần không hòa tan từ sinh vật sản xuất. Thuật ngữ “được tinh chế” cũng bao hàm protein enzym lactaza về cơ bản không chứa các hợp phần không hòa tan từ sinh vật nguyên thể mà từ đó thu được nó. Tốt hơn nữa, nó cũng được tách khỏi một số hợp phần hòa tan của sinh vật và môi trường nuôi cấy mà nó được dẫn xuất. Tốt hơn nữa nếu, nó được tách bằng một hoặc nhiều bước vận hành đơn vị: lọc, kết tủa, hoặc sắc ký.

Do đó, enzym có hoạt tính lactaza có thể được tinh chế, tức là chỉ một lượng nhỏ của các protein khác đang có mặt. Thuật ngữ “các protein khác” đề cập cụ thể đến các enzym khác. Thuật ngữ “được tinh chế” như được sử dụng trong bản mô tả này cũng dùng để chỉ việc loại bỏ các hợp phần khác, tốt hơn nếu các protein khác và tốt nhất là các enzym khác có mặt trong tế bào có nguồn gốc lactaza. Lactaza có thể “về cơ bản tinh khiết”, tức là không chứa các hợp phần khác từ sinh vật trong đó nó được tạo ra, tức là, ví dụ, sinh vật chủ đối với lactaza được tạo ra bằng tái tổ hợp. Tốt hơn nữa, lactaza là chế phẩm enzym protein tinh khiết ít nhất là 40% (khối lượng/khối lượng), tốt hơn nữa ít nhất là 50%, 60%, 70%, 80% hoặc thậm chí ít nhất bằng 90% tinh khiết.

Thuật ngữ enzym có hoạt tính lactaza bao gồm hợp chất hỗ trợ bất kỳ có thể cần cho hoạt tính xúc tác của enzym như, ví dụ, chất nhận hoặc đồng yếu tố thích hợp, có thể có mặt hoặc có thể không có mặt tự nhiên trong hệ phản ứng.

Enzym có thể là dạng bất kỳ thích hợp để sử dụng đang nghi ngờ như, ví dụ, ở dạng bột khô hoặc hạt, hạt không bụi, chất lỏng, chất lỏng đã được làm ổn định, hoặc enzym bảo vệ.

### Sản phẩm sữa được axit hóa

Theo phương án cụ thể theo sáng chế, sản phẩm đã được axit hóa theo sáng chế có độ pH nằm trong khoảng từ 3,2 đến 4,8, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,6 và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 3,6 đến 4,4.

Theo một phương án, sản phẩm sữa được axit hóa là sản phẩm sữa được axit hóa bằng hóa học. Sự axit hóa có thể được thực hiện bằng chất axit hóa bất kỳ đã được phê chuẩn cho sản phẩm thực phẩm như axit lactic, axit citric, axit malic, axit tartric, axit phosphoric, axit fumaric, nước ép hoa quả, bột hoa quả và hỗn hợp hoa quả.

Theo một phương án khác, sản phẩm sữa được axit hóa là sản phẩm sữa lên men được sản xuất bằng cách lên men sử dụng giống khởi động. Giống khởi động có thể là giống khởi động thông thường bất kỳ chứa vi khuẩn axit lactic, bao gồm môi trường nuôi cấy một chủng duy nhất và hỗn hợp môi trường nuôi cấy, được sử dụng để tạo ra loại cụ thể của sản phẩm sữa lên men. Vi khuẩn hữu ích khác, có thể được bổ sung vào sản phẩm ngoài giống khởi động, bao gồm lợi khuẩn *Bifidobacterium spp.*

Theo phương án ưu tiên, sản phẩm sữa lên men sau khi lên men được đưa vào bước xử lý nhiệt để làm giảm hàm lượng vi khuẩn của giống khởi động đến hàm lượng không lớn hơn  $1 \times 10^2$  CFU/g, và trong đó lactaza đã được bổ sung sau khi xử lý nhiệt.

Giống khởi động có thể là giống khởi động thông thường bất kỳ chứa vi khuẩn axit lactic, bao gồm môi trường nuôi cấy một chủng duy nhất và hỗn hợp môi trường nuôi cấy, được sử dụng để tạo ra loại sản phẩm sữa lên men cụ thể. Theo một phương án được ưu tiên của sản phẩm theo sáng chế, sự lên men được thực hiện để thu được độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 3,2 đến 4,8, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,6 và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 3,6 đến 4,4.

Tốt hơn nữa, bước xử lý nhiệt để làm giảm hàm lượng vi khuẩn của giống khởi động đến hàm lượng không lớn hơn  $1,0 \times 10^2$  CFU/g sữa đã lên men được thực hiện bằng cách đưa giống khởi động sản phẩm sữa lên men đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 110°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50°C đến 100°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50°C đến 90°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 60°C đến 85°C, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 65°C đến 82°C, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ

70°C đến 80°C. Tốt hơn nếu, bước xử lý nhiệt được thực hiện trong khoảng thời gian từ 5 giây đến 180 giây, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5 giây đến 120 giây, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 5 giây đến 90 giây, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 5 giây đến 60 giây, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 8 giây đến 50 giây, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 10 và 40 giây. Tốt hơn nếu, hàm lượng vi khuẩn của giống khởi động được giảm đến hàm lượng không lớn hơn  $1,0 \times 10^1$  CFU/g sữa đã lên men, tốt hơn nữa nếu 0 CFU/g.

Enzym được bổ sung với lượng thích hợp để đạt được nồng độ lactoza thủy phân mong muốn trong các điều kiện phản ứng đã chọn. Theo phương án cụ thể theo sáng chế, sản phẩm sữa chứa lactaza ở lượng nằm trong khoảng từ 100 đến 20000 LAU/L sản phẩm sữa, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 100 đến 10000 LAU/L sản phẩm sữa, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 100 đến 5000 LAU/L sản phẩm sữa, tốt hơn nếu nhỏ hơn 3000, như nhỏ hơn 1500, nhỏ hơn 1000, nhỏ hơn 750 hoặc nhỏ hơn 500, LAU/L sản phẩm sữa.

Theo một phương án được ưu tiên, lactaza được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 400 LAU trong mỗi g lactoza trong sản phẩm sữa, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5 đến 200 LAU trong mỗi g lactoza trong sản phẩm sữa, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5 đến 100 LAU trong mỗi g lactoza trong sản phẩm sữa, tốt hơn nếu nhỏ hơn 50, như nhỏ hơn 40, nhỏ hơn 30, nhỏ hơn 20 hoặc nhỏ hơn 10, LAU trong mỗi g lactoza trong sản phẩm sữa.

Theo phương án ưu tiên, sản phẩm sữa được axit hóa có hàm lượng lactoza nằm trong khoảng từ 2,0mg/mL đến 50mg/mL, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5mg/mL đến 48mg/mL, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 10mg/mL đến 46mg/mL, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 20mg/mL đến 45mg/mL.

Theo phương án ưu tiên, sản phẩm sữa được axit hóa chứa sản phẩm thực phẩm khác nữa được chọn từ nhóm bao gồm đồ uống hoa quả, sản phẩm ngũ cốc lên men, sản phẩm ngũ cốc đã được axit hóa bằng hóa học, sản phẩm sữa đậu nành và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Sản phẩm sữa được axit hóa thường chứa protein ở mức nằm trong khoảng từ 2,0% khối lượng đến 3,5% khối lượng. Sản phẩm sữa được axit hóa cũng có thể là sản phẩm protein thấp với hàm lượng protein nằm trong khoảng từ 1,0% khối lượng đến

2,0% khối lượng. Theo cách khác, sản phẩm sữa được axit hóa có thể là sản phẩm protein cao với hàm lượng protein cao hơn 3,5% khối lượng. Theo phương án cụ thể của sản phẩm sữa được axit hóa theo sáng chế, sản phẩm là hỗn hợp của sản phẩm sữa được axit hóa và sản phẩm ngũ cốc, ví dụ, sản phẩm yến mạch, trong đó sản phẩm ngũ cốc có thể là sản phẩm ngũ cốc lên men, ví dụ, sản phẩm yến mạch lên men.

Theo phương án cụ thể theo sáng chế, sản phẩm sữa được axit hóa chứa sản phẩm ngũ cốc lên men. Sản phẩm ngũ cốc lên men có thể được tạo ra bằng cách nghiền hạt của nguyên liệu nguồn ngũ cốc sinh học để tạo ra bột ngũ cốc, sau đó được đưa vào lên men. Sự lên men bột ngũ cốc có thể được thực hiện bằng cách sử dụng vi khuẩn axit lactic (giống khởi động) giống như đã được sử dụng để lên men cơ chất sữa như được mô tả ở các đoạn khác trong đơn này.

Theo phương án cụ thể theo sáng chế, sản phẩm sữa được axit hóa là đồ uống hoa quả. Đồ uống hoa quả có thể còn chứa, ví dụ, yến mạch, đậu nành, hạnh nhân, nước sữa và/hoặc sữa không lên men, ví dụ, ở dạng sữa bột.

Theo phương án cụ thể theo sáng chế sản phẩm sữa được axit hóa theo sáng chế là sản phẩm đã được axit hóa bằng hóa học. Sự axit hóa có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chất axit hóa bất kỳ thích hợp để bổ sung vào sản phẩm thực phẩm, như axit lactic, axit citric, nước ép hoa quả, bột hoa quả và hỗn hợp hoa quả. Theo phương án cụ thể, sản phẩm sữa được axit hóa được axit hóa bằng nước ép hoa quả.

Theo phương án cụ thể theo sáng chế, sản phẩm sữa được axit hóa là sản phẩm ngũ cốc đã được axit hóa bằng hóa học. Sản phẩm ngũ cốc đã được axit hóa bằng hóa học có thể được tạo ra bằng cách nghiền hạt nguyên liệu nguồn ngũ cốc sinh học để tạo ra bột ngũ cốc, sau đó được sử dụng để tạo ra nước huyền phù, và độ pH của huyền phù này sau đó được điều chỉnh đến mức mong muốn.

Sản phẩm sữa được axit hóa chứa nước sữa axit hoặc sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit

Theo khía cạnh cụ thể theo sáng chế, sản phẩm sữa được axit hóa chứa sản phẩm nước sữa axit được chọn từ nhóm bao gồm nước sữa axit và sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit. Đặc biệt, sản phẩm nước sữa axit thu được từ việc cô sản phẩm sữa lên men để chia nó thành phân đoạn đã cô và phân đoạn nước sữa axit được phân tách.

Nước sữa axit và sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit là các sản phẩm phụ của quá trình sản xuất một số pho mát tươi như phô mai, pho-mát ricota, Skyr, sữa chua Hy Lạp, Tвороq, pho-mát Đức và Labneh. Nước sữa axit và sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit có độ pH nhỏ hơn 5,1 trong dung dịch 10%, và về mặt lịch sử rất khó tìm ra việc sử dụng đối với các sản phẩm phụ, ví dụ, do tính axit của nó. Nước sữa axit thu được bằng cách cô sữa chua trong thiết bị tách. Sản phẩm thấm qua màng của axit thu được bằng cách cô sữa chua trong thiết bị siêu lọc.

Theo khía cạnh này, sáng chế đề cập đến việc sử dụng nước sữa axit và sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit để tạo ra sản phẩm sữa, ví dụ, đồ uống từ sữa. Khía cạnh này dựa trên việc nhận thức được rằng nước sữa axit và sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit là thích hợp để tạo ra sản phẩm sữa theo sáng chế có hàm lượng lactoza giảm, do việc tạo ra sản phẩm cần sự thủy phân bằng enzym lactoza ở độ pH thấp.

Theo phương án cụ thể của khía cạnh thứ ba của quy trình theo sáng chế, giống khởi động sản phẩm sữa lên men được đưa vào bước cô để chia giống khởi động sản phẩm sữa lên men thành phân đoạn đã cô và phân đoạn nước sữa axit được phân tách, trong đó phân đoạn nước sữa axit được phân tách và không phải phân đã cô được đưa vào các bước tiếp theo của quy trình.

#### Quy trình sản xuất sản phẩm sữa lên men

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm sữa được axit hóa bao gồm các bước điều chế sản phẩm sữa được axit hóa cơ bản, có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 và hàm lượng lactoza ít nhất bằng 1,5mg/mL, bổ sung lactaza, duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza, vào sản phẩm sữa được axit hóa cơ bản để thu được sản phẩm sữa được axit hóa chứa lactaza, và bảo quản sản phẩm sữa được axit hóa chứa lactaza ở nhiệt độ ít nhất bằng 2°C trong ít nhất 1 ngày.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm sữa được axit hóa bao gồm các bước điều chế sản phẩm sữa được axit hóa cơ bản, có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 và hàm lượng lactoza ít nhất bằng 1,5mg/mL, đưa sản phẩm sữa được axit hóa cơ bản vào bước xử lý nhiệt để làm giảm hàm lượng vi khuẩn đến hàm lượng không lớn hơn  $1 \times 10^2$  CFU/g để thu được sản phẩm sữa được axit hóa được

xử lý nhiệt, bổ sung lactaza, duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza, vào sản phẩm sữa được axit hóa được xử lý nhiệt để thu được sản phẩm sữa được axit hóa chứa lactaza, và bảo quản sản phẩm sữa được axit hóa chứa lactaza ở nhiệt độ ít nhất bằng 2°C trong ít nhất 1 ngày.

Nói cách khác, khía cạnh thứ hai là phương án cụ thể của khía cạnh thứ nhất bao gồm các bước đưa sản phẩm sữa được axit hóa cơ bản vào bước xử lý nhiệt để làm giảm hàm lượng vi khuẩn đến hàm lượng không lớn hơn  $1 \times 10^2$  CFU/g để thu được sản phẩm sữa được axit hóa được xử lý nhiệt, bổ sung lactaza, duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza, vào sản phẩm sữa được axit hóa được xử lý nhiệt để thu được sản phẩm sữa được axit hóa chứa lactaza, và bảo quản sản phẩm sữa được axit hóa chứa lactaza ở nhiệt độ ít nhất bằng 2°C trong ít nhất 1 ngày.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm các bước lên men cơ chất sữa bằng cách sử dụng giống khởi động của vi khuẩn axit lactic để thu được giống khởi động sản phẩm sữa lên men, có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 và hàm lượng lactoza ít nhất bằng 1,5mg/mL, đưa giống khởi động sản phẩm sữa lên men vào bước xử lý nhiệt để làm giảm hàm lượng vi khuẩn đến hàm lượng không lớn hơn  $1 \times 10^2$  CFU/g để thu được sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt, bổ sung lactaza, duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza, vào sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt để thu được sản phẩm sữa lên men chứa lactaza, và bảo quản sản phẩm sữa lên men chứa lactaza ở nhiệt độ ít nhất bằng 2°C trong ít nhất 1 ngày.

Nói cách khác, khía cạnh thứ ba là phương án cụ thể của khía cạnh thứ nhất, trong đó sản phẩm sữa được axit hóa được tạo ra là sản phẩm sữa lên men, và trong đó quy trình bao gồm các bước lên men cơ chất sữa bằng cách sử dụng giống khởi động của vi khuẩn axit lactic để thu được giống khởi động sản phẩm sữa lên men, có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 và hàm lượng lactoza ít nhất bằng 1,5mg/mL, đưa giống khởi động sản phẩm sữa lên men vào bước xử lý nhiệt để làm giảm hàm lượng vi khuẩn đến hàm lượng không lớn hơn  $1 \times 10^2$  CFU/g để thu được sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt, bổ sung lactaza, duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C

ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza, vào sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt để thu được sản phẩm sữa lên men chứa lactaza, và bảo quản sản phẩm sữa lên men chứa lactaza ở nhiệt độ ít nhất bằng 2°C trong ít nhất 1 ngày.

Theo một phương án của quy trình theo sáng chế, sản phẩm sữa được axit hóa là sản phẩm sữa được axit hóa bằng hóa học. Theo một phương án khác, sản phẩm sữa được axit hóa là sản phẩm sữa lên men được sản xuất bằng cách lên men sử dụng giống khởi động.

Theo một phương án của quy trình theo sáng chế, sản phẩm sữa được axit hóa cơ bản hoặc giống khởi động sản phẩm sữa lên men có thể được đưa vào bước xử lý nhiệt để làm giảm hàm lượng vi khuẩn đến hàm lượng không lớn hơn  $1 \times 10^2$  CFU/g. Sản phẩm đã được axit hóa được xử lý nhiệt như vậy cũng được gọi là sản phẩm sau thanh trùng, mà theo đó chỉ ra rằng sản phẩm đã được đưa vào thanh trùng sau khi tạo ra sản phẩm sữa được axit hóa bằng hóa học hoặc sản phẩm sữa lên men. Sản phẩm đã được axit hóa được xử lý nhiệt như vậy không cần phải giữ ở nhiệt độ đông lạnh, và do đó nó thích hợp để vận chuyển và bảo quản ở nhiệt độ môi trường.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên của quy trình theo sáng chế, sản phẩm đã được axit hóa hoặc sản phẩm sữa lên men chứa lactaza được bảo quản ở nhiệt độ ít nhất bằng 5°C, tốt hơn ít nhất bằng 10°C, tốt hơn nữa ít nhất bằng 15°C, và tốt nhất nếu ít nhất là 20°C.

Theo phương án cụ thể của quy trình theo sáng chế, sản phẩm đã được axit hóa hoặc sản phẩm sữa lên men chứa lactaza được bảo quản trong ít nhất hai ngày, tốt hơn ít nhất là 3 ngày, tốt hơn nữa ít nhất là 4 ngày, tốt hơn nữa ít nhất là 5 ngày, tốt hơn nữa ít nhất là 6 ngày, và tốt nhất nếu ít nhất là 7 ngày.

Theo phương án cụ thể theo sáng chế, sản phẩm đã được axit hóa hoặc sản phẩm sữa lên men chứa lactaza sau khi bảo quản có hàm lượng lactoza nhỏ hơn 40mg/mL, tốt hơn nếu nhỏ hơn 35mg/mL, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 30mg/mL, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 25mg/mL, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 20mg/mL, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 15mg/mL, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 10mg/mL, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 5mg/mL, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 3mg/mL, và tốt nhất là nhỏ hơn 1,5mg/mL.

Giống khởi động có thể là giống khởi động thông thường bất kỳ của vi khuẩn axit

lactic, bao gồm môi trường nuôi cấy một chủng duy nhất và hỗn hợp môi trường nuôi cấy, được sử dụng để tạo ra loại sản phẩm sữa lên men cụ thể. Theo một phương án được ưu tiên của sản phẩm theo sáng chế, sự lên men được thực hiện để thu được độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 3,2 đến 4,8, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,6 và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 3,8 đến 4,4.

Tốt hơn nếu, bước xử lý nhiệt để làm giảm hàm lượng vi khuẩn của giống khởi động đến hàm lượng không lớn hơn  $1,0 \times 10^2$  CFU/g sữa đã lên men được thực hiện bằng cách đưa giống khởi động sản phẩm sữa lên men đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 110°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50°C đến 100°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50°C đến 90°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 60°C đến 85°C, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 65°C đến 82°C, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 70°C đến 80°C. Bước xử lý nhiệt tốt hơn nếu được thực hiện trong khoảng thời gian từ 5 giây đến 180 giây, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 10 giây đến 180 giây, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 12 giây đến 120 giây, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 14 giây đến 90 giây, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 16 giây đến 60 giây, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 18 giây đến 50 giây đến tốt nhất là nằm trong khoảng từ 20 và 40 giây. Tốt hơn nếu, hàm lượng vi khuẩn của giống khởi động được giảm đến hàm lượng không lớn hơn  $1,0 \times 10^1$  CFU/g sữa đã lên men, tốt hơn nữa nếu 0 CFU/g. Sản phẩm sữa lên men được đưa vào bước xử lý nhiệt để làm giảm hàm lượng vi khuẩn đến hàm lượng không lớn hơn  $1 \times 10^2$  CFU/g là thích hợp để sử dụng bảo quản ở nhiệt độ môi trường, như bảo quản ở nhiệt độ ít nhất bằng 5°C, tốt hơn ít nhất bằng 10°C, tốt hơn nữa ít nhất bằng 15°C, và tốt nhất nếu ít nhất là 20°C.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm các bước lên men cơ chất sữa bằng cách sử dụng giống khởi động của vi khuẩn axit lactic để thu được giống khởi động sản phẩm sữa lên men, có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 và hàm lượng lactoza ít nhất bằng 1,5mg/mL, đưa giống khởi động sản phẩm sữa lên men vào bước xử lý nhiệt để làm giảm hàm lượng vi khuẩn đến hàm lượng không lớn hơn  $1 \times 10^8$  CFU/g để thu được sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt, bổ sung lactaza, duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza, vào sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt để thu được sản phẩm sữa lên men chứa lactaza, và bảo

quản sản phẩm sữa lên men chứa lactaza ở nhiệt độ ít nhất bằng 2°C trong ít nhất 1 ngày. Tốt hơn nếu, hàm lượng vi khuẩn của giống khởi động được giảm đến hàm lượng không lớn hơn  $1,0 \times 10^7$  CFU/g sữa đã lên men, tốt hơn nữa nếu không lớn hơn  $1,0 \times 10^6$  CFU/g sữa đã lên men, và tốt nhất là không lớn hơn  $1,0 \times 10^5$  CFU/g sữa đã lên men. Sản phẩm sữa lên men được đưa vào bước xử lý nhiệt để làm giảm hàm lượng vi khuẩn đến hàm lượng không lớn hơn, ví dụ,  $1 \times 10^8$  CFU/g có thời hạn sử dụng kéo dài ở nhiệt độ đông lạnh.

Enzym được bổ sung với lượng thích hợp để đạt được nồng độ lactoza thủy phân mong muốn trong các điều kiện phản ứng đã chọn. Theo phương án cụ thể theo sáng chế, sản phẩm sữa chứa lactaza ở lượng nằm trong khoảng từ 100 đến 20000 LAU/L sản phẩm sữa, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 100 đến 10000 LAU/L sản phẩm sữa, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 100 đến 5000 LAU/L sản phẩm sữa, tốt hơn nếu nhỏ hơn 3000, như nhỏ hơn 1500, nhỏ hơn 1000, nhỏ hơn 750 hoặc nhỏ hơn 500, LAU/L sản phẩm sữa.

Theo một phương án được ưu tiên, lactaza được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 400 LAU trong mỗi g lactoza trong sản phẩm sữa, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5 đến 200 LAU trong mỗi g lactoza trong sản phẩm sữa, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5 đến 100 LAU trong mỗi g lactoza trong sản phẩm sữa, tốt hơn nếu nhỏ hơn 50, như nhỏ hơn 40, nhỏ hơn 30, nhỏ hơn 20 hoặc nhỏ hơn 10, LAU trong mỗi g lactoza trong sản phẩm sữa.

Theo phương án ưu tiên, sản phẩm sữa được axit hóa có hàm lượng lactoza nằm trong khoảng từ 2,0mg/mL đến 45mg/mL, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5mg/mL đến 40mg/mL, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 10mg/mL đến 37mg/mL, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 20mg/mL đến 37mg/mL.

Theo phương án ưu tiên, sản phẩm sữa được axit hóa, mà lactaza được bổ sung vào, có độ nhớt, cho phép phân phối dễ dàng lactaza trong sản phẩm sữa được axit hóa, ví dụ, bằng cách trộn. Theo một phương án được ưu tiên của quy trình theo sáng chế, lactaza được bổ sung vào sản phẩm sữa lên men được đề cập đến ở dạng chế phẩm vô trùng. Theo một phương án được ưu tiên khác của quy trình theo sáng chế, lactaza được bổ sung vào sản phẩm sữa lên men trong các điều kiện vô trùng, ví dụ, bằng cách lọc vô trùng dung dịch chứa lactaza.

Theo một phương án được ưu tiên của quy trình theo sáng chế, lactaza được bổ sung vào sản phẩm sữa được axit hóa bằng cách định lượng lắp sẵn. Liên quan đến sáng chế, thuật ngữ “định lượng lắp sẵn” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ định lượng trực tiếp vào ống mà sản phẩm sữa được axit hóa chảy qua. Do đó, thuật ngữ “ống” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ ống hoặc dạng tương tự bất kỳ của chúng, bao gồm kênh, đường dẫn, đường ống, ống dẫn, mạch dẫn, kênh dẫn, ống thông và ống. Ví dụ về hệ định lượng lắp sẵn thương mại thích hợp để dùng theo sáng chế là hệ định lượng lắp sẵn Tetra FlexDos<sup>®</sup> Aseptic và hệ định lượng lắp sẵn Tetra Aldose<sup>®</sup> Aseptic.

Theo một phương án được ưu tiên của quy trình theo sáng chế, lactaza được bổ sung vào sản phẩm sữa được axit hóa bằng cách định lượng lắp sẵn vào ống, và tiếp theo là lactaza được trộn vào sữa chua trong ống bằng dụng cụ trộn. Tốt hơn nếu, dụng cụ trộn được chọn từ nhóm bao gồm ít nhất một phần uốn cong của ống, lò xo ổn áp, thiết bị khuấy tĩnh hoặc thiết bị khuấy rôto/tĩnh. Ví dụ thương mại về thiết bị khuấy rôto/tĩnh là thiết bị làm đồng nhất Ytron-Z (bơm cắt).

#### Bổ sung lactaza hai bước

Theo phương án cụ thể của khía cạnh thứ ba và thứ tư của quy trình theo sáng chế, lactaza được bổ sung ngược dòng bước xử lý nhiệt giống khởi động sản phẩm sữa lên men. Lactaza được bổ sung ngược dòng có thể là lactaza bất kỳ, bao gồm lactaza được chọn từ nhóm bao gồm Ha-lactaza và lactaza được sử dụng trong quy trình theo sáng chế, tức là lactaza, duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza. Ha-lactaza là lactaza thu được từ nấm men từ giống *Klyveromyces*, cụ thể là được chọn từ nhóm bao gồm *Klyveromyces lactis* và *Klyveromyces fragilis*.

Theo phương án cụ thể lactaza được bổ sung ngược dòng được bổ sung ở thời điểm bắt đầu lên men cùng với giống khởi động. Trong trường hợp này, tốt hơn nếu lactaza được bổ sung ngược dòng là Ha-lactaza.

Theo phương án cụ thể khác, lactaza được bổ sung ngược dòng được bổ sung sau khi bắt đầu lên men.

Khi bổ sung lactaza cả ở thời điểm bắt đầu lên men và sau khi xử lý nhiệt giống khởi động sản phẩm sữa lên men, một phần lactoza sẽ được thủy phân trong bước lên

men và một phần lactoza còn lại sẽ được thủy phân trong quá trình bảo quản sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt. Khi bổ sung lactaza cả ở thời điểm bắt đầu lên men và sau khi xử lý nhiệt giống khởi động sản phẩm sữa lên men, có thể làm giảm đến tổng lượng lactaza được bổ sung để làm giảm nồng độ lactoza trong sản phẩm sữa lên men đến mức mong muốn so với chỉ bổ sung lactaza sau khi xử lý nhiệt giống khởi động sản phẩm sữa lên men. Do đó, lactaza được bổ sung ở thời điểm bắt đầu lên men sẽ có hoạt tính ở độ pH cao hơn so với độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0, ví dụ, ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 và 7,0, và phần lớn lactaza có hoạt tính cao hơn ở độ pH cao hơn như vậy. Vì vậy, lượng lactaza đã cho được bổ sung ở thời điểm bắt đầu lên men sẽ thu được mức thủy phân lactoza cao hơn so với cùng lượng lactaza được bổ sung sau khi xử lý nhiệt giống khởi động sản phẩm sữa lên men.

#### Sử dụng

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng lactaza, duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza, để bổ sung vào sản phẩm sữa được axit hóa, có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 và hàm lượng lactoza ít nhất bằng 1,5mg/mL, để làm giảm lactoza này trong quá trình bảo quản.

#### Định nghĩa

Liên quan đến sáng chế, các định nghĩa sau được sử dụng:

Thuật ngữ “LAU” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ “các đơn vị Lactoza” và 1 đơn vị lactaza (1 LAU) là lượng enzym giải phóng 1 micromol glucoza trong mỗi phút trong dung dịch đệm M ở độ pH 6,5 và 37°C với nồng độ lactoza 4,75% khối lượng/thể tích. Dung dịch đệm M được tạo ra bằng cách hoà tan 3,98 g  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ , 8,31 g axit xitric, 0,9 g  $K_2SO_4$ , 2,6 g  $K_2HPO_4$ , 7,35 g  $KH_2PO_4$ , 5,45 g KOH, 4,15 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 3,75 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  và 1,4 g  $NaHCO_3$  trong 4 lít nước, bổ sung 12,5 ml NaOH 4N, điều chỉnh đến pH 6,5 bằng cách sử dụng HCl, và bổ sung nước lên đến tổng thể tích là 5 lít.

Hoạt tính trong LAU của lactaza cụ thể có thể được xác định bằng cách đo trực tiếp glucoza được giải phóng từ lactoza trong các điều kiện được mô tả nêu trên. Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách xác định hoạt tính như vậy. Theo

cách khác, hoạt tính có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính lactaza mô tả trong Ví dụ 1 của đơn sáng chế. Ở đây, hoạt tính thu được bằng cách so sánh với đường cong chuẩn được chạy bằng lactaza của hoạt tính đã biết, và hoạt tính của mẫu chưa biết được tính toán từ việc so sánh này. Lactaza của hoạt tính đã biết có thể là, ví dụ, Lactozym thu được từ Novozymes A/S, Denmark.

Thuật ngữ “xử lý nhiệt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bước xử lý bất kỳ bằng cách dùng nhiệt độ bất kỳ, trong khoảng thời gian bất kỳ và bằng phương tiện hoặc thiết bị bất kỳ, mà gây bất hoạt ít nhất một phần vi khuẩn của giống khởi động. Liên quan đến thuật ngữ “làm bất hoạt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc làm ngừng, làm giảm hoặc ức chế bất kỳ sự sinh trưởng của vi khuẩn, ví dụ, làm tiêu tế bào.

Thuật ngữ “vi khuẩn axit lactic” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vi khuẩn gram dương, ưa vi khí hoặc kỵ khí, lên men đường với việc tạo ra các axit bao gồm axit lactic dưới dạng axit được tạo ra chủ yếu, axit axetic và axit propionic. Vi khuẩn axit lactic hữu ích nhất trong công nghiệp được phát hiện thuộc Bộ “Lactobacillales” bao gồm *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *PseudoLeuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Enterococcus spp.* và *Propionibacterium spp.* Chúng thường được sử dụng làm môi trường nuôi cấy thực phẩm riêng rẽ hoặc kết hợp với vi khuẩn axit lactic khác.

Vi khuẩn axit lactic, bao gồm vi khuẩn của loài *Lactobacillus sp.* và *Lactococcus sp.*, thường được cung cấp cho ngành công nghiệp sữa dưới dạng môi trường nuôi cấy đông lạnh hoặc môi trường nuôi cấy đông khô để nhân giống men sản xuất hoặc dưới cái được gọi là môi trường nuôi cấy “Direct Vat Set” (DVS) (canh trường cho vào trực tiếp), dự định để cấy trực tiếp vào bình hoặc bể lên men để tạo ra 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 “giống khởi động” hoặc “giống khởi động”. Thông thường, giống khởi động cho sữa chua bao gồm *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, và ở hầu hết các nước sữa chua theo luật được định nghĩa là sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng cách sử dụng giống khởi động chứa hai chủng này.

Thuật ngữ “sữa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sữa tiết ra thu được bằng cách vắt sữa động vật có vú bất kỳ như bò, cừu, dê, trâu hoặc lạc đà. Theo một phương án được ưu tiên, sữa là sữa bò. Thuật ngữ “sữa” cũng bao gồm các dung dịch protein/chất

béo được làm từ nguyên liệu thực vật, ví dụ, sữa đậu nành.

Thuật ngữ “cơ chất sữa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ nguyên liệu sữa thô và/hoặc sữa chế biến bất kỳ có thể được lên men theo phương pháp của sáng chế. Do đó, cơ chất sữa hữu ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch/huyền phù của sữa hoặc sản phẩm giống sữa bất kỳ chứa protein, như sữa nguyên chất hoặc sữa ít béo, sữa gầy, bơ sữa, sữa bột hoàn nguyên, sữa đặc, sữa khô, nước sữa, nước sữa axit, sản phẩm thấm qua màng của nước sữa, bao gồm sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit, bột nước sữa, bao gồm bột nước sữa axit, bột nước sữa có đường, bột nước sữa khử khoáng và bột nước sữa khử lactoza, lactoza, nước cái từ quá trình kết tinh lactoza, protein nước sữa cô đặc hoặc kem. Rõ ràng là, cơ chất sữa có thể có nguồn gốc từ động vật có vú bất kỳ, ví dụ, là sữa động vật có vú về cơ bản nguyên chất, hoặc sữa bột hoàn nguyên.

Thuật ngữ “sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm thấm qua màng của nước sữa thu được từ việc cô sản phẩm sữa lên men bằng cách siêu lọc để tạo ra pho-mát tươi, như pho-mát làm từ sữa đã gạn kem, pho-mát ricota, Skyr, sữa chua Hy Lạp, Tвороq, pho-mát Đức và Labneh, được sản xuất bằng cách làm đông axit nhờ lên men vi khuẩn axit lactic, và trong đó độ pH của sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit trong dung dịch 10% là thấp hơn 5,1.

Thuật ngữ “nước sữa axit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân đoạn nước sữa thu được từ việc cô sản phẩm sữa lên men trong thiết bị tách trong việc tạo ra pho-mát tươi, như pho-mát làm từ sữa đã gạn kem, pho-mát ricota, Skyr, sữa chua Hy Lạp, Tвороq, pho-mát Đức và Labneh, được sản xuất bằng cách làm đông axit nhờ lên men vi khuẩn axit lactic, và trong đó độ pH của phân đoạn nước sữa axit trong dung dịch 10% là thấp hơn 5,1.

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

Thuật ngữ “làm đồng nhất” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bước trộn mạnh để thu được huyền phù hoặc nhũ tương hòa tan. Nếu việc làm đồng nhất được thực hiện trước khi lên men, nó có thể được thực hiện để phá vỡ các chất béo sữa thành các kích cỡ nhỏ hơn để nó không còn tách ra khỏi sữa. Điều này có thể được thực hiện bằng cách ép sữa ở áp suất cao đi qua các lỗ nhỏ.

Thuật ngữ “thanh trùng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bước xử lý cơ chất sữa để làm giảm hoặc loại bỏ sự có mặt của các sinh vật sống, như vi sinh vật. Tốt hơn nữa, việc thanh trùng đạt được bằng cách duy trì nhiệt độ được chỉ định trong một khoảng thời gian nhất định. Nhiệt độ được chỉ định thường đạt được bằng cách gia nhiệt. Nhiệt độ và thời gian có thể được chọn để diệt hoặc khử hoạt tính của một số vi khuẩn, như vi khuẩn có hại. Bước làm mát nhanh có thể tiếp theo sau.

“Sự lên men” trong phương pháp theo sáng chế nghĩa là sự chuyển hoá của hydrat cacbon thành rượu hoặc các axit thông qua các tác động của vi sinh vật. Tốt hơn nữa, sự lên men trong phương pháp theo sáng chế bao gồm sự chuyển hoá của lactoza thành axit lactic.

Quy trình lên men được sử dụng để tạo ra sản phẩm sữa là đã biết và người có hiểu biết 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 điểm đặc trưng 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).

Việc sử dụng thuật ngữ “một” và các thuật ngữ tương tự trong nội dung bản mô tả sáng chế (đặc biệt là trong nội dung của yêu cầu bảo hộ dưới đây) được hiểu là bao gồm cả số ít và số nhiều, trừ khi có quy định rõ ràng trong bản mô tả hoặc có mâu thuẫn rõ ràng theo ngữ cảnh. Các thuật ngữ “bao gồm”, “có”, “gồm” và “chứa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các thuật ngữ mở (nghĩa là “bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,”) trừ khi có quy định khác. Việc đọc các dãy giá trị trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích viết tắt để chỉ riêng lẻ từng giá trị riêng biệt nằm trong phạm vi, trừ khi có quy định khác, và mỗi giá trị riêng biệt được đưa vào bản mô tả như thể nó được nêu riêng rẽ trong bản mô tả này. Tất cả các phương pháp được mô tả ở đây có thể được thực hiện theo trình tự thích hợp bất kỳ, trừ khi có quy định khác trong tài liệu này hoặc mâu thuẫn rõ ràng theo ngữ cảnh. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ hoặc ngôn ngữ mẫu (ví dụ, “như”) được cung cấp ở đây, chỉ nhằm hiểu sáng chế tốt hơn và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế, trừ khi có quy định khác. Ngôn ngữ trong bản mô tả không được hiểu là việc chỉ ra yếu tố không bảo hộ bất kỳ cần thiết để ứng dụng thực tế sáng chế.

Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi trong đó việc tạo ra sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi bao gồm việc lên men cơ chất sữa bằng vi khuẩn axit lactic. “Sản phẩm sữa lên men” như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sản phẩm như sản phẩm sữa lên men ưa nhiệt, ví dụ, sữa chua, sản phẩm sữa lên men ưa nhiệt trung bình, ví dụ, kem chua và bơ sữa, cũng như nước sữa lên men.

Thuật ngữ “ưa nhiệt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vi sinh vật phát triển tốt nhất ở các nhiệt độ trên 35°C. Vi khuẩn ưa nhiệt hữu ích nhất trong công nghiệp bao gồm *Streptococcus spp.* và *Lactobacillus spp.* Thuật ngữ “sự lên men ưa nhiệt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự lên men ở nhiệt độ trên khoảng 35°C, như nằm trong khoảng từ khoảng 35°C đến khoảng 45°C. Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men ưa nhiệt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm sữa lên men được sản xuất bằng cách lên men ưa nhiệt giống khởi động ưa nhiệt và bao gồm các sản phẩm sữa lên men như vậy dưới dạng sữa chua truyền thống, sữa chua khuấy và sữa chua uống, ví dụ, Yakult.

Thuật ngữ “ưa nhiệt trung bình” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vi sinh vật phát triển tốt nhất ở các nhiệt độ vừa phải (15°C-35°C). Vi khuẩn ưa nhiệt trung bình hữu ích nhất trong công nghiệp bao gồm *Lactococcus spp.* và *Leuconostoc spp.* Thuật ngữ “sự lên men ưa nhiệt trung bình” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 22°C đến khoảng 35°C. Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men ưa nhiệt trung bình” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm sữa lên men được sản xuất bằng cách lên men ưa nhiệt trung bình giống khởi động ưa nhiệt trung bình và bao gồm các sản phẩm sữa lên men như vậy như bơ sữa, sữa chua, sữa nuôi cấy, váng sữa, kem chua, Kefir và pho-mát tươi, như pho-mát Đức, tvarog và pho-mát kem.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

#### Ví dụ 1

Thử nghiệm hoạt tính lactaza trong ống Eppendorf ở nhiệt độ 37°C, độ pH bằng 6,5

Nguyên lý:

Lactaza thủy phân lactoza thành glucoza và galactoza. Glucoza được đo sau phiên bản cải biến của thử nghiệm glucoza oxidaza/peroxidaza thông thường (Werner, W. *et al.*

(1970) *Z. analyt. Chem.* 252: 224.).

LAU được xác định là lượng enzym giải phóng 1 micromol glucoza trong mỗi phút ở nhiệt độ 37°C, độ pH 6,5 trong dung dịch đệm M (M-đệm được xác định trong phần mô tả của đơn sáng chế này). Theo cách khác, hoạt tính trong LAU cho lactaza cụ thể có thể được xác định bằng phương pháp được mô tả ở đây. Giá trị thu được được so sánh với đường cong chuẩn được chạy bằng lactaza của hoạt tính đã biết, và hoạt tính của mẫu chưa biết được tính toán từ việc so sánh này. Lactaza của hoạt tính đã biết có thể, ví dụ, là Lactozym thu được từ Novozymes A/S, Denmark.

Dung dịch:

Dung dịch đệm thử nghiệm: 50 mM succinat, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Triton X100, độ pH 6,5

Dung dịch GOD-Perid: 65 mM natri phosphat, độ pH 7, 0,4g/L glucoza oxidaza, 0,013g/L HRP (Peroxidaza cây cải ngựa), 0,65g/L ABTS (axit 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonic)).

Cơ chất:

160 mM lactoza, 50 mM succinat, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, độ pH 6,5.

Dung dịch chuẩn:

Lactozym (sẵn có từ Novozymes A/S, Denmark) với hoạt tính đã biết trong LAU/g được sử dụng làm dung dịch chuẩn, được pha loãng trong dung dịch đệm thử nghiệm trong khoảng từ 0,09 - 0,7 LAU/g.

Mẫu:

Mẫu enzym được pha loãng thích hợp trong dung dịch đệm thử nghiệm.

Các bước thực hiện:

1. 375μL cơ chất được ủ 5 phút ở nhiệt độ 37°C.
2. 25μL enzym được pha loãng trong dung dịch đệm thử nghiệm được bổ sung.
3. Phản ứng được dừng sau 30 phút bằng cách bổ sung 60μL 1 M NaOH
4. 20μL được chuyển đến đĩa vi chuẩn độ 96 giếng và 200μL dung dịch GOD-

Perid được bổ sung. Sau 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, độ hấp thụ được đo ở bước sóng bằng 420 nm.

#### Ví dụ 2

100mL 15 hoặc 30%(khối lượng/khối lượng) sản phẩm thấm qua màng của nước sữa chứa lactoza cơ bản và ion được tạo ra bằng cách trộn 15 hoặc 30 g bột thấm qua nước sữa đông khô (Variolac, Arla) trong lần lượt 85 hoặc 70mL nước ion. Dung dịch được rót vào bình chứa thanh khuấy từ và đặt trong bể nước ở nhiệt độ 37°C. Sau khi 15 min, enzym được bổ sung. Enzym được thử nghiệm là Lactozym, lactaza sẵn có trên thị trường của Novozymes A/S, Denmark, có hoạt tính là 3060 LAU/g, và lactaza thử nghiệm từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được thể hiện trong SEQ ID NO.2 và hoạt tính là 295 LAU/g.

Liều lượng là 4225 LAU/l sữa của Lactozym và 2025 LAU/l sữa của lactaza của *Bifidobacterium*. Mẫu sữa được lấy đều đặn cho đến 5,5 giờ và enzym được làm bất hoạt bằng cách gia nhiệt đến 99°C trong 10 phút trong thiết bị khuấy nhiệt. Mẫu được pha loãng thích hợp và được lọc qua màng lọc 0,20µm.

Sự thủy phân lactoza được đo bằng cách sử dụng Dionex BioLC được trang bị cột Dionex PA1 và thiết bị dò Pulsed Amperimetric Detektor (PAD). Các đỉnh được xác định và định lượng bằng cách so sánh với các chuẩn lactoza, glucoza và galactoza đã biết.

Kết quả được thể hiện dưới đây.

Bảng 1: Lactoza, glucoza và galactoza trong 15% DS sản phẩm thấm qua màng của nước sữa sau khi xử lý bằng Lactozym hoặc lactaza của *Bifidobacterium*.

| Thời gian<br>(phút) | Lactozym        |                 |                   | Lactaza của <i>Bifidobacterium</i> |                 |                   |
|---------------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------------------------|-----------------|-------------------|
|                     | Lactoza<br>(mM) | Glucoza<br>(mM) | Galactoza<br>(mM) | Lactoza<br>(mM)                    | Glucoza<br>(mM) | Galactoza<br>(mM) |
| 0                   | 499             | 1               | 2                 | 499                                | 1               | 2                 |
| 30                  | 312             | 135             | 106               | 410                                | 61              | 63                |
| 60                  | 211             | 224             | 155               | 349                                | 119             | 122               |
| 120                 | 110             | 295             | 221               | 220                                | 199             | 202               |
| 180                 | 66              | 324             | 249               | 149                                | 281             | 290               |
| 240                 | 50              | 346             | 279               | 84                                 | 336             | 348               |
| 330                 | 37              | 372             | 312               | 31                                 | 350             | 368               |

Bảng 2: Lactoza, glucoza và galactoza trong 30% DS sản phẩm thấm qua màng của nước sữa sau khi xử lý bằng Lactozym hoặc lactaza của *Bifidobacterium*.

| Thời gian<br>(phút) | Lactozym        |                 |                   | Lactaza của <i>Bifidobacterium</i> |                 |                   |
|---------------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------------------------|-----------------|-------------------|
|                     | Lactoza<br>(mM) | Glucoza<br>(mM) | Galactoza<br>(mM) | Lactoza<br>(mM)                    | Glucoza<br>(mM) | Galactoza<br>(mM) |
| 0                   | 848             | 1               | 4                 | 848                                | 1               | 4                 |
| 30                  | 824             | 109             | 75                | 819                                | 43              | 45                |
| 60                  | 615             | 253             | 150               | 788                                | 86              | 83                |
| 120                 | 420             | 370             | 242               | 651                                | 159             | 158               |
| 180                 | 291             | 459             | 300               | 625                                | 232             | 230               |
| 240                 | 246             | 559             | 373               | 501                                | 283             | 273               |
| 330                 | 154             | 544             | 367               | 391                                | 333             | 324               |
| 1440                | 54              | 649             | 545               | 20                                 | 727             | 739               |

Ngoài ra, khi được thử nghiệm ở các nồng độ lactoza cao hơn như ở 15% hoặc 30% sản phẩm thấm qua màng của nước sữa thì không có hoặc có rất ít galactooligosaccarit được tạo ra. Ngoài ra, mức galactoza và glucoza được tạo ra là bằng nhau và phù hợp với lượng lactoza được thủy phân. Để so sánh, lactozym tạo ra ít galactoza hơn so với glucoza, cho thấy rõ rằng galactooligosaccarit đã được tạo ra.

### Ví dụ 3

Đặc tính độ pH (ở nhiệt độ 37°C) và đặc tính nhiệt độ (ở độ pH 6,5) của lactaza thử nghiệm từ *Bifidobacterium bifidum* bằng cách sử dụng lactoza làm cơ chất.

### Nguyên lý:

Lactaza thủy phân lactoza và glucoza + galactoza được tạo ra. Glucoza được đo sau phiên bản cải biến của thử nghiệm glucoza oxidaza/peroxidaza thông thường (Werner, W. *et al.* (1970) *Z. analyt. Chem.* 252: 224.)

### Đặc tính độ pH

#### Cơ chất:

167 mM lactoza, 50 mM succinat, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> và độ pH được điều chỉnh đến 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 và 10 bằng NaOH.

#### Mẫu enzym:

Lactaza thử nghiệm từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được thể hiện trong SEQ ID NO.2 được pha loãng thích hợp trong 150 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Triton X100.

#### Các bước thực hiện:

- 10 $\mu$ L mẫu enzym được pha loãng trong dung dịch đệm pha loãng enzym được bổ sung vào ống PCR ở nhiệt độ trong phòng.

- 90 $\mu$ L cơ chất được bổ sung ở nhiệt độ trong phòng và đặt nhanh trong thiết bị luân nhiệt Peltier Thermal Cycler (PCT-200, nghiên cứu MJ) ở 37°C và được ủ trong 30 phút và sau đó được đặt trên nước đá.

- Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 100 $\mu$ L NaOH 0,25M.

- 20 $\mu$ L được chuyển đến đĩa vi chuẩn độ 96 giếng và 230 $\mu$ L 65 mM natri phosphat, độ pH 7, 0,4g/L glucoza oxidaza, 0,013g/L HRP, 0,65g/L dung dịch ABTS được bổ sung. Sau 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, độ hấp thụ được đo ở bước sóng bằng 420 nm.

Bảng 3:

| Độ pH | Hoạt tính tương đối của lactaza <i>B. bifidum</i><br>(% hoạt tính ở độ pH bằng 6) |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 3     | 0                                                                                 |
| 4     | 4                                                                                 |
| 5     | 75                                                                                |
| 6     | 100                                                                               |
| 7     | 85                                                                                |
| 8     | 39                                                                                |
| 9     | 10                                                                                |
| 10    | 4                                                                                 |

Đặc tính nhiệt độ

Cơ chất:

167 mM lactoza, 50 mM succinat, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> và pH được điều chỉnh đến độ pH 6,5 bằng NaOH.

Mẫu enzym:

Lactaza thử nghiệm từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được thể hiện trong SEQ ID NO.2 được pha loãng thích hợp trong 50 mM succinat, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Triton X100 đến pH được điều chỉnh đến độ pH 6,5.

Các bước thực hiện:

- 10 $\mu$ L mẫu enzym được pha loãng trong dung dịch đệm pha loãng enzym được

bổ sung vào ống PCR ở nhiệt độ trong phòng.

- 90 $\mu$ L cơ chất được gia nhiệt sơ bộ (trong thiết bị luân nhiệt Peltier Thermal Cycler 30-70°C) được bổ sung và việc cấy được thực hiện với gradien nhiệt độ nằm trong khoảng 30-70°C trong 30 phút và sau đó được đặt trên nước đá.

- Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 100 $\mu$ L NaOH 0,25M.

- 20 $\mu$ L được chuyển đến đĩa vi chuẩn độ 96 giếng và 230 $\mu$ L 65 mM natri phosphat, độ pH 7, 0,4g/L glucoza oxidaza, 0,013g/L HRP, 0,65g/L dung dịch ABTS được bổ sung. Sau 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, độ hấp thụ được đo ở bước sóng bằng 420 nm.

Bảng 4:

| Nhiệt độ (°C) | Hoạt tính tương đối của lactaza <i>B. bifidum</i> (% hoạt tính ở nhiệt độ 38,1°C) |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 20            | 54                                                                                |
| 21            | 63                                                                                |
| 22            | 64                                                                                |
| 24            | 68                                                                                |
| 26            | 73                                                                                |
| 29            | 81                                                                                |
| 31            | 88                                                                                |
| 34            | 94                                                                                |
| 36            | 96                                                                                |
| 38            | 100                                                                               |
| 43            | 96                                                                                |
| 48            | 91                                                                                |
| 52            | 83                                                                                |
| 57            | 76                                                                                |
| 62            | 58                                                                                |
| 66            | 32                                                                                |
| 69            | 20                                                                                |
| 70            | 17                                                                                |

Ví dụ 4

Xác định Km cho enzym lactaza ở nhiệt độ 5°C

Nguyên lý:

Lactaza thủy phân lactoza và glucoza + galactoza được tạo ra. Glucoza được đo sau phiên bản cải biến của thử nghiệm glucoza oxidaza/peroxidaza thông thường (Werner, W. *et al.* (1970) *Z. analyt. Chem.* 252: 224.)

Cơ chất:

Các nồng độ lactoza khác nhau nằm trong khoảng từ Km/5 đến 10\*Km, 50 mM succinat, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> và pH được điều chỉnh đến độ pH 6,5 bằng NaOH.

Mẫu enzym:

Lactaza thử nghiệm từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được thể hiện trong SEQ ID NO.2 được pha loãng thích hợp trong 50 mM succinat, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Triton X100, độ pH được điều chỉnh đến độ pH 6,5 bằng NaOH.

12g/L Lactozym (lactaza sẵn có trên thị trường của Novozymes A/S, Denmark) được pha loãng 6000 lần trong cùng dung dịch đệm.

Các bước thực hiện:

- 10μL mẫu enzym (5°C) được bổ sung vào đĩa vi chuẩn độ 96 giếng trên nước đá.
- 90μL cơ chất (5°C) được bổ sung và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 5°C.
- Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 100μL NaOH 0,25M.
- 20μL được chuyển đến đĩa vi chuẩn độ 96 giếng và 230μL 65 mM natri phosphat, độ pH 7, 0,4g/L glucoza oxidaza, 0,013g/L HRP, 0,65g/L dung dịch ABTS được bổ sung. Sau 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, độ hấp thụ được đo ở bước sóng bằng 420 nm.

Xác định Km:

Phương pháp bình phương tối thiểu không tuyến tính máy tính hóa và phương trình Michaelis-Menten:  $v = (V_{max} * S) / (K_m + S)$

được sử dụng. Km cho lactaza của *Bifidobacterium* và Lactozym được xác định lần lượt là 8 mM và 30 mM.

Trong thử nghiệm tương tự được thực hiện ở nhiệt độ 37°C, Km cho lactaza của *Bifidobacterium* và Lactozym được xác định lần lượt là 13 mM và 30 mM.

Ví dụ 5

Sản xuất sữa chua sau thanh trùng chứa lactaza được bổ sung sau khi thanh trùng

Cơ chất sữa

Hàm lượng chất béo 2,8%\*

Hàm lượng protein 2,8%\*

Lactoza 3,0%

Sucroza 5,0% (được bổ sung)

Tinh bột cải biến E1442 Cargill loại 75720 1,50%

Pectin loại LMA CP Kelco loại LM 106 AS-YA 0,25%

Gellan Gum loại Kelcogel YSS 0,05%

\*Mức trong thành phẩm, tức là sau khi xử lý nhiệt, bổ sung chủng bảo quản ở nhiệt độ môi trường và bảo quản trong 150 ngày.

Giống khởi động

Giống khởi động YoFlex® loại FD-DVS YF-L904 chứa hai chủng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*.

Lactaza

Lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được nêu trong SEQ ID NO. 2 và hoạt tính là 295 LAU/g.

Các bước thực hiện tạo ra sản phẩm

1. Phân tán các thành phần khô vào sữa
2. Để yên trong 3 giờ kết hợp khuấy nhẹ
3. Gia nhiệt sữa cho đến khi đạt đến nhiệt độ 65°C
4. Làm đồng nhất ở 150 bar ( $150 \times 10^5$  kPa)
5. Xử lý nhiệt đến nhiệt độ 95°C trong 5 phút.
6. Làm nguội đến nhiệt độ lên men 43°C
7. Bơm sữa vào bể lên men
8. Cấy giống khởi động YoFlex loại YF-L904.
9. Lên men cho đến khi độ pH đạt đến 4,30.
10. Phá vỡ cục sữa đông và khuấy cho đến khi thu được cấu trúc trơn nhẵn
11. Xử lý nhiệt ở 75°C trong 30 giây.
12. Làm nguội đến 25°C

13. Bổ sung lactaza ở mức bằng 1420 LAU/L sản phẩm sữa chua và trộn nhẹ sữa chua để phân bố lactaza đều trong sữa chua.

14. Nạp sữa chua vào các đồ chứa.

15. Bảo quản sữa chua ở nhiệt độ 20°C trong khoảng thời gian 7 ngày.

#### Ví dụ 6

Bổ sung xuôi dòng lactaza vào sữa chua sau thanh trùng

Mục đích của thử nghiệm được thực hiện là nhằm cho thấy rằng có thể bổ sung lactaza thích hợp sau khi xử lý nhiệt cuối cùng sữa chua sau thanh trùng để đạt được nồng độ lactoza còn lại là <0,01%.

Sữa chua sau thanh trùng với thành phần là 2,9% protein và 2,8% chất béo được tạo ra. Cơ chất sữa được lên men đến độ pH bằng 4,30 bằng giống khởi động YoFlex loại YF-L904. Sau khi đạt đến độ pH bằng 4,30 sữa chua được làm mát xuống 15°C trong thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm và được giữ trong thùng dung dịch đệm cách điện ở 15°C trong ba giờ trước khi thực hiện bước xử lý nhiệt cuối cùng. Bước xử lý nhiệt cuối cùng được thực hiện ở 74°C, 20 giây. Trong thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm, và sản phẩm được nạp ở 25°C vào các cốc vô trùng. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ môi trường (22°C) trong một ngày trước khi bổ sung lactaza vô trùng.

#### Cơ chất sữa

| Thành phần                   | Thông số kỹ thuật                         | Liều lượng            |
|------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|
| Sữa tươi                     | 3,5% chất béo, sữa thương mại, Arla Foods | 74,15%                |
| Nước                         |                                           | 16,6%                 |
| Sucroza                      |                                           | 7,0%                  |
| Chất cô đặc protein nước sữa | Nutrilac YO-7830, Arla Food Ingredients   | 0,60%                 |
| Tinh bột cải biến            | Clearam CJ 5025, Roquette                 | 1,50%                 |
| LM Pectin                    | LM 106-AS YA, CP Kelco                    | 0,12%                 |
| Gôm Gellan                   | Kelcogel YSS, CP Kelco                    | 0,03%                 |
| Môi trường nuôi cấy          | FD-DVS YF-L904                            | 200 đơn vị/tấn hệ mét |

Phân tích Milkoscan:

Hàm lượng chất béo 2,8%

Hàm lượng protein 2,9%

Các thông số sau được sử dụng để lên men và xử lý:

Nhiệt độ trộn: 10°C

Thời gian hydrat hóa: 3 giờ kết hợp khuấy nhẹ

Lactaza

Lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được nêu trong SEQ ID NO. 2.

Giống khởi động

Giống khởi động YoFlex® loại YF-L904 từ khoảng sản phẩm Chr. Hansen YoFlex® chứa hai loài *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*.

Quy trình sản xuất sữa chua

Áp suất làm đồng nhất: 150 ba ( $150 \times 10^{+2}$  kPa)

Điều kiện thanh trùng: 95°C, 5 phút

Nhiệt độ lên men: 43°C

Độ pH cuối: 4,30

Phá vỡ cục sữa đông bằng tay và khuấy cho đến khi thu được cấu trúc trơn nhẵn.

Làm nguội đến 15°C trong thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm

Xử lý nhiệt trong thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm, tốc độ dòng 414L/h

Áp suất làm đồng nhất: 0 ba ( $0 \times 10^{+2}$  kPa)

Điều kiện xử lý nhiệt: 74°C, 20 giây

Nạp vào các cốc vô trùng dung tích 100mL, nhiệt độ nạp 25°C.

Bổ sung lactaza

Lactaza được lọc vô trùng và được bổ sung vào cốc dung tích 100mL chứa sữa chua sau thanh trùng với liều lượng sau: a) 0 LAU/L - tham chiếu, b) 1000 LAU/L, c) 3000 LAU/L, và d) 10000 LAU/L

Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng (22°C) và mẫu được lấy để phân tích lactoza còn lại ở các thời điểm sau; 24 giờ, 48 giờ và 1 tuần.

Kết quả

Trong Fig.1 lactoza còn lại của mẫu với việc bổ sung lactaza được thể hiện. Lactoza còn lại của mẫu tham chiếu được đo là 2,4% lactoza còn lại. Từ Fig.1 thấy rõ rằng nồng độ lactoza giảm đến mức khoảng 0,005% đối với các nồng độ lactaza 3000 LAU/L và 10000 LAU/L sau 24 giờ bổ sung. Ngoài ra, nồng độ lactoza giảm đến mức khoảng 0,005% đối với tất cả ba nồng độ lactaza sau 48 giờ và sau 1 tuần bổ sung.

#### Ví dụ 7

Bổ sung xuôi dòng lactaza vào sữa chua sau thanh trùng

Mục đích của thử nghiệm được thực hiện là nhằm cho thấy rằng có thể bổ sung lactaza thích hợp sau khi xử lý nhiệt cuối cùng sữa chua sau thanh trùng để đạt được nồng độ lactoza còn lại là <0,1%.

Sữa chua sau thanh trùng với thành phần là 2,87% protein và 2,89% chất béo được tạo ra. Cơ chất sữa được lên men đến độ pH bằng 4,30 bằng giống khởi động YoFlex loại YF-L904. Sau khi đạt đến độ pH bằng 4,30 sữa chua được làm mát xuống 15°C trong thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm và được giữ trong thùng dung dịch đệm cách điện ở 15°C trong ba giờ trước khi thực hiện bước xử lý nhiệt cuối cùng. Bước xử lý nhiệt cuối cùng được thực hiện ở 74°C, 20 giây. Trong thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm, và sản phẩm được nạp ở 25°C vào các cốc vô trùng. Mẫu được bảo quản ở 25°C trong một ngày trước khi bổ sung lactaza vô trùng.

#### Cơ chất sữa

| Thành phần                   | Thông số kỹ thuật                         | Liều lượng            |
|------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|
| Sữa tươi                     | 3,5% chất béo, sữa thương mại, Arla Foods | 74,15%                |
| Nước                         |                                           | 16,6%                 |
| Sucroza                      |                                           | 7,0%                  |
| Chất cô đặc protein nước sữa | Nutrilac YO-7830, Arla Food Ingredients   | 0,60%                 |
| Tinh bột cải biến            | Clearam CJ 5025, Roquette                 | 1,50%                 |
| LM Pectin                    | LM 106-AS YA, CP Kelco                    | 0,12%                 |
| Gôm Gellan                   | Kelcogel YSS, CP Kelco                    | 0,03%                 |
| Môi trường nuôi cấy          | FD-DVS YF-L904                            | 200 đơn vị/tấn hệ mét |

Phân tích Milkoscan:

Hàm lượng chất béo 2,87%

Hàm lượng protein 2,89%

Các thông số sau được sử dụng để lên men và xử lý:

Nhiệt độ trộn: 10°C

Thời gian hydrat hóa: 3 giờ kết hợp khuấy nhẹ

Lactaza

Lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được nêu trong SEQ ID NO. 2.

Giống khởi động

Giống khởi động YoFlex® loại YF-L904 từ nhóm sản phẩm Chr. Hansen YoFlex® chứa hai loài *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*.

Quy trình sản xuất sữa chua

Áp suất làm đồng nhất: 150 ba

Điều kiện thanh trùng: 95°C, 5 phút

Nhiệt độ lên men: 43°C

Độ pH cuối: 4,30

Phá vỡ cục sữa đông bằng tay và khuấy cho đến khi thu được cấu trúc trơn nhẵn.

Làm nguội đến 15°C trong thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm

Xử lý nhiệt trong thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm, tốc độ dòng 414L/h

Điều kiện xử lý nhiệt: 74°C, 20 giây

Nạp vào các cốc vô trùng dung tích 100mL, nhiệt độ nạp 25°C.

Bổ sung lactaza

Lactaza được lọc vô trùng và được bổ sung vào cốc dung tích 100mL chứa sữa chua sau thanh trùng với liều lượng sau: a) 0 LAU/L - tham chiếu, b) 200 LAU/L, c) 400 LAU/L, d) 600 LAU/L, e) 800 LAU/L, f) 1000 LAU/L, và g) 1200 LAU/L

Mẫu được bảo quản ở 25°C và mẫu được lấy ra để phân tích lactoza còn lại ở các thời điểm sau; 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 76 giờ.

Kết quả

Fig.2-Fig.4 thể hiện lactoza còn lại của mẫu với việc bổ sung lactaza. Lactoza còn

lại của mẫu tham chiếu được đo là 2,4% lactoza còn lại. Đường nằm ngang ở nồng độ lactoza còn lại là 0,1 và 0,5 biểu thị nồng độ lactoza, mà theo luật pháp về thực phẩm là đủ điều kiện vì không chứa lactoza lần lượt ở châu Âu và Trung Quốc.

Từ Fig.2-4 thấy rõ ràng rằng nồng độ lactoza ở 24 giờ giảm đến mức khoảng 0,355% đối với nồng độ lactaza là 400 LAU/L và đến mức dưới 0,01% đối với các nồng độ lactaza cao hơn. Ở 48 giờ, nồng độ lactoza đã giảm đến mức là 0,015% đối với nồng độ lactaza là 400 LAU/L và đến mức dưới 0,01% đối với các nồng độ lactaza cao hơn. Ở 76 giờ, nồng độ lactoza đã giảm đến mức dưới 0,01% đối với nồng độ lactaza là 400 LAU/L và các nồng độ lactaza cao hơn.

Do đó, các thử nghiệm theo sáng chế cho thấy rằng có thể đáp ứng đích lactoza còn lại là 0,01% hoặc nhỏ hơn với liều dùng lactaza là 600 LAU/l ở 48 giờ và liều dùng lactaza là 400 LAU/l ở 76 giờ.

#### Ví dụ 8

Bổ sung xuôi dòng lactaza vào sữa chua sau thanh trùng ở mức pH khác nhau (từ 4,0 đến 4,4)

Mục đích của thử nghiệm được thực hiện là nhằm cho thấy rằng trong quy trình loại bỏ lactoza trong sữa chua sau thanh trùng (PPY) bằng cách sử dụng lactaza có thể để thu được mức loại bỏ lactoza mong muốn đối với PPY ở độ pH khác nhau nằm trong khoảng từ 4,0 đến 4,4.

#### Cơ chất sữa

| Thành phần                   | Thông số kỹ thuật                         | Liều lượng Lactoza chuẩn | Liều lượng Lactoza cao |
|------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| Sữa tươi                     | 3,5% chất béo, sữa thương mại, Arla Foods | 74,30%                   | 74,0%                  |
| Nước                         |                                           | 16,45%                   | 15,95%                 |
| Sucroza                      |                                           | 7,0%                     | 7,0%                   |
| Chất cô đặc protein nước sữa | Nutrillac YO-7830, Arla Food Ingredients  | 0,60%                    | 0,60%                  |
| Tinh bột cải biến            | Clearam CJ 5025, Roquette                 | 1,50%                    | 1,5%                   |
| LM Pectin                    | LM 106-AS YA, CP Kelco                    | 0,12%                    | 0,12%                  |
| Gôm Gellan                   | Kelcogel YSS, CP Kelco                    | 0,03%                    | 0,03%                  |
| Môi trường nuôi cấy          | FD-DVS YF-L904                            | 200 đơn vị/tấn hệ mét    | 200 đơn vị/tấn hệ mét  |

Phân tích Milkoscan:

Nền sữa Lactoza chuẩn: Hàm lượng chất béo 2,88%, hàm lượng protein 2,91%

Nền sữa Lactoza cao: Hàm lượng chất béo 2,91%, hàm lượng protein 2,94%

Lactaza

Lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được nêu trong SEQ ID NO. 2.

Quy trình sản xuất sữa chua

Áp suất làm đồng nhất: 150 ba ( $150 \times 10^{+2}$  kPa) ở nhiệt độ 60°C

Điều kiện thanh trùng: 95°C, 5 phút

Nhiệt độ lên men: 43°C

Độ pH cuối đối với nền sữa lactoza chuẩn: 4,0, 4,1, 4,2, 4,3 và 4,4

Độ pH cuối đối với nền sữa lactoza cao: 4,3

Phá vỡ cục sữa đông bằng tay và khuấy cho đến khi thu được cấu trúc trơn nhẵn.

Làm nguội đến 15°C trong thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm

Xử lý nhiệt trong thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm, tốc độ dòng 414L/h

Điều kiện xử lý nhiệt: 74°C, 20 giây

Nạp vào các cốc vô trùng dung tích 100mL, nhiệt độ nạp 25°C.

Bổ sung lactaza

Lactaza được lọc vô trùng và được bổ sung vào cốc dung tích 100mL chứa sữa chua sau thanh trùng với liều lượng sau: a) 0 LAU/L - tham chiếu, b) 200 LAU/L, c) 400 LAU/L, d) 600 LAU/L, và e) 800 LAU/L

Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 15°C, 20°C, 25°C đến 30°C và mẫu được lấy ra để phân tích lactoza còn lại ở các thời điểm sau; 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ.

Kết quả

Nhằm mục đích ngắn gọn, chỉ thể hiện các kết quả đối với các mẫu được cất trữ ở 25°C. Các kết quả tương ứng thu được đối với các mẫu được bảo quản ở 15°C, 20°C và 30°C.

Bảng 5: Nồng độ lactoza còn lại đối với mẫu được bảo quản ở 25°C.

| Nền sữa | Độ pH cuối cùng | Liều lượng lactaza (LAU/L) | 24 giờ (%) | 48 giờ (%) | 72 giờ (%) |
|---------|-----------------|----------------------------|------------|------------|------------|
| Chuẩn   | 4,4             | 200                        | 0,918      | 0,220      | 0,034      |
| Chuẩn   | 4,4             | 400                        | 0,106      | 0,004      | 0,003      |
| Chuẩn   | 4,4             | 600                        | 0,077      | 0,003      | 0,003      |
| Chuẩn   | 4,4             | 800                        | 0,009      | <0,002     | 0,002      |
| Chuẩn   | 4,4             | 1000                       | 0,004      | 0,002      | 0,002      |
| Chuẩn   | 4,3             | 200                        | 1,322      | 0,567      | 0,223      |
| Chuẩn   | 4,3             | 400                        | 0,566      | 0,043      | 0,008      |
| Chuẩn   | 4,3             | 600                        | 0,063      | 0,005      | 0,004      |
| Chuẩn   | 4,3             | 800                        | 0,015      | 0,003      | 0,003      |
| Chuẩn   | 4,3             | 1000                       | 0,007      | <0,002     | 0,002      |
| Chuẩn   | 4,2             | 200                        | 1,422      | 0,0803     | 0,356      |
| Chuẩn   | 4,2             | 400                        | 0,671      | 0,071      | 0,013      |
| Chuẩn   | 4,2             | 600                        | 0,177      | 0,008      | 0,004      |
| Chuẩn   | 4,2             | 800                        | 0,128      | 0,005      | 0,003      |
| Chuẩn   | 4,2             | 1000                       | ND         | ND         | ND         |
| Chuẩn   | 4,1             | 200                        | 1,719      | 1,177      | 0,808      |
| Chuẩn   | 4,1             | 400                        | 0,923      | 0,266      | 0,051      |
| Chuẩn   | 4,1             | 600                        | 0,572      | 0,066      | 0,019      |
| Chuẩn   | 4,1             | 800                        | 0,245      | 0,010      | 0,005      |
| Chuẩn   | 4,1             | 1000                       | 0,108      | 0,005      | 0,003      |
| Chuẩn   | 4,0             | 200                        | 1,725      | 1,196      | 0,933      |
| Chuẩn   | 4,0             | 400                        | 1,236      | 0,589      | 0,265      |
| Chuẩn   | 4,0             | 600                        | 0,773      | 0,187      | 0,039      |
| Chuẩn   | 4,0             | 800                        | 0,502      | 0,049      | 0,010      |
| Chuẩn   | 4,0             | 1000                       | ND         | ND         | ND         |
| Cao     | 4,3             | 200                        | 2,011      | 1,139      | 0,584      |
| Cao     | 4,3             | 400                        | 0,876      | 0,121      | 0,018      |
| Cao     | 4,3             | 600                        | 0,250      | 0,009      | 0,005      |
| Cao     | 4,3             | 800                        | 0,053      | 0,006      | 0,003      |
| Cao     | 4,3             | 1000                       | 0,017      | 0,004      | 0,003      |

Bảng 6: Nồng độ lactoza còn lại không được bổ sung lactaza.

| Nền sữa                   | Độ pH | Liều lượng Lactaza (LAU/L) | 24 giờ (%) |
|---------------------------|-------|----------------------------|------------|
| Chuẩn                     | 4,4   | 0                          | 2,6        |
| Chuẩn                     | 4,3   | 0                          | 2,7        |
| Chuẩn                     | 4,2   | 0                          | 2,6        |
| Chuẩn                     | 4,1   | 0                          | 2,5        |
| Chuẩn                     | 4,0   | 0                          | 2,5        |
| Cao                       | 4,3   | 0                          | 3,2        |
| Chuẩn (trước khi lên men) |       | 0                          | 3,3        |
| Cao (trước khi lên men)   |       | 0                          | 4,0        |

Từ Bảng 5 và 6 thấy rõ rằng độ pH cuối của sữa chua càng thấp thì hàm lượng lactoza còn lại càng cao. Kết quả cho thấy ở độ pH thấp nhất có thể đạt được đích lactoza còn lại dưới 0,1% với liều dùng lactaza là 800 LAU/L ở 48 giờ. Hơn nữa, ở độ pH cuối là

4,1 có thể đạt được lượng lactoza còn lại là 0,18% với liều dùng lactaza là 1000 LAU/L ở 24 giờ.

#### Ví dụ 9

Bổ sung xuôi dòng lactaza vào sữa chua sau thanh trùng ở các nồng độ lactaza được bổ sung thấp

Mục đích của thử nghiệm được thực hiện nhằm thử nghiệm tính hiệu lực của liều lượng lactaza thấp trong quy trình loại bỏ lactoza trong sữa chua sau thanh trùng (PPY) bằng cách sử dụng lactaza để thiết lập liều dùng tối thiểu cần thiết để thu được đích lactoza còn lại mong muốn.

#### Cơ chất sữa

| Thành phần                   | Thông số kỹ thuật                         | Liều lượng            |
|------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|
| Sữa tươi                     | 3,5% chất béo, sữa thương mại, Arla Foods | 74,30%                |
| Nước                         |                                           | 16,45%                |
| Sucroza                      | Nutrilac YO-7830, Arla Food Ingredients   | 7,0%                  |
| Chất cô đặc protein nước sữa |                                           | 0,60%                 |
| Tinh bột cải biến            |                                           | 1,50%                 |
| LM Pectin                    | Clearam CJ 5025, Roquette                 | 0,12%                 |
| Gôm Gellan                   | LM 106-AS YA, CP Kelco                    | 0,03%                 |
| Môi trường nuôi cấy          | Kelcogel YSS, CP Kelco                    | 200 đơn vị/tấn hệ mét |
|                              | FD-DVS YF-L904                            |                       |

#### Phân tích Milkoscan:

Nền sữa: Hàm lượng chất béo 2,81%, hàm lượng protein 3,11%

#### Lactaza

Lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được nêu trong SEQ ID NO. 2.

#### Quy trình sản xuất sữa chua

Áp suất làm đồng nhất: 150 ba ( $150 \times 10^{+2}$  kPa) ở nhiệt độ 60°C

Điều kiện thanh trùng: 95°C, 5 phút

Nhiệt độ lên men: 43°C

Độ pH cuối đối với nền sữa lactoza chuẩn: 4,15, 4,20, 4,25 và 4,30

Độ pH cuối đối với nền sữa lactoza cao: 4,3

Phá vỡ cục sữa đông bằng tay và khuấy cho đến khi thu được cấu trúc trơn nhẵn.

Làm nguội đến 15°C trong thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm

Xử lý nhiệt trong thiết bị trao đổi nhiệt dạng tấm, tốc độ dòng 414L/h

Điều kiện xử lý nhiệt: 74°C, 20 giây

Nạp vào các cốc vô trùng dung tích 100mL, nhiệt độ nạp 25°C.

Bổ sung lactaza

Lactaza được lọc vô trùng và được bổ sung vào cốc dung tích 100mL chứa sữa chua sau thanh trùng với liều lượng sau: a) 0 LAU/L - tham chiếu, b) 50 LAU/L, c) 100 LAU/L, d) 200 LAU/L, và e) 300 LAU/L

Mẫu được bảo quản ở 25°C và mẫu được lấy ra để phân tích lactoza còn lại ở các thời điểm sau: 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ.

Kết quả

Nhằm mục đích ngắn gọn, chỉ thể hiện các kết quả đối với mẫu được bảo quản ở 25°C. Thu được các kết quả tương ứng đối với mẫu được bảo quản ở 15°C, 20°C đến 30°C.

Bảng 7: Nồng độ lactoza còn lại đối với mẫu

| Nền sữa | Độ pH cuối cùng | Liều lượng của lactaza (LAU/L) | 24 giờ (%) | 48 giờ (%) | 72 giờ (%) |
|---------|-----------------|--------------------------------|------------|------------|------------|
| Chuẩn   | 4,30            | 50                             | 2,1        | 1,8        | 1,5        |
| Chuẩn   | 4,25            | 100                            | 1,8        | 1,3        | 0,9        |
| Chuẩn   | 4,20            | 100                            | 1,9        | 1,4        | 1,1        |
| Chuẩn   | 4,15            | 100                            | 1,9        | 1,5        | 1,2        |
| Chuẩn   | 4,30            | 200                            | 1,2        | 0,4        | 0,087      |
| Chuẩn   | 4,25            | 200                            | 1,1        | 0,5        | 0,119      |
| Chuẩn   | 4,20            | 200                            | 1,4        | 0,7        | 0,237      |
| Chuẩn   | 4,15            | 200                            | 1,4        | 0,7        | 0,317      |
| Chuẩn   | 4,30            | 300                            | 0,7        | 0,055      | 0,010      |
| Chuẩn   | 4,25            | 300                            | 0,8        | 0,102      | 0,017      |
| Chuẩn   | 4,20            | 300                            | 0,9        | 0,2        | 0,037      |
| Chuẩn   | 4,15            | 300                            | 1,0        | 0,3        | 0,081      |

Nền sữa chua thanh trùng với độ pH bằng 4,3, 4,25, 4,20 và 4,15 và không được bổ sung lactaza có nồng độ lactoza lần lượt là 2,57, 2,52, 2,47 và 2,40.

Từ Bảng 7 thấy rõ ràng rằng có thể để đạt được đích lactoza còn lại thấp hơn 0,5% với liều dùng lactaza là 200 LAU/L ở 48 giờ đối với mẫu có độ pH bằng 4,3 và 4,25 và

với nồng độ lactaza thấp hơn 0,3 với liều dùng lactaza là 300 LAU/L ở 48 giờ đối với tất cả các mẫu được thử nghiệm.

#### Ví dụ 10

Sản xuất đồ uống dạng nước sữa axit có nồng độ lactoza thấp bằng cách bổ sung lactaza

Mục đích của thử nghiệm được thực hiện là nhằm cho thấy rằng có thể loại bỏ được lactoza ra khỏi sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit và nghiên cứu mức độ ảnh hưởng của liều lượng lactaza khác nhau, thời gian phản ứng và nhiệt độ.

#### Cơ chất sữa

| Thành phần        | Thông số kỹ thuật                                                                  | Liều lượng (g/1000 g) |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Nước sữa axit     | Sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit (sản phẩm phụ từ quá trình sản xuất Skyr) | 800                   |
| Sucroza           | Đường Nordic                                                                       | 70                    |
| Nước (đã ion hóa) |                                                                                    | 90                    |
| HM Pectin         | YM-115-H, CP-Kelco                                                                 | 4,5                   |
| Tổng cộng         |                                                                                    | 979,5                 |

Sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit (từ quá trình siêu lọc) là sản phẩm phụ của quá trình sản xuất Skyr. Sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit có thành phần sau: Protein 0,2%, Đường 3,7%, Chất béo 0,01%, Tro 0,8%, Độ ẩm 94,7%, Độ pH 4,27.

#### Lactaza

Lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được nêu trong SEQ ID NO. 2.

#### Quy trình

1. Gia nhiệt sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit đến 72°C, / 2 phút.
2. Làm nguội đến
  - a. 5°C (2 x 1000mL)
  - b. 40°C (3 x 1000mL)
3. Định lượng lactaza:
  - a. 5°C: 2500 đến 5000 LAU/L (2 x 1000mL)
  - b. 40°C: 500, 1000 đến 2500 LAU/L (3 x 1000mL)

## 4. Mẫu để phân tích lactoza:

a. Trước khi bổ sung lactaza

b. Ở 40°C đến 2500 LAU/L: cứ sau 1 giờ từ 3 đến 7 giờ và 24 giờ

c. Mẫu khác: 24 giờ.

## 5. Xử lý đồ uống trên cơ sở nước sữa axit

a. Bổ sung dung dịch HM pectin, hương liệu và sucroza.

b. Điều chỉnh độ pH đến 3,9 bằng axit xitric

c. Gia nhiệt đến 80°C trong 2 phút.

d. Làm đồng nhất ở 150 ba ( $150 \times 10^2$  kPa) ở nhiệt độ 80°C

e. Nạp vào các chai.

## Kết quả

Bảng 8: Nồng độ lactoza còn lại (g/L) đối với mẫu thử nghiệm

| Nhiệt độ        |        | 5°C    | 5°C    |        | 40°C   | 40°C   | 40°C   |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Lactaza (LAU/L) | 0      | 2500   | 5000   | 0      | 500    | 1000   | 2500   |
| 0 giờ           | 2,7235 |        |        | 2,7235 |        |        |        |
| 1 giờ           |        |        |        |        |        |        |        |
| 2 giờ           |        |        |        |        |        |        |        |
| 3 giờ           |        |        |        |        |        |        | 1,7793 |
| 4 giờ           |        |        |        |        |        |        | 0,5527 |
| 5 giờ           |        |        |        |        |        |        | 0,3117 |
| 6 giờ           |        |        |        |        |        |        | 0,1681 |
| 7 giờ           |        |        |        |        |        |        | 0,1376 |
| 24 giờ          |        | 0,5646 | 0,1018 |        | 0,4381 | 0,0830 | 0,0378 |

Từ Bảng 8 thấy rõ rằng có thể làm giảm nồng độ lactoza đến mức khoảng 0,1g/L đối với mẫu thử nghiệm ở nhiệt độ là 40°C và đối với các nồng độ lactaza nằm trong khoảng từ 1000 đến 2500 LAU/L cũng như ở nhiệt độ là 5°C đối với nồng độ lactaza là 5000 LAU/L. Đối với hai mẫu khác có thể làm giảm nồng độ lactoza đến mức thấp hơn 0,5g/L.

## Các trình tự

SEQ ID NO.1 thể hiện trình tự của thể đột biến có trình tự như nêu trong SEQ ID NO. 4.

SEQ ID NO.2 thể hiện trình tự của thể đột biến có trình tự như nêu trong SEQ ID NO. 4.

SEQ ID NO.3 thể hiện trình tự của lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* DSM20215.

SEQ ID NO.4 thể hiện trình tự của lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171, trình tự nucleotit của nó được nêu trong NCBI với số truy nhập là DQ448279.

SEQ ID NO.4 được thảo luận trong các tài liệu tham khảo sau, trong đó nó được gọi là bbgIII:

Appl Microbiol Biotechnol (2007) 76:1365-1372, T K Goulas et al.

Appl Microbiol Biotechnol (2009) 82:1079-1088, T Goulas et al.

Appl Microbiol Biotechnol (2009) 84:899-907, T Goulas et al.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Sản phẩm sữa được axit hóa có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 và hàm lượng lactoza ít nhất bằng 1,5mg/mL, trong đó sản phẩm này chứa lactaza, duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza, trong đó sản phẩm sữa này là sản phẩm sữa lên men được sản xuất bằng cách lên men sử dụng giống khởi động, và trong đó sản phẩm sữa lên men sau khi lên men được đưa vào bước xử lý nhiệt để làm giảm lượng vi khuẩn của giống khởi động đến mật độ không lớn hơn  $1 \times 10^2$  CFU/g, và trong đó lactaza được bổ sung vào sau khi xử lý nhiệt.
2. Sản phẩm sữa theo điểm 1, trong đó lactaza duy trì được hoạt tính của nó ở nhiệt độ 10°C và độ pH bằng 6,0 ở mức ít nhất bằng 10% so với hoạt tính của nó ở nhiệt độ tối ưu của lactaza.
3. Sản phẩm sữa theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó sản phẩm này chứa lactaza ở lượng nằm trong khoảng từ 100 đến 20000 LAU/L sản phẩm sữa.
4. Sản phẩm sữa theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lactaza là lactaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium bifidum*.
5. Sản phẩm sữa theo điểm 4, trong đó lactaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium bifidum* chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 50% so với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin 28-1931 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, các axit amin 28-1331 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4 và các mảnh hoạt tính lactaza của chúng.
6. Sản phẩm sữa theo điểm 1, trong đó sản phẩm chứa sản phẩm nước sữa axit được chọn từ nhóm bao gồm nước sữa axit và sản phẩm thấm qua màng của nước sữa axit.
7. Quy trình sản xuất sản phẩm sữa được axit hóa bao gồm các bước điều chế sản phẩm sữa được axit hóa cơ sở, có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 và hàm lượng lactoza ít nhất bằng 1,5mg/mL, bổ sung lactaza mà duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza, vào sản phẩm sữa được axit hóa cơ sở để thu được sản phẩm sữa được axit hóa chứa lactaza, và bảo quản sản phẩm sữa được axit hóa chứa lactaza ở nhiệt độ ít nhất bằng 2°C trong ít nhất 1 ngày.

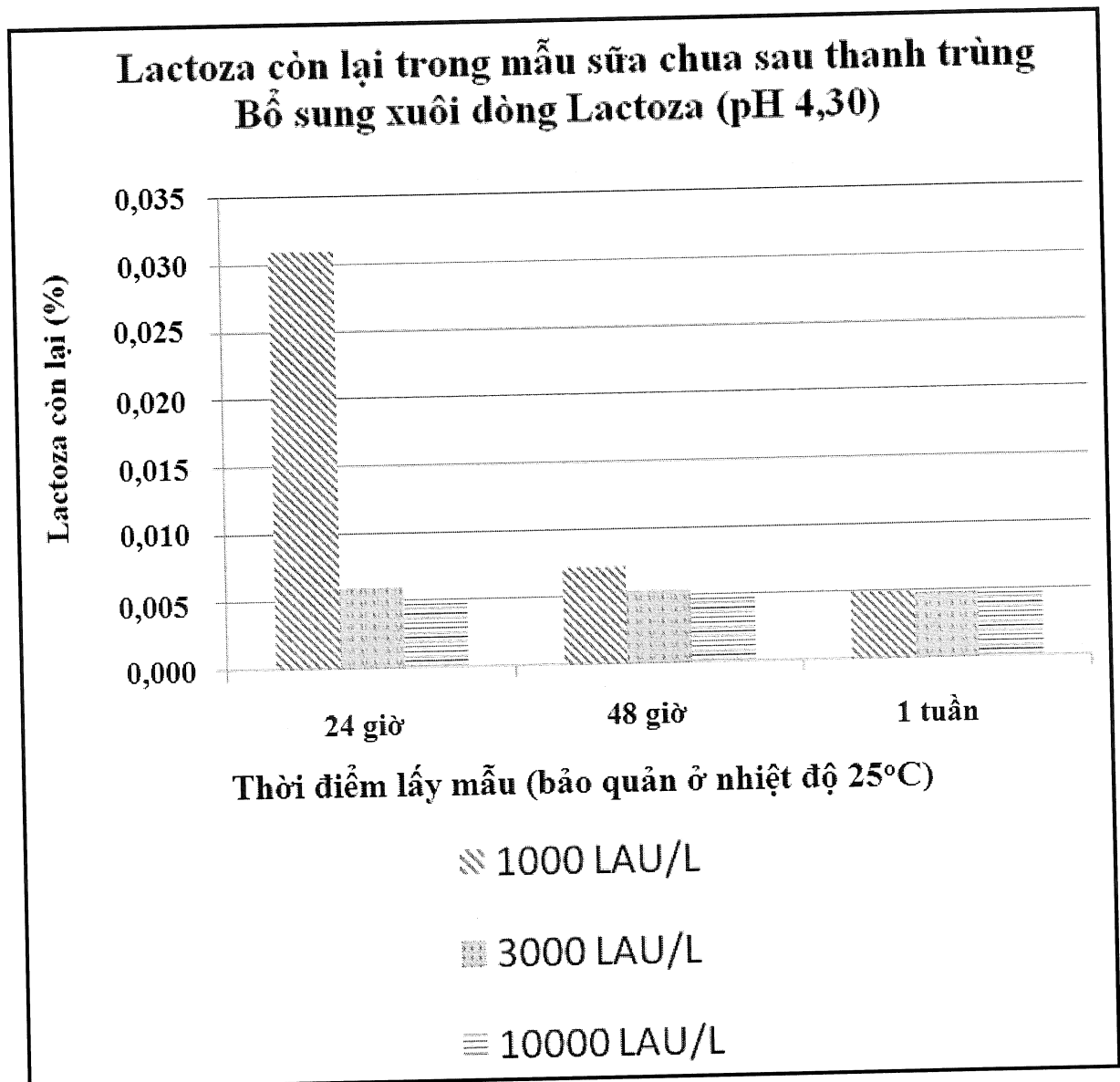
8. Quy trình sản xuất sản phẩm sữa được axit hóa bao gồm các bước điều chế sản phẩm sữa được axit hóa cơ sở, có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 và hàm lượng lactoza ít nhất bằng 1,5mg/mL, đưa sản phẩm sữa được axit hóa cơ sở vào bước xử lý nhiệt để làm giảm lượng vi khuẩn đến mật độ không lớn hơn  $1 \times 10^2$  CFU/g để thu được sản phẩm sữa được axit hóa được xử lý nhiệt, bổ sung lactaza mà duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza, vào sản phẩm sữa được axit hóa được xử lý nhiệt để thu được sản phẩm sữa được axit hóa chứa lactaza, và bảo quản sản phẩm sữa được axit hóa chứa lactaza ở nhiệt độ ít nhất bằng 2°C trong ít nhất 1 ngày.

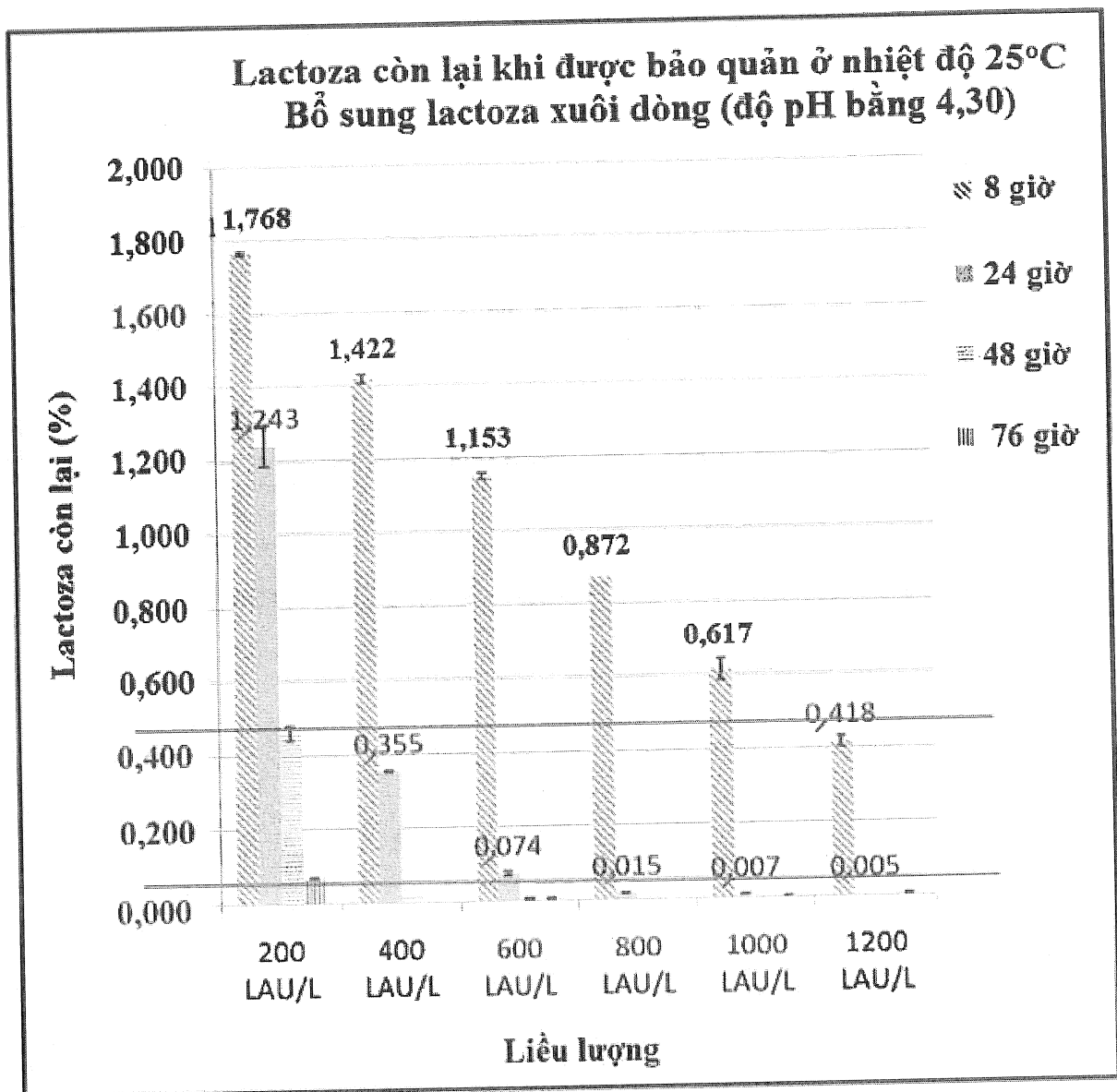
9. Quy trình sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm các bước lên men cơ chất sữa bằng cách sử dụng giống khởi động vi khuẩn axit lactic để thu được sản phẩm sữa được lên men bằng giống khởi động, có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0 và hàm lượng lactoza ít nhất bằng 1,5mg/mL, đưa sản phẩm sữa được lên men bằng giống khởi động vào bước xử lý nhiệt để làm giảm lượng vi khuẩn đến mật độ không lớn hơn  $1 \times 10^2$  CFU/g để thu được sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt, bổ sung lactaza mà duy trì được hoạt tính của nó ở độ pH bằng 5,0 và nhiệt độ 37°C ở mức ít nhất bằng 5% so với hoạt tính của nó ở độ pH tối ưu của lactaza, vào sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt để thu được sản phẩm sữa lên men chứa lactaza, và bảo quản sản phẩm sữa lên men chứa lactaza ở nhiệt độ ít nhất bằng 2°C trong ít nhất 1 ngày.

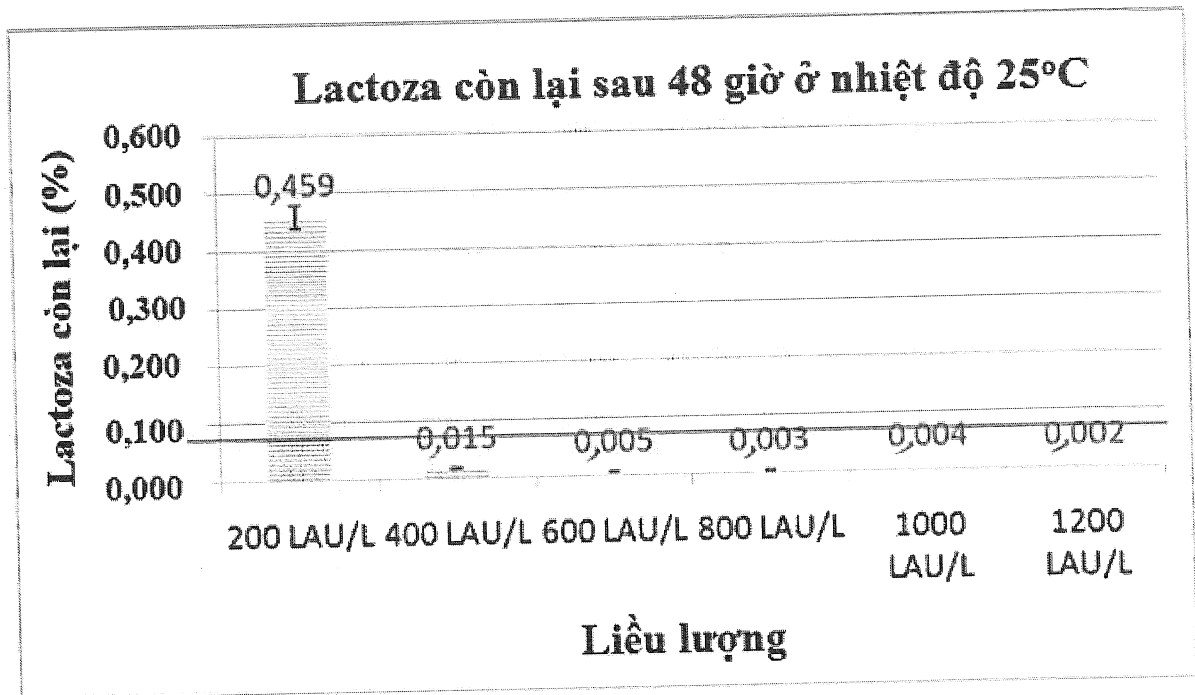
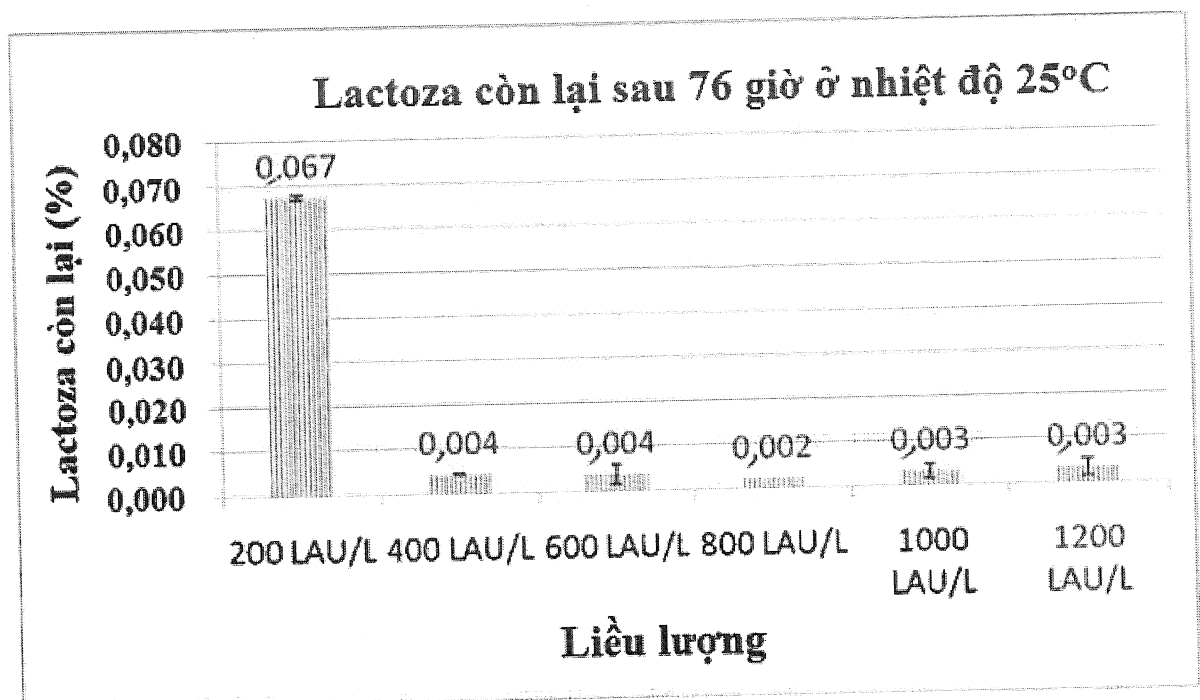
10. Quy trình theo điểm 9, trong đó sản phẩm sữa lên men chứa lactaza được bảo quản ở nhiệt độ ít nhất bằng 15°C.

11. Quy trình theo điểm 9 hoặc 10, trong đó sản phẩm sữa lên men chứa lactaza được bảo quản trong ít nhất 7 ngày.

12. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó sản phẩm sữa được lên men bằng giống khởi động được đưa vào bước cô để chia sản phẩm sữa được lên men bằng giống khởi động thành phân đoạn cô đặc và phân đoạn nước sữa axit được phân tách, trong đó phân đoạn nước sữa axit được phân tách và phân đoạn cô đặc không được đưa vào bước tiếp theo của quy trình.

**Fig.1**

**Fig.2**

**Fig.3****Fig.4**

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CHR. HANSEN A/S  
 <120> SẢN PHẨM SỮA ĐƯỢC AXIT HÓA VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT SẢN PHẨM SỮA ĐƯỢC AXIT HÓA  
 <130> P6079EP00  
 <160> 4  
 <170> PatentIn phiên bản 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1931  
 <212> PRT  
 <213> Bifidobacterium bifidum  
 <400> 1

```

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
1      5      10      15
Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Val Glu Asp Ala
20      25      30
Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr Pro Glu Val Ala
35      40      45
Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr Ser Asp Phe Asp
50      55      60
Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln Ala Gln Asp Pro
65      70      75      80
Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu Pro His Asp Tyr
85      90      95
Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala Glu Ser Ala Tyr
100     105     110
Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe Thr Ile Asp Arg
115     120     125
Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp Gly Val Tyr Met
130     135     140
Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly Thr His Pro Tyr
145     150     155     160
Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn Ala Lys Phe Gly
165     170     175
Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg Leu Pro Ser Ser
180     185     190
Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val Thr Leu Thr Val
195     200     205
Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala Ile Lys Thr Pro
210     215     220
Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met Asn Leu Thr Thr
225     230     235     240
Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile Thr Leu Lys Gln
245     250     255
Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala Ile Gly Thr Val
260     265     270
Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser Ala Asp Val Thr
275     280     285
Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser Ile Lys Asn Pro
290     295     300
Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly Gly Lys Val Leu
305     310     315     320
Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr Gly Phe Asp Ala
325     330     335
Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys Leu Lys Gly Val
340     345     350
Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val Ala Asn Arg Arg
355     360     365
Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met Gly Val Asn Ser
370     375     380
Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu Ile Asp Val Cys
385     390     395     400
Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Val Phe Asp Met Trp Asn
405     410     415
Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys Trp Phe Gly Gln
420     425     430
Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp Lys Asp Glu Thr
435     440     445
Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg Asp Arg Asn Ala
450     455     460
Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met Met Glu Gly Ile
465     470     475     480
Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala Lys Leu Val Ala
485     490     495
Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr Tyr Gly Asp Asn
500     505     510

```

```

Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met Gly Asp Asn Leu
515 520 525
Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser Asp Gly Ala Asn
530 535 540
Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala Ile Tyr Gly Ser
545 550 555 560
Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr Asn Arg Thr Thr
565 570 575
Gly Gly Ala Gln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Asn Ser
580 585 590
Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp Tyr Asp Val Val
595 600 605
Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr Gly Phe Asp Tyr
610 615 620
Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser Gly Ala Val Gly
625 630 635 640
Ser Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile Val Asp Thr Ala
645 650 655
Gly Phe Pro Lys Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser Gln Trp Asn Asp
660 665 670
Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn Glu Asn Val Val
675 680 685
Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val Tyr Thr Asp Ala
690 695 700
Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser Thr Glu Lys Arg
705 710 715 720
Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr Ala Ala Gly Tyr
725 730 735
Thr Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser Thr Ala His Lys
740 745 750
Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu Gly Thr Ile Ser
755 760 765
Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro Glu Gly Ser Thr
770 775 780
Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala Ala Lys Leu Lys
785 790 795 800
Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly Lys Asp Leu Ser
805 810 815
Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His Ile Val Pro Asp
820 825 830
Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala Gly Lys Leu Val
835 840 845
Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser Tyr Gln Ala Asp
850 855 860
Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile Val Gln Ser Thr
865 870 875 880
Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala Asp Gly Leu Gln
885 890 895
Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro Gly Thr Ser Thr
900 905 910
Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn Tyr Tyr Val Lys
915 920 925
Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu Val Arg Tyr Ser
930 935 940
Asp Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp Ala Val Ser Asp
945 950 955 960
Asp Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala Gly Thr Val Ala
965 970 975
Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp Glu Ile Gly Ala
980 985 990
Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr Pro Ala Val Leu
995 1000 1005
Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly Thr Val Thr Ser
1010 1015 1020
Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asp Thr Val Tyr
1025 1030 1035
Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val Phe
1040 1045 1050
Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg Val Gln Arg Ser
1055 1060 1065
Gln Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu
1070 1075 1080
Thr Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp Thr Leu Asp Ala
1085 1090 1095
Ile Lys Asp Gly Ser Thr Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly
1100 1105 1110
Ala Asn Pro Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly
1115 1120 1125

```

|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| His  | Asn | Thr | Ala | Glu | Ile | Thr  | Phe | Glu | Tyr | Ala | Thr  | Glu | Gln | Gln |
| 1130 |     |     |     |     |     | 1135 |     |     |     |     | 1140 |     |     |     |
| Leu  | Gly | Gln | Ile | Val | Met | Tyr  | Phe | Phe | Arg | Asp | Ser  | Asn | Ala | Val |
| 1145 |     |     |     |     |     | 1150 |     |     |     |     | 1155 |     |     |     |
| Arg  | Phe | Pro | Asp | Ala | Gly | Lys  | Thr | Lys | Ile | Gln | Ile  | Ser | Ala | Asp |
| 1160 |     |     |     |     |     | 1165 |     |     |     |     | 1170 |     |     |     |
| Gly  | Lys | Asn | Trp | Thr | Asp | Leu  | Ala | Ala | Thr | Glu | Thr  | Ile | Ala | Ala |
| 1175 |     |     |     |     |     | 1180 |     |     |     |     | 1185 |     |     |     |
| Gln  | Glu | Ser | Ser | Asp | Arg | Val  | Lys | Pro | Tyr | Thr | Tyr  | Asp | Phe | Ala |
| 1190 |     |     |     |     |     | 1195 |     |     |     |     | 1200 |     |     |     |
| Pro  | Val | Gly | Ala | Thr | Phe | Val  | Lys | Val | Thr | Val | Thr  | Asn | Ala | Asp |
| 1205 |     |     |     |     |     | 1210 |     |     |     |     | 1215 |     |     |     |
| Thr  | Thr | Thr | Pro | Ser | Gly | Val  | Val | Cys | Ala | Gly | Leu  | Thr | Glu | Ile |
| 1220 |     |     |     |     |     | 1225 |     |     |     |     | 1230 |     |     |     |
| Glu  | Leu | Lys | Thr | Ala | Thr | Ser  | Lys | Phe | Val | Thr | Asn  | Thr | Ser | Ala |
| 1235 |     |     |     |     |     | 1240 |     |     |     |     | 1245 |     |     |     |
| Ala  | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Val  | Asn | Gly | Thr | Lys | Val  | Ser | Asp | Ser |
| 1250 |     |     |     |     |     | 1255 |     |     |     |     | 1260 |     |     |     |
| Val  | Leu | Ala | Ala | Gly | Ser | Tyr  | Asn | Thr | Pro | Ala | Ile  | Ile | Ala | Asp |
| 1265 |     |     |     |     |     | 1270 |     |     |     |     | 1275 |     |     |     |
| Val  | Lys | Ala | Glu | Gly | Glu | Gly  | Asn | Ala | Ser | Val | Thr  | Val | Leu | Pro |
| 1280 |     |     |     |     |     | 1285 |     |     |     |     | 1290 |     |     |     |
| Ala  | His | Asp | Asn | Val | Ile | Arg  | Val | Ile | Thr | Glu | Ser  | Glu | Asp | His |
| 1295 |     |     |     |     |     | 1300 |     |     |     |     | 1305 |     |     |     |
| Val  | Thr | Arg | Lys | Thr | Phe | Thr  | Ile | Asn | Leu | Gly | Thr  | Glu | Gln | Glu |
| 1310 |     |     |     |     |     | 1315 |     |     |     |     | 1320 |     |     |     |
| Phe  | Pro | Ala | Asp | Ser | Asp | Glu  | Arg | Asp | Tyr | Pro | Ala  | Ala | Asp | Met |
| 1325 |     |     |     |     |     | 1330 |     |     |     |     | 1335 |     |     |     |
| Thr  | Val | Thr | Val | Gly | Ser | Glu  | Gln | Thr | Ser | Gly | Thr  | Ala | Thr | Glu |
| 1340 |     |     |     |     |     | 1345 |     |     |     |     | 1350 |     |     |     |
| Gly  | Pro | Lys | Lys | Phe | Ala | Val  | Asp | Gly | Asn | Thr | Ser  | Thr | Tyr | Trp |
| 1355 |     |     |     |     |     | 1360 |     |     |     |     | 1365 |     |     |     |
| His  | Ser | Asn | Trp | Thr | Pro | Thr  | Thr | Val | Asn | Asp | Leu  | Trp | Ile | Ala |
| 1370 |     |     |     |     |     | 1375 |     |     |     |     | 1380 |     |     |     |
| Phe  | Glu | Leu | Gln | Lys | Pro | Thr  | Lys | Leu | Asp | Ala | Leu  | Arg | Tyr | Leu |
| 1385 |     |     |     |     |     | 1390 |     |     |     |     | 1395 |     |     |     |
| Pro  | Arg | Pro | Ala | Gly | Ser | Lys  | Asn | Gly | Ser | Val | Thr  | Glu | Tyr | Lys |
| 1400 |     |     |     |     |     | 1405 |     |     |     |     | 1410 |     |     |     |
| Val  | Gln | Val | Ser | Asp | Asp | Gly  | Thr | Asn | Trp | Thr | Asp  | Ala | Gly | Ser |
| 1415 |     |     |     |     |     | 1420 |     |     |     |     | 1425 |     |     |     |
| Gly  | Thr | Trp | Thr | Thr | Asp | Tyr  | Gly | Trp | Lys | Leu | Ala  | Glu | Phe | Asn |
| 1430 |     |     |     |     |     | 1435 |     |     |     |     | 1440 |     |     |     |
| Gln  | Pro | Val | Thr | Thr | Lys | His  | Val | Arg | Leu | Lys | Ala  | Val | His | Thr |
| 1445 |     |     |     |     |     | 1450 |     |     |     |     | 1455 |     |     |     |
| Tyr  | Ala | Asp | Ser | Gly | Asn | Asp  | Lys | Phe | Met | Ser | Ala  | Ser | Glu | Ile |
| 1460 |     |     |     |     |     | 1465 |     |     |     |     | 1470 |     |     |     |
| Arg  | Leu | Arg | Lys | Ala | Val | Asp  | Thr | Thr | Asp | Ile | Ser  | Gly | Ala | Thr |
| 1475 |     |     |     |     |     | 1480 |     |     |     |     | 1485 |     |     |     |
| Val  | Thr | Val | Pro | Ala | Lys | Leu  | Thr | Val | Asp | Arg | Val  | Asp | Ala | Asp |
| 1490 |     |     |     |     |     | 1495 |     |     |     |     | 1500 |     |     |     |
| His  | Pro | Ala | Thr | Phe | Ala | Thr  | Lys | Asp | Val | Thr | Val  | Thr | Leu | Gly |
| 1505 |     |     |     |     |     | 1510 |     |     |     |     | 1515 |     |     |     |
| Asp  | Ala | Thr | Leu | Arg | Tyr | Gly  | Val | Asp | Tyr | Leu | Leu  | Asp | Tyr | Ala |
| 1520 |     |     |     |     |     | 1525 |     |     |     |     | 1530 |     |     |     |
| Gly  | Asn | Thr | Ala | Val | Gly | Lys  | Ala | Thr | Val | Thr | Val  | Arg | Gly | Ile |
| 1535 |     |     |     |     |     | 1540 |     |     |     |     | 1545 |     |     |     |
| Asp  | Lys | Tyr | Ser | Gly | Thr | Val  | Ala | Lys | Thr | Phe | Thr  | Ile | Glu | Leu |
| 1550 |     |     |     |     |     | 1555 |     |     |     |     | 1560 |     |     |     |
| Lys  | Asn | Ala | Pro | Ala | Pro | Glu  | Pro | Thr | Leu | Thr | Ser  | Val | Ser | Val |
| 1565 |     |     |     |     |     | 1570 |     |     |     |     | 1575 |     |     |     |
| Lys  | Thr | Lys | Pro | Ser | Lys | Leu  | Thr | Tyr | Val | Val | Gly  | Asp | Ala | Phe |
| 1580 |     |     |     |     |     | 1585 |     |     |     |     | 1590 |     |     |     |
| Asp  | Pro | Ala | Gly | Leu | Val | Leu  | Gln | Leu | Asn | Tyr | Asp  | Asp | Asp | Ser |
| 1595 |     |     |     |     |     | 1600 |     |     |     |     | 1605 |     |     |     |
| Thr  | Gly | Thr | Val | Thr | Trp | Asn  | Thr | Gln | Thr | Ala | Gly  | Asp | Phe | Thr |
| 1610 |     |     |     |     |     | 1615 |     |     |     |     | 1620 |     |     |     |
| Phe  | Lys | Pro | Ala | Leu | Asp | Ala  | Lys | Leu | Lys | Val | Thr  | Asp | Lys | Thr |
| 1625 |     |     |     |     |     | 1630 |     |     |     |     | 1635 |     |     |     |
| Val  | Thr | Val | Thr | Tyr | Gln | Gly  | Lys | Ser | Ala | Val | Ile  | Asp | Ile | Thr |
| 1640 |     |     |     |     |     | 1645 |     |     |     |     | 1650 |     |     |     |
| Val  | Ser | Gln | Pro | Ala | Pro | Thr  | Val | Ser | Lys | Thr | Asp  | Leu | Asp | Lys |
| 1655 |     |     |     |     |     | 1660 |     |     |     |     | 1665 |     |     |     |
| Ala  | Ile | Lys | Ala | Ile | Glu | Ala  | Lys | Asn | Pro | Asp | Ser  | Ser | Lys | Tyr |
| 1670 |     |     |     |     |     | 1675 |     |     |     |     | 1680 |     |     |     |
| Thr  | Ala | Asp | Ser | Trp | Lys | Thr  | Phe | Ala | Asp | Ala | Met  | Ala | His | Ala |
| 1685 |     |     |     |     |     | 1690 |     |     |     |     | 1695 |     |     |     |
| Lys  | Ala | Val | Ile | Ala | Asp | Asp  | Ser | Ala | Thr | Gln | Gln  | Asp | Val | Asp |
| 1700 |     |     |     |     |     | 1705 |     |     |     |     | 1710 |     |     |     |

```

Asn Ala Leu Lys Ala Leu Thr Asp Ala Tyr Ala Gly Leu Thr Glu
1715 1720 1725
Lys Thr Pro Glu Pro Ala Pro Val Ser Lys Ser Glu Leu Asp Lys
1730 1735 1740
Lys Ile Lys Ala Ile Glu Ala Glu Lys Leu Asp Gly Ser Lys Tyr
1745 1750 1755
Thr Ala Glu Ser Trp Lys Ala Phe Glu Thr Ala Leu Ala His Ala
1760 1765 1770
Lys Ala Val Ile Ala Ser Asp Ser Ala Thr Gln Gln Asn Val Asp
1775 1780 1785
Ala Ala Leu Gly Ala Leu Thr Ser Ala Arg Asp Gly Leu Thr Glu
1790 1795 1800
Lys Gly Glu Val Lys Pro Asp Pro Lys Pro Glu Pro Gly Thr Val
1805 1810 1815
Asp Lys Ala Ala Leu Asp Lys Ala Val Lys Lys Val Glu Ala Glu
1820 1825 1830
Lys Leu Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Ala Asp Ser Trp Lys Ala Phe
1835 1840 1845
Glu Thr Ala Leu Ala His Ala Lys Ala Val Ile Gly Asn Ala Asn
1850 1855 1860
Ser Thr Gln Phe Asp Ile Asp Asn Ala Leu Ser Met Leu Asn Asp
1865 1870 1875
Ala Arg Ala Ala Leu Lys Glu Lys Pro Gly Arg Ile Ile Ala Ile
1880 1885 1890
Ile Asp Gly Ser Ala Leu Ser Lys Thr Gly Ala Ser Val Ala Ile
1895 1900 1905
Ile Ala Ser Val Ala Ala Ala Met Leu Ala Val Gly Ala Gly Val
1910 1915 1920
Met Ala Leu Arg Arg Lys Arg Ser
1925 1930
<210> 2
<211> 1341
<212> PRT
<213> Bifidobacterium bifidum
<400> 2
Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
1 5 10 15
Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ile Glu Asp Ala Thr
20 25 30
Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr Pro Glu Val Ala Tyr
35 40 45
Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr Ser Asp Phe Asp Ala
50 55 60
Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln Ala Gln Asp Pro Ala
65 70 75 80
Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu Pro His Asp Tyr Ser
85 90 95
Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala Glu Ser Ala Tyr Leu
100 105 110
Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe Thr Ile Asp Arg Asp
115 120 125
Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp Gly Val Tyr Met Asn
130 135 140
Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly Thr His Pro Tyr Gly
145 150 155 160
Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn Ala Lys Phe Gly Gly
165 170 175
Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg Leu Pro Ser Ser Arg
180 185 190
Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val Thr Leu Thr Val Thr
195 200 205
Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala Ile Lys Thr Pro Ser
210 215 220
Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met Asn Leu Thr Thr Lys
225 230 235 240
Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile Thr Leu Lys Gln Thr
245 250 255
Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala Ile Gly Thr Val Thr
260 265 270
Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser Ala Asp Val Thr Ser
275 280 285
Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser Ile Lys Asn Pro Asn
290 295 300
Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly Gly Lys Val Leu Asp
305 310 315 320
Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr Gly Phe Asp Ala Thr
325 330 335
Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys Leu Lys Gly Val Ser

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |
| Met | His | His | Asp | Gln | Gly | Ser | Leu | Gly | Ala | Val | Ala | Asn | Arg | Arg | Ala |  |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |
| Ile | Glu | Arg | Gln | Val | Glu | Ile | Leu | Gln | Lys | Met | Gly | Val | Asn | Ser | Ile |  |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |  |
| Arg | Thr | Thr | His | Asn | Pro | Ala | Ala | Lys | Ala | Leu | Ile | Asp | Val | Cys | Asn |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |  |
| Glu | Lys | Gly | Val | Leu | Val | Val | Glu | Glu | Val | Phe | Asp | Met | Trp | Asn | Arg |  |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     |     | 415 |  |  |
| Ser | Lys | Asn | Gly | Asn | Thr | Glu | Asp | Tyr | Gly | Lys | Trp | Phe | Gly | Gln | Ala |  |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |  |
| Ile | Ala | Gly | Asp | Asn | Ala | Val | Leu | Gly | Gly | Asp | Lys | Asp | Glu | Thr | Trp |  |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |  |
| Ala | Lys | Phe | Asp | Leu | Thr | Ser | Thr | Ile | Asn | Arg | Asp | Arg | Asn | Ala | Pro |  |  |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |  |
| Ser | Val | Ile | Met | Trp | Ser | Leu | Gly | Asn | Glu | Met | Glu | Gly | Ile | Ser |     |  |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     | 480 |     |  |  |
| Gly | Ser | Val | Ser | Gly | Phe | Ser | Ala | Thr | Ser | Ala | Lys | Leu | Val | Ala | Trp |  |  |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |  |  |
| Thr | Lys | Ala | Ala | Asp | Ser | Thr | Arg | Pro | Met | Thr | Tyr | Gly | Asp | Asn | Lys |  |  |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |  |
| Ile | Lys | Ala | Asn | Trp | Asn | Glu | Ser | Asn | Thr | Met | Gly | Asp | Asn | Leu | Thr |  |  |
|     | 515 |     |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |  |  |
| Ala | Asn | Gly | Gly | Val | Val | Gly | Thr | Asn | Tyr | Ser | Asp | Gly | Ala | Asn | Tyr |  |  |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |  |  |
| Asp | Lys | Ile | Arg | Thr | Thr | His | Pro | Ser | Trp | Ala | Ile | Tyr | Gly | Ser | Glu |  |  |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     | 560 |     |  |  |
| Thr | Ala | Ser | Ala | Ile | Asn | Ser | Arg | Gly | Ile | Tyr | Asn | Arg | Thr | Thr | Gly |  |  |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |  |  |
| Gly | Ala | Gln | Ser | Ser | Asp | Lys | Gln | Leu | Thr | Ser | Tyr | Asp | Asn | Ser | Ala |  |  |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |  |  |
| Val | Gly | Trp | Gly | Ala | Val | Ala | Ser | Ser | Ala | Trp | Tyr | Asp | Val | Val | Gln |  |  |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |  |  |
| Arg | Asp | Phe | Val | Ala | Gly | Thr | Tyr | Val | Trp | Thr | Gly | Phe | Asp | Tyr | Leu |  |  |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |  |  |
| Gly | Glu | Pro | Thr | Pro | Trp | Asn | Gly | Thr | Gly | Ser | Gly | Ala | Val | Gly | Ser |  |  |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     | 640 |     |  |  |
| Trp | Pro | Ser | Pro | Lys | Asn | Ser | Tyr | Phe | Gly | Ile | Val | Asp | Thr | Ala | Gly |  |  |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |  |  |
| Phe | Pro | Lys | Asp | Thr | Tyr | Tyr | Phe | Tyr | Gln | Ser | Gln | Trp | Asn | Asp | Asp |  |  |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |  |  |
| Val | His | Thr | Leu | His | Ile | Leu | Pro | Ala | Trp | Asn | Glu | Asn | Val | Val | Ala |  |  |
|     |     | 675 |     |     |     | 680 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |

```

          965          970          975
Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp Glu Ile Gly Ala Leu
          980          985          990
Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr Pro Ala Val Leu Pro
          995          1000          1005
Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly Thr Val Thr Ser Ala
1010          1015          1020
Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asp Thr Val Tyr Asn
1025          1030          1035
Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val Phe Gly
1040          1045          1050
Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg Val Gln Arg Ser Gln
1055          1060          1065
Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Thr
1070          1075          1080
Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp Thr Leu Asp Ala Ile
1085          1090          1095
Lys Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly Ala
1100          1105          1110
Asn Pro Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly His
1115          1120          1125
Asn Thr Ala Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala Thr Glu Gln Gln Leu
1130          1135          1140
Gly Gln Ile Val Met Tyr Phe Phe Arg Asp Ser Asn Ala Val Arg
1145          1150          1155
Phe Pro Asp Ala Gly Lys Thr Lys Ile Gln Ile Ser Ala Asp Gly
1160          1165          1170
Lys Asn Trp Thr Asp Leu Ala Ala Thr Glu Thr Ile Ala Ala Gln
1175          1180          1185
Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys Pro Tyr Thr Tyr Asp Phe Ala Pro
1190          1195          1200
Val Gly Ala Thr Phe Val Arg Val Thr Val Thr Asn Ala Asp Thr
1205          1210          1215
Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala Gly Leu Thr Glu Ile Glu
1220          1225          1230
Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Ala Asn Thr Ser Ala Ala
1235          1240          1245
Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Gly Thr Lys Val Ser Asp Ser Val
1250          1255          1260
Leu Ala Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Pro Ala Ile Ile Ala Asp Val
1265          1270          1275
Lys Ala Glu Gly Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Val Leu Pro Ala
1280          1285          1290
His Asp Asn Val Ile Arg Val Ile Thr Glu Ser Glu Asp His Val
1295          1300          1305
Thr Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly Thr Glu Gln Glu Phe
1310          1315          1320
Pro Ala Asp Ser Asp Glu Arg Asp Gln His Gln His Gln His Gln
1325          1330          1335
His Gln Gln
1340
<210> 3
<211> 1752
<212> PRT
<213> Bifidobacterium bifidum
<400> 3
Met Ala Val Arg Arg Leu Gly Gly Arg Ile Val Ala Phe Ala Ala Thr
1 5 10 15
Val Ala Leu Ser Ile Pro Leu Gly Leu Leu Thr Asn Ser Ala Trp Ala
20 25 30
Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
35 40 45
Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr
50 55 60
Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
65 70 75 80
Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu
85 90 95
Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala
100 105 110
Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe
115 120 125
Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp
130 135 140
Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly
145 150 155 160
Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn
165 170 175

```

Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg  
 180 185 190  
 Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val  
 195 200 205  
 Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala  
 210 215 220  
 Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile  
 245 250 255  
 Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala  
 260 265 270  
 Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser  
 275 280 285  
 Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser  
 290 295 300  
 Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr  
 325 330 335  
 Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys  
 340 345 350  
 Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val  
 355 360 365  
 Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met  
 370 375 380  
 Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu  
 385 390 395 400  
 Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe  
 405 410 415  
 Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys  
 420 425 430  
 Trp Phe Gly Gln Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp  
 435 440 445  
 Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg  
 450 455 460  
 Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met  
 465 470 475 480  
 Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala  
 485 490 495  
 Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr  
 500 505 510  
 Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met  
 515 520 525  
 Gly Asp Asn Leu Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser  
 530 535 540  
 Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala  
 545 550 555 560  
 Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr  
 565 570 575  
 Asn Arg Thr Thr Gly Gly Ala Gln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser  
 580 585 590  
 Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp  
 595 600 605  
 Tyr Asp Val Val Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr  
 610 615 620  
 Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser  
 625 630 635 640  
 Gly Ala Val Gly Ser Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile  
 645 650 655  
 Val Asp Thr Ala Gly Phe Pro Lys Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser  
 660 665 670  
 Gln Trp Asn Asp Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn  
 675 680 685  
 Glu Asn Val Val Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val  
 690 695 700  
 Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser  
 705 710 715 720  
 Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr  
 725 730 735  
 Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser  
 740 745 750  
 Thr Ala His Lys Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu  
 755 760 765  
 Gly Thr Ile Ser Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro  
 770 775 780

Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala  
 785 790 795 800  
 Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly  
 805 810 815  
 Lys Asp Leu Ser Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His  
 820 825 830  
 Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala  
 835 840 845  
 Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser  
 850 855 860  
 Tyr Gln Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile  
 865 870 875 880  
 Val Gln Ser Thr Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala  
 885 890 895  
 Asp Gly Leu Gln Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro  
 900 905 910  
 Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn  
 915 920 925  
 Tyr Tyr Val Lys Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu  
 930 935 940  
 Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp  
 945 950 955 960  
 Ala Val Ser Asp Asp Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala  
 965 970 975  
 Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp  
 980 985 990  
 Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr  
 995 1000 1005  
 Pro Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly  
 1010 1015 1020  
 Thr Val Thr Ser Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala  
 1025 1030 1035  
 Asp Thr Val Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr  
 1040 1045 1050  
 Ala Thr Val Phe Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg  
 1055 1060 1065  
 Val Gln Arg Ser Gln Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn  
 1070 1075 1080  
 Ala Leu Arg Leu Thr Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp  
 1085 1090 1095  
 Thr Leu Asp Ala Ile Lys Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn  
 1100 1105 1110  
 Thr Gly Gly Gly Ala Asn Pro Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr  
 1115 1120 1125  
 Ser Lys Ala Gly His Asn Thr Ala Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala  
 1130 1135 1140  
 Thr Glu Gln Gln Leu Gly Gln Ile Val Met Tyr Phe Phe Arg Asp  
 1145 1150 1155  
 Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly Lys Thr Lys Ile Gln  
 1160 1165 1170  
 Ile Ser Ala Asp Gly Lys Asn Trp Thr Asp Leu Ala Ala Thr Glu  
 1175 1180 1185  
 Thr Ile Ala Ala Gln Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys Pro Tyr Thr  
 1190 1195 1200  
 Tyr Asp Phe Ala Pro Val Gly Ala Thr Phe Val Lys Val Thr Val  
 1205 1210 1215  
 Thr Asn Ala Asp Thr Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala Gly  
 1220 1225 1230  
 Leu Thr Glu Ile Glu Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Thr  
 1235 1240 1245  
 Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Gly Thr Lys  
 1250 1255 1260  
 Val Ser Asp Ser Val Leu Ala Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Pro Ala  
 1265 1270 1275  
 Ile Ile Ala Asp Val Lys Ala Glu Gly Glu Gly Asn Ala Ser Val  
 1280 1285 1290  
 Thr Val Leu Pro Ala His Asp Asn Val Ile Arg Val Ile Thr Glu  
 1295 1300 1305  
 Ser Glu Asp His Val Thr Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly  
 1310 1315 1320  
 Thr Glu Gln Glu Phe Pro Ala Asp Ser Asp Glu Arg Asp Tyr Pro  
 1325 1330 1335  
 Ala Ala Asp Met Thr Val Thr Val Gly Ser Glu Gln Thr Ser Gly  
 1340 1345 1350  
 Thr Ala Thr Glu Gly Pro Lys Lys Phe Ala Val Asp Gly Asn Thr  
 1355 1360 1365  
 Ser Thr Tyr Trp His Ser Asn Trp Thr Pro Thr Thr Val Asn Asp  
 1370 1375 1380

Leu Trp Ile Ala Phe Glu Leu Gln Lys Pro Thr Lys Leu Asp Ala  
 1385 1390 1395  
 Leu Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Gly Ser Lys Asn Gly Ser Val  
 1400 1405 1410  
 Thr Glu Tyr Lys Val Gln Val Ser Asp Asp Gly Thr Asn Trp Thr  
 1415 1420 1425  
 Asp Ala Gly Ser Gly Thr Trp Thr Thr Asp Tyr Gly Trp Lys Leu  
 1430 1435 1440  
 Ala Glu Phe Asn Gln Pro Val Thr Thr Lys His Val Arg Leu Lys  
 1445 1450 1455  
 Ala Val His Thr Tyr Ala Asp Ser Gly Asn Asp Lys Phe Met Ser  
 1460 1465 1470  
 Ala Ser Glu Ile Arg Leu Arg Lys Ala Val Asp Thr Thr Asp Ile  
 1475 1480 1485  
 Ser Gly Ala Thr Val Thr Val Pro Ala Lys Leu Thr Val Asp Arg  
 1490 1495 1500  
 Val Asp Ala Asp His Pro Ala Thr Phe Ala Thr Lys Asp Val Thr  
 1505 1510 1515  
 Val Thr Leu Gly Asp Ala Thr Leu Arg Tyr Gly Val Asp Tyr Leu  
 1520 1525 1530  
 Leu Asp Tyr Ala Gly Asn Thr Ala Val Gly Lys Ala Thr Val Thr  
 1535 1540 1545  
 Val Arg Gly Ile Asp Lys Tyr Ser Gly Thr Val Ala Lys Thr Phe  
 1550 1555 1560  
 Thr Ile Glu Leu Lys Asn Ala Pro Ala Pro Glu Pro Thr Leu Thr  
 1565 1570 1575  
 Ser Val Ser Val Lys Thr Lys Pro Ser Lys Leu Thr Tyr Val Val  
 1580 1585 1590  
 Gly Asp Ala Phe Asp Pro Ala Gly Leu Val Leu Gln His Asp Arg  
 1595 1600 1605  
 Gln Ala Asp Arg Pro Pro Gln Pro Leu Val Gly Glu Gln Ala Asp  
 1610 1615 1620  
 Glu Arg Gly Leu Thr Cys Gly Thr Arg Cys Asp Arg Val Glu Gln  
 1625 1630 1635  
 Leu Arg Lys His Glu Asn Arg Glu Ala His Arg Thr Gly Leu Asp  
 1640 1645 1650  
 His Leu Glu Phe Val Gly Ala Ala Asp Gly Ala Val Gly Glu Gln  
 1655 1660 1665  
 Ala Thr Phe Lys Val His Val His Ala Asp Gln Gly Asp Gly Arg  
 1670 1675 1680  
 His Asp Asp Ala Asp Glu Arg Asp Ile Asp Pro His Val Pro Val  
 1685 1690 1695  
 Asp His Ala Val Gly Glu Leu Ala Arg Ala Ala Cys His His Val  
 1700 1705 1710  
 Ile Gly Leu Arg Val Asp Thr His Arg Leu Lys Ala Ser Gly Phe  
 1715 1720 1725  
 Gln Ile Pro Ala Asp Asp Met Ala Glu Ile Asp Arg Ile Thr Gly  
 1730 1735 1740  
 Phe His Arg Phe Glu Arg His Val Gly  
 1745 1750  
 <210> 4  
 <211> 1935  
 <212> PRT  
 <213> Bifidobacterium bifidum  
 <400> 4  
 Met Ala Val Arg Arg Leu Gly Gly Arg Ile Val Ala Phe Ala Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Val Ala Leu Ser Ile Pro Leu Gly Leu Leu Thr Asn Ser Ala Trp Ala  
 20 25 30  
 Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr  
 35 40 45  
 Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr  
 50 55 60  
 Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln  
 65 70 75 80  
 Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu  
 85 90 95  
 Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala  
 100 105 110  
 Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe  
 115 120 125  
 Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp  
 130 135 140  
 Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly  
 145 150 155 160  
 Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn  
 165 170 175  
 Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Leu | Pro | Ser | Ser | Arg | Trp | Tyr | Ser | Gly | Ser | Gly | Ile | Tyr | Arg | Asp | Val |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Thr | Leu | Thr | Val | Thr | Asp | Gly | Val | His | Val | Gly | Asn | Asn | Gly | Val | Ala |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Ile | Lys | Thr | Pro | Ser | Leu | Ala | Thr | Gln | Asn | Gly | Gly | Asn | Val | Thr | Met |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Asn | Leu | Thr | Thr | Lys | Val | Ala | Asn | Asp | Thr | Lys | Ala | Ala | Ala | Asn | Ile |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |  |
| Thr | Leu | Lys | Gln | Thr | Val | Phe | Pro | Lys | Gly | Gly | Lys | Thr | Asp | Ala | Ala |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Ile | Gly | Thr | Val | Thr | Thr | Ala | Ser | Lys | Ser | Ile | Ala | Ala | Gly | Ala | Ser |  |
|     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
| Ala | Asp | Val | Thr | Ser | Thr | Ile | Thr | Ala | Ala | Ser | Pro | Lys | Leu | Trp | Ser |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| Ile | Lys | Asn | Pro | Asn | Leu | Tyr | Thr | Val | Arg | Thr | Glu | Val | Leu | Asn | Gly |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
| Gly | Lys | Val | Leu | Asp | Thr | Tyr | Asp | Thr | Glu | Tyr | Gly | Phe | Arg | Trp | Thr |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
| Gly | Phe | Asp | Ala | Thr | Ser | Gly | Phe | Ser | Leu | Asn | Gly | Glu | Lys | Val | Lys |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     |     | 345 |     |     |     | 350 |     |     |  |
| Leu | Lys | Gly | Val | Ser | Met | His | His | Asp | Gln | Gly | Ser | Leu | Gly | Ala | Val |  |
|     | 355 |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |
| Ala | Asn | Arg | Arg | Ala | Ile | Glu | Arg | Gln | Val | Glu | Ile | Leu | Gln | Lys | Met |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |
| Gly | Val | Asn | Ser | Ile | Arg | Thr | Thr | His | Asn | Pro | Ala | Ala | Lys | Ala | Leu |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |
| Ile | Asp | Val | Cys | Asn | Glu | Lys | Gly | Val | Leu | Val | Val | Glu | Glu | Val | Phe |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |
| Asp | Met | Trp | Asn | Arg | Ser | Lys | Asn | Gly | Asn | Thr | Glu | Asp | Tyr | Gly | Lys |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     |     | 425 |     |     |     | 430 |     |     |  |
| Trp | Phe | Gly | Gln | Ala | Ile | Ala | Gly | Asp | Asn | Ala | Val | Leu | Gly | Gly | Asp |  |
|     | 435 |     |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |
| Lys | Asp | Glu | Thr | Trp | Ala | Lys | Phe | Asp | Leu | Thr | Ser | Thr | Ile | Asn | Arg |  |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |
| Asp | Arg | Asn | Ala | Pro | Ser | Val | Ile | Met | Trp | Ser | Leu | Gly | Asn | Glu | Met |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |
| Met | Glu | Gly | Ile | Ser | Gly | Ser | Val | Ser | Gly | Phe | Pro | Ala | Thr | Ser | Ala |  |
|     |     |     | 485 |     |     |     |     |     | 490 |     |     |     | 495 |     |     |  |
| Lys | Leu | Val | Ala | Trp | Thr | Lys | Ala | Ala | Asp | Ser | Thr | Arg | Pro | Met | Thr |  |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |
| Tyr | Gly | Asp | Asn | Lys | Ile | Lys | Ala | Asn | Trp | Asn | Glu | Ser | Asn | Thr | Met |  |
|     | 515 |     |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |  |
| Gly | Asp | Asn | Leu | Thr | Ala | Asn | Gly | Gly | Val | Val | Gly | Thr | Asn | Tyr | Ser |  |
|     | 530 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

[illegible]

|                             |                     |             |
|-----------------------------|---------------------|-------------|
| 1400                        | 1405                | 1410        |
| Thr Glu Tyr Lys Val Gln Val | Ser Asp Asp Gly Thr | Asn Trp Thr |
| 1415                        | 1420                | 1425        |
| Asp Ala Gly Ser Gly Thr Trp | Thr Thr Asp Tyr Gly | Trp Lys Leu |
| 1430                        | 1435                | 1440        |
| Ala Glu Phe Asn Gln Pro Val | Thr Thr Lys His Val | Arg Leu Lys |
| 1445                        | 1450                | 1455        |
| Ala Val His Thr Tyr Ala Asp | Ser Gly Asn Asp Lys | Phe Met Ser |
| 1460                        | 1465                | 1470        |
| Ala Ser Glu Ile Arg Leu Arg | Lys Ala Val Asp Thr | Thr Asp Ile |
| 1475                        | 1480                | 1485        |
| Ser Gly Ala Thr Val Thr Val | Pro Ala Lys Leu Thr | Val Asp Arg |
| 1490                        | 1495                | 1500        |
| Val Asp Ala Asp His Pro Ala | Thr Phe Ala Thr Lys | Asp Val Thr |
| 1505                        | 1510                | 1515        |
| Val Thr Leu Gly Asp Ala Thr | Leu Arg Tyr Gly Val | Asp Tyr Leu |
| 1520                        | 1525                | 1530        |
| Leu Asp Tyr Ala Gly Asn Thr | Ala Val Gly Lys Ala | Thr Val Thr |
| 1535                        | 1540                | 1545        |
| Val Arg Gly Ile Asp Lys Tyr | Ser Gly Thr Val Ala | Lys Thr Phe |
| 1550                        | 1555                | 1560        |
| Thr Ile Glu Leu Lys Asn Ala | Pro Ala Pro Glu Pro | Thr Leu Thr |
| 1565                        | 1570                | 1575        |
| Ser Val Ser Val Lys Thr Lys | Pro Ser Lys Leu Thr | Tyr Val Val |
| 1580                        | 1585                | 1590        |
| Gly Asp Ala Phe Asp Pro Ala | Gly Leu Val Leu Gln | Leu Asn Tyr |
| 1595                        | 1600                | 1605        |
| Asp Asp Asp Ser Thr Gly Thr | Val Thr Trp Asn Thr | Gln Thr Ala |
| 1610                        | 1615                | 1620        |
| Gly Asp Phe Thr Phe Lys Pro | Ala Leu Asp Ala Lys | Leu Lys Val |
| 1625                        | 1630                | 1635        |
| Thr Asp Lys Thr Val Thr Val | Thr Tyr Gln Gly Lys | Ser Ala Val |
| 1640                        | 1645                | 1650        |
| Ile Asp Ile Thr Val Ser Gln | Pro Ala Pro Thr Val | Ser Lys Thr |
| 1655                        | 1660                | 1665        |
| Asp Leu Asp Lys Ala Ile Lys | Ala Ile Glu Ala Lys | Asn Pro Asp |
| 1670                        | 1675                | 1680        |
| Ser Ser Lys Tyr Thr Ala Asp | Ser Trp Lys Thr Phe | Ala Asp Ala |
| 1685                        | 1690                | 1695        |
| Met Ala His Ala Lys Ala Val | Ile Ala Asp Asp Ser | Ala Thr Gln |
| 1700                        | 1705                | 1710        |
| Gln Asp Val Asp Lys Ala Leu | Lys Ala Leu Thr Asp | Ala Tyr Ala |
| 1715                        | 1720                | 1725        |
| Gly Leu Thr Glu Lys Thr Pro | Glu Pro Ala Pro Val | Ser Lys Ser |
| 1730                        | 1735                | 1740        |
| Glu Leu Asp Lys Lys Ile Lys | Ala Ile Glu Ala Glu | Lys Leu Asp |
| 1745                        | 1750                | 1755        |
| Gly Ser Lys Tyr Thr Ala Glu | Ser Trp Lys Ala Phe | Glu Thr Ala |
| 1760                        | 1765                | 1770        |
| Leu Ala His Ala Lys Ala Val | Ile Ala Ser Asp Ser | Ala Thr Gln |
| 1775                        | 1780                | 1785        |
| Gln Asp Val Asp Ala Ala Leu | Gly Ala Leu Thr Ser | Ala Arg Asp |
| 1790                        | 1795                | 1800        |
| Gly Leu Thr Glu Lys Gly Glu | Val Lys Pro Asp Pro | Lys Pro Glu |
| 1805                        | 1810                | 1815        |
| Pro Gly Thr Val Asp Lys Ala | Ala Leu Asp Lys Ala | Val Lys Lys |
| 1820                        | 1825                | 1830        |
| Val Glu Ala Glu Lys Leu Asp | Gly Ser Lys Tyr Thr | Ala Asp Ser |
| 1835                        | 1840                | 1845        |
| Trp Lys Ala Phe Glu Thr Ala | Leu Ala His Ala Lys | Ala Val Ile |
| 1850                        | 1855                | 1860        |
| Gly Asn Ala Asn Ser Thr Gln | Phe Asp Ile Asp Asn | Ala Leu Ser |
| 1865                        | 1870                | 1875        |
| Met Leu Asn Asp Ala Arg Ala | Ala Leu Lys Glu Lys | Pro Gly Arg |
| 1880                        | 1885                | 1890        |
| Ile Ile Ala Ile Ile Asp Gly | Gly Ala Leu Ser Lys | Thr Gly Ala |
| 1895                        | 1900                | 1905        |
| Ser Val Ala Ile Ile Ala Ser | Val Ala Ala Ala Met | Lys Ala Val |
| 1910                        | 1915                | 1920        |
| Gly Ala Gly Val Met Ala Leu | Arg Pro Pro Lys Trp |             |
| 1925                        | 1930                | 1935        |