



(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)



1-0038957

(51)^{2006.01} A23G 1/00; C12R 1/24; C12R 1/225;
A23G 1/30; C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2019-01178

(22) 10/08/2017

(86) PCT/JP2017/029046 10/08/2017

(87) WO 2018/030505 15/02/2018

(30) 2016-158335 11/08/2016 JP

(45) 26/02/2024 431

(43) 27/05/2019 374A

(73) 1. Noster Inc. (JP)

35-3, Minamibiraki, Kamiueno-cho, Muko-shi, Kyoto 617-0006, Japan

2. LOTTE CO., LTD. (JP)

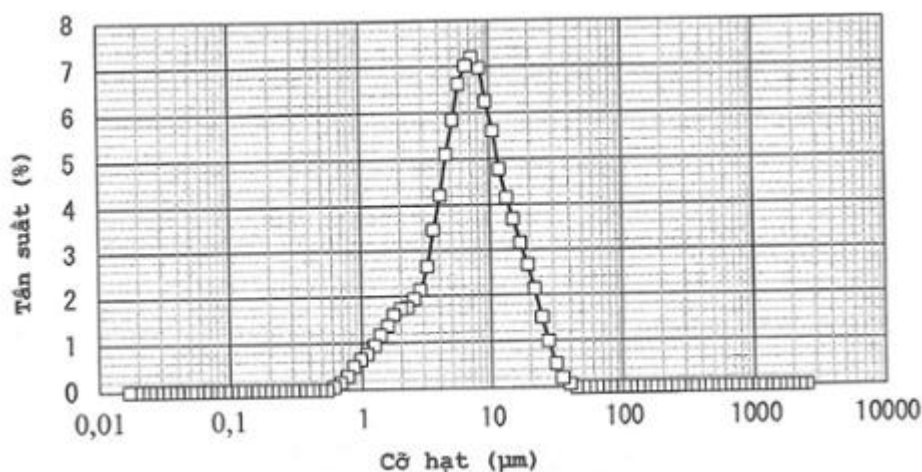
20-1, Nishi-shinjuku 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan

(72) ASHITANI, Hiroaki (JP); KOYAMA, Toshiyuki (JP); USAMIKRANK, Yoko (JP);
KABUKI, Yusuke (JP); YONEJIMA, Yasunori (JP); HISA, Keiko (JP).

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

(54) SÔCÔLA CHỨA VI KHUẨN LACTIC VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
SÔCÔLA

(57) Sáng chế đề cập đến sôcôla chứa vi khuẩn lactic mà vi khuẩn lactic ở trạng thái sống, trong đó cỡ hạt trung bình của các hạt rắn trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic là lớn hơn 1 μ m và nhỏ hơn 9 μ m, và phương pháp sản xuất sôcôla này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến sôcôla chứa vi khuẩn lactic mà vi khuẩn lactic sống ở trạng thái ổn định và phương pháp sản xuất sôcôla này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn lactic là vi khuẩn mà tạo ra axit lactic từ đường. Đối với vi khuẩn tạo ra axit lactic từ đường bằng quá trình lên men (sự lên men axit lactic), các giống *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, v.v. là đã biết. *Bifidobacterium* còn được biết đến là loại vi khuẩn mà phân hủy đường để tạo ra axit lactic và axit axetic. Vi khuẩn của giống *Bifidobacterium* có thể được phân loại ở dạng *Bacillus bifidus* (khuẩn hình que) tách biệt với vi khuẩn lactic, tuy nhiên theo sáng chế này, vi khuẩn của giống *Bifidobacterium* cũng được bao gồm trong vi khuẩn lactic.

Nhiều loại vi sinh vật sống trong ruột người, và vi khuẩn lactic thuộc các giống *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* được phát hiện thấy ở đường ruột của hầu như tất cả mọi người.

Theo nhà vi trùng học Fuller người Anh thì lợi khuẩn (probiotics) được định nghĩa là "các loài vi sinh vật sống mà mang lại lợi ích cho con người bởi sự cải thiện độ cân bằng của khu hệ ruột", và cần đến đường ruột ở trạng thái sống và có thể sinh trưởng trong môi trường đường ruột. Một số vi khuẩn lactic điều chỉnh hệ miễn dịch, hệ nội tiết, hệ thần kinh và tương tự, ngoài sự điều chỉnh khu hệ ruột, và thu hút sự quan tâm đối với các lợi khuẩn.

Có mong muốn là hấp thụ vi khuẩn lactic để tăng cường và duy trì sức khỏe. Sữa chua, đồ uống vi khuẩn lactic, v.v., là các thực phẩm chứa vi khuẩn lactic phổ biến. Ngoài các loại này, các thực phẩm chứa vi khuẩn lactic ở dạng lợi khuẩn là thuận tiện hơn và ngon hơn để đáp ứng nhu cầu của xã hội hiện đại về sức khỏe, sự thuận tiện và sự ngon miệng.

Tài liệu sáng chế 1 bộc lộ sôcôla chứa vi khuẩn lactic bao gồm *Bacillus bifidus* ở trạng thái sống, và bộc lộ kỹ thuật để cải thiện tính ổn định từ lúc sản xuất, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào liên quan đến cỡ hạt của các hạt rắn có trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic.

Các tác giả sáng chế đã nộp đơn đăng ký cho tài liệu sáng chế 2 đề cập đến sôcôla chứa vi khuẩn lactic khác biệt ở chỗ vận chuyển vi khuẩn lactic sống đến ruột và phương pháp sản xuất sôcôla này. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu liên quan đến cỡ hạt của các hạt rắn có trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic.

Đối với vi khuẩn lactic được kỳ vọng là thể hiện tác dụng cải thiện sức khỏe, vi khuẩn lactic của giống *Lactobacillus*, giống *Enterococcus*, giống *Bifidobacterium*, giống *Leuconostoc* là đã biết và các ví dụ về chúng bao gồm *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium longum*, *Leuconostoc mesenteroide* và tương tự.

Đối với *Lactobacillus brevis*, loài phụ *Lactobacillus brevis subsp. coagulans* (còn được gọi là “vi khuẩn Labre”) và các loài tương tự là đã biết. Ngoài ra, *Lactobacillus brevis* được xem là có hoạt tính kích thích miễn dịch và hoạt tính kháng virus gây cúm, cũng như tác dụng ngăn sự tăng trọng lượng cơ thể, lượng mỡ trong gan, và hàm lượng cholesterol trong máu, v.v., và như vậy *Lactobacillus brevis* là vi khuẩn lactic mà được kỳ vọng có nhiều lợi ích cho sức khỏe. *Leuconostoc mesenteroide* là vi khuẩn lactic mà có hoạt tính kích thích miễn dịch và có thể kỳ vọng có nhiều lợi ích cho sức khỏe. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Enterococcus faecalis* hoặc *Bifidobacterium longum* đều được sử dụng để sản xuất các sản phẩm bơ sữa như sữa chua và được kỳ vọng là tạo ra lợi ích cải thiện sức khỏe.

Danh mục tài liệu

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP-A-08-126473

Tài liệu sáng chế 2: Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 2016-543748

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 48(9) pp.656-663 (2001)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Vấn đề đặt ra cho sáng chế là đề xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic mà vi

khuẩn lactic ở trạng thái sống trong một thời gian dài và phương pháp sản xuất sôcôla này.

Cách thức giải quyết vấn đề

Sôcôla chứa vi khuẩn lactic với tỷ lệ sống sót cao của vi khuẩn lactic đã và đang được sản xuất thành công bằng cách thêm vi khuẩn lactic vào sôcôla có cỡ hạt rắn nhỏ.

Hiệu quả của sáng chế

Sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo sáng chế có thể chứa vi khuẩn lactic ở trạng thái sống trong một thời gian dài.

Hơn nữa, sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo sáng chế là thuận lợi trong việc kho vận như bảo quản, vận chuyển và trưng bày ở cửa hàng, và khiến cho có thể tạo ra một cách ổn định sôcôla chứa vi khuẩn lactic suốt năm.

Hơn nữa, theo một cách bất ngờ, họ phát hiện ra rằng bằng cách giảm cỡ hạt và làm cho sự phân bố cỡ hạt đồng đều, thậm chí sử dụng sôcôla có hoạt độ nước cao thì có thể sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic mà vi khuẩn lactic ở trạng thái sống trong thời gian dài, và tạo ra một cách thành công sôcôla chứa vi khuẩn lactic mà vi khuẩn lactic ở trạng thái sống trong một thời gian dài.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện sự phân bố cỡ hạt của các hạt rắn trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic 1 theo ví dụ 1.

Fig. 2 thể hiện sự phân bố cỡ hạt của các hạt rắn trong bột nhào sôcôla 1 đến 4.

Fig. 3 thể hiện sự biến thiên ERH (%) qua thời gian của bột nhào sôcôla 1 đến 4.

Fig. 4A là sơ đồ minh họa phương pháp sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic.

Fig. 4B là sơ đồ minh họa phương pháp sản xuất sôcôla hạnh nhân chứa vi khuẩn lactic.

Fig. 4C là sơ đồ minh họa phương pháp sản xuất chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic.

Fig. 5(a), (b), (c) là các đồ thị thể hiện kết quả thí nghiệm sự chống chịu của sôcôla chứa vi khuẩn lactic đối với dịch vị nhân tạo.

Fig. 6 là đồ thị thể hiện kết quả thí nghiệm sự chống chịu của sôcôla chứa vi khuẩn lactic và bột vi khuẩn lactic đối với dịch vị nhân tạo.

Mô tả chi tiết sáng chế

Một phương án của sáng chế là sôcôla chứa vi khuẩn lactic mà vi khuẩn lactic ở trạng thái sống và có cỡ hạt trung bình của các hạt rắn trong sôcôla là nhỏ hơn $9\mu\text{m}$. Tốt hơn là cỡ hạt trung bình của các hạt rắn trong sôcôla là nhỏ hơn $7\mu\text{m}$.

Giới hạn dưới của cỡ hạt trung bình của các hạt rắn trong sôcôla tốt hơn là lớn hơn $1\mu\text{m}$, tốt hơn nữa là lớn hơn $5\mu\text{m}$.

Khoảng ưu tiên của cỡ hạt trung bình của các hạt rắn trong sôcôla là lớn hơn $1\mu\text{m}$ và nhỏ hơn $9\mu\text{m}$, tốt hơn nữa là lớn hơn $5\mu\text{m}$ và nhỏ hơn $7\mu\text{m}$.

Để giữ vi khuẩn lactic sống trong thời gian dài và ổn định thì tốt hơn là làm cho cỡ hạt của các hạt rắn có trong bột nhào sôcôla đồng đều, và cỡ hạt của các hạt rắn trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic tốt hơn là có đỉnh phân bố đơn.

Theo bản mô tả sáng chế này, sôcôla không bị giới hạn bởi các quy ước thông thường (các quy định về cạnh tranh công bằng liên quan đến việc trưng bày sôcôla) hoặc các quy định pháp lý, và đề cập đến sôcôla chủ yếu làm bằng nguyên liệu có nguồn gốc từ ca cao và nếu cần thì thêm sacarit, các sản phẩm bơ sữa, các loại chất béo và dầu ăn được khác, hương liệu, chất nhũ hoá và tương tự.

Cỡ hạt rắn trong sôcôla là cỡ hạt rắn mà qua được sàng với đường kính $150\mu\text{m}$ (100 lỗ của sàng thử nghiệm JIS) khi sôcôla tan chảy ở 50°C được đưa qua sàng. Cỡ hạt rắn thường bao gồm các hạt như ca cao, sữa, sacarit và tương tự. Trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic, vi khuẩn lactic còn được chứa trong các hạt rắn. Theo sáng chế, do tỷ lệ của vi khuẩn lactic trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic nhỏ nên hầu hết (về cơ bản) là không gây ảnh hưởng đến sự phân bố cỡ hạt của sôcôla chứa vi khuẩn lactic.

Trong bản mô tả sáng chế này, các hạt rắn được làm phân tán trong sôcôla hoặc sôcôla chứa vi khuẩn lactic thường được gọi tắt là các hạt, và cỡ hạt của các hạt rắn này thường được gọi tắt là cỡ hạt.

Sôcôla theo sáng chế bao gồm sôcôla đen, sôcôla sữa, sôcôla trắng, và hơn nữa là sôcôla màu mà là sôcôla trắng là màu gốc và tạo ra màu mong muốn.

Ví dụ, sôcôla sữa có thể được chế biến bằng cách trộn khối lượng ca cao: 0 - 70% trọng lượng, tổng lượng bột sữa: 0 - 20% trọng lượng, bơ ca cao: 0 - 25% trọng lượng, dầu hoặc chất béo thực vật: 0 - 20% trọng lượng, đường: 0 - 45%

trọng lượng. Chất nhũ hoá, hương liệu và bột vi khuẩn lactic cũng có thể được trộn nếu thích hợp. Hơn nữa, thực phẩm thô: 0 - 15% trọng lượng, oligosacarit: 0 - 10% trọng lượng cũng có thể được trộn.

Thêm nữa, sôcôla theo sáng chế cũng có thể là sôcôla không đường. Trong trường hợp này, ngoài bột vi khuẩn lactic, hỗn hợp pha trộn có thể được thay đổi một cách thích hợp trong khoảng rượu đường: 0 - 50% trọng lượng, khối lượng ca cao: 0 - 70% trọng lượng, thực phẩm làm từ sữa và tương tự làm nguyên liệu chính: 0 - 25% trọng lượng, dầu hoặc chất béo thực vật: 0 - 25% trọng lượng, bơ ca cao: 0 - 25% trọng lượng. Ngoài ra, các nguyên liệu bổ sung như chất làm ngọt có độ ngọt cao, chất nhũ hoá, hương liệu và tương tự cũng có thể được thêm vào nếu thích hợp, và lượng của chúng cũng có thể được điều chỉnh thích hợp. Hơn nữa, thực phẩm thô: 0 - 15% trọng lượng, oligosacarit: 0 - 10% trọng lượng cũng có thể được trộn vào. Các ví dụ về oligosacarit có thể sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở fructo-oligosacarit, galacto-oligosacarit, isomalto-oligosacarit, oligosacarit đậu tương và tương tự.

Đối với sôcôla, các hạt ca cao làm nguyên liệu được chọn lọc, tách, rang và xay để tạo ra khối ca cao, khối ca cao này, đường, sữa bột, dầu và chất béo thực vật, một phần bơ ca cao và chất nhũ hoá được trộn trong máy trộn nguyên liệu, hỗn hợp này được tán nhỏ đồng đều bằng máy tinh chế sao cho các hạt có cỡ định trước, được làm hoàn thiện, và hương liệu và chất béo và dầu còn lại và chất nhũ hoá được thêm vào ở bước sau của bước làm hoàn thiện sôcôla để tạo ra bột nhào sôcôla. Vi khuẩn lactic có thể được thêm vào bột nhào sôcôla đã được chế biến khi thích hợp.

Các ví dụ về vi khuẩn lactic bao gồm giống *Lactobacillus* (như *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus acidophilus* L-92, *Lactobacillus cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus gasseri* OLL 2716, *Lactobacillus gasseri* PA-3, *Lactobacillus gasseri* SBT 2055, *Lactobacillus bulgaricus* OLL1073R-1, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus yogurti*, *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* 2038, *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *delbrueckii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, v.v.), giống *Streptococcus* (như *Streptococcus thermophilus* 1131, v.v.), giống *Bifidobacterium* (như *Bifidobacterium longum* BB 536, *Bifidobacterium longum* SBT 2928, *Bifidobacterium lactis* GCL 2505, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium*

catenulatum, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium animalis*, v.v.), giống *Enterococcus* (như *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, v.v.), giống *Lactococcus* (như *Lactococcus lactis* loài phụ *lactis*, *Lactococcus lactis* loài phụ *cremoris*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis*, v.v.), giống *Pediococcus* (như *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus damnosus*, v.v.), và giống *Leuconostoc* (như *Leuconostoc dextranum*, *Leuconostoc citrovorum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis*, v.v.), và tương tự.

Trong số chúng, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, và *Leuconostoc* được ưu tiên làm vi khuẩn lactic theo sáng chế, và *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium longum*, và *Leuconostoc mesenteroides* là được ưu tiên hơn, tuy nhiên các vi khuẩn không bị giới hạn ở các giống được đề cập nêu trên miễn là chúng là vi khuẩn tạo ra axit lactic.

Sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo phương án này tốt hơn là chứa vi khuẩn lactic sống ở mức không nhỏ hơn 1×10^4 vi khuẩn/g, tốt hơn nữa là, không nhỏ hơn 1×10^4 vi khuẩn/g và không lớn hơn 1×10^{12} vi khuẩn/g, tốt hơn nữa là, không nhỏ hơn 1×10^6 vi khuẩn/g và không lớn hơn 1×10^{12} vi khuẩn/g, còn tốt hơn nữa là, không nhỏ hơn 1×10^7 vi khuẩn/g và không lớn hơn 1×10^{12} vi khuẩn/g.

Sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo phương án này thể hiện tỷ lệ sống sót của vi khuẩn lactic không nhỏ hơn 50%, tốt hơn là không nhỏ hơn 60%, tốt hơn nữa là không nhỏ hơn 70%, sau khi bảo quản ở 28°C trong 2 tháng.

Sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo phương án này thể hiện tỷ lệ thay đổi ERH không lớn hơn 5%, tốt hơn là không lớn hơn 3%, tốt hơn nữa là không lớn hơn 1%, sau khi bảo quản ở 25°C, độ ẩm tương đối 75% trong 98 giờ.

Một phương án theo sáng chế là phương pháp sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic, và phương pháp này khác biệt ở chỗ các nguyên liệu được tán nhỏ đến cỡ hạt trung bình nhỏ hơn 9µm, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 7µm. Trong trường hợp này, giới hạn dưới của cỡ hạt trung bình của các hạt rắn không bị giới hạn cụ thể. Tốt hơn là lớn hơn 1µm, tốt hơn nữa là lớn hơn 5µm. Thông thường, cỡ hạt trung bình được kiểm soát bằng cách kiểm soát máy cuộn tinh chế và điều chỉnh lượng chất béo và dầu trong nguyên liệu.

Theo sáng chế, bước tán nhỏ không bị giới hạn cụ thể miễn là cỡ hạt mục tiêu có thể được cải thiện, và bước tán nhỏ sử dụng thiết bị như máy tinh chế và

tương tự có thể được đề cập.

Trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic, bước thêm vi khuẩn lactic không bị giới hạn. Ví dụ, bột vi khuẩn lactic có thể được thêm vào bột nhào sôcôla sau khi nhào trộn và trước khi đúc khuôn. Hơn nữa, sôcôla với mật độ vi khuẩn lactic cao được sản xuất bằng cách trộn nồng độ cao bột vi khuẩn lactic với sôcôla, và sau đó sôcôla với mật độ vi khuẩn lactic cao có thể được thêm vào bột nhào sôcôla sau khi nhào trộn và trước khi đúc khuôn. Trong khi sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic trong đó nguyên liệu lõi được bao, bột vi khuẩn lactic được thêm vào bột nhào sôcôla có nhiệt độ đã được điều chỉnh, và nguyên liệu lõi có thể được bao bằng hỗn hợp này.

Hơn nữa, một phương án theo sáng chế là thực phẩm chứa sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo sáng chế. Các ví dụ về chúng bao gồm bánh kẹo sôcôla chứa vi khuẩn lactic được thêm hoa quả, hạt, ngũ cốc, kẹo gôm, kẹo và tương tự, kẹo sậy, snack, bánh quy, bánh, kem, đồ uống, mỗi loại chứa sôcôla chứa vi khuẩn lactic, và tương tự.

Hơn nữa, sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo sáng chế, ví dụ, có thể là đồ uống như nước ngọt có ga, đồ uống dạng bột, hoặc bằng cách thêm hương liệu thích hợp vào đó. Cụ thể là sôcôla có thể được trộn với nước hoa quả, sữa bò, bánh kẹo, kẹo dẻo, và tương tự và được bảo quản để ăn và uống. Thực phẩm như vậy cũng có thể được tạo ra làm thực phẩm đáp ứng yêu cầu về sức khỏe. Thực phẩm đáp ứng yêu cầu về sức khỏe bao gồm thực phẩm và đồ uống, cụ thể là thực phẩm để sử dụng cho các mục đích về sức khỏe cụ thể, thực phẩm chức năng đáp ứng yêu cầu về mặt dinh dưỡng và tương tự, với chỉ dẫn rằng chúng được sử dụng nhằm các ứng dụng như sinh trưởng vi khuẩn bifido, sự cải thiện khu hệ ruột và tương tự.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

1. Điều chế bột vi khuẩn lactic

Loài phụ vi khuẩn lactic *brevis* subsp. *coagulans* (vi khuẩn Labre) được sử dụng làm bột vi khuẩn lactic. Vi khuẩn Labre được nuôi cấy sử dụng môi trường nuôi cấy vi khuẩn lactic thường được sử dụng (môi trường MRS v.v.), và vi khuẩn được nuôi cấy được gom bằng cách quay ly tâm hoặc tương tự, được làm đông khô, được tán thành bột, và tương tự để thu được bột mà tinh bột được thêm vào đó để tạo ra bột vi khuẩn lactic.

2. Sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic

Các bột nhào sôcôla 1 – 4 chứa đường, khối ca cao, bơ ca cao, tổng lượng bột sữa hoặc sữa bò, chất nhũ hoá, hương liệu và tương tự được điều chế. Sôcôla 1 – 4 với mật độ vi khuẩn lactic cao được sản xuất bằng cách làm tan chảy mỗi loại bột nhào sôcôla ở 40°C và thêm nồng độ cao bột vi khuẩn lactic vào đó. Mỗi loại bột nhào sôcôla 1 – 4 sau khi nhào trộn được trộn với sôcôla 1 - 4 tương ứng chứa mật độ cao vi khuẩn lactic, được làm mát và hoá rắn để sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic 1 - 4, mỗi loại có lượng vi khuẩn lactic 5×10^7 vi khuẩn - 5×10^8 vi khuẩn/gam.

Cỡ hạt trung bình và hoạt độ nước của 4 loại sôcôla chứa vi khuẩn lactic 1 – 4 được thể hiện trong bảng 1. Cỡ hạt trung bình được đo sử dụng máy phân tích sự phân bố cỡ hạt nhiễu xạ tia laser do Shimadzu Corporation sản xuất, và hoạt độ nước được đo sử dụng hệ đo hoạt độ nước AW-labo do Rotronic sản xuất.

ERH (Equilibrium Relative Humidity- Độ ẩm tương đối cân bằng) thể hiện ở dạng hoạt độ nước là tỷ lệ áp suất hơi nước khi đạt tới độ cân bằng giữa đối tượng và môi trường trong lọ chứa được bịt kín chứa đối tượng đo và áp suất hơi nước bão hoà ở nhiệt độ đó, và có giá trị bằng 100 lần hoạt độ nước (AW) được lấy làm chỉ số bảo quản thực phẩm.

Phương pháp đo cụ thể cỡ hạt trung bình bao gồm đặt sôcôla chứa vi khuẩn lactic (0,5g) trong isopropanol (10mL), làm tan chảy sôcôla bằng cách khuấy trong nước nóng ở 50°C trong 10 phút, và đo mẫu được pha loãng bằng isopropanol sao cho sự hấp thụ ở chiều dài bước sóng đo 680nm là 0,1 đến 0,2 bằng máy phân tích sự phân bố cỡ hạt nhiễu xạ laser. Khi vi khuẩn Labre có hình dạng gậy với cỡ hạt khoảng 2 đến 4µm trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic, số lượng vi khuẩn được trộn trong mỗi 1g sôcôla hầu như không ảnh hưởng đến sự phân bố cỡ hạt (xem các Fig. 1 và Fig. 2).

Bảng 1

	cỡ hạt trung bình (µm)	hoạt độ nước ERH (%-°C)
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 1	6,744	37,9-19,3
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 2	6,940	24,5-19,3
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 3	7,026	38,4-20,1
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 4	9,211	49,4-20,5

Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 1 – 4 được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng

không đổi ở 28°C, và thử nghiệm tính ổn định được thực hiện trong 2 tháng từ khi sản xuất. Các kết quả thử nghiệm đo vi khuẩn sống sót trong các vi khuẩn lactic lúc sản xuất, lúc một tháng và lúc 2 tháng được thể hiện trong Bảng 2. Hơn nữa, tỷ lệ sống sót với số lượng vi khuẩn sống sót lúc sản xuất là 100% được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 2

	thời gian sản xuất	ở 1 tháng	ở 2 tháng
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 1	$5,86 \times 10^7$	$5,74 \times 10^7$	$4,05 \times 10^7$
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 2	$9,42 \times 10^7$	$9,31 \times 10^7$	$7,98 \times 10^7$
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 3	$1,22 \times 10^8$	$7,14 \times 10^7$	$7,27 \times 10^7$
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 4	$1,04 \times 10^7$	$5,74 \times 10^8$	$2,19 \times 10^5$

Bảng 3

	thời gian sản xuất	ở 1 tháng	ở 2 tháng
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 1	100%	98,0%	69,1%
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 2	100%	98,8%	84,7%
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 3	100%	58,5%	59,6%
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic 4	100%	55,2%	2,1%

Từ các kết quả này, rõ ràng là sôcôla chứa vi khuẩn lactic 1 – 3 có cỡ hạt trung bình của các hạt rắn tương đối nhỏ có trong sôcôla thể hiện tỷ lệ sống sót của vi khuẩn lactic cao đáng kể so với sôcôla chứa vi khuẩn lactic 4 có cỡ hạt lớn.

Tính ổn định của vi khuẩn lactic bị ảnh hưởng lớn bởi độ ẩm trong thực phẩm và thông thường, khó để giữ vi khuẩn lactic ở trạng thái sống trong thời gian dài trong các thực phẩm có hoạt độ nước cao. Trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic 1 và 3, mặc dù hoạt độ ERH cao khoảng 40%, tỷ lệ sống sót của vi khuẩn lactic là cao. Đã biết là hoạt độ của sôcôla là khó để kiểm soát các nguyên liệu và các phương pháp sản xuất.

Từ ví dụ này, bằng cách đạt được cỡ hạt nhỏ của sôcôla, thậm chí sử dụng sôcôla có hoạt độ nước tương đối cao thì có thể sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic mà vi khuẩn lactic ở trạng thái sống trong thời gian dài.

Ví dụ 2

Nghiên cứu sự phân bố cỡ hạt của các hạt rắn trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic

Sự phân bố cỡ hạt của các hạt rắn trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic 1 được sản xuất trong ví dụ 1 được thể hiện trong Fig. 1. Sự phân bố cỡ hạt trong Fig. 1 thể hiện đỉnh đơn.

Sự tương quan giữa sự phân bố cỡ hạt của các hạt rắn trong bột nhào sôcôla và hoạt độ được nghiên cứu. Bốn loại bột nhào sôcôla có sự phân bố cỡ hạt khác nhau được chế biến (bột nhào sôcôla 1 - 4). Sự phân bố cỡ hạt của các hạt rắn trong mỗi bột nhào được thể hiện trong Fig. 2. Bột nhào sôcôla này được bảo quản dưới các điều kiện 25°C, 75% RH (độ ẩm tương đối) trong 98 giờ và sự gia tăng theo thời gian trong hoạt độ mà vào thời điểm đó được quan sát thấy. Các kết quả về sự biến thiên ERH theo thời gian (%) được thể hiện trong Fig. 3. Bột nhào sôcôla 1, 2 thể hiện đỉnh phân bố đơn và bột nhào 3, 4 thể hiện hai đỉnh trong sự phân bố cỡ hạt. Hơn nữa, bột nhào sôcôla 3, 4 thể hiện sự biến thiên ERH lớn hơn khi so sánh với bột nhào sôcôla 1, 2.

Từ các kết quả này, rõ ràng là bột nhào sôcôla thể hiện một đỉnh trong sự phân bố cỡ hạt của các hạt rắn có trong bột nhào là thấp trong tỷ lệ tăng của ERH. Tính ổn định của vi khuẩn lactic trở nên thấp hơn khi ERH tăng, và ngăn sự gia tăng ERH của chính bột nhào sôcôla là quan trọng để giữ vi khuẩn lactic ở trạng thái sống. Ví dụ này thể hiện là sôcôla chứa vi khuẩn lactic được sản xuất ổn định hơn bằng cách đạt được đỉnh phân bố đơn của sự phân bố cỡ hạt của các hạt rắn có trong sôcôla.

Sau đây là các ví dụ sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic và các ví dụ tham khảo thể hiện sự hữu ích của chúng, và không cấu thành một phần của sáng chế.

Ví dụ tham khảo 1: Sôcôla chứa vi khuẩn lactic (vi khuẩn Labre)

1. Chế biến bột vi khuẩn lactic

Lactobacillus brevis subsp. coagulans (vi khuẩn Labre) thuộc loài *Lactobacillus brevis* được sử dụng làm bột vi khuẩn lactic. Vi khuẩn Labre được nuôi cấy sử dụng môi trường nuôi cấy vi khuẩn lactic thường được sử dụng (môi trường MRS v.v.), và vi khuẩn đã nuôi cấy được gom bằng cách quay ly tâm hoặc tương tự, được làm đông khô, được nghiền thành bột, v.v., để thu được bột, mà tinh bột được thêm vào đó để tạo ra bột vi khuẩn lactic. Bột vi khuẩn lactic tốt hơn là chứa từ 1×10^5 vi khuẩn lactic sống sót/g đến 1×10^{13} vi khuẩn lactic sống sót/g, tốt hơn là từ 1×10^7 vi khuẩn lactic sống sót/g đến 1×10^{13} vi khuẩn lactic sống sót/g, và tốt hơn nữa là từ 1×10^8 vi khuẩn lactic sống sót/g đến 1×10^{13} vi khuẩn

lactic sống sót/g.

2. Sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic

Thông thường, sôcôla thu được bằng cách chọn lọc, tách, rang và xay hạt ca cao ở dạng nguyên liệu thô để thu được khối ca cao, trộn khối ca cao, đường, sữa bột, dầu hoặc chất béo thực vật, một phần bơ ca cao và một phần chất nhũ hoá trong máy trộn vật liệu thô, tán nhỏ đồng đều hỗn hợp bằng máy tinh chế sao cho các hạt có cỡ định trước, cho sản phẩm được tán nhỏ tham gia quy trình hoàn thiện sôcôla, và thêm hương liệu, bột vi khuẩn lactic và bơ ca cao và chất nhũ hoá còn lại ở giai đoạn sau của quy trình hoàn thiện để chế biến bột nhào sôcôla. Trong một số trường hợp, bột nhào sôcôla này được bảo quản ở khoảng từ 45°C đến 50°C trong bình chứa trong khoảng trung bình 4 ngày. Sự bảo quản này được gọi là thời gian chờ được gây ra bởi sự vận hành dây chuyền sản xuất. Sau đó, bột nhào này được nhào trộn ở nhiệt độ khoảng từ 28°C đến 30°C, sau đó nó được nhồi vào trong khuôn để đúc khuôn, làm nguội/hóa rắn, và tháo khuôn để thu được sôcôla, mà được bảo quản, giám sát, và vận chuyển sau khi làm chín.

Trên cơ sở phương pháp sản xuất này, sôcôla chứa vi khuẩn lactic được sản xuất bằng cách thêm bột vi khuẩn lactic bằng phương pháp sản xuất thông thường (bột vi khuẩn lactic được thêm vào cùng thời điểm với việc bổ sung hương liệu và tương tự), phương pháp sản xuất 1, và phương pháp sản xuất 2. Các phương pháp sản xuất tương ứng được thể hiện trong Fig. 4A.

Phương pháp sản xuất thông thường

Bột vi khuẩn lactic được thêm vào bột nhào sôcôla mà đạt đến 45 đến 50°C sau khi hoàn thiện, và sau 4 ngày bảo quản, bột nhào được nhào trộn, đúc khuôn, v.v..

Phương pháp sản xuất 1

Bột vi khuẩn lactic được thêm vào bột nhào sôcôla (27 đến 31°C) mà việc nhào trộn đã được hoàn thiện trước đó. Sôcôla chứa vi khuẩn lactic này tốt hơn là chứa vi khuẩn lactic ở trạng thái sống với lượng không nhỏ hơn 1×10^5 vi khuẩn/g và không lớn hơn 1×10^{12} vi khuẩn/g, tốt hơn nữa là không nhỏ hơn 1×10^7 vi khuẩn/g và không lớn hơn 1×10^{12} vi khuẩn/g, còn tốt hơn nữa là không nhỏ hơn 1×10^8 vi khuẩn/g và không lớn hơn 1×10^{12} vi khuẩn/g.

Phương pháp sản xuất 2

Sôcôla với nồng độ vi khuẩn lactic cao được sản xuất bằng cách làm tan

chảy bột nhào sôcôla trước ở nhiệt độ 40°C và thêm nồng độ cao bột vi khuẩn lactic vào đó. Ngẫu nhiên là, trong sôcôla với mật độ cao vi khuẩn lactic, vi khuẩn lactic sống sót được chứa với lượng tốt hơn là từ 1×10^5 vi khuẩn lactic sống sót/g đến 1×10^{12} vi khuẩn lactic sống sót/g, tốt hơn nữa là từ 1×10^7 vi khuẩn lactic sống sót/g đến 1×10^{12} vi khuẩn lactic sống sót/g, còn tốt hơn nữa là từ 1×10^8 vi khuẩn lactic sống sót/g đến 1×10^{12} vi khuẩn lactic sống sót/g. Bột nhào sôcôla sau khi nhào trộn được điều chỉnh đến 27°C đến 31°C, và sôcôla với mật độ cao vi khuẩn lactic được thêm vào đó và sau đó được trộn cùng nhau.

Trong bất kỳ phương pháp sản xuất nào được đề cập ở trên, quá trình sản xuất được thực hiện theo công thức sôcôla sữa được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

	% trọng lượng
Khối lượng cacao	17
Bột sữa toàn phần	20
Bơ ca cao	12
Dầu hoặc chất béo thực vật	10
Đường	40
Chất nhũ hoá	0,4
Hương liệu	0,1
Bột vi khuẩn lactic	0,5
Tổng lượng	100

Thậm chí với bất kỳ một trong các phương pháp sản xuất nêu trên cũng có thể sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic. Nếu sử dụng phương pháp sản xuất 2 thì phương pháp này được ưu tiên hơn so với các phương pháp khác xét từ góc độ về việc kiểm soát sản xuất do phương pháp này có thể ngăn sự phân tán vi khuẩn lactic và như vậy gây ô nhiễm dây chuyền sản xuất. Ngoài ra, theo phương pháp sản xuất 2, vi khuẩn lactic có thể được trộn một cách đồng đều với bột nhào sôcôla trong thời gian ngắn hơn.

Việc trộn sôcôla chứa vi khuẩn lactic có thể được thực hiện bằng cách thêm, ngoài bột vi khuẩn lactic, các chất phụ gia khác trong khoảng lượng được thay đổi thích hợp, chẳng hạn như trong khoảng từ 0 đến 70% trọng lượng của khối cacao, từ 0 đến 20% trọng lượng của tổng lượng bột sữa, từ 0 đến 25% trọng lượng bơ ca cao, từ 0 đến 20% trọng lượng dầu hoặc chất béo thực vật, và từ 0 đến 45% trọng lượng đường. Ngoài ra, các nguyên liệu phụ trợ như các chất nhũ hoá và hương

liệu có thể được thêm vào nếu thích hợp, và các lượng trộn của chúng có thể được điều chỉnh một cách thích hợp. Hơn nữa, thực phẩm thô với lượng từ 0 đến 15% trọng lượng và oligosacarit với lượng từ 0 đến 10% trọng lượng có thể được trộn.

3. Thử nghiệm sự đề kháng của sôcôla chứa vi khuẩn lactic đối với dịch vị nhân tạo

Trên cơ sở phương pháp sản xuất 2, sôcôla chứa vi khuẩn lactic được chế biến sao cho hàm lượng bột vi khuẩn lactic trở thành 0,25% trọng lượng. Tức là, chỉ hàm lượng bột vi khuẩn lactic được thay đổi theo bảng 4. Sử dụng sôcôla chứa vi khuẩn lactic làm mẫu thì thử nghiệm sự kháng dịch vị nhân tạo được thực hiện theo quy trình sau đây.

(1) Môi trường MRS được điều chỉnh đến độ pH định trước và được bổ sung pepsin 0,04% được sử dụng làm dịch vị nhân tạo (theo tài liệu phi sáng chế 1). Môi trường là 300ml. Dịch vị nhân tạo nêu trên được điều chỉnh đến độ pH 2,5 bằng axit clohydric loãng. Do thành phần chính của axit dạ dày là axit clohydric nên các axit khác không được sử dụng.

(2) Một miếng sôcôla (2g) được nhúng trong dịch vị nhân tạo được giữ ở nhiệt độ 37°C, được lắc đến mức độ mà bề mặt chất lỏng gọn nhẹ, và 1ml dịch vị nhân tạo được lấy ra sau 30 phút, 1 giờ và 2 giờ, sau đó số lượng vi khuẩn còn sống trong đó được tính. Phương pháp đo số lượng vi khuẩn còn sống được thực hiện theo cùng cách thức như trong thí nghiệm khoảng thời gian trên số lượng vi khuẩn còn sống trong vi khuẩn lactic. Có lưu ý là thời gian tối đa là 2 giờ do thời gian cần cho các chất tiêu hóa trong dạ dày được vận chuyển hoàn toàn đến tá tràng là khoảng 2 giờ. Thêm nữa, với đối chứng, các thử nghiệm được thực hiện tương tự trên các đồ uống chứa vi khuẩn lactic mà chứa vi khuẩn Labre bằng cách điều chỉnh thích hợp lượng thêm vào sao cho số lượng vi khuẩn còn sống vào thời gian bổ sung trong dịch vị nhân tạo là khoảng tương tự với số lượng vi khuẩn còn sống của sôcôla chứa vi khuẩn lactic.

(3) Kết quả

Do thử nghiệm tương tự được thực hiện ba lần ở những ngày và thời điểm khác nhau, các kết quả được thể hiện trong bảng 5. Các kết quả này được thể hiện trong các đồ thị ở Fig.5. Trong thử nghiệm thứ ba, hai loại đồ uống chứa vi khuẩn lactic chứa vi khuẩn Labre được sử dụng làm mẫu so sánh.

Bảng 5

Các kết quả thử nghiệm vào ngày thứ 1

	thời gian bổ sung	30 phút	1 giờ	2 giờ
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic	8,62E +07	3,24E +06	6,90E +05	2,82E +04
Đồ uống chứa vi khuẩn lactic chứa vi khuẩn Labre	5,60E +07	4,71E +04	1,47E +04	4,50E +03

Các kết quả thử nghiệm vào ngày thứ 2

	thời gian bổ sung	30 phút	1 giờ	2 giờ
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic	8,62E +07	2,13E +07	6,18E +06	7,77E +04
Đồ uống chứa vi khuẩn lactic chứa vi khuẩn Labre	5,60E +07	5,58E +05	2,88E +04	8,70E +03

Các kết quả thử nghiệm vào ngày thứ 3

	thời gian bổ sung	30 phút	1 giờ	2 giờ
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic	8,62E +07	1,47E +07	3,81E +05	6,30E +04
Đồ uống chứa vi khuẩn lactic chứa vi khuẩn Labre	4,25E +07	9,60E +03	6,30E +03	3,90E +03
Đồ uống chứa vi khuẩn lactic chứa vi khuẩn Labre (sản phẩm khác)	5,00E +07	1,20E +05	2,46E +04	1,20E +03

Từ các kết quả thử nghiệm của sôcôla chứa vi khuẩn lactic kháng lại dịch vị nhân tạo, bất ngờ nhận thấy rằng sôcôla chứa vi khuẩn lactic được điều chế bằng phương pháp sản xuất 2 có tỷ lệ sống sót của vi khuẩn lactic trong dịch vị nhân tạo rất cao và tỷ lệ sống sót này là cao hơn nhiều so với tỷ lệ sống sót của vi khuẩn trong đồ uống chứa vi khuẩn lactic làm mẫu đối chứng.

4. Thử nghiệm so sánh sự kháng của sôcôla chứa vi khuẩn lactic và bột vi khuẩn lactic đối với dịch vị nhân tạo

Đối với thử nghiệm kháng dịch vị nhân tạo của sôcôla chứa vi khuẩn lactic, thử nghiệm kháng dịch vị nhân tạo sử dụng sôcôla chứa vi khuẩn lactic được chuẩn bị sao cho hàm lượng bột vi khuẩn lactic trở thành 0,25% trọng lượng trên cơ sở

phương pháp sản xuất 2 và chính bột vi khuẩn lactic được thực hiện theo cùng cách thức như trong thử nghiệm kháng dịch vị nhân tạo của sôcôla chứa vi khuẩn lactic.

Tuy nhiên, đối với mẫu đối chứng, bột vi khuẩn lactic được điều chỉnh một cách thích hợp sao cho số lượng vi khuẩn sống sót vào thời gian bổ sung trong dịch vị nhân tạo là xấp xỉ bằng với số lượng này trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic, và thử nghiệm tương tự được tiến hành.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 6. Fig.6 thể hiện đồ thị các kết quả.

Bảng 6

	thời gian bổ sung	30 phút	1 giờ	2 giờ
Sôcôla chứa vi khuẩn lactic	8,75E+07	1,89E+07	1,71E+07	1,56E+07
Bột vi khuẩn lactic	6,21E+07	1,10E+06	2,82E+04	0,00E+00

Trong thử nghiệm kháng dịch vị nhân tạo của ví dụ tham khảo này, phát hiện thấy rằng tỷ lệ sống sót của vi khuẩn lactic lúc kết thúc 30 phút, 1 giờ và 2 giờ trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo sáng chế, tức là sự kháng dịch vị nhân tạo của vi khuẩn lactic trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic là cao hơn nhiều so với sự kháng lại của vi khuẩn này trong bột vi khuẩn lactic.

5. Thử nghiệm khoảng thời gian về số lượng vi khuẩn lactic sống sót trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic

Theo cùng cách thức như trong thử nghiệm kháng dịch vị nhân tạo của sôcôla chứa vi khuẩn lactic, sôcôla chứa vi khuẩn lactic có hàm lượng 0,25% trọng lượng bột vi khuẩn lactic được chế biến trên cơ sở phương pháp sản xuất 2.

Số lượng vi khuẩn lactic sống sót trong mẫu sôcôla chứa vi khuẩn lactic ngay sau khi sản xuất, hoặc mẫu được bảo quản trong 1 tháng đến 14 tháng ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 18°C) được kiểm tra bằng phương pháp sau đây. Thử nghiệm tương tự cũng được tiến hành trên kẹo mềm chứa vi khuẩn lactic làm mẫu đối chứng.

(1) Một mảnh hoặc khoảng 1g mẫu được lấy ra, và khối được đo chính xác. Mẫu được đặt trong 100ml chất pha loãng, được lắc mạnh, và được tạo hỗn dịch đồng đều làm mẫu dung dịch gốc. 1ml mẫu dung dịch gốc được thêm vào 9ml chất pha loãng được phân phối riêng và được làm loãng gấp 10 lần. Quy trình tương tự được lặp lại để điều chế dung dịch mẫu.

(2) Lượng thích hợp của 1ml hoặc ít hơn dung dịch mẫu được phân phối vào hai đĩa cạn có nắp, và môi trường thạch trắng MRS được giữ ở 50°C được thêm vào đó, trộn và sau đó hóa rắn.

(3) Sau khi hóa rắn, sự nuôi cấy kỵ khí được thực hiện ở nhiệt độ từ 35 đến 37°C trong 48 đến 72 giờ, và số lượng cụm khuẩn mà đã xuất hiện được tính để thu được số lượng thực khuẩn trung bình.

(4) Số lượng vi khuẩn sống sót (CFU) trong 1g mẫu được tính bằng công thức tính sau đây.

Số lượng vi khuẩn sống sót (CFU/g) = Số lượng cụm khuẩn trung bình (CFU) × Hệ số pha loãng × Mẫu dung dịch gốc (ml)/Lượng bổ sung mẫu dung dịch (ml)/Lượng được lấy mẫu (g)

(5) Kết quả

Thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 18°C) và các kết quả được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7

	Ngày sau khi sản xuất	1 tháng	2 tháng	6 tháng	12 tháng	14 tháng
Số lượng vi khuẩn sống sót (CFU/g)	1,04E+08	1,16E+08	1,60E+08	9,08E+07	8,08E+07	6,62E+07
Tỷ lệ sống sót	100%	111%	153%	87%	77%	63%

Liên quan đến kẹo mềm chứa vi khuẩn lactic, thí nghiệm khoảng thời gian số lượng vi khuẩn lactic được kiểm tra một cách tương tự, và các kết quả được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8

	Ngày sau khi sản xuất	1 tháng	2 tháng
Số lượng vi khuẩn sống sót (CFU/g)	2,18E+07	3,43E+03	5,95E+01

Trong kẹo mềm, hầu hết vi khuẩn lactic chết vào lúc một tháng sau khi sản xuất và có rất ít vi khuẩn sống sót sau hai tháng. Có thể thấy rằng tỷ lệ sống sót hầu như là 0% hoặc là trong 1 tháng hoặc 2 tháng sau khi sản xuất. Khi so sánh, sôcôla chứa vi khuẩn lactic có thể duy trì cực kỳ ổn định trạng thái vi khuẩn sống sót của vi khuẩn lactic. Hơn nữa, khi nhìn vào các kết quả mẫu sau 14 tháng sản xuất ở

nhệt độ trong phòng (khoảng 18°C), vi khuẩn lactic được bảo đảm là sống sót trong 1 năm ở nhiệt độ trong phòng do tính ổn định tốt của vi khuẩn lactic.

6. So sánh số lượng vi khuẩn lactic có trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic được sản xuất bằng mỗi phương pháp sản xuất

Số lượng vi khuẩn lactic mỗi gam sôcôla chứa vi khuẩn lactic được sản xuất tương ứng bằng phương pháp sản xuất thông thường, phương pháp sản xuất 1, và phương pháp sản xuất 2 được tính. Bảng 9 thể hiện các giá trị lý thuyết của vi khuẩn lactic được tính từ số lượng vi khuẩn lactic có trong bột vi khuẩn lactic được thêm vào và các giá trị được đo.

Bảng 9

	Phương pháp sản xuất thông thường	Phương pháp sản xuất 1	Phương pháp sản xuất 2
Giá trị lý thuyết (CFU/g)	9,24E+07	9,24E+07	9,24E+07
Giá trị được đo (CFU/g)	2,40E+07	1,04E+08	9,88E+07

Số lượng vi khuẩn lactic trong phương pháp sản xuất thông thường giảm do sự bất hoạt của vi khuẩn bởi quy trình sản xuất. Trong phương pháp sản xuất 1 và phương pháp sản xuất 2, có thể ngăn sự bất hoạt trong quy trình, và do sự khác biệt về số lượng vi khuẩn lactic là khoảng 5 lần so với phương pháp sản xuất thông thường, có thể thấy rằng mỗi phương pháp sản xuất 1 và phương pháp sản xuất 2 là phương pháp sản xuất vượt trội để gia tăng số lượng vi khuẩn sống sót khi đến dạ dày. Đối với sôcôla với mật độ cao vi khuẩn lactic vào khoảng $1,4 \times 10^9$ vi khuẩn/g bột vi khuẩn lactic được sản xuất trong quy trình theo phương pháp sản xuất 2, số lượng vi khuẩn lactic sống sót trong sôcôla sau khi được cho giữ nguyên ở 45°C trong 2 ngày được đo theo cách tương tự. Kết quả là, số lượng này hầu như không thay đổi và là khoảng $1,3 \times 10^9$ vi khuẩn/g. Từ đó, có thể cho rằng sự giảm số lượng vi khuẩn lactic trong phương pháp sản xuất thông thường là không đơn giản do nhiệt, tuy nhiên xét thấy rằng sự chuyển động trong thời gian dài trong khi bảo quản, quy trình nhào trộn hoặc tương tự ảnh hưởng đến sự giảm số lượng vi khuẩn.

7. Thử nghiệm sự kháng của sôcôla chứa vi khuẩn lactic được sản xuất bằng mỗi phương pháp sản xuất đối với dịch vị nhân tạo

Sử dụng sôcôla chứa vi khuẩn lactic được chế biến theo phương pháp sản xuất thông thường, phương pháp sản xuất 1, phương pháp sản xuất 2, thử nghiệm

sự kháng của sôcôla chứa vi khuẩn lactic đối với dịch vị nhân tạo được thực hiện theo cùng cách thức như trong thử nghiệm sự kháng của sôcôla chứa vi khuẩn lactic đối với dịch vị nhân tạo.

Kết quả

Các kết quả được biểu hiện ở dạng tỷ lệ sống sót trong bảng 10 khi số lượng vi khuẩn vào thời gian sản xuất ở mỗi phương pháp sản xuất được xác định là 100%, bởi vì số lượng vi khuẩn vào thời gian sản xuất thay đổi phụ thuộc vào mỗi phương pháp sản xuất.

Bảng 10

	Số lượng vi khuẩn vào thời gian sản xuất	30 phút	1 giờ	2 giờ
Phương pháp sản xuất thông thường	100%	37,5%	20,2%	17,6%
Phương pháp sản xuất 1	100%	33,3%	29,6%	23,1%
Phương pháp sản xuất 2	100%	38,3%	38,3%	32,1%

Từ các kết quả nêu trên, bắt ngờ nhận thấy rằng sôcôla chứa vi khuẩn lactic được chế biến bằng phương pháp sản xuất 1 và phương pháp sản xuất 2 có tỷ lệ sống sót của vi khuẩn lactic trong thử nghiệm kháng lại dịch vị nhân tạo cao hơn so với tỷ lệ sống sót của sôcôla chứa vi khuẩn lactic được chế biến bằng phương pháp sản xuất thông thường. Vì vậy, nhận thấy rằng phương pháp sản xuất 1 và phương pháp sản xuất 2 là các phương pháp sản xuất vượt trội ngay cả về sự kháng axit dạ dày.

Như được mô tả nêu trên, từ các kết quả của ví dụ tham khảo này, bắt ngờ nhận thấy rằng phương pháp sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo sáng chế là phương pháp đơn giản, tuy nhiên là phương pháp rất thuận lợi để duy trì số lượng vi khuẩn rất cao trong khi sản xuất. Hơn nữa, sôcôla chứa vi khuẩn lactic thu được bằng phương pháp sản xuất ưu việt theo sáng chế kháng lại axit dạ dày hơn so với các đồ uống chứa vi khuẩn lactic và tương tự và còn có sự kháng lại axit cao hơn so với sôcôla chứa vi khuẩn lactic được sản xuất bằng phương pháp sản xuất thông thường. Hơn nữa, sôcôla chứa vi khuẩn lactic được sản xuất bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế được xem là sôcôla mà tăng thêm tác dụng của các lợi khuẩn, và là thực phẩm với vị rất ngon và rất hữu ích cho sự duy trì sức khỏe.

Ví dụ tham khảo 2: Sôcôla chứa vi khuẩn lactic (Vi khuẩn lactic khác ngoài vi khuẩn Labre)

1. Sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic

Sử dụng công thức như thể hiện trong bảng 4, sôcôla chứa vi khuẩn lactic được chế biến theo phương pháp sản xuất 2 bằng cách thay đổi vi khuẩn Labre bằng vi khuẩn lactic khác, cụ thể là *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium longum*, hoặc *Leuconostoc mesenteroides* sao cho bột vi khuẩn lactic là 0,5% trọng lượng trong trường hợp *Leuconostoc mesenteroides* hoặc 0,25% trọng lượng trong trường hợp của 4 vi khuẩn còn lại.

2. Thử nghiệm khoảng thời gian mà số lượng vi khuẩn lactic sống sót trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic

Liên quan đến sôcôla chứa vi khuẩn lactic được sản xuất, đối với khoảng thời gian mà số lượng vi khuẩn lactic sống sót trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic ở ví dụ tham khảo 1, số lượng vi khuẩn lactic sống sót trong mẫu sôcôla chứa vi khuẩn lactic ngay sau khi sản xuất hoặc sau khi bảo quản ở nhiệt độ trong phòng ở khoảng 18°C đến khoảng 25°C trong 1 tháng đến 3 tháng được kiểm tra. Các kết quả được thể hiện trong bảng 11 dưới đây. Phát hiện thấy rằng vi khuẩn trong nhiều sôcôla chứa vi khuẩn lúc 3 tháng sau khi sản xuất có thể được duy trì ở trạng thái sống và cực kỳ ổn định của nhiều vi khuẩn.

Bảng 11

	Ngay sau khi sản xuất	1 tháng	2 tháng	3 tháng
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4,43E+07	4,62E+07	6,00E+07	4,43E+07
<i>Lactobacillus gasseri</i>	5,88E+07	5,43E+07	7,52E+07	6,87E+07
<i>Enterococcus faecalis</i>	3,89E+07	3,56E+07	4,39E+07	3,45E+07
<i>Bifidobacterium longum</i>	4,66E+07	4,21E+07	4,32E+07	4,89E+07

<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1,28E+08	1,27E+08	—	1,22E+08
----------------------------------	----------	----------	---	----------

3. Thử nghiệm sự kháng lại của sôcôla chứa vi khuẩn lactic đối với dịch vị nhân tạo

Thử nghiệm sự kháng lại của sôcôla chứa vi khuẩn lactic được sản xuất đối với dịch vị nhân tạo được thực hiện theo cùng cách thức như trong ví dụ tham khảo 1. Ngoài ra, đối với mẫu đối chứng, các thử nghiệm cũng được thực hiện tương tự đối với mỗi loại bột vi khuẩn. Các kết quả được thể hiện trong bảng 12 dưới đây. Phát hiện thấy rằng sự kháng lại của vi khuẩn lactic trong nhiều sôcôla chứa vi khuẩn kháng lại dịch vị nhân tạo là cao hơn nhiều so với bột vi khuẩn lactic.

Bảng 12

		thời gian bổ sung	30 phút	1 giờ	2 giờ
<i>Lacto-bacillus acidophilus</i>	sôcôla chứa	1,02E+08	7,14E+07	4,32E+07	4,68E+07
	Bột vi khuẩn	6,67E+07	2,26E+07	1,69E+07	1,83E+07
<i>Lacto-bacillus gasseri</i>	sôcôla chứa	1,27E+08	5,43E+07	4,14E+07	6,24E+07
	Bột vi khuẩn	5,98E+07	1,33E+07	6,96E+06	6,90E+05
<i>Enterococcus faecalis</i>	sôcôla chứa	8,34E+07	7,86E+07	3,57E+07	3,00E+07
	Bột vi khuẩn	5,15E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>Bifidobacterium longum</i>	sôcôla chứa	1,02E+08	3,18E+07	1,05E+07	9,30E+05
	Bột vi khuẩn	6,76E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	sôcôla chứa	5,42E+08	1,44E+08	7,20E+07	8,58E+07
	Bột vi khuẩn	5,08E+08	2,40E+03	0,00E+00	8,40E+03

Ví dụ tham khảo 3: Sôcôla hạnh nhân chứa vi khuẩn lactic

1. Sản xuất sôcôla hạnh nhân chứa vi khuẩn lactic

Vi khuẩn Labre được sử dụng làm vi khuẩn lactic, và bột vi khuẩn Labre

được điều chế theo cùng cách thức như trong ví dụ tham khảo 1. Tỷ lệ trộn được thể hiện trong bảng 13 dưới đây. Đối với sơ đồ phương pháp sản xuất được thể hiện trong Fig.4B, bột vi khuẩn lactic được thêm vào bột nhào sôcôla mà đã được bảo quản ở 42°C đến 43°C và sau đó được điều chỉnh đến 37°C đến 38°C, và sôcôla được sử dụng để bọc hạnh nhân. Sôcôla hạnh nhân chứa vi khuẩn lactic có thể được tạo ra bằng cách trộn bột vi khuẩn lactic với 0 đến 45% trọng lượng đường, 0 đến 20% trọng lượng của tổng lượng bột sữa, 0 đến 70% trọng lượng khối ca cao, 0 đến 25% trọng lượng bơ ca cao, và 0 đến 20% trọng lượng dầu hoặc chất béo thực vật, lượng này được thay đổi thích hợp trong khoảng nêu trên. Ngoài ra, các nguyên liệu phụ như các chất nhũ hoá và hương liệu có thể được thêm nếu thích hợp, và lượng trộn của chúng có thể được điều chỉnh một cách thích hợp. Hơn nữa, 0 đến 15% trọng lượng của thực phẩm thô và 0 đến 10% trọng lượng của oligosacarit có thể được trộn. Loại nguyên liệu lõi không bị giới hạn ở hạnh nhân nhưng có thể thay đổi một cách thích hợp, và lượng nguyên liệu lõi được trộn có thể được điều chỉnh một cách thích hợp.

Bảng 13

	% trọng lượng
Đường	32
Hạnh nhân	25
Bột sữa toàn phần	15
Khối ca cao	14
Bơ ca cao	8
Dầu hoặc chất béo thực vật	5
Chất làm trong	0,5
Chất nhũ hóa	0,4
Hương liệu	0,1
Bột vi khuẩn lactic	0,4
Tổng trọng lượng	100

2. Thử nghiệm khoảng thời gian mà số lượng vi khuẩn lactic sống sót trong sôcôla hạnh nhân chứa vi khuẩn lactic

Liên quan đến sôcôla hạnh nhân chứa vi khuẩn lactic, đối với thử nghiệm khoảng thời gian mà số lượng vi khuẩn lactic sống sót trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic trong ví dụ tham khảo 1, số lượng vi khuẩn lactic sống sót trong mẫu sôcôla hạnh nhân chứa vi khuẩn lactic ngay lập tức sau khi sản xuất hoặc sau khi bảo quản ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 18°C) trong 3 tháng đến 7 tháng được kiểm tra.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 14 dưới đây. Phát hiện thấy rằng vi khuẩn trong sôcôla hạnh nhân chứa vi khuẩn lactic có thể được duy trì ở trạng thái sống và cực kỳ ổn định.

Bảng 14

	ngay sau khi sản xuất	3 tháng	5 tháng	7 tháng
Số lượng vi khuẩn sống sót (CFU/g)	3,70E+07	2,20E+07	8,10E+06	6,00E+06

3. Thử nghiệm sự kháng của sôcôla hạnh nhân chứa vi khuẩn lactic đối với dịch vị nhân tạo

Thử nghiệm sự kháng của sôcôla hạnh nhân chứa vi khuẩn lactic được sản xuất đối với dịch vị nhân tạo được thực hiện theo cùng cách thức như trong ví dụ tham khảo 1. Các kết quả được thể hiện trong bảng 15 sau đây. Hơn nữa, các thử nghiệm được thực hiện tương tự đối với bột vi khuẩn lactic làm mẫu đối chứng. Phát hiện thấy rằng sự kháng lại của vi khuẩn lactic trong sôcôla hạnh nhân chứa vi khuẩn lactic đối với dịch vị nhân tạo là cao hơn nhiều khi so sánh với bột vi khuẩn lactic.

Bảng 15

	thời gian bổ sung	30 phút	1 giờ	2 giờ
Sôcôla hạnh nhân chứa vi khuẩn lactic	2,62E+08	9,60E+07	8,10E+07	9,60E+07
Bột vi khuẩn lactic	2,94E+08	3,84E+04	1,14E+04	0,00E+00

Ví dụ tham khảo 4: Sôcôla không đường chứa vi khuẩn lactic

Trong ví dụ này, sôcôla không đường chứa vi khuẩn lactic được sản xuất theo công thức được thể hiện trong bảng 16 dưới đây theo phương pháp sản xuất 2.

Bảng 16

	% trọng lượng
Rượu đường	34
Khối ca cao	31
Sữa bột	16
Dầu hoặc chất béo thực vật	16

Bơ ca cao	2
Chất nhũ hoá	0,5
Hương liệu	0,2
Chất làm ngọt cao	0,1
Bột vi khuẩn lactic	0,5
Tổng trọng lượng	100

Trong thử nghiệm khoảng thời gian và thử nghiệm sự kháng lại dịch vị nhân tạo của vi khuẩn lactic, sôcôla không đường chứa vi khuẩn lactic cũng hầu như thể hiện sự ổn định tương tự qua thời gian và sự kháng lại dịch vị nhân tạo như trong ví dụ tham khảo 1.

Sôcôla không đường chứa vi khuẩn lactic có thể được tạo ra bằng cách trộn bột vi khuẩn lactic với 0 đến 50% trọng lượng rượu đường, 0 đến 70% trọng lượng khối ca cao, 0 đến 25% trọng lượng thực phẩm sử dụng sữa và tương tự làm nguyên liệu chính, 0 đến 25% trọng lượng dầu hoặc chất béo thực vật, và 0 đến 25% trọng lượng bơ ca cao, lượng này được thay đổi thích hợp trong khoảng nêu trên. Ngoài ra, các nguyên liệu phụ như các chất làm ngọt tạo độ ngọt cao, các chất nhũ hoá, hương liệu và tương tự có thể được thêm vào một cách thích hợp, và lượng trộn của chúng cũng có thể được điều chỉnh một cách thích hợp. Hơn nữa, 0 đến 15% trọng lượng của thực phẩm thô và 0 đến 10% trọng lượng của oligosacarit có thể được trộn. Oligosacarit mà có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở fructo-oligosacarit, galacto-oligosacarit, isomalto-oligosacarit, oligosacarit đậu nành, và tương tự.

Ví dụ tham khảo 5: Chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic

1. Sản xuất chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic

Chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic được điều chế sử dụng bột vi khuẩn Labre được điều chế theo cách tương tự như trong ví dụ tham khảo 1. Lượng trộn được thể hiện trong bảng 17 dưới đây. Sơ đồ phương pháp sản xuất được thể hiện trong Fig. 4C. Chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic này ở trạng thái rắn ở khoảng nhiệt độ bình thường (25°C), tuy nhiên trở thành lỏng ở khoảng nhiệt độ cơ thể người (35°C đến 40°C) và có các đặc tính vật lý giống như kem dưỡng tay.

Chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic có thể được tạo ra bằng cách trộn bột vi khuẩn lactic với 0 đến 80% trọng lượng đường, 20 đến 99% trọng lượng dầu hoặc chất béo thực vật, 0 đến 40% trọng lượng của tổng lượng bột sữa

và 0 đến 20% trọng lượng lactoza, các lượng này được thay đổi một cách thích hợp trong khoảng nêu trên. Hơn nữa, các nguyên liệu phụ như các chất tạo độ ngọt cao, chất nhũ hoá, hương liệu và tương tự có thể được thêm vào một cách thích hợp, và lượng trộn của chúng cũng có thể được điều chỉnh một cách thích hợp. Hơn nữa, 0 đến 15% trọng lượng của thực phẩm thô và 0 đến 10% trọng lượng của oligosacarit có thể được trộn. Chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic là chế phẩm sôcôla trắng hoặc chế phẩm tương tự sôcôla trắng, và có thể được sử dụng làm chế phẩm bao ngoài hoặc ở dạng nguyên liệu phủ bề mặt thực phẩm như bánh kẹo nướng và sôcôla, hoặc nguyên liệu để trang trí và tương tự, tuy nhiên chế phẩm này không bị giới hạn bởi các cách sử dụng chúng.

Bảng 17

	% trọng lượng
Đường	40
Dầu hoặc chất béo thực vật	34
Tổng lượng bột sữa	19
Lactoza	7
Bột vi khuẩn lactic	0,5
Tổng trọng lượng	100

2. Thử nghiệm khoảng thời gian mà số lượng vi khuẩn lactic sống sót trong chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic

Liên quan đến chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic được sản xuất, đối với thử nghiệm khoảng thời gian mà số lượng vi khuẩn lactic sống sót trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic trong ví dụ tham khảo 1, số lượng vi khuẩn lactic sống sót trong mẫu chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic ngay sau khi sản xuất hoặc sau khi bảo quản ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 25°C) trong 1 tháng đến 2 tháng được kiểm tra. Các kết quả được thể hiện trong bảng 18 dưới đây. Phát hiện thấy rằng vi khuẩn trong chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic có thể được duy trì ở trạng thái sống và cực kỳ ổn định.

Bảng 18

	ngay sau khi sản xuất	1 tháng	2 tháng
Số lượng vi khuẩn sống (CFU/g)	4,48E+07	4,36E+07	4,32E+07

3. Thử nghiệm sự kháng lại của chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic

đối với dịch vị nhân tạo

Thử nghiệm sự kháng lại của chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic được sản xuất đối với dịch vị nhân tạo được thực hiện theo cùng cách thức như trong ví dụ tham khảo 1. Các kết quả được thể hiện trong bảng 19 sau đây. Hơn nữa, các thử nghiệm được thực hiện tương tự khi bột vi khuẩn lactic làm đối chứng. Phát hiện thấy rằng sự kháng lại của vi khuẩn lactic trong chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic đối với dịch vị nhân tạo là cao hơn nhiều so với bột vi khuẩn lactic.

Bảng 19

	thời gian bổ sung	30 phút	1 giờ	2 giờ
Chế phẩm dầu hoặc chất béo chứa vi khuẩn lactic	2,10E+08	2,55E+07	2,46E+07	3,45E+07
Bột vi khuẩn lactic	2,29E+08	5,46E+05	3,63E+04	0,00E+00

Đơn sáng chế này dựa trên đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế số 2016-158335 nộp tại Nhật Bản (ngày nộp đơn: 11/08/2016), các nội dung của đơn được kết hợp đầy đủ trong bản mô tả này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Sôcôla chứa vi khuẩn lactic bao gồm vi khuẩn lactic ở trạng thái sống, trong đó cỡ hạt trung bình của các hạt rắn trong sôcôla chứa vi khuẩn lactic này là lớn hơn 5 μm và nhỏ hơn 7 μm , và trong đó cỡ hạt có một đỉnh phân bố.
2. Sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo điểm 1, trong đó vi khuẩn lactic là một loại bất kỳ hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm giống *Lactobacillus*, giống *Enterococcus*, giống *Bifidobacterium* và giống *Leuconostoc*.
3. Sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo điểm 1, trong đó vi khuẩn lactic là *Lactobacillus brevis*.
4. Sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vi khuẩn lactic được chứa với lượng không nhỏ hơn 1×10^4 vi khuẩn/gam và không lớn hơn 1×10^{12} vi khuẩn/gam.
5. Sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vi khuẩn lactic được chứa với lượng không nhỏ hơn 1×10^6 vi khuẩn/gam và không lớn hơn 1×10^{12} vi khuẩn/gam.
6. Thực phẩm chứa sôcôla chứa vi khuẩn lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.
7. Phương pháp sản xuất sôcôla chứa vi khuẩn lactic bao gồm bước tán nhỏ nguyên liệu thành cỡ hạt trung bình lớn hơn 5 μm và nhỏ hơn 7 μm , trong đó cỡ hạt có một đỉnh phân bố.

Fig. 1

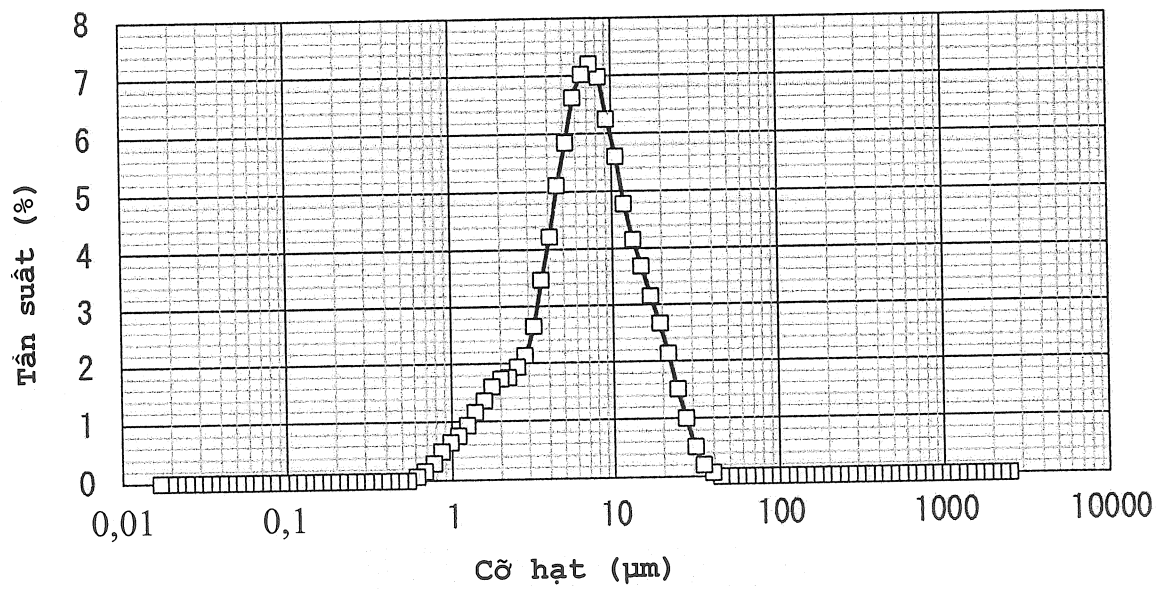


Fig. 2

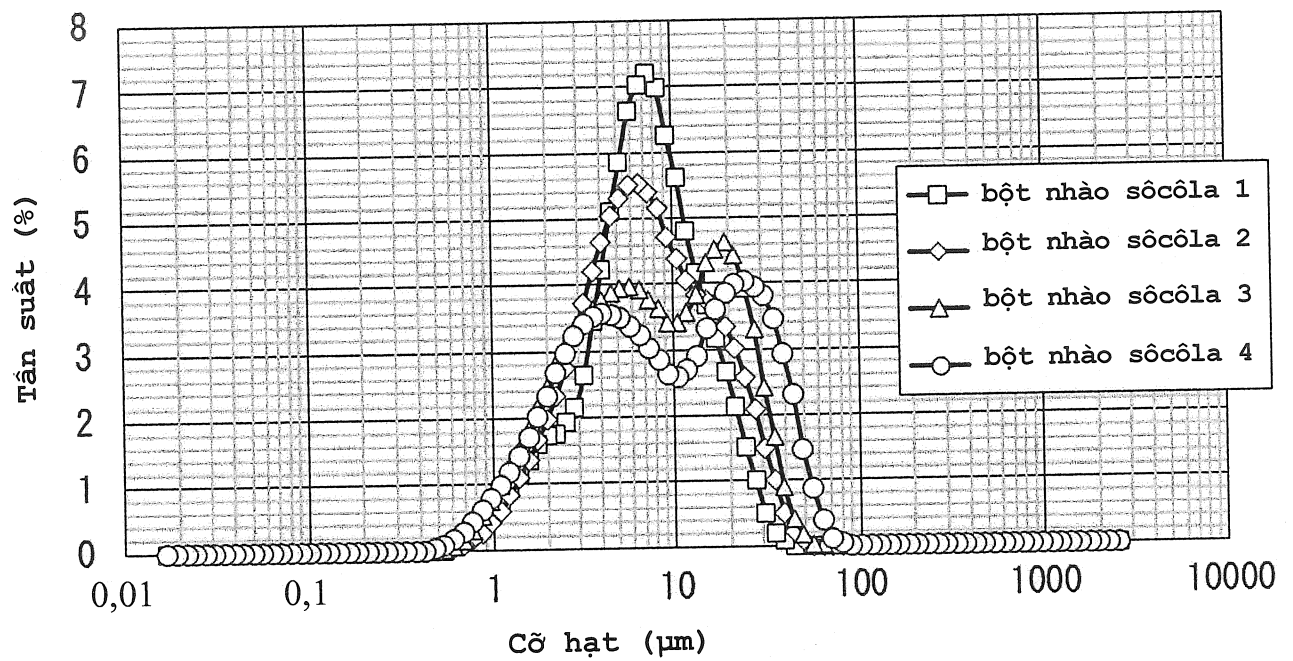


Fig. 3

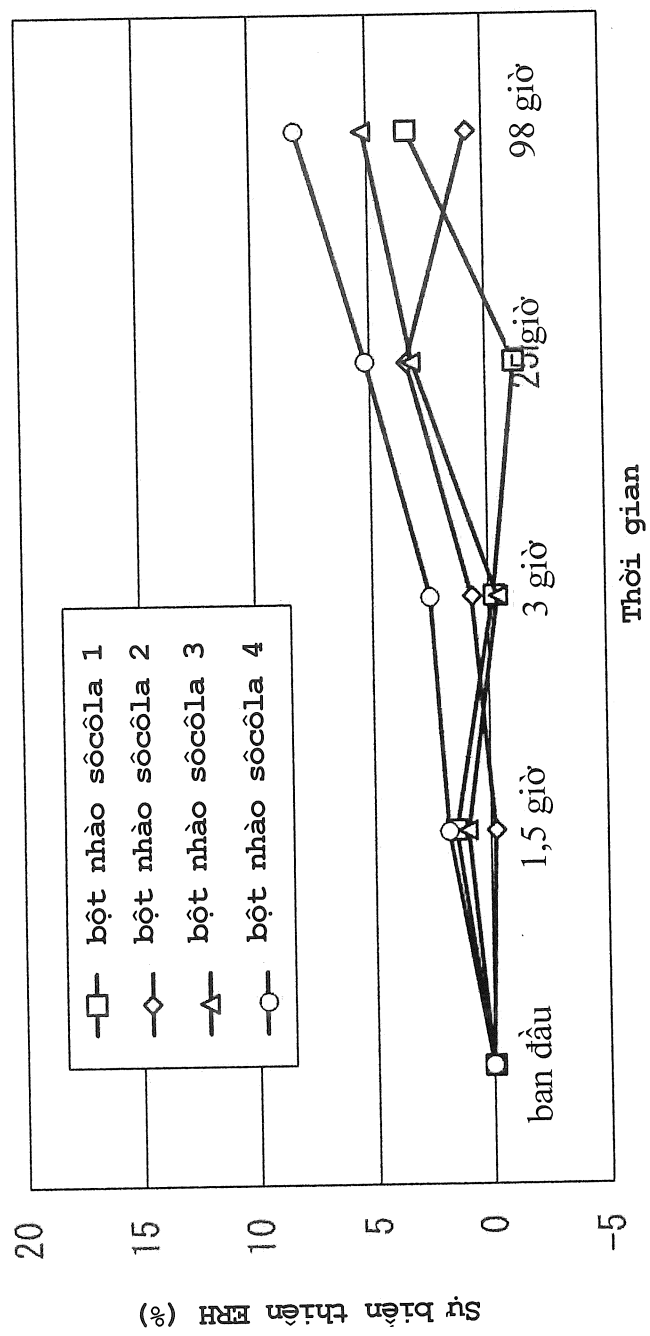


Fig. 4A

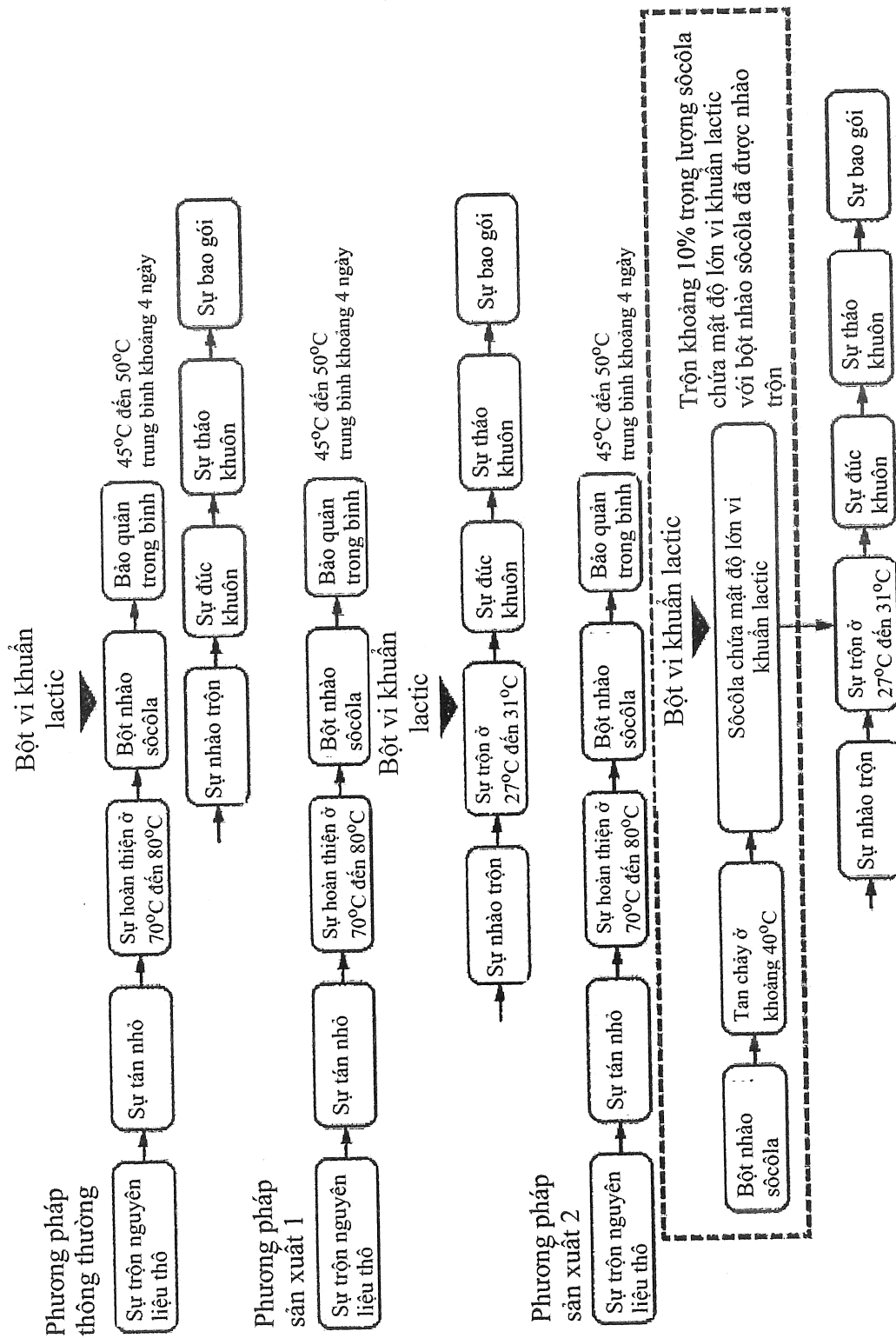


Fig. 4B

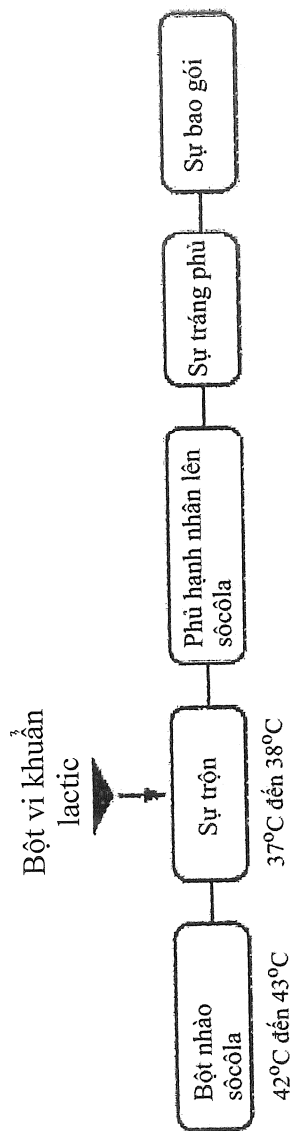


Fig. 4C

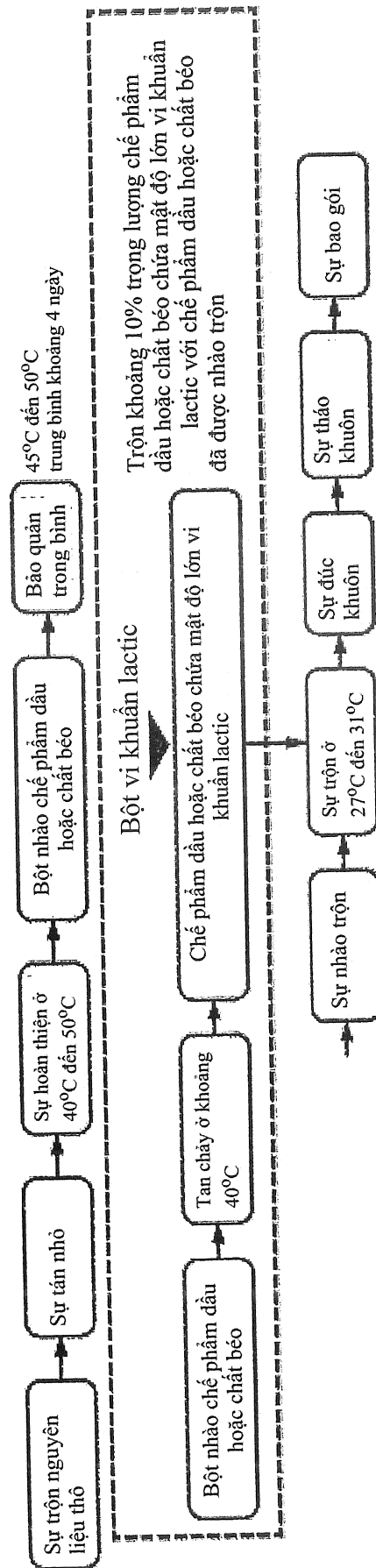
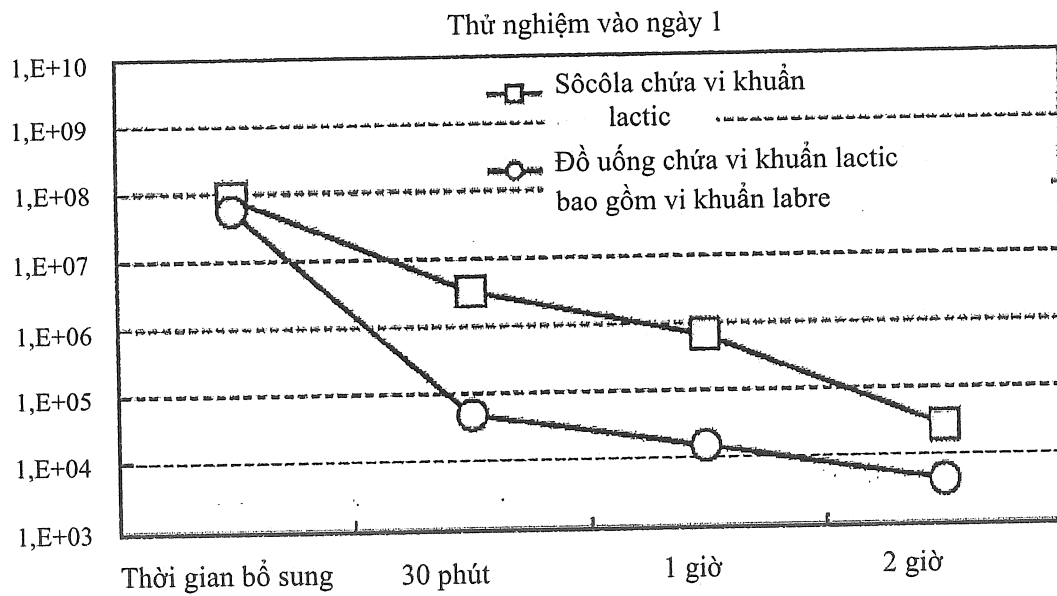
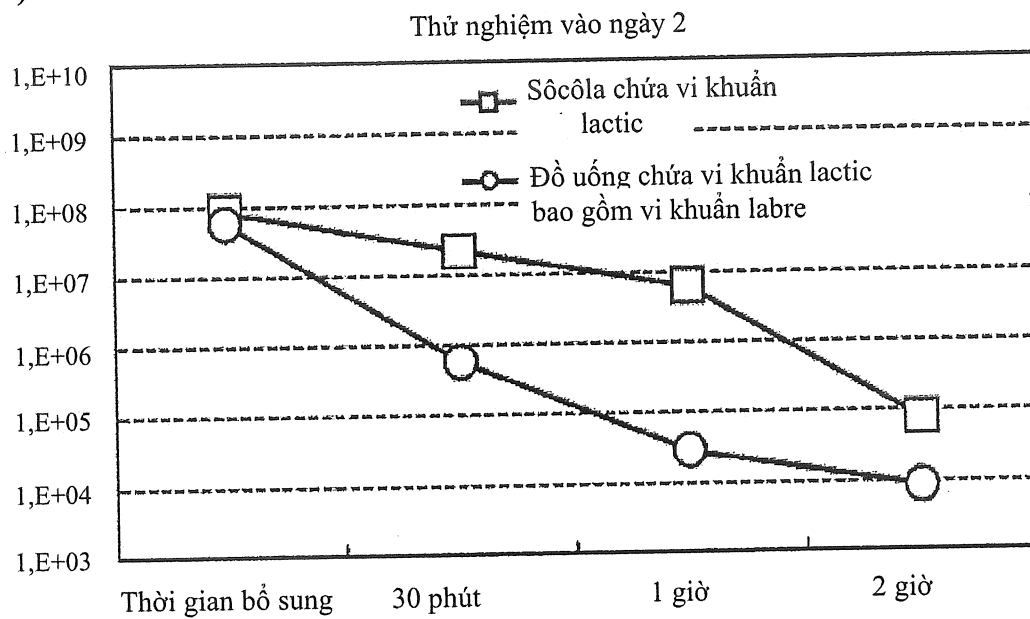


Fig. 5

(a)



(b)



(c)

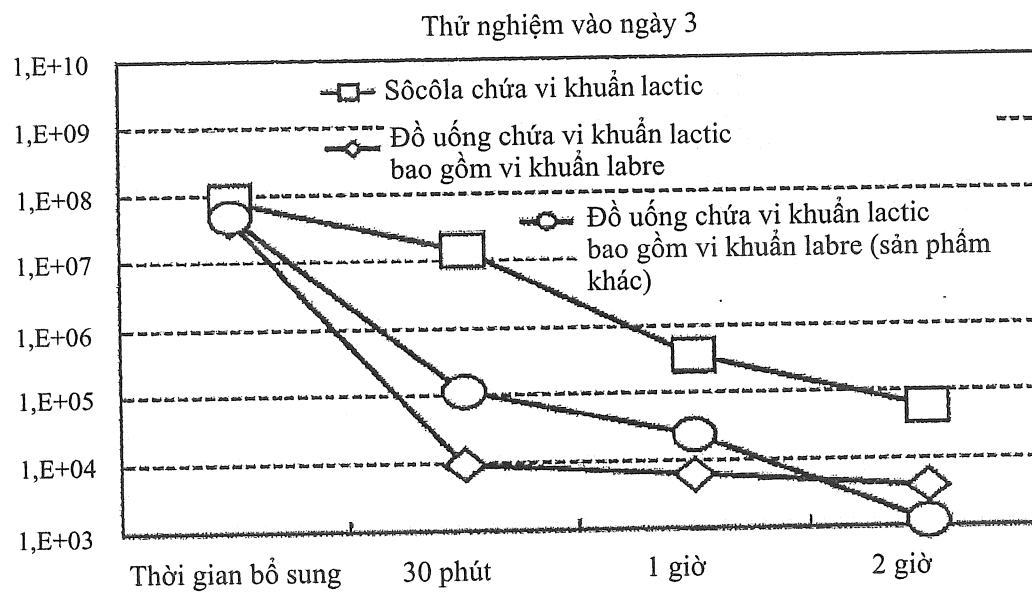


Fig. 6

