



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0038960

(51)⁷ A23C 9/123; C12N 1/20

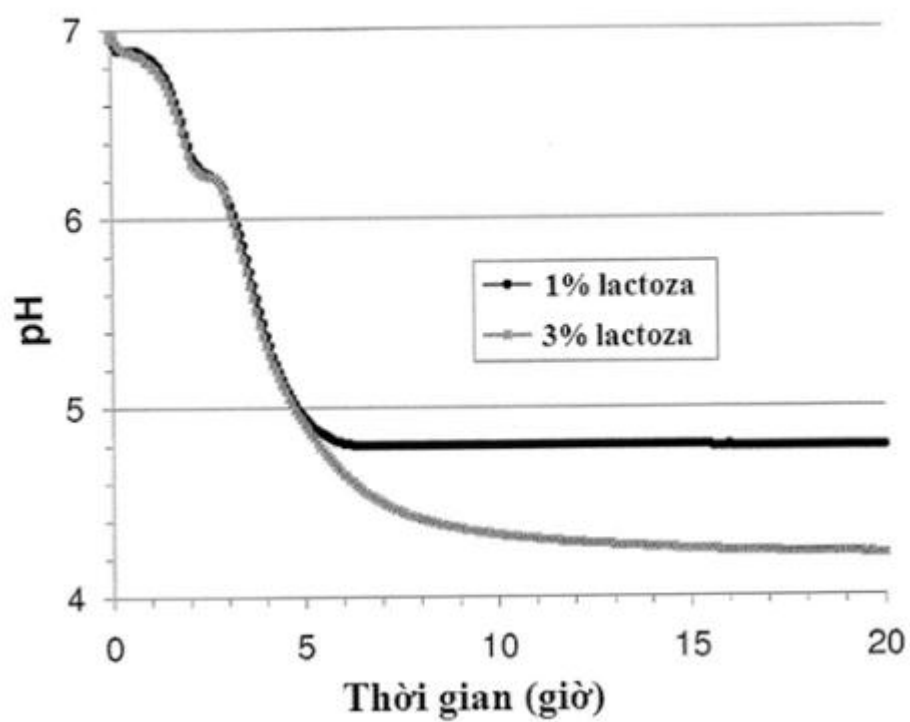
(13) B

-
- (21) 1-2016-04609 (22) 18/06/2015
(86) PCT/EP2015/063767 18/06/2015 (87) WO2015/193459 23/12/2015
(30) 14173196.8 19/06/2014 EP; 14176627.9 10/07/2014 EP; 14196125.0 03/12/2014 EP;
15156025.7 20/02/2015 EP
(45) 26/02/2024 431 (43) 27/03/2017 348A
(73) CHR. HANSEN A/S (DK)
Boege Allé 10-12, DK-2970 Hoersholm, Denmark
(72) GARRIGUES Christel (FR); GILLELADEN Christian (DK); CURIC-BAWDEN
Mirjana (US); JANZEN Thomas (DE); BIRKELUND Mimi (DK); BUCHHORN
Gäelle Lettier (DK); SOERENSEN Kim Ib (DK); CHRISTENSEN Nanna (DK);
SVANE Claus (DK); RIIS Soeren (DK); PEDERSEN Martin Bastian (DK);
ODINOT Jean-Marie (FR); JIMENEZ Luciana (FR); LANCIAUX Pascal (FR);
HAMM Duncan (NZ); SIEW Choon Ming (MY).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)
-

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM SỮA LÊN MEN VÀ SẢN PHẨM SỮA LÊN MEN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa, trong đó (a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa vi khuẩn lactic có khả năng chuyển hóa một hoặc một số hydrat cacbon có mặt trong sữa, (b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon trong bước lên men, và (c) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic. Sáng chế cũng đề cập đến sản phẩm sữa lên men được sản xuất bằng phương pháp này.

CHCC6008 - Hạn chế lactoza



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa vi khuẩn lactic và trong đó bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của hydrat cacbon có thể được chuyển hoá bằng vi khuẩn lactic. Phương pháp theo sáng chế tạo ra việc kiểm soát có cải tiến quá trình sau axit hóa, tức là quá trình axit hóa gây ra bởi vi khuẩn sau khi kết thúc bước lên men, ví dụ, trong quá trình xử lý và bảo quản tiếp theo.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phần lớn phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men hiện nay được đặc trưng bởi các bước sau:

(a) sữa được lên men bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động chứa vi khuẩn lactic (hoặc LAB) có khả năng chuyển hóa glucoza thu được từ lactoza có mặt trong sữa;

(b) bước lên men tạo ra axit lactic, dẫn đến việc giảm độ pH vào lúc ban đầu 6,4-6,8 (đối với sữa bò) đến độ pH 3,8-4,7;

(c) bước lên men được kết thúc bằng cách làm lạnh nhanh sản phẩm sữa lên men khi đã đạt đến độ pH mong muốn quá trình sản phẩm đã được lên men thu được.

Phương pháp này là ví dụ được sử dụng để tạo ra sữa chua và sữa chua uống.

Việc làm lạnh nhanh sản phẩm sữa lên men ở độ pH xác định trước được thực hiện để kết thúc bước lên men. Không cần làm lạnh sản phẩm đã được lên men, bước lên men sẽ tiếp tục. Tuy nhiên, việc làm lạnh nhanh có các nhược điểm vì nó dẫn đến việc làm mất cấu trúc. Việc tránh bước làm lạnh nhanh cũng sẽ bớt được thao tác và do đó làm giảm được chi phí tạo ra.

Ngay cả trong phương pháp bao gồm bước làm lạnh nhanh, quan sát được quá trình sau axit hóa, tức là sự tạo ra axit lactic bằng LAB sau khi kết thúc bước lên men, tức là sau khi đã đạt được độ pH mong muốn. Ngày nay, quá trình sau axit hóa được xem là một trong các vấn đề quan trọng nhất trong bước lên men các sản phẩm sữa. Việc giảm

tiếp độ pH trong quá trình chế biến và bảo quản sản phẩm sữa lên men dẫn đến các vấn đề liên quan đến việc tăng tính axit và việc giảm thời hạn sử dụng.

Vì vậy, quá trình sau axit hóa cũng có tác động bất lợi đến thời hạn sử dụng của sữa chua. Thời hạn sử dụng của sữa chua thay đổi trong khoảng từ 30 đến 50 ngày tùy thuộc vào quốc gia. Trong thời gian này, quá trình sau axit hóa làm thay đổi chất lượng của sữa chua làm cho sản phẩm bị chua và việc phân tách nước sữa giàu protein. Thông thường, chất lượng của sữa chua được duy trì tốt nhất có thể khi giữ sản phẩm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4 đến 8°C trong thời gian bảo quản. Ở nhiệt độ này, vi khuẩn sẽ chỉ có hoạt tính rất thấp. Tuy nhiên, ở nhiều quốc gia, để duy trì dây chuyền lạnh là điều khó trong thời gian bảo quản.

Do vậy, việc tạo ra sữa chua có thời hạn sử dụng dài (sữa chua ESL - Extended Shelf Life Yoghurt), đang rất được quan tâm, đặc biệt là ở các quốc gia mà để duy trì dây chuyền lạnh là điều khó. Phương pháp đã biết trong giải pháp kỹ thuật có liên quan tạo ra sữa chua ESL bao gồm bước xử lý nhiệt (thường là ở 65°C/30 giây) sau khi lên men. Việc xử lý này làm giảm đáng kể số lượng vi khuẩn được sử dụng để lên men cũng như số lượng nấm men và nấm mốc. Bước gia nhiệt cũng ức chế hoạt tính của enzym có mặt trong sữa chua. Kết quả là, sản phẩm này có thời hạn sử dụng kéo dài đến 9 tháng, trong đó quan sát được không có hoặc có rất ít quá trình sau axit hóa và các thay đổi về hương vị.

Tuy nhiên, việc xử lý nhiệt có tác động bất lợi đến chất lượng của sữa chua và gây ra các thay đổi về hương vị và cấu trúc. Một tác động bất lợi khác nữa của việc xử lý nhiệt là khử bỏ hoặc làm mất đi các lợi ích về mặt sức khỏe thu được nhờ ăn vi khuẩn sống.

Một trong số các phương pháp kiểm soát quá trình sau axit hóa là tập trung vào việc tạo ra các sản phẩm sữa có độ pH có tính axit tương đối. Trong phương pháp này việc LAB sinh trưởng tiếp và sự tạo ra axit lactic được ức chế bởi độ pH có tính axit. Tuy nhiên, việc tạo ra tiếp axit lactic chỉ được ức chế và không được kết thúc hoàn toàn và phương pháp này rõ ràng là không thích hợp để tạo ra sản phẩm sữa lên men có vị dịu nhẹ.

Đã giả định rằng quá trình sau axit hóa được kiểm soát bằng hoạt tính chuyển hóa của *L. bulgaricus* và được gây ra bởi sự hấp thu peptit và các chủng không có sự chuyển

hóa axit amin được tạo ra để kiểm soát quá trình sau axit hóa (US2010/0021586 và WO2006/042862A1). Một phương pháp khác để kiểm soát quá trình sau axit hóa đã được mô tả trong tình trạng kỹ thuật và bao gồm các quy trình dựa vào việc sử dụng các chủng vi khuẩn lactic đặc hiệu được đặc trưng bởi hoạt tính sau axit hóa yếu (WO2010/139765).

Một phương pháp khác để làm giảm đến mức tối thiểu quá trình sau axit hóa là dựa vào việc kiểm soát tỷ lệ giữa protein và lactoza, việc kiểm soát khả năng tạo đệm và việc duy trì khả năng tạo đệm và độ pH trong khoảng định trước trong bước lên men (WO2013/169205). Tuy nhiên, phương pháp này cần xác định các thông số xử lý trong bước lên men và có thể cần đến việc bổ sung protein hoặc lactoza hoặc dung dịch đệm vào môi trường lên men để đảm bảo rằng khoảng định trước được duy trì trong bước lên men này.

Rõ ràng là, vẫn có nhu cầu về phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men cải tiến, mà phương pháp này tạo ra sự kiểm soát tốt hơn hoạt tính sau axit hóa trong sản phẩm sữa lên men.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề nêu trên được giải quyết bằng phương pháp theo sáng chế, mà tạo ra sản phẩm sữa với hoạt tính sau axit hóa cực kỳ thấp.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa vi khuẩn lactic có khả năng chuyển hóa một hoặc một số hydrat cacbon có mặt trong sữa,

(b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon trong bước lên men, và

(c) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra bởi hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic.

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng việc kết thúc bước lên men có thể được kiểm soát bằng nồng độ của hydrat cacbon trong sữa đã được lên men mà không gây ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả hoặc thời gian cần cho bước lên men. Đây là điều bất ngờ vì đã giả định rằng việc làm giảm hydrat cacbon có mặt trong sữa mà sẵn có cho LAB để lên men sẽ ức chế hoặc trì hoãn bước lên men và do đó làm cho bước lên men

không có hiệu quả mà không thể sử dụng được trong tạo ra sản phẩm sữa lên men, như sữa chua, ở quy mô lớn. Các tác giả sáng chế cũng đã bất ngờ phát hiện ra rằng bước lên men diễn tiến một cách nhanh chóng đến một thời điểm mà tại đó về cơ bản toàn bộ hydrat cacbon đã được tiêu thụ nhờ LAB và tiếp theo kết thúc gần như hoàn toàn (Fig.1; 1% lactoza). Đã kỳ vọng rằng bước lên men với sự có mặt của nồng độ hydrat cacbon rất thấp sẵn có đối với LAB sẽ dẫn đến việc làm cho hoạt tính axit hóa của LAB thấp trong một khoảng thời gian dài.

Theo cách khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó:

(i) môi trường nuôi cấy khởi động này chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,

(ii) bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 45°C,

(iii) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của hydrat cacbon trong bước lên men,

(iv) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic, và

trong đó sản phẩm sữa lên men được đặc trưng bởi độ pH của sản phẩm này được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men ở nhiệt độ sử dụng để lên men ở bước (ii) trong thời gian 20 giờ. Điều này có nghĩa là phương pháp này không nhất thiết bao gồm bước duy trì sản phẩm sữa lên men trong thời gian 20 giờ sau khi kết thúc bước lên men ở nhiệt độ sử dụng để lên men ở bước (ii). Đây chỉ là thử nghiệm về mặt chức năng có thể được sử dụng để xác nhận quá trình sau axit hóa thấp. Việc duy trì độ pH của sản phẩm sữa lên men trong khoảng 0,3 đơn vị pH trong thời gian 20 giờ nếu được bảo quản ở nhiệt độ để lên men là chỉ báo về quá trình sau axit hóa rất thấp.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men mà được đặc trưng bởi về cơ bản có quá trình sau axit hóa. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men tương ứng bao gồm bước lên men sữa bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó:

(i) môi trường nuôi cấy khởi động này chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,

(ii) bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 45°C,

(iii) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của hydrat cacbon trong bước lên men,

(iv) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic, và

trong đó sản phẩm sữa lên men được đặc trưng bởi độ pH của sản phẩm này được duy trì ở khoảng 0,1 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men ở nhiệt độ sử dụng để lên men ở bước (ii) trong thời gian 20 giờ. Việc duy trì độ pH của sản phẩm sữa lên men trong khoảng 0,1 đơn vị pH trong thời gian 20 giờ nếu được bảo quản ở nhiệt độ để lên men là chỉ báo về sự không có mặt của quá trình sau axit hóa.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm:

(a) bước lên men sữa bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó:

(i) bước lên men được khởi động bằng cách sử dụng sữa và môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó nồng độ lactoza trong sữa nằm trong khoảng từ 5 đến 100mg/g ở thời điểm bắt đầu lên men

(ii) môi trường nuôi cấy khởi động này chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,

(iii) bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 45°C,

(iv) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của lactoza trong bước lên men,

(v) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic, và

(b) bước đóng gói sản phẩm đã được lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C.

Do quá trình sau axit hóa thấp, phương pháp này không đòi hỏi bước làm lạnh sau khi lên men.

Sáng chế cũng đề cập đến sản phẩm sữa lên men thu được bằng phương pháp này. Các sản phẩm sữa lên men này được đặc trưng bởi việc duy trì độ pH của sản phẩm trong khoảng 0,3 đơn vị pH trong thời gian 20 giờ nếu được bảo quản ở nhiệt độ sử dụng để lên men. Các sản phẩm này còn được đặc trưng bởi nồng độ hydrat cacbon rất thấp có thể được chuyển hoá bằng LAB được sử dụng cho bước lên men. Các hydrat cacbon khác có thể có mặt với nồng độ cao hơn đáng kể.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự so sánh quá trình hoạt tính axit hóa của chủng *S. thermophilus* CHCC6008 khi được sử dụng để cấy sữa chứa 1 và 3% lactoza.

Fig.2 thể hiện sự so sánh quá trình hoạt tính axit hóa của *S. thermophilus* CHCC15914 và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* CHCC10019 với quá trình hoạt tính axit hóa của *S. thermophilus* CHCC17862 và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* CHCC18944 khi được sử dụng để lên men sữa được bổ sung sucroza.

Fig.3 thể hiện quá trình hoạt tính axit hóa của tỷ lệ khác nhau giữa *S. thermophilus* CHCC17861 và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* CHCC18944 khi được sử dụng để lên men sữa được bổ sung sucroza và so sánh với quá trình hoạt tính axit hóa của *S. thermophilus* CHCC15914.

Fig.4 thể hiện quá trình sau axit hóa, tức là phụ thuộc độ pH trong hai sản phẩm sữa lên men khác nhau sau khi lên men bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế (Acidifix) và phương pháp đã biết trong giải pháp kỹ thuật có liên quan (YFL-904).

Fig.5 thể hiện sự phụ thuộc độ pH trong môi trường nuôi cấy được lên men bằng Sweety sau khi kết thúc bước lên men ở 6°C trong 42 ngày (tức là quá trình sau axit hóa). Hình vẽ này cho thấy rằng độ pH thay đổi nhỏ hơn 0,1 đơn vị pH trong các điều kiện này.

Fig.6 thể hiện phụ thuộc độ pH trong môi trường nuôi cấy khác nhau được lên men bằng và không bằng lactaza trong thời gian bảo quản ở nhiệt độ làm lạnh trong thời gian 48 ngày.

Fig.7 thể hiện tổng quan về phương pháp lên men bằng cách sử dụng bước cô đặc protein trước khi lên men (phần ở phía bên tay trái) và bước cô đặc protein sau khi lên

men bằng cách phân tách bằng cách sử dụng phương pháp ly tâm hoặc siêu lọc (phần phía bên tay phải).

Fig.8 thể hiện mức độ ảnh hưởng của độ pH đối với ứng suất trượt trong quá trình phân tách nước sữa ra khỏi sản phẩm sữa sau khi lên men bằng SSC17.

Fig.9 thể hiện mức độ ảnh hưởng của độ pH đối với ứng suất trượt trong quá trình phân tách nước sữa ra khỏi sản phẩm sữa sau khi lên men bằng Mild2.0.

Fig.10 thể hiện mức độ ảnh hưởng của độ pH đối với mô-đun phức hoặc độ cứng của gel trong quá trình phân tách nước sữa ra khỏi sản phẩm sữa sau khi lên men bằng SSC17.

Fig.11 thể hiện mức độ ảnh hưởng của độ pH đối với mô-đun phức hoặc độ cứng của gel trong quá trình phân tách nước sữa ra khỏi sản phẩm sữa sau khi lên men bằng Mild2.0.

Mô tả chi tiết sáng chế

Nói chung, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa vi khuẩn lactic có khả năng chuyển hóa một hoặc một số hydrat cacbon có mặt trong sữa,

(b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon trong bước lên men, và

(c) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic.

Thuật ngữ “sữa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chất lỏng được tạo ra bằng tuyến vú của động vật hoặc bằng thực vật. Phù hợp với sáng chế, sữa có thể đã được chế biến và thuật ngữ “sữa” bao gồm sữa nguyên kem, sữa không kem, sữa không béo, sữa ít béo, sữa béo, sữa giảm lactoza, hoặc sữa đặc. Sữa không béo là sản phẩm sữa không có chất béo hoặc sữa không kem. Sữa ít béo thường được xác định là sữa chứa trong khoảng từ 1% đến 2% chất béo. Sữa béo thường chứa 2% chất béo hoặc nhiều hơn. Thuật ngữ “sữa” được dự định bao hàm sữa từ nguồn động vật có vú khác nhau và nguồn thực vật. Nguồn sữa từ động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở bò, cừu, dê, trâu, lạc

đà, lạc đà không bướu, ngựa và hươu. Nguồn sữa từ thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sữa được chiết từ đậu nành, đậu, lạc, lúa mạch, gạo, yến mạch, diêm mạch, hạnh nhân, hạt điều, dừa, hạt dẻ, cây gai dầu, hạt vừng và hạt hướng dương.

Theo phương pháp và sản phẩm theo sáng chế, tốt đặc biệt là sữa có nguồn gốc từ bò được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu cho bước lên men.

Sữa giảm lactoza đã được sử dụng trong một số ví dụ theo sáng chế và hiện đang có trên thị trường (ví dụ, sữa được cung cấp từ Select Milk Nhà sản xuất Inc., Texas, USA). Sữa giảm lactoza có thể được tạo ra theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm thủy phân lactoza bằng enzym lactaza thành glucoza và galactoza, hoặc bằng cách lọc nano, điện thẩm phân tách, sắc ký trao đổi ion và ly tâm.

Thuật ngữ “nguyên liệu sữa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ nguyên liệu sữa hoặc các hợp phần từ sữa có thể được sử dụng làm môi trường để sinh trưởng và lên men LAB. Nguyên liệu sữa chứa các hợp phần có nguồn gốc từ sữa và hợp phần khác bất kỳ có thể được sử dụng nhằm mục đích sinh trưởng hoặc lên men LAB.

Thuật ngữ “vi khuẩn lactic” hoặc “LAB” được sử dụng để chỉ vi khuẩn sử dụng trong thực phẩm tạo ra axit lactic dưới dạng sản phẩm cuối chuyển hóa chính của hydrat cacbon lên men. Các vi khuẩn này có liên quan về các đặc tính sinh lý và chuyển hóa chung của chúng và thường là vi khuẩn hoặc khuẩn cầu Gram dương, GC thấp, chống chịu axit, không hình thành bào tử, không hô hấp, hình que. Trong giai đoạn lên men, việc tiêu thụ lactoza bởi các vi khuẩn này làm tạo thành axit lactic, làm giảm độ pH và dẫn đến sự tạo thành protein coagulum. Do đó, các vi khuẩn này chịu trách nhiệm về quá trình axit hóa sữa và về cấu trúc của sản phẩm từ sữa. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vi khuẩn lactic” bao hàm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., như *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* và *Leuconostoc* spp.

Bước lên men của quy trình tạo ra sản phẩm sữa lên men bao gồm việc bổ sung môi trường nuôi cấy khởi động vào sữa. Thuật ngữ “môi trường khởi đầu” hoặc “môi trường nuôi cấy khởi động” khi được sử dụng trong bản mô tả này sử dụng để chỉ môi

trường chứa một hoặc nhiều vi sinh vật sử dụng trong thực phẩm, đặc biệt là vi khuẩn lactic, mà chịu trách nhiệm về quá trình axit hóa nguyên liệu sữa. Môi trường nuôi cấy khởi động có thể là men tươi, men đông lạnh hoặc men được làm đông cô đặc. Để tạo ra sản phẩm sữa lên men, môi trường khởi đầu có thể được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 3%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,025 % theo thể tích của tổng lượng sữa.

Thuật ngữ “có khả năng chuyển hóa một hoặc một số hydrat cacbon có mặt trong sữa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hoạt tính chuyển hóa của LAB mà làm tạo ra axit lactic dưới dạng sản phẩm cuối chuyển hóa chính của bước lên men hydrat cacbon. Như sẽ được giải thích một cách chi tiết hơn dưới đây, LAB có thể chuyển hóa một, một số hoặc toàn bộ các hydrat cacbon có mặt trong sữa. Hydrat cacbon có thể có mặt trong sữa tự nhiên hoặc có thể đã được bổ sung vào sữa.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp lên men bằng cách sử dụng LAB có khả năng chuyển hóa lactoza và glucoza. Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp lên men bằng cách sử dụng LAB không có khả năng chuyển hóa glucoza nhưng có khả năng chuyển hóa các hydrat cacbon khác như lactoza và galactoza. Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp lên men bằng cách sử dụng LAB không có khả năng chuyển hóa lactoza nhưng có khả năng chuyển hóa các hydrat cacbon khác như glucoza.

Phương pháp theo sáng chế được đặc trưng bởi bước lên men sữa và bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon trong bước lên men. Điều này có nghĩa là LAB có mặt trong môi trường lên men có thể không còn tạo ra được lượng đáng kể của axit lactic do nồng độ hydrat cacbon rất thấp có thể chuyển hoá được. Theo một phương án, việc kết thúc bước lên men có thể được đặc trưng bởi độ pH mà được duy trì ở khoảng nhỏ hơn 0,3 đơn vị pH trong khi môi trường nuôi cấy được duy trì ở nhiệt độ sử dụng để lên men trong 20 giờ. Ví dụ, nếu phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa như được mô tả trên đây được thực hiện, người ta có thể dễ dàng kiểm tra xem việc kết thúc bước lên men là do sự giảm nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon trong bước lên men nhờ việc duy trì sản phẩm ở nhiệt độ để lên men trong 20 giờ. Nếu độ pH không thay đổi nhiều hơn 0,3

đơn vị pH trong thời gian này so với việc kết thúc bước lên men gây ra bởi sự giảm nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon trong bước lên men.

Phương pháp đã biết trong giải pháp kỹ thuật có liên quan mà kết thúc bước lên men bằng cách làm lạnh ngay sau khi đạt được độ pH mong muốn không thể đáp ứng được thử nghiệm này, vì hydrat cacbon còn lại sẵn có đối với hoạt tính chuyển hóa sẽ gây ra quá trình sau axit hóa đáng kể ở nhiệt độ sử dụng để lên men (Fig.1, đường cong 3%; Fig.2 và Fig.3 đường cong thấp nhất).

Phương pháp theo sáng chế còn khác biệt ở chỗ sự giảm nồng độ của hydrat cacbon ít đặc biệt là cũng gây ra bởi hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic. Điều này có nghĩa là vi khuẩn lactic góp phần làm giảm hydrat cacbon, mặc dù các hợp phần khác, ví dụ, enzym như lactaza, cũng có thể góp phần làm giảm hydrat cacbon có thể được chuyển hoá trong bước lên men.

Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đóng gói sản phẩm đã được lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C. Như đã chỉ ra trên đây, một trong số các vấn đề chính của tình trạng kỹ thuật là tập trung vào nhu cầu cần làm lạnh nhanh sản phẩm lên men để kết thúc bước lên men. Phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm bước đóng gói sản phẩm lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C. Điều này cho thấy trái ngược với phương pháp đã biết trong giải pháp kỹ thuật có liên quan, trong đó việc làm lạnh nhanh là hoàn toàn không cần thiết.

Theo một phương án khác, việc kết thúc bước lên men có thể được đặc trưng bởi nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon có thể được chuyển hoá bằng vi khuẩn lactic. Vào thời điểm kết thúc bước lên men, nồng độ của hydrat cacbon được chuyển hoá bằng vi khuẩn lactic có thể nằm trong khoảng nhỏ hơn 100mg/g, như nhỏ hơn 30mg/g, bao gồm trị số nằm trong khoảng từ 25mg/g từ 0,01mg/g, hoặc nằm trong khoảng từ 5mg/g đến 0,01mg/g.

Như đã chỉ ra trên đây, phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men theo sáng chế có thể còn được đặc trưng bởi độ pH đặc biệt ổn định trong thời gian bảo quản. Sản phẩm đã được lên men có thể được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH trong thời gian 20 giờ khi được bảo quản ở nhiệt độ sử dụng để lên men.

Theo một phương án khác, phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men theo sáng chế có thể được đặc trưng bởi nhiệt độ trong bước lên men nằm trong khoảng từ 22°C đến 45°C. Khoảng nhiệt độ này bao gồm khoảng được sử dụng cho môi trường nuôi cấy ưa nhiệt và ưa nhiệt trung bình. Thuật ngữ “ưa nhiệt trung bình” sử dụng để chỉ vi sinh vật sinh trưởng tốt nhất ở nhiệt độ vừa phải, tức là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 40°C. Các vi khuẩn ưa nhiệt trung bình hữu ích nhất trong công nghệ bao gồm *Lactococcus* spp. và *Leuconostoc* spp. Sản phẩm sữa ưa nhiệt trung bình bao gồm các sản phẩm sữa như sữa bơ, sữa chua, được nuôi cấy sữa, váng sữa, kem chua và pho mát tươi, như pho mát Đức (Quark), pho mát sữa đông và pho mát kem. Trong nội dung bản mô tả thuật ngữ “ưa nhiệt” sử dụng để chỉ vi sinh vật sinh trưởng tốt nhất ở nhiệt độ trên 40°C. Vi khuẩn ưa nhiệt hữu ích nhất trong công nghệ bao gồm *Streptococcus* spp. và *Lactobacillus* spp. Sản phẩm sữa ưa nhiệt bao gồm các sản phẩm sữa như sữa chua.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp như được mô tả trên đây, trong đó môi trường ưa nhiệt và ưa nhiệt trung bình đều được lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 45°C.

Sáng chế cũng đề cập đến sản phẩm sữa lên men thu được bằng phương pháp như được mô tả trên đây. Tốt hơn, nếu sản phẩm sữa lên men theo sáng chế là sản phẩm thức ăn lên men, bao gồm sữa chua, sữa chua vị hoa quả, sữa chua uống hoặc pho mát.

Theo phương án được ưu tiên nhất, toàn bộ các phương pháp theo sáng chế là phương pháp sản xuất sữa chua và sản phẩm theo sáng chế là sữa chua.

Thuật ngữ "sữa chua" sử dụng để chỉ các sản phẩm chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* và tùy ý các vi sinh vật khác như *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* và *Lactobacillus paracasei*, hoặc vi sinh vật bất kỳ có nguồn gốc từ chúng. Các chủng vi khuẩn lactic ngoài *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, cũng nằm trong phạm vi sáng chế để tạo ra thành phẩm có các đặc tính khác nhau, như đặc tính thúc đẩy sự cân bằng của hệ vi khuẩn. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "sữa chua" bao hàm sữa chua truyền thống, sữa chua khuấy, sữa chua uống, Petit Suisse, sữa chua được xử lý nhiệt, sữa chua dẻo hoặc sữa chua kiểu Hy Lạp được đặc trưng bởi mức protein cao và các sản phẩm giống sữa chua.

Đặc biệt, thuật ngữ “sữa chua” bao hàm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sữa chua như được xác định theo các quy định của Pháp và châu Âu, ví dụ, sản phẩm sữa đông thu được bằng cách lên men axit lactic chỉ bằng vi khuẩn lactic ưa nhiệt đặc hiệu (tức là *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*) mà được nuôi cấy một cách đồng thời và được phát hiện là sống trong sản phẩm cuối với lượng ít đặc biệt là 10 triệu CFU (đơn vị tạo thành khuẩn lạc - colony-forming unit)/g. Sữa chua có thể tùy ý chứa nguyên liệu sữa thô được bổ sung (ví dụ, kem) hoặc các thành phần khác như đường hoặc chất tạo ngọt, một hoặc nhiều chất điều vị, hoa quả, ngũ cốc, hoặc nutritional các chất dinh dưỡng, đặc biệt là các vitamin, các khoáng chất và các sợi, cũng như chất làm ổn định và chất làm đặc. Theo một phương án khác, sữa chua đáp ứng các thông số đối với sữa và sữa chua lên men theo tiêu chuẩn AFNOR NF 04-600 và/hoặc tiêu chuẩn codex StanA-lla-1975. Để thỏa mãn tiêu chuẩn AFNOR NF 04-600, sản phẩm phải không được gia nhiệt sau khi lên men và nguyên liệu sữa thô phải có tối thiểu 70% (m/m) thành phẩm.

Pho mát, như Mozzarella và pho mát pizza cũng như Feta, cũng có thể được tạo ra bằng cách lên men bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Hoier et al. (2010) trong *The Technology of Cheesemaking*, 2nd Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192).

Phương pháp theo sáng chế bao gồm nhiều phương án khác nhau. Các phương án sẽ được mô tả một cách chi tiết dưới đây:

(A) Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng sữa có hàm lượng lactoza thấp.

(B) LAB không có lactoza và phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng LAB không có lactoza.

(C) Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men có thời hạn sử dụng kéo dài.

(D) Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng LAB không có glucoza.

(E) Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bằng cách bổ sung lactaza vào bước lên men.

(F) Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men vắt dựa vào sản phẩm thu được bằng một trong các phương pháp từ (A) đến (E).

(G) Phương pháp sản xuất sản phẩm pho mát pasta filat bằng cách sử dụng một trong các phương pháp từ (A) đến (E).

A: Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng sữa có hàm lượng lactoza thấp

Theo phương án này, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa vi khuẩn lactic, mà môi trường nuôi cấy khởi động này chứa *Streptococcus thermophilus* (ST) và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* đều có khả năng chuyển hóa lactoza có mặt trong sữa,

(b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của lactoza trong bước lên men, và

(c) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic,

trong đó trước khi bổ sung môi trường nuôi cấy khởi động nồng độ của lactoza trong sữa này thấp hơn 30mg/g và nồng độ của glucoza trong sữa này thấp hơn 15mg/g. Theo một phương án khác, nồng độ của lactoza là thấp hơn 25mg/g hoặc thấp hơn 15mg/g và nồng độ của glucoza là thấp hơn 2mg/g.

Theo một khía cạnh của phương án này, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa vi khuẩn lactic, mà môi trường nuôi cấy khởi động này chứa *Streptococcus thermophilus* (ST) và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* đều có khả năng chuyển hóa lactoza có mặt trong sữa,

(b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của lactoza trong bước lên men, và

(c) sự giảm được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic,

trong đó phương pháp này còn bao gồm bước đóng gói sản phẩm đã được lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C.

Theo một phương án khác, phương pháp này có thể còn khác biệt ở chỗ độ pH của sản phẩm đã được lên men được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH hoặc trong khoảng 0,1 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men ở nhiệt độ sử dụng để lên men trong thời gian 20 giờ.

Lactoza có thể có mặt một cách tự nhiên trong sữa hoặc có thể đã được bổ sung vào sữa.

Theo phương án khác, bước lên men được gây ra bởi LAB có khả năng chuyển hóa lactoza và việc kết thúc bước lên men được gây ra bởi nồng độ của lactoza là quá thấp để bước lên men và việc tạo ra axit lactic bằng LAB được kết thúc. Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng ngay cả khi các nồng độ rất thấp này của lactoza trong sữa tạo ra nguồn hydrat cacbon đủ để lên men nhanh. Cũng đã thấy rằng một khi nồng độ của lactoza được giảm xuống dưới ngưỡng nhất định, bước lên men được kết thúc một cách nhanh chóng (Ví dụ 1, Fig.1).

Nồng độ lactoza ban đầu trong sữa có thể là dưới 30mg/g, ví dụ, nằm trong khoảng từ 30mg/g đến 5mg/g, hoặc nằm trong khoảng từ 15mg/g đến 5mg/g, hoặc nằm trong khoảng 10mg/g đến 5mg/g.

Sữa có nồng độ lactoza giảm có thể mua được trên thị trường hoặc được tạo ra theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một phương án của phương án này, sữa chứa hàm lượng lactoza giảm và không có hydrat cacbon bổ sung không có mặt tự nhiên trong sữa bò. Do đó, nồng độ glucoza ban đầu trong sữa có thể thấp hơn đáng kể 15mg/g, như dưới 2mg/g. Bước lên men có thể được thực hiện trên sữa có hàm lượng lactoza giảm và không có hydrat cacbon bất kỳ được bổ sung vào sữa bò tự nhiên.

Theo phương án khác của phương pháp này, sữa chứa hàm lượng lactoza giảm và bổ sung hydrat cacbon không có mặt tự nhiên trong sữa bò như glucoza hoặc sucroza.

B: LAB không có lactoza và phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng LAB không có lactoza

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến LAB không có lactoza.

Các thuật ngữ “sự không có chuyển hóa lactoza” và “không có lactoza” được sử dụng trong bản mô tả để xác định đặc điểm LAB mà mất một phần hoặc hoàn toàn khả năng sử dụng lactoza làm nguồn để sinh trưởng tế bào hoặc duy trì khả năng sống của tế bào. LAB tương ứng có khả năng chuyển hóa một hoặc một số hydrat cacbon được chọn từ sucroza, galactoza và/hoặc glucoza hoặc các hydrat cacbon lên men khác. Do các hydrat cacbon này không có mặt tự nhiên trong sữa với lượng đủ để hỗ trợ bước lên men bởi các thể đột biến không có lactoza, việc bổ sung các hydrat cacbon này vào sữa sẽ là điều cần thiết. LAB không có và không có một phần lactoza có thể được đặc trưng bởi các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal.

Như được mô tả chi tiết trong Ví dụ 2 dưới đây, các tác giả sáng chế đã phân lập một số LAB không có lactoza, đặc biệt là chủng *Streptococcus thermophilus* (ST) và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (LB). Các LAB không có lactoza này chuyển hóa sucroza.

Các chủng có nguồn gốc từ chủng CHCC15914 mà không có lactoza. Do đó, sáng chế đề cập đến chủng *Streptococcus thermophilus* phân lập, chủng này là chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28909.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các chủng vi khuẩn lactic không có lactoza sau:

(a) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28952;

(ii) hoặc chủng có nguồn gốc từ DSM 28952, trong đó chủng thu được còn được đặc trưng bởi chủng này có khả năng tạo ra các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(b) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28953;

(ii) hoặc chủng có nguồn gốc từ DSM 28953, trong đó chủng thu được còn được đặc trưng bởi chủng này có khả năng tạo ra các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(c) chủng *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28910;

(ii) hoặc chủng có nguồn gốc từ DSM 28910, trong đó chủng thu được còn được đặc trưng bởi chủng này có khả năng tạo ra các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng các chủng này trong phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men như mô tả ở đây. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến sản phẩm thức ăn lên men, chứa một hoặc một số chủng trong số các chủng sau:

(a) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28952;

(ii) hoặc chủng có nguồn gốc từ DSM 28952, trong đó chủng thu được còn được đặc trưng bởi chủng này có khả năng tạo ra các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(b) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28953;

(ii) hoặc chủng có nguồn gốc từ DSM 28953, trong đó chủng thu được còn được đặc trưng bởi chủng này có khả năng tạo ra các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(c) chủng *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28910;

(ii) hoặc chủng có nguồn gốc từ DSM 28910, trong đó chủng thu được còn được đặc trưng bởi chủng này có khả năng tạo ra các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal.

Sản phẩm thức ăn lên men có thể là sữa chua, sữa chua vị hoa quả, sữa chua uống hoặc pho mát.

Theo phương pháp này, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa *Streptococcus thermophilus* không có khả năng chuyển hóa lactoza và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* không có khả năng chuyển hóa lactoza,

(b) hydrat cacbon được bổ sung vào sữa có thể được chuyển hoá bằng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* như được xác định trong mục (a),

(c) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của hydrat cacbon được bổ sung vào sữa, và

(d) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* như được xác định trong mục (a).

Theo một số phương án, phương pháp còn được đặc trưng bởi bao gồm bước đóng gói sản phẩm đã được lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C.

Theo phương án khác nữa, phương pháp này có thể còn khác biệt ở chỗ độ pH của sản phẩm đã được lên men được duy trì ở khoảng 0,3 pH hoặc trong khoảng 0,1 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men ở nhiệt độ sử dụng để lên men trong thời gian 20 giờ.

Tổng nồng độ của hydrat cacbon có thể được chuyển hoá bằng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* như được xác định trong mục

(a) có thể nằm trong khoảng từ 30mg/g đến 2mg/g, hoặc nằm trong khoảng từ 20mg/g đến 3mg/g hoặc nằm trong khoảng từ 10mg/g đến 4mg/g.

Phương pháp theo sáng chế này có thuận lợi là sữa bình thường có nồng độ lactoza trong khoảng 5% (50mg/g) có thể được sử dụng trong quy trình sản xuất và bước lên men có thể được kiểm soát một cách chính xác bằng lượng hydrat cacbon được bổ sung. Nồng độ của hydrat cacbon cần được bổ sung có thể được xác định trong các thử nghiệm kiểm tra các điều kiện lên men mong muốn, bao gồm độ pH cuối, nhiệt độ, môi trường nuôi cấy khởi động, v.v.

Theo một phương án được ưu tiên của phương pháp này, bước lên men được thực hiện bằng cách sử dụng LAB mà có khả năng dễ chuyển hóa sucroza (suc+) và sucroza được bổ sung vào sữa trước khi lên men. Theo một phương án khác, nồng độ của sucroza nằm trong khoảng từ 30mg/g đến 2mg/g, hoặc nằm trong khoảng từ 20mg/g đến 3mg/g hoặc nằm trong khoảng từ 10mg/g đến 4mg/g.

Theo một khía cạnh, bước (a) của phương pháp nêu trên được thực hiện bằng cách sử dụng một hoặc một số chủng trong số các chủng sau:

(a) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28952;

(ii) hoặc chủng có nguồn gốc từ DSM 28952, trong đó chủng thu được còn được đặc trưng bởi chủng này có khả năng tạo ra các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(b) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28953;

(ii) hoặc chủng có nguồn gốc từ DSM 28953, trong đó chủng thu được còn được đặc trưng bởi chủng này có khả năng tạo ra các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(c) chủng *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28910;

(ii) hoặc chủng có nguồn gốc từ DSM 28910, trong đó chủng thu được còn được đặc trưng bởi chủng này có khả năng tạo ra các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal.

C: Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men có thời hạn sử dụng kéo dài

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp kiểm soát quá trình sau axit hóa đã mô tả ở trên, đặc biệt là phương pháp đã được mô tả trong phần B nêu trên, được sử dụng để tạo ra sản phẩm sữa lên men có thời hạn sử dụng kéo dài.

Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men tương ứng có thể, ví dụ, bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa vi khuẩn lactic có khả năng chuyển hóa một hoặc một số hydrat cacbon có mặt trong sữa,

(b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon trong bước lên men, và

(c) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic,

trong đó sản phẩm đã được lên men được đặc trưng bởi độ pH của sản phẩm này được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men trong khoảng thời gian 6 tháng. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, sản phẩm đã được lên men được đặc trưng bởi độ pH của sản phẩm này được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men trong khoảng thời gian 12 tháng. Sản phẩm có thể được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến nhiệt độ trong phòng. Việc bảo quản ở nhiệt độ tủ lạnh, tức là nằm trong khoảng từ 4 đến 8°C, được ưu tiên.

Như đã chỉ ra trên đây, không đòi hỏi bảo quản sản phẩm trong vài tháng. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men theo sáng chế được đặc trưng bởi sản phẩm thu

được bằng phương pháp mà duy trì độ ổn định trong một khoảng thời gian được chỉ định. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó sản phẩm thu được bằng phương pháp được bảo quản trong 6 hoặc 12 tháng.

Theo một phương án khác, phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó:

(i) môi trường nuôi cấy khởi động này chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,

(ii) bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 45°C,

(iii) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của hydrat cacbon trong bước lên men,

(iv) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic, và

trong đó sản phẩm đã được lên men được đặc trưng bởi độ pH của sản phẩm này được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men trong khoảng thời gian 6 hoặc 12 tháng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm các bước sau:

(a) bước lên men sữa bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó:

(i) bước lên men được khởi động bằng cách sử dụng sữa và môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó nồng độ lactoza trong sữa nằm trong khoảng từ 5 đến 100mg/g ở thời điểm bắt đầu lên men

(ii) môi trường nuôi cấy khởi động này chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,

(iii) bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 45°C,

(iv) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của lactoza trong bước lên men,

(v) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic, và

(b) bước đóng gói sản phẩm đã được lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C,

trong đó sản phẩm đã được lên men được đặc trưng bởi độ pH của sản phẩm này được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men trong khoảng thời gian 6 hoặc 12 tháng.

Theo một phương án, phương pháp này sử dụng vi khuẩn lactic để lên men mà không có khả năng chuyển hóa lactoza. Vi khuẩn lactic có thể có khả năng chuyển hóa sucroza. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, phương pháp này sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động chứa một hoặc một số chủng trong số các chủng sau:

(a) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28952;

(ii) hoặc chủng có nguồn gốc từ DSM 28952, trong đó chủng thu được còn được đặc trưng bởi chủng này có khả năng tạo ra các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(b) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28953;

(ii) hoặc chủng có nguồn gốc từ DSM 28953, trong đó chủng thu được còn được đặc trưng bởi chủng này có khả năng tạo ra các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(c) chủng *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28910;

(ii) hoặc chủng có nguồn gốc từ DSM 28910, trong đó chủng thu được còn được đặc trưng bởi chủng này có khả năng tạo ra các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal.

Đối với bước lên men sữa chua, tốt hơn là môi trường nuôi cấy khởi động được sử dụng bao gồm chủng *Streptococcus thermophilus* và chủng *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* như được mô tả trên đây.

Phương pháp này có thể còn bao gồm việc xử lý nhiệt sau khi lên men. Việc xử lý nhiệt này có thể, ví dụ, được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 65°C trong 10 đến 30 giây và tốt hơn là được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 55°C trong 10 đến 25 giây.

Sáng chế cũng đề cập đến sản phẩm sữa lên men thu được bằng phương pháp đã mô tả ở trên. Sản phẩm sữa lên men có thể là sữa chua, sữa chua vị hoa quả, sữa chua uống hoặc pho mát. Vì vậy, sáng chế đề cập đến sữa chua truyền thống, sữa chua khuấy, sữa chua uống, Petit Suisse, sữa chua được xử lý nhiệt, sữa chua dẻo hoặc sữa chua kiểu Hy Lạp được đặc trưng bởi mức protein cao và các sản phẩm giống sữa chua thu được bằng phương pháp này.

D. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng LAB không có glucoza

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa *Streptococcus thermophilus* không có khả năng chuyển hóa glucoza và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* không có khả năng chuyển hóa glucoza,

(b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của lactoza trong bước lên men, và

(c) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic.

Theo một khía cạnh được ưu tiên, phương pháp này có thể còn được đặc trưng bởi bao gồm bước đóng gói sản phẩm đã được lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C.

Theo phương án khác nữa, phương pháp này có thể còn khác biệt ở chỗ độ pH của sản phẩm đã được lên men được duy trì ở khoảng 0,3 pH hoặc trong khoảng 0,1 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men ở nhiệt độ sử dụng để lên men trong thời gian 20 giờ.

Thuật ngữ “sự không có chuyển hóa glucoza” và thuật ngữ “không có glucoza” đều được sử dụng trong bản mô tả để xác định đặc điểm LAB mà mất một phần hoặc hoàn toàn khả năng sử dụng glucoza làm nguồn để sinh trưởng tế bào hoặc duy trì khả năng sống của tế bào. Sự không có chuyển hóa glucoza tương ứng có thể, ví dụ, được gây ra bởi đột biến trong gen ức chế hoặc gây bất hoạt sự biểu hiện hoặc hoạt tính của glucokinaza protein hoặc protein vận chuyển glucoza. LAB không có khả năng chuyển hóa glucoza có thể được đặc trưng bởi sự tăng nồng độ glucoza trong môi trường nuôi cấy, khi được sinh trưởng trên lactoza làm nguồn hydrat cacbon. Việc tăng glucoza được gây ra do sự tiết glucoza của LAB không có glucoza. Việc tăng nồng độ glucoza trong môi trường nuôi cấy có thể được xác định bằng phân tích HPLC, ví dụ, bằng cách sử dụng cột Dionex CarboPac PA 20 3*150mm (Thermo Fisher Scientific, số sản phẩm 060142).

Một số dạng glucoza LAB không có khả năng chuyển hóa glucoza đã được mô tả trong tình trạng kỹ thuật, bao gồm LAB có khả năng chuyển hóa lactoza và galactoza (WO 2013/160413, Pool et al., 2006). LAB tương ứng có thể phân giải hydrat cacbon chính có mặt trong sữa, lactoza, do đó tạo ra glucoza và galactoza. Các chủng không có glucoza, như chủng không có glucoza *Streptococcus thermophilus* đã được mô tả trong WO 2013/160413, có thể chuyển hóa galactoza và xuất hiện tiếp để tiết glucoza. Các chủng khác nữa được mô tả trong WO 2013/160413, như chủng vi khuẩn lactic đột biến *Lactobacillus delbrueckii* kháng 2-deoxyglucoza, mà không thể hấp thụ glucoza hoặc galactoza có mặt trong môi trường. Tuy nhiên, chủng có thể hấp thụ lactoza, phân giải lactoza và sử dụng glucoza thu được từ quá trình phân giải lactoza để sinh trưởng và tạo ra axit. Bài báo của Pool et al., 2006 đề cập đến phương pháp khác nữa để tạo ra LAB không có khả năng chuyển hóa glucoza. Bằng cách sử dụng các nguyên tắc chung đã được mô tả trong các bài báo này các LAB khác nhau có sự không có chuyển hóa glucoza giống hoặc tương tự có thể được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Do vị của glucoza ngọt hơn nhiều so với vị của galactoza, bước lên men sữa bằng cách sử dụng các thể đột biến không có glucoza này sẽ làm tăng hương vị ngọt ngào của sản phẩm đã được lên men, trong khi việc giảm đáng kể nồng độ lactoza và không làm tăng tổng nồng độ của hydrat cacbon (như được mô tả một cách chi tiết trong WO2013/160413).

Theo một phương án khác, vi khuẩn lactic không có khả năng chuyển hóa glucoza có thể chứa chủng *Streptococcus thermophilus* và/hoặc chủng *Lactobacillus delbrueckii* không có glucoza nhưng lên men galactoza mà không hấp thu glucoza. Chủng *Lactobacillus delbrueckii* không hấp thu glucoza có thể chuyển hóa lactoza và sử dụng glucoza thu được từ quá trình thủy phân lactoza trong tế bào.

Môi trường nuôi cấy khởi động có thể chứa các LAB bổ sung hoặc có thể bao gồm hỗn hợp của các chủng này.

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa một hoặc nhiều chủng *Streptococcus thermophilus* được chọn từ CHCC16731, CHCC15757 và CHCC16404 và chủng *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* CHCC16159,

(b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của lactoza trong bước lên men, và

(c) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic.

Bằng cách sử dụng các LAB không có glucoza này trong phương pháp theo sáng chế thu được các lợi ích khác nữa mà sản phẩm sữa lên men tạo ra như vậy có hương vị ngọt ngào.

Phương án này của sáng chế có thể sử dụng sản phẩm sữa có nồng độ lactoza giảm để lên men để kết thúc bước lên men do sự giảm nồng độ của lactoza trong bước lên men. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng cách sữa và môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó trước khi bổ sung môi trường nuôi cấy khởi động nồng độ của lactoza

trong sữa này thấp hơn 30mg/g và trong đó môi trường nuôi cấy khởi động này chứa *Streptococcus thermophilus* không có khả năng chuyển hóa glucoza và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* không có khả năng chuyển hóa glucoza,

(b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của lactoza trong bước lên men, và

(c) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic.

Nồng độ lactoza ban đầu, tức là nồng độ trước khi bổ sung môi trường nuôi cấy khởi động, trong sữa có thể nằm trong khoảng từ 50mg/g đến 5mg/g, hoặc nằm trong khoảng từ 25mg/g từ 5mg/g.

Sữa có nồng độ lactoza giảm có thể mua được trên thị trường hoặc được tạo ra theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

E: Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bằng cách bổ sung lactaza vào bước lên men

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa vi khuẩn lactic có khả năng chuyển hóa một hoặc một số hydrat cacbon có mặt trong sữa,

(b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon trong bước lên men, và

(c) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic,

và trong đó bước lên men được thực hiện với sự có mặt của lactaza ở nồng độ ban đầu nằm trong khoảng từ 500 đến 5000 NLU/l.

Theo một khía cạnh được ưu tiên, phương pháp này có thể còn được đặc trưng bởi bao gồm bước đóng gói sản phẩm đã được lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C.

Theo phương án khác nữa, phương pháp này có thể còn khác biệt ở chỗ độ pH của sản phẩm đã được lên men được duy trì ở khoảng 0,3 pH hoặc ở khoảng 0,1 đơn vị pH

nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men ở nhiệt độ sử dụng để lên men trong thời gian 20 giờ.

Lactaza là enzym mà thủy phân lactoza và tạo ra glucoza và galactoza. Lactaza hiện đang có trên thị trường từ nhiều nguồn và có thể được tạo ra theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Lactaza hoạt tính có thể được xác định là đơn vị của hoạt tính lactaza trung tính (neutral lactase activity - NLU). Phù hợp với sáng chế, hoạt tính lactaza được xác định bằng cách sử dụng phương pháp như mô tả bởi phương pháp Food Chemicals Codex (FCC) IV.

F: Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men vắt dựa vào sản phẩm thu được bằng một trong các phương pháp từ (A) đến (E)

Các phương pháp từ A đến E đã mô tả ở trên là đặc biệt có lợi để tạo ra sản phẩm sữa lên men vắt, như sữa chua vắt (Sữa chua kiểu Hy Lạp, sữa chua phân tách nước (Labneh)), pho mát Đức (Quark), sữa chua pho mát và pho mát kem. Sản phẩm sữa lên men vắt được đặc trưng bởi bước sản xuất, trong đó nước sữa được loại bỏ ra khỏi sữa lên men bằng cách phân tách và/hoặc lọc sau khi lên men dẫn đến thu được các sản phẩm tương đối đặc có nồng độ protein cao.

Việc làm cô đặc sữa lên men bằng cách sử dụng phương pháp siêu lọc hoặc bằng cách sử dụng thiết bị phân tách sau các quy trình lên men thông thường sẽ dẫn đến quá trình sau axit hóa trong bước cô đặc. Quá trình sau axit hóa sẽ tác động một số yếu tố trước khi và trong quy trình phân tách. Đầu tiên, quá trình sau axit hóa sẽ làm độ pH giảm tiếp. Kết quả của việc độ pH giảm là độ cứng của gel sẽ tăng. Kết quả khác nữa của việc giảm độ pH là cỡ hạt trong sữa chua sẽ tăng. Cuối cùng, ứng suất trượt sẽ tăng do việc tạo ra và tiết liên tục của exopolysaccarit (hoặc các chất polyme ngoại bào hoặc EPS) nhờ LAB.

Do đó, sữa lên men được sản xuất bằng phương pháp này sẽ thiếu tính đồng nhất. Điều này sẽ tác động đến các thông số chính của quy trình phân tách trực tiếp liên quan đến định luật Stokes, ví dụ, cỡ hạt, khả năng gắn kết hạt nước, độ nhớt của pha huyết thanh và nước cố định trong mạng protein. Do việc giảm tiếp độ pH, ví dụ, từ, ví dụ 4,65 xuống đến độ pH 4,30, sẽ thu được hiệu suất sản phẩm thấp hơn và sẽ quan sát được sự thay đổi trong chất lượng sản phẩm về vị, tính axit và cấu trúc. Vì vậy, trong tình trạng kỹ thuật, sản phẩm sữa lên men vắt được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp bao gồm

các bước của phương pháp, mà ức chế quá trình sau axit hóa, thường xuyên nhất sử dụng bước làm lạnh. Tuy nhiên, bước làm lạnh đòi hỏi lượng năng lượng đáng kể và có các ảnh hưởng bất lợi đối với các sản phẩm được chế biến tiếp.

Tổng quan về phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men khác nhau bằng cách sử dụng bước cô đặc protein được thể hiện trong Fig.7. Phần phía bên tay trái của Fig.7 thể hiện phương pháp sử dụng bước cô đặc trước khi lên men và phần phía bên tay phải của Fig.6 thể hiện phương pháp sử dụng bước cô đặc sau khi lên men bằng cách phân tách bằng cách sử dụng phương pháp ly tâm hoặc siêu lọc .

Fig.8 đến Fig.11 hiển thị kết quả chứng minh của các thử nghiệm cơ bản minh họa những lợi ích có thể đạt được bằng cách kết hợp các phương pháp làm giảm quá trình sau axit hóa như được mô tả trên đây với phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men mà bao gồm bước loại bỏ nước sữa ra khỏi sữa lên men bằng cách phân tách và/hoặc lọc dẫn đến việc sữa chua tương đối đặc có nồng độ protein cao. Các kết quả này thu được với thiết lập thử nghiệm sau:

Hai mẻ môi trường nuôi cấy thương mại dưới đây được lên men trong cùng dạng nguyên liệu sữa:

- Mild 2.0 (của Chr. Hansen, Đan mạch);
- Môi trường nuôi cấy loại Premium 1.0 (70%) + Môi trường nuôi cấy loại SSC17 (30%) (đều của Chr. Hansen, Đan mạch).

Nguyên liệu sữa được sử dụng là sữa gầy; bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ là 40°C.

Cả hai mẻ được lên men đến độ pH 4,60. Các mẫu được lấy ra để phân tích cấu trúc và bước lên men được tiếp tục cho đến khi đạt được độ pH là 4,45. Mặt khác, cấu trúc của sản phẩm được phân tích. Bốn mẫu sữa chua đông (hai môi trường nuôi cấy khác nhau ở hai độ pH khác nhau là 4,60 và 4,45) được xử lý trong bộ sau xử lý (FH Scandinox) sau khi đạt đến độ pH cụ thể. Áp suất ngược khác nhau được đưa vào môi trường nuôi cấy, nằm trong khoảng từ 4 đến 9 hoặc nằm trong khoảng từ 4 đến 12 ba ($12 \cdot 10^{+2}$ kPa). Ứng suất trượt và mô-đun phức được xác định bằng cách sử dụng lưu biến kế.

Fig.8 đến Fig.11 cho thấy cả ứng suất trượt và mô-đun phức đều cao hơn ở độ pH 4,45 so với ở độ pH 4,60. Hơn nữa, cấu trúc của sản phẩm sữa lên men tăng do kết quả của việc giảm độ pH nằm trong khoảng từ 4,60 đến 4,45.

Môi trường nuôi cấy Premium 1.0 + SSC17 tạo ra ứng suất trượt và mô-đun phức cao hơn khi được so sánh với Mild 2.0, ở cả hai độ pH.

Cấu trúc đã giảm đáng kể khi áp suất ngược được đưa vào nằm trong khoảng từ 4 lên đến 9 hoặc nằm trong khoảng từ 4 ba (4.10^{+2} kPa) lên đến 12 ba (12.10^{+2} kPa).

Vì vậy, bằng chứng của các thử nghiệm cơ bản cho thấy rằng sẽ có thể và có lợi nếu phân tách nước sữa ra khỏi sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng ứng suất trượt và mô-đun phức thấp hơn với phương pháp kiểm soát quá trình sau axit hóa như được mô tả trên đây. Cấu trúc phụ thuộc vào dạng môi trường nuôi cấy, độ pH và áp suất ngược được đưa vào quy trình trước khi được đưa vào thiết bị phân tách hoặc UF. Đã không thể giảm được cấu trúc ở độ pH 4,45 xuống đến cấu trúc ở 4,60 ngay cả khi áp suất ngược cao đã được đưa vào sữa chua đông.

Do đó, phương pháp kiểm soát quá trình sau axit hóa tạo ra khả năng lên men sữa bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy LAB ở độ pH cụ thể tùy thuộc vào hydrat cacbon được bổ sung để lên men. Phương pháp này tạo ra việc kiểm soát có cải tiến độ pH trong sữa chua during quá trình xử lý sau lên men và do đó sẽ đặc biệt cải thiện bước phân tách. Ngoài ra, tốc độ có thể được tối ưu hóa vì việc làm lạnh là không cần thiết và hiệu suất sản xuất tăng.

Theo khía cạnh này của sáng chế, các phương án sau được đề cập đến trong số các phương án khác:

1. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men vát bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa vi khuẩn lactic có khả năng chuyển hóa một hoặc một số hydrat cacbon có mặt trong sữa,

(b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon trong bước lên men,

(c) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic,

(d) ít nhất một phần nước sữa được phân tách ra khỏi sản phẩm sữa lên men.

2. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men vắt bao gồm bước lên men sữa bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó:

(i) môi trường nuôi cấy khởi động này chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,

(ii) bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 45°C,

(iii) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của hydrat cacbon trong bước lên men,

(iv) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic,

(v) ít nhất một phần nước sữa được phân tách ra khỏi sản phẩm sữa lên men, và

trong đó sản phẩm sữa lên men trước khi phân tách nước sữa được đặc trưng bởi độ pH của sản phẩm này được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH hoặc được duy trì ở khoảng 0,1 đơn vị pH nếu được bảo quản, được chế biến hoặc được duy trì sau khi kết thúc bước lên men ở nhiệt độ sử dụng để lên men ở bước (ii) trong thời gian 20 giờ.

3. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm:

(a) bước lên men sữa bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó:

(i) bước lên men được khởi động bằng cách sử dụng sữa và môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó nồng độ lactoza trong sữa nằm trong khoảng từ 5 đến 100mg/g ở thời điểm bắt đầu lên men

(ii) môi trường nuôi cấy khởi động này chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,

(iii) bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 45°C,

(iv) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của lactoza trong bước lên men,

(v) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic, và

(b) bước phân tách ít nhất một phần nước sữa ra khỏi sản phẩm sữa lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C,

(c) bước đóng gói sản phẩm đã được lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C,

trong đó sản phẩm sữa lên men được đặc trưng bởi độ pH của sản phẩm này được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH hoặc được duy trì ở khoảng 0,1 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men ở nhiệt độ sử dụng để lên men ở bước (ii) trong thời gian 20 giờ.

4. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó việc phân tách được thực hiện bằng cách lọc, bao gồm việc lọc bằng cách sử dụng thiết bị phân tách dạng vòi phun, ly tâm hoặc siêu lọc với thiết bị lọc dạng xoắn hoặc thiết bị lọc dạng gôm.

5. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 4, trong đó sản phẩm sữa lên men vắt được đặc trưng bởi hàm lượng protein nằm trong khoảng từ 6 đến 13% và hàm lượng chất béo nằm trong khoảng từ 0 đến 10%.

6. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 5, trong đó sản phẩm sữa lên men vắt được đặc trưng bởi hàm lượng protein nằm trong khoảng từ 6 đến 10%.

7. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6, trong đó sản phẩm sữa lên men vắt là sữa chua, sữa chua kiểu Hy Lạp, sữa chua phân tách nước (Labneh), pho mát Đức (Quark), sữa chua pho mát hoặc pho mát kem.

8. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 7, trong đó việc phân tách ít nhất một phần nước sữa ra khỏi sản phẩm sữa lên men được thực hiện mà không cần việc làm lạnh chủ động sản phẩm sữa lên men.

9. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 8, trong đó môi trường nuôi cấy khởi động này chứa chủng lactoza âm tính.

10. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 9, trong đó môi trường nuôi cấy khởi động này chứa một hoặc nhiều LAB được chọn từ các chủng CHCC18944, CHCC17861 và CHCC17862.

11. Sản phẩm sữa lên men thu được bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 10.

12. Sản phẩm sữa lên men theo phương án 11, trong đó sản phẩm sữa lên men này là sữa chua, sữa chua vị hoa quả, sữa chua uống hoặc pho mát.

Việc phân tách nước sữa có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị phân tách dạng vòi phun (ly tâm) thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này để phân tách nước sữa ra khỏi sản phẩm sữa lên men. Theo cách khác hoặc ngoài ra, các hệ siêu lọc có thể được sử dụng, thông thường là thiết bị lọc dạng xoắn hoặc thiết bị lọc dạng gôm. Theo một phương án khác, thiết bị lọc dạng tấm hoặc dạng khung được sử dụng cho các ứng dụng có hàm lượng protein rắn và chất béo cao, ví dụ, pho mát kem béo.

Sữa chua vắt được đặc trưng bởi hàm lượng protein nằm trong khoảng từ 6 đến 13%. Sản phẩm có thể còn có hàm lượng chất béo nằm trong khoảng từ 0 đến 10%.

Theo cách khác, sản phẩm đã được lên men có thể là pho mát Đức (Quark) hoặc sữa chua pho mát. Pho mát Đức (Quark) và sữa chua pho mát thường được đặc trưng bởi hàm lượng protein nằm trong khoảng từ 6 đến 10%. Pho mát Đức (Quark) và sữa chua pho mát có thể còn được đặc trưng bởi hàm lượng chất béo nằm trong khoảng từ 6 đến 10%.

Theo một phương án khác, sản phẩm đã được lên men là pho mát kem. Pho mát kem có thể được đặc trưng bởi hàm lượng protein nằm trong khoảng từ 6 đến 13%. Pho mát kem có thể còn được đặc trưng bởi hàm lượng chất béo nằm trong khoảng từ 0 đến 35%.

Theo các phương án được ưu tiên của khía cạnh này của sáng chế, việc phân tách ít nhất một phần nước sữa ra khỏi sản phẩm sữa lên men được thực hiện mà không cần việc làm lạnh chủ động sản phẩm sữa lên men. Điều này không có nghĩa là sản phẩm này được duy trì ở nhiệt độ sử dụng để lên men, mà đơn giản là sản phẩm không được đưa vào làm lạnh.

Theo phương án khác, phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men vắt nêu trên được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động chứa chủng lactoza âm tính. Như được giải thích trong phần B nêu trên, việc sử dụng các chủng lactoza âm tính để kiểm soát quá trình sau axit hóa là đặc biệt có lợi. Do đó, sáng chế đề cập đến phương

pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men vắt sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động chứa một hoặc nhiều LAB được chọn từ các chủng CHCC18944, CHCC17861 và CHCC17862.

Phương án này đặc biệt thích hợp để sự tạo ra sữa chua kiểu Hy Lạp, pho mát Đức (Quark) hoặc pho mát kem.

(G) Phương pháp sản xuất sản phẩm pho mát pasta filat bằng cách sử dụng một trong các phương pháp từ (A) đến (E).

Phương pháp theo sáng chế như được mô tả trong các phần từ (A) đến (E) nêu trên đặc biệt thích hợp để tạo ra pho mát pasta filat. A pho mát pasta filat is pho mát được sản xuất bằng phương pháp bao gồm bước xử lý nhiệt sữa đông. Việc xử lý nhiệt này có thể được thực hiện theo nhiều cách khác nhau, bao gồm ngâm sữa đông trong nước nóng hoặc nước sữa. Theo một phương án khác, hơi nước được phun vào sữa đông. Bước xử lý nhiệt tạo ra thành phẩm pho mát có cấu trúc dạng sợi và đặc tính kéo đặc biệt. Pho mát pasta filat thông thường là Mozzarella và Provolone, Caciocavallo, Pallone di Gravina, và Scamorza.

Theo khía cạnh này, sáng chế đề cập đến các phương án sau trong số các phương án khác:

1. Phương pháp sản xuất pho mát pasta filat bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa vi khuẩn lactic có khả năng chuyển hóa một hoặc một số hydrat cacbon có mặt trong sữa,

(b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon trong bước lên men, và

(c) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic;

(d) sản phẩm đã được lên men được đưa vào xử lý nhiệt, ví dụ, bằng cách đặt sản phẩm đã được lên men trong nước nóng hoặc phun hơi nước vào sản phẩm đã được lên men.

2. Phương pháp sản xuất pho mát pasta filat bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(i) môi trường nuôi cấy khởi động này chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,

(ii) bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 45°C,

(iii) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của hydrat cacbon trong bước lên men,

(iv) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic, và

trong đó sản phẩm sữa lên men được đặc trưng bởi độ pH của sản phẩm này được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH hoặc được duy trì ở khoảng 0,1 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men ở nhiệt độ sử dụng để lên men ở bước (ii) trong thời gian 20 giờ; và

trong đó sản phẩm đã được lên men được đưa vào xử lý nhiệt, ví dụ, bằng cách đặt sản phẩm đã được lên men trong nước nóng hoặc phun hơi nước vào sản phẩm đã được lên men.

3. Phương pháp sản xuất pho mát pasta filat bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men sữa bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó:

(i) bước lên men được khởi động bằng cách sử dụng sữa và môi trường nuôi cấy khởi động, trong đó nồng độ lactoza trong sữa nằm trong khoảng từ 5 đến 100mg/g ở thời điểm bắt đầu lên men

(ii) môi trường nuôi cấy khởi động này chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,

(iii) bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 45°C,

(iv) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của lactoza trong bước lên men,

(v) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic, và

(b) bước đóng gói sản phẩm đã được lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C,

trong đó sản phẩm sữa lên men được đặc trưng bởi độ pH của sản phẩm này được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH hoặc được duy trì ở khoảng 0,1 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men ở nhiệt độ sử dụng để lên men ở bước (ii) trong thời gian 20 giờ; và

trong đó sản phẩm đã được lên men được đưa vào xử lý nhiệt, ví dụ, bằng cách đặt sản phẩm đã được lên men trong nước nóng hoặc phun hơi nước vào sản phẩm đã được lên men.

4. Phương pháp sản xuất pho mát pasta filat theo theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó vi khuẩn lactic có khả năng chuyển hóa lactoza và glucoza và trong đó trước khi bổ sung môi trường nuôi cấy khởi động nồng độ của lactoza trong sữa này thấp hơn 200mg/g, ví dụ, nằm trong khoảng từ 100mg/g đến 5mg/g, hoặc nằm trong khoảng từ 50mg/g đến 5mg/g, hoặc nằm trong khoảng từ 25mg/g từ 5mg/g.

5. Phương pháp sản xuất pho mát pasta filat theo theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó vi khuẩn lactic không có khả năng chuyển hóa lactoza và trong đó trước khi bổ sung môi trường nuôi cấy khởi động tổng nồng độ của hydrat cacbon có thể được chuyển hoá bằng vi khuẩn lactic trong sữa này thấp hơn 45mg/g.

6. Phương pháp sản xuất pho mát pasta filat theo theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó vi khuẩn lactic có khả năng chuyển hóa lactoza và galactoza nhưng không có glucoza.

7. Phương pháp sản xuất pho mát pasta filat theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6, trong đó bước lên men được thực hiện với sự có mặt của lactaza ở nồng độ ban đầu nằm trong khoảng từ 500 đến 5000 NLU/l.

8. Phương pháp sản xuất pho mát pasta filat theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 7, trong đó việc kết thúc bước lên men được gây ra bằng cách làm giảm tổng nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon có thể được chuyển hoá bằng vi khuẩn lactic đến trị số nhỏ hơn 30mg/g, bao gồm trị số nằm trong khoảng từ 25mg/g từ 0,01mg/g, hoặc nằm trong khoảng từ 5mg/g đến 0,01mg/g.

9. Phương pháp sản xuất pho mát pasta filat theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 8, trong đó độ pH của sản phẩm đã được lên men được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH trong thời gian 20 giờ khi được bảo quản ở nhiệt độ để lên men.

10. Phương pháp sản xuất pho mát pasta filat theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 9, trong đó bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 và 45°C.

11. Phương pháp sản xuất pho mát pasta filat theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 10, trong đó sau khi kết thúc sản phẩm lên men đã được lên men được đóng gói ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C.

12. Phương pháp sản xuất pho mát pasta filat theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 11, trong đó sản phẩm đã được lên men được đặc trưng bởi độ pH của sản phẩm này được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men trong khoảng thời gian 6 tháng hoặc được đặc trưng bởi độ pH của sản phẩm này được duy trì ở khoảng 0,3 đơn vị pH nếu được bảo quản sau khi kết thúc bước lên men trong khoảng thời gian 12 tháng.

13. Sản phẩm sữa lên men thu được bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 12, trong đó sản phẩm sữa là pho mát pasta filat.

14. Sản phẩm sữa lên men theo phương án 13, trong đó pho mát pasta filat được chọn từ Mozzarella, Provolone, Caciocavallo, Pallone di Gravina, và Scamorza.

Chi tiết hơn, phương pháp sản xuất pho mát pasta filat theo sáng chế có thể bao gồm các bước sau:

thu nhận sản phẩm sữa có protein, chất béo và chất rắn đã được chuẩn hóa;

điều chỉnh nhiệt độ đến nhiệt độ đông tụ (32-38°C);

bổ sung môi trường nuôi cấy Acidifix (*Streptococcus thermophilus* CHCC17861 và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944);

bổ sung chất làm đông tụ;

đông tụ sữa trong 15-60 phút, cắt và khuấy sữa đông;

tùy ý gia nhiệt (hấp) sữa đông;

axit hóa sữa đông (được phủ bởi nước sữa hoặc rút từ nước sữa);

kéo sữa đông trong nước nóng hoặc bằng cách phun bằng hơi nước (trong ‘thiết bị kéo khô’) hoặc bằng các phương tiện gia nhiệt khác và xử lý cơ học sữa đông này;

chế biến và làm lạnh pho mát;

làm lạnh và ướp muối pho mát;

đóng gói pho mát.

Theo một phương án khác, phương pháp sản xuất pho mát pasta filat theo sáng chế có thể bao gồm các bước sau:

thu nhận sản phẩm sữa có protein, chất béo và chất rắn đã được chuẩn hóa;

bổ sung sucroza đủ cho axit hóa môi trường nuôi cấy;

điều chỉnh nhiệt độ đến nhiệt độ đông tụ (32-38°C);

bổ sung môi trường nuôi cấy Acidifix (*Streptococcus thermophilus* CHCC17861 và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944);

bổ sung chất làm đông tụ;

đông tụ sữa trong 15-60 phút, cắt và khuấy sữa đông;

tùy ý gia nhiệt (hấp) sữa đông;

axit hóa sữa đông (được phủ bởi nước sữa hoặc rút từ nước sữa);

làm lạnh sữa đông đã được axit hóa;

kéo sữa đông trong nước nóng hoặc bằng cách phun bằng hơi nước (trong ‘thiết bị kéo khô’) hoặc bằng các phương tiện gia nhiệt khác và xử lý cơ học sữa đông;

chế biến và làm lạnh pho mát;

làm lạnh và ướp muối pho mát;

đóng gói pho mát.

Theo một phương án khác, phương pháp sản xuất pho mát pasta filat theo sáng chế có thể bao gồm các bước sau:

thu nhận sản phẩm sữa có protein, chất béo và chất rắn đã được chuẩn hóa;

bổ sung sucroza đủ cho axit hóa môi trường nuôi cấy;

điều chỉnh nhiệt độ đến nhiệt độ đông tụ (32-38°C);

bổ sung môi trường nuôi cấy Acidifix (*Streptococcus thermophilus* CHCC17861 và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944);

bổ sung chất làm đông tụ;

đông tụ sữa trong 15-60 phút, cắt và khuấy sữa đông;

tùy ý gia nhiệt (hấp) sữa đông;

axit hóa sữa đông (được phủ bởi nước sữa hoặc rút từ nước sữa);

bảo quản sữa đông đã được axit hóa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 6 đến 25°C;

kéo sữa đông trong nước nóng hoặc bằng cách phun bằng hơi nước (trong ‘thiết bị kéo khô’) hoặc bằng các phương tiện gia nhiệt khác và xử lý cơ học sữa đông;

chế biến và làm lạnh pho mát;

làm lạnh và ướp muối pho mát;

đóng gói pho mát.

Theo toàn bộ các phương án, pho mát có thể được cắt lát, xé nhỏ, cắt thành khoanh, cắt thành miếng vuông nhỏ hoặc được cắt thành các phần bằng các phương tiện khác trước khi đóng gói.

Chủng vi khuẩn lactic:

Các ví dụ sau sử dụng các chủng CH, một số chủng trong số các chủng này đã được lưu trữ cho các đơn yêu cầu cấp patent trước đó của Chr. Hansen. Các thông tin khác nữa của các chủng này được cung cấp bởi đơn yêu cầu cấp patent tương ứng và thông tin lưu trữ là như sau:

Streptococcus thermophilus CHCC6008 được lưu trữ cho đơn yêu cầu cấp patent với số cô đăng bố quốc tế WO2011/000879 tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig vào ngày 23 tháng 03 năm 2006 với mã truy cập là DSM 18111.

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* CHCC10019 được lưu trữ cho đơn yêu cầu cấp patent với số cô đăng bố quốc tế WO2011/000879 tại Ngân hàng giống và vi

sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig vào ngày 03 tháng 04 năm 2007 với mã truy cập là DSM 19252.

Streptococcus thermophilus CHCC15757 được lưu trữ cho đơn yêu cầu cấp patent với số công bố quốc tế WO2013160413 tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig vào ngày 03 tháng 04 năm 2012 với mã truy cập là DSM 25850.

Streptococcus thermophilus CHCC16404 được lưu trữ cho đơn yêu cầu cấp patent với số công bố quốc tế WO2013160413 tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig vào ngày 12 tháng 12 năm 2012 với mã truy cập là DSM 26722.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CHCC16159 được lưu trữ cho đơn yêu cầu cấp patent với số công bố quốc tế WO2013160413 tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig vào ngày 06 tháng 09 năm 2012 với mã truy cập là DSM 26420.

Các chủng còn lại được sử dụng trong các ví dụ sau đã được lưu trữ cho đơn này hoặc hiện đang có trên thị trường do Chr. Hansen cung cấp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng sữa có hàm lượng lactoza thấp

Thu nhận sữa tùy chỉnh chứa 1% lactoza (10 g/L) (của Select Milk Nhà sản xuất, Inc., Texas, USA). Sữa này chứa 3% lactoza (30 g/L) được tạo ra bằng cách bổ sung 2% lactoza (20 g/L) vào sữa chứa 1% lactoza.

Sữa được cấy chủng *S. thermophilus* CHCC6008 (0,01% F-DVS) và được duy trì ở nhiệt độ là 37°C trong 20 giờ. Quá trình axit hóa (độ pH) được xác định một cách tự động theo thời gian.

Kết quả được thể hiện trên Fig.1. Bước lên men bằng cách sử dụng 1% lactoza thể hiện gần với profin axit hóa lý tưởng. Ban đầu, sản phẩm được axit hóa ở tốc độ cao, nhưng quá trình axit hóa ngừng một cách đột ngột ở độ pH 4,8 sau khoảng 6 giờ và độ pH của môi trường nuôi cấy duy trì không đổi trong 14 giờ tiếp theo mặc dù môi trường

nuôi cấy được duy trì ở nhiệt độ là 37°C. Điều này cho thấy rằng quá trình axit hóa đã kết thúc hoàn toàn.

Bước lên men bằng cách sử dụng 3% lactoza được sử dụng làm mẫu đối chứng. Vào lúc ban đầu sản phẩm được axit hóa ở cùng tốc độ như bước lên men dựa vào 1% lactoza. Điều này cho thấy rằng nồng độ lactoza là 1% (10mg/g) là quá thấp để ức chế bước lên men trong pha ban đầu.

Nhưng bước lên men bằng cách sử dụng 3% lactoza không được kết thúc ở độ pH 4,8 mà tiếp tục axit hóa cho đến khi đạt được độ pH là khoảng 4,5 ở trạng thái mà sự có mặt của axit được tạo ra bằng vi khuẩn ức chế tiếp bước lên men. Kết quả là, bước lên men diễn tiến ở tốc độ thấp cho đến khi đạt được độ pH là khoảng 4,2.

Các kết quả này chứng minh rằng bước cô đặc hydrat cacbon (ở đây là lactoza) có thể được sử dụng một cách bất ngờ để kiểm soát việc kết thúc bước lên men. Phương thức này cho phép các quy trình, trong đó thu được độ pH mong muốn bằng cách lên men và không quan sát được quá trình sau axit hóa sau đó.

Ví dụ 2: Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa bằng cách sử dụng LAB không có lactoza

Các thể đột biến không có lactoza được phân tách ra từ chủng EPS dương tính *S. thermophilus* (ST) CHCC15914 và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (LB) CHCC10019. Các chủng này được chọn sau khi gây đột biến bằng UV dưới dạng các khuẩn lạc màu trắng (chỉ ra kiểu hình không có lactoza) trên M17 với lần lượt 1% lactoza và 200mg/ml X-Gal cho CHCC15914. Các đĩa thạch MRS với 1% lactoza và 200mg/ml X-Gal cho CHCC10019.

Cả hai chủng dạng đại đều có hoạt tính β -galactosidaza, và các khuẩn lạc dạng đại xuất hiện màu xanh da trời do hoạt tính của β -galactosidaza.

Từ CHCC10019, một thể đột biến không có lactoza được phân lập và được định danh là CHCC18944 (thể đột biến này được xác định là CHCC18994 trong Đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 14173196; nhưng số truy cập nội bộ của Người nộp đơn đã thay đổi và bây giờ là CHCC18944; số truy cập DSMZ không thay đổi và do đó vẫn là DSM28910).

Từ CHCC15914, hai các thể đột biến không có lactoza được phân lập và được định danh lần lượt là CHCC17861 và CHCC17862.

Đặc tính sinh trưởng của các thể đột biến không có lactoza đã phân lập này được xác định như sau:

Kiểu hình của LB CHCC18944: lac-, suc-, gal-, glc+

Kiểu hình của ST CHCC17861: lac-, suc+, gal+, glc+

Kiểu hình của ST CHCC17862: lac-, suc+, gal+, glc+

Vùng điều khiển lactoza hoàn chỉnh được sắp xếp trình tự cho toàn bộ ba thể đột biến và được so sánh với chủng dạng đại tương ứng để bộc lộ dạng đột biến.

So với chủng mẹ CHCC15914 đã cho thấy rằng CHCC17861 có một nucleotit “T” dư ở trình tự bắt đầu của gen *lacZ* (ghi mã cho β -galactosidaza) dẫn đến bộ ba mã hóa kết thúc trong trình tự ghi mã có rất ít nucleotit xuôi chiều của đột biến. CHCC17862 đã cho thấy sự khuyết đoạn của một nucleotit, cũng phá vỡ trình tự ghi mã của gen *lacZ*.

Đối với đột biến CHCC18944 bên trong gen *lacZ* được xác định. Kết quả này đã dẫn đến sự trao đổi 8 nucleotit (5'-CTT CCA AGC-3' to 5'-CGC TAC TAT-3') và do đó dẫn đến sự thay đổi về 3 axit amin (Leu-Pro-Ser to Arg-Tyr-Tyr) trong *lacZ*, giải thích cho kiểu hình không có lactoza.

Toàn bộ các thể đột biến khi được sử dụng làm các chủng riêng rẽ hoặc kết hợp (ST + LB), axit hóa sữa tùy thuộc vào việc bổ sung hydrat cacbon lên men khác nhau từ lactoza. Hoạt tính axit hóa của môi trường nuôi cấy không có lactoza, ví dụ, được xác định bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy qua đêm trong MRS (Thể đột biến LB wt và LB lac); M17 với 1% lactoza (ST wt); hoặc M17 với nồng độ sucroza khác nhau (1% và 0,5%; lên men với thể đột biến ST lac). Sữa được cấy và bước lên men được kiểm tra bằng cách phát triển pH ở 37°C.

Sự phát triển pH trong điều kiện nhiệt độ lên men trong 20 và 40 giờ được minh họa lần lượt trong Fig.2 và Fig.3 và cho thấy rằng sucroza được chuyển hoá nhờ các chủng không có lactoza đạt được bước lên men có tốc độ nhanh gần bằng bước lên men gây ra bởi LAB bố mẹ có khả năng chuyển hóa lactoza. Bước lên men được điều khiển bằng sucroza được kết thúc ngay và đưa vào băng phẳng khi sucroza bị cạn kiệt. Sau khi kết thúc bước lên men gây ra bởi sự cạn kiệt hydrat cacbon, độ pH được duy trì ổn định ở

độ pH 4,5. Đã phát hiện ra độ pH cuối ổn định khi CHCC17861, CHCC17862, hoặc CHCC18944, được sử dụng làm các chủng đơn, hoặc dưới dạng hỗn hợp của một trong số các thể đột biến ST cùng với thể đột biến LB (hỗn hợp này được thể hiện trên Fig.3). Điều này là tương đồng với môi trường nuôi cấy khởi động được sử dụng trong phương pháp lên men tạo ra sữa chua thông thường.

Không quan sát được sự sai khác đáng kể giữa các chủng CHCC17861 và CHCC17862. Vì vậy, việc bổ sung sucroza tạo ra sự kiểm soát chính xác hoạt tính axit hóa.

Trong một số bước lên men, quan sát được sự tạo thành “vành” (“shoulder”) trong các đường cong pH của môi trường nuôi cấy hỗn hợp cho thấy rằng sự chuyển hóa dịch chuyển trước khi việc tạo ra axit được dừng hoàn toàn (Fig.3). Để kiểm tra tiếp về hiện tượng này, tỷ lệ ST:LB được thay đổi và điều này dẫn đến sự thay đổi về việc tạo ra vành. Việc giảm nồng độ lac- ST và tăng chủng lac- LB dẫn đến việc giảm vành của đường cong pH và “đường cong”-pH thậm chí trở nên ngang hơn.

Mặt khác, điều thú vị là, việc sử dụng 100% ST CHCC17861 dẫn đến việc phá vỡ hoàn toàn sự tạo ra axit khi sucroza bị cạn kiệt và làm mất vành của đường cong pH, nhưng độ dốc của độ pH dừng ở 0,3 điểm cao hơn giá trị pH (Fig.3).

Trong toàn bộ các trường hợp, độ pH duy trì ổn định ở 4,75 đến cuối thời gian lên men (48 giờ).

Trong quá trình đồng lên men ST/LB, phần *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* chịu trách nhiệm cho the độ dốc của đường cong pH và cũng là cho phần chính của quá trình sau axit hóa. Vì lý do này, nồng độ của LB là thấp hơn so với nồng độ của ST trong hầu hết bước lên men sữa chua.

Điều này cho thấy rằng độ pH có thể được kiểm soát hoàn toàn bằng cách cô đặc sucroza bổ sung hoặc các hydrat cacbon lên men khác, vì *Lb. Bulgaricus* có thể được tăng lên một cách dễ dàng.

Môi trường nuôi cấy lac- sẽ không những dẫn đến việc độ pH cuối cao hơn sau, ví dụ, 6 giờ, mà cũng sẽ có quá trình sau axit hóa giảm đáng kể và do đó giúp kéo dài thời hạn sử dụng.

Trong một số thử nghiệm, đã quan sát được rằng độ pH rất ổn định trong khoảng 5 giờ sau khi kết thúc bước lên men và sau đó bị giảm nhẹ trong 10 giờ tiếp theo (dữ liệu không được thể hiện). Điều này dường như là do các thể hồi biến tự phát, tức là LAB đạt được khả năng sử dụng lactoza bằng cách gây đột biến tự phát.

Ví dụ 3: Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men có thời hạn sử dụng kéo dài

Sữa chua có thời hạn sử dụng kéo dài (sữa chua ESL) được tạo ra bằng cách lên men sữa với FD-DVS YFL-904 đang có trên thị trường và trong bước lên men riêng rẽ với môi trường nuôi cấy mới F-DVS Acidifix 2.0 (chứa *Streptococcus thermophilus* CHCC17861 và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944, mô tả trong Ví dụ 2).

Bảng 1 - Sữa chua ESL cô đặcng thức:

Nguyên liệu sữa

Thành phần	Thông số	Liều lượng
Sữa tươi	Meiji, chai dung tích 2L	97,95%
Thermex	Tinh bột cải biến, Ingredion	1,00%
LM 106-AS-YA	Pectin, CP Kelco	0,15%
Kelcogel YSS	Gôm gellan, CP Kelco	0,03%
Đường	Đường tinh luyện, Phoon Huat	0,87%
Môi trường nuôi cấy	FD-DVS-YF-L904 F-DVS-Acidifix	100u/mt 100u/mt

Phân tích Milkoscan: chất béo: 3,70% Protein: 3,05%

12% xi-rô đường được bổ sung vào khối màu trắng sau khi lên men

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

Nhiệt độ trộn: 45°C - 50°C

Thời gian hydrat hoá: 20 phút

Quy trình:

Áp suất ủ: 150 ba ($150 \cdot 10^{+2}$ kPa) + 30 ba ($30 \cdot 10^{+2}$ kPa) (tổng là 180 ba ($180 \cdot 10^{+2}$ kPa))

Điều kiện tiệt trùng theo phương pháp Pasteur: 95°C/4 phút

nhiệt độ làm lạnh: nhỏ hơn 10°C

Lên men:

Nhiệt độ lên men: 43°C đối với YF-L904 và 39°C đối với Acidifix

Độ pH cuối: $4,35 \pm 0,05$

Phá vỡ sữa đông bằng tay khi đạt được độ pH mong muốn.

Bổ sung 12% xi-rô đường vào 88% chế phẩm lên men Nguyên liệu sữa. Khuấy bằng tay để trộn đều.

Xử lý bằng nhiệt sữa chua nhờ nhà máy sản xuất GEA:

Homo áp suất: 0 bar

Điều kiện xử lý sữa bằng nhiệt: 65°C/30 giây

Nạp vào các chai (nhiệt độ nạp: 28°C - 33°C).

Hoạt tính sau axit hóa được phân tích đối với cả hai sản phẩm trực tiếp sau khi lên men, sau khi xử lý sữa bằng nhiệt và sau 6 ngày bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau. Các kết quả được thể hiện trên Fig.4 và cho thấy độ ổn định cao của độ pH của sản phẩm thu được bằng Acidifix trong quá trình xử lý và bảo quản.

Ví dụ 4: Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng LAB không có glucoza

Vật liệu và phương pháp

Nguyên liệu sữa (1,0% chất béo & 4,5% protein):

Thành phần: Hỗn hợp của sữa thương mại (1,5% chất béo + 0,5% chất béo + sữa không kem bột để đạt được lượng chất béo và protein theo yêu cầu) 9,5% khối lượng/khối lượng Sữa bột gầy + 90,5% nước máy

Sữa thương mại: Arla Harmonie minimælk (0,5% chất béo) và Arla Harmonie letmælk (1,5% chất béo)

Sữa bột gầy: Arla Foods, Gin 990214

Tiến hành: Trộn sữa và khuấy bột, nhiệt xử lý 90°C, 20 phút

Lactoza:

Sản phẩm: Lactozamonohydrat (Gin 500449, mẻ 0005078607)

Nhà sản xuất: German Lac-Sachsenmilch

Được bổ sung dưới dạng dung dịch 19% khối lượng/khối lượng vào nền làm sữa chua, để thu được mức đúng theo quy định

Công thức pha chế: 0,6kg lactoza monohydrat + 2,4 kg nước máy

Quy trình: Gia nhiệt kết hợp khuấy, trước khi tiệt trùng bằng phương pháp Pasteur (95°C, 5 phút)

Môi trường nuôi cấy khởi động:

F-DVS Sweety 1.0 chứa hỗn hợp của các chủng sau

chủng kháng 2-deoxy-glucoza

Streptococcus thermophilus CHCC16731 (thể đột biến CHCC11976 lên men hyper-lactoza và tiết glucoza).

Streptococcus thermophilus CHCC15757 (thể đột biến CHCC14944 kháng 2-deoxyglucoza).

Streptococcus thermophilus CHCC16404 (thể đột biến CHCC15757 lên men hyper-lactoza và tiết glucoza).

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CHCC16159 (thể đột biến CHCC10019 kháng 2-deoxyglucoza).

Đặc tính sau axit hóa thấp của thể đột biến *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* lên men hyper-lactoza và tiết glucoza.

Việc tiết của thể đột biến *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* lên men hyper-lactoza và tiết glucoza được thực hiện như được mô tả trong WO2013/160413 với tên sáng chế là “Sử dụng vi khuẩn lactic để tạo ra sản phẩm thức ăn lên men có hương vị ngọt ngào cao”.

Để thể hiện đặc tính sau axit hóa thấp của môi trường nuôi cấy trong thiết lập chuẩn đối với việc tạo ra sữa chua, 0,024 % Môi trường nuôi cấy Frozen Direct Vat Set (F-DVS) chứa hỗn hợp môi trường nuôi cấy Sweety 1.0 được sử dụng để cấy 3 l nguyên liệu sữa và sữa được lên men ở 43°C.

Tiếp theo là axit hóa bằng thiết bị ghi pH CINAC (thiết bị Alliance) với điện cực pH chuẩn và phần mềm CINAC 4.0. Khi độ pH đạt đến 4,55 ở 43°C hiện tượng đông tụ

sữa đã xảy ra. Sau đó, sữa chua được làm lạnh và được ủ ở $7 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ trong 42 ngày. Sau đó, sự phát triển pH diễn ra trong thời gian 42 ngày tiếp theo (Fig.5). Như có thể quan sát được từ Fig.5, sự phát triển pH sau 42 ngày bảo quản ở $7 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ ít hơn 0,1 đơn vị pH xác nhận mức sau axit hóa cực kỳ thấp.

Dữ liệu này cho thấy rằng hỗn hợp sữa chua chứa chủng tiết glucoza và việc sử dụng phương pháp theo sáng chế sẽ gây đông tụ sữa, duy trì độ pH cuối rất ổn định trong 43 ngày ở $7 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ và làm tăng hương vị ngọt ngào của sản phẩm đã được lên men.

Môi trường nuôi cấy hỗn hợp chứa chủng *Streptococcus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tiết glucoza chuyển hóa toàn bộ hoặc hầu như toàn bộ lactoza có mặt trong sữa trong bước lên men. Kết quả là, LAB không còn gây ra quá trình sau axit hóa.

Ví dụ 5: Quá trình sau axit hóa thấp khi sử dụng lactaza trong bước lên men sữa chua

Đã bất ngờ phát hiện ra rằng việc bổ sung lactaza trong phương pháp sản xuất sữa chua làm giảm đáng kể quá trình sau axit hóa so với sữa chua được tạo ra mà không sử dụng lactaza.

Vật liệu và phương pháp

Nguyên liệu sữa (0,1% chất béo & 4,5% protein):

Thành phần: Hỗn hợp sữa thương mại (0,1% chất béo) và sữa bột gầy để đạt được mức protein theo yêu cầu.

Sữa thương mại: Arla skummetmælk (0,1% chất béo)

Sữa bột gầy: Milex 240, Arla Foods, lot 990214

Tiến hành: Trộn bột và sữa, hydrat hoá ở 5°C qua đêm, xử lý nhiệt ở $90^{\circ}\text{C}/20$ phút.

Lactaza:

Sản phẩm: Ha-Lactaza 5200 (Gin 450805)

Nhà sản xuất: Chr. Hansen A/S

Môi trường nuôi cấy khởi động:

F-DVS YF-L706, Gin 685141

F-DVS YF-L901, Gin 685142

F-DVS YoFlex®Mild 1.0, Gin 702897

F-DVS YoFlex®Creamy 1,0, Gin 706168

F-DVS YoFlex®Premium 1.0, Gin 706161

Toàn bộ đều được cung cấp từ Chr. Hansen A/S

Bước lên men được thực hiện trong quy mô 3 lít. Môi trường nuôi cấy được cấy ở 0,02%, và các mẫu được lên men ở 43°C. Lactaza ở liều lượng 3500 NLU/l được bổ sung vào nguyên liệu sữa cùng với môi trường nuôi cấy. Sự axit hóa được kiểm tra bằng máy đo pH 1120 (Mettler-Toledo AG, 52120653), và bước lên men đã dừng ở độ pH 4,55. Sản phẩm sữa lên men được khuấy theo cách tiêu chuẩn hóa, và được điều áp và làm lạnh tiếp (2 ba ($2 \cdot 10^{+2}$ kPa), 25°C), trước khi bảo quản ở 6°C. Độ pH của các mẫu tiếp theo được kiểm tra ở 1, 7, 14, 21 và 48 ngày bằng cách sử dụng máy đo pH 1120 (Mettler-Toledo AG, 52120653). Nồng độ của lactoza, glucoza và galactoza (mg/g) trong sữa chua vào ngày 1 sau khi lên men được xác định bằng cách sử dụng HPLC với cột Dionex CarboPac PA 20 3*150mm (Thermo Fisher Scientific, số sản phẩm 060142).

Các kết quả được thể hiện trên Fig.6, minh họa sự phát triển độ pH trong thời gian bảo quản và trong quá trình sau axit hóa. Các kết quả khác nữa được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây tạo ra tổng quan về sự sai khác độ pH thu được trong sữa chua được tạo ra bằng lactoza và không bằng lactaza với môi trường nuôi cấy khác nhau. Sự khác nhau này gây ra bởi quá trình sau axit hóa và được xác định bằng cách sử dụng sữa chua F-DVS YoFlex®Mild 1.0 làm ví dụ: Sữa chua F-DVS YoFlex®Mild 1.0 with 3500 NLU/L lactaza có độ pH sau 21 ngày là 4,44, trong khi sữa chua F-DVS YoFlex®Mild 1.0 không có lactaza có độ pH là 4,36. Bước lên men được dừng ở 4,55 cho cả hai loại sữa chua. Quá trình sau axit hóa đối với sữa chua được xử lý bằng lactaza là $4,55 - 4,44 = 0,11$, đối với sữa chua không có lactaza là $4,55 - 4,36 = 0,19$. Do đó, sự khác nhau về quá trình sau axit hóa giữa sữa chua được lên men bằng F-DVS YoFlex®Mild 1.0 có và không có 3500 NLU/L lactaza là $0,19 - 0,11 = 0,08$.

Bảng 2: Sự khác nhau về quá trình sau axit hóa giữa sữa chua được tạo ra bằng môi trường nuôi cấy trong Bảng ở 0,02%, có và không có 3500 NLU/L lactaza.

Môi trường nuôi cấy	Ngày 21	Ngày 48
F-DVS YF-L706	0,00	0,00
F-DVS YF-L901	0,04	0,04
F-DVS YoFlex® Creamy	0,10	0,07
F-DVS YoFlex® Premium 1.0	0,08	0,08
F-DVS YoFlex® Mild 1.0	0,08	0,11

Các dữ liệu được thể hiện cho thấy rằng môi trường nuôi cấy thương mại Chr. Hansen chọn lọc cùng với lactaza có thể được sử dụng để thu nhận sữa chua có quá trình sau axit hóa giảm. F-DVS YoFlex® Mild 1.0, F-DVS YoFlex® Creamy 1,0 và F-DVS YoFlex® Premium 1.0, toàn bộ đều cho thấy quá trình sau axit hóa thấp. Việc giảm quá trình sau axit hóa thể hiện ít rõ rệt hơn trong môi trường nuôi cấy YF-L901 và không quan sát được việc giảm quá trình sau axit hóa đối với F-DVS YF-L706.

Bảng 3. Nồng độ của lactoza, glucoza và galactoza (mg/g) trong sữa chua được tạo ra bằng và không bằng 3500 NLU/L lactaza vào ngày 1 sau khi lên men được xác định bằng cách sử dụng HPLC.

Môi trường nuôi cấy	Galactoza (mg/g)	Glucoza (mg/g)	Lactoza (mg/g)
F-DVS YF-L706	9,2	0,4	42,3
F-DVS YF-L706 + 3500 NLU/lactaza	26,2	21,8	2,0
F-DVS YF-L901	10,6	1,6	39,4
F-DVS YF-L901 + 3500 NLU/lactaza	26,1	21,4	2,1
F-DVS YoFlex® Creamy 1,0	7,7	0,0	43,4
F-DVS YoFlex® Creamy 1,0 + 3500 NLU/lactaza	23,1	21,2	5,3
F-DVS YoFlex® Premium 1.0	7,7	0,6	41,7
F-DVS YoFlex® Premium 1.0 + 3500 NLU/lactaza	25,1	23,8	2,0
F-DVS YoFlex® Mild 1.0	7,7	0,6	42,2
F-DVS YoFlex® Mild 1.0 + 3500 NLU/lactaza	25,4	24,1	2,9

Bảng 3 cho thấy rằng môi trường nuôi cấy được lên men với sự có mặt của lactaza có lượng lactoza còn lại rất thấp nhưng nồng độ glucoza và galactoza lại cao hơn. Do đó, trên thực tế, quá trình sau axit hóa quan sát được đối với các chủng có thể được giải thích bằng tổng lượng hydrat cacbon sẵn có còn lại cao đối với sự chuyển hóa LAB.

Mức độ sau axit hóa vẫn rất thấp và do đó đáng ngạc nhiên đối với nồng độ của hydrat cacbon còn lại. Quá trình sau axit hóa thấp dường như được gây ra bởi nhu cầu về sự dịch chuyển chuyển hóa của nguồn hydrat cacbon ở vi sinh vật. Nói cách khác, môi trường nuôi cấy có quá trình sau axit hóa thấp chứa các chủng tồn tại với sự dịch chuyển nguồn hydrat cacbon từ lactoza thành glucoza.

Lưu trữ sinh học và giải pháp của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này

Người nộp đơn yêu cầu mẫu vi sinh vật được lưu trữ cho đơn này như được mô tả dưới đây chỉ có thể được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, cho đến ngày sáng chế này được cấp bằng.

Streptococcus thermophilus CHCC16731 được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 04 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28889.

Streptococcus thermophilus CHCC15914 được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28909.

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus CHCC18944 được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28910.

Streptococcus thermophilus CHCC17861 được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28952.

Streptococcus thermophilus CHCC17862 được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28953.

Việc lưu trữ này được thực hiện theo hiệp ước Budapest về sự công nhận quốc tế đối với việc lưu trữ các vi sinh vật nhằm mục đích tiến hành thủ tục cấp bằng sáng chế.

Tài liệu tham khảo

US2010/0021586

WO2006/042862A1

WO2010/139765

WO2013/169205

WO2011/000879

Pool et al., Metabolic Engineering, vol. 8, 2006, 456-464

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước lên men sữa, trong đó:

(a) bước lên men được khởi động bằng môi trường nuôi cấy khởi động chứa vi khuẩn lactic có khả năng chuyển hóa một hoặc một số hydrat cacbon được bổ sung vào sữa,

(b) bước lên men được kết thúc bằng cách làm giảm nồng độ của một hoặc một số hydrat cacbon trong bước lên men, trong đó sự kết thúc bước lên men được kiểm soát bằng nồng độ của hydrat cacbon trong sữa cần lên men, và trong đó ở thời điểm kết thúc bước lên men, nồng độ của hydrat cacbon được chuyển hóa bằng vi khuẩn lactic nằm trong khoảng từ 0,01mg/g đến 5mg/g,

(c) bước làm giảm này ít nhất cũng được gây ra nhờ hoạt tính chuyển hóa của vi khuẩn lactic, và

(d) bước lên men được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy khởi động chứa ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* thiếu hụt lactoza, trong đó hydrat cacbon là hydrat cacbon có thể lên men được khác với lactoza.

2. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men theo điểm 1, trong đó vi khuẩn lactic không có khả năng chuyển hóa lactoza và trong đó trước khi bổ sung môi trường nuôi cấy khởi động, tổng nồng độ của hydrat cacbon có thể được chuyển hóa bằng vi khuẩn lactic trong sữa là thấp hơn 45mg/g.

3. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 45°C.

4. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó sau khi kết thúc bước lên men, sản phẩm đã được lên men được đóng gói ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C,

5. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó môi trường nuôi cấy khởi động chứa chủng vi khuẩn lactic phân lập được đặc trưng bởi:

(a) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28952; hoặc

(b) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28953.

6. Sản phẩm sữa lên men được sản xuất bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó sản phẩm này chứa một hoặc nhiều chủng sau:

(a) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28952; hoặc

(b) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28953; và tùy ý

(c) chủng *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28910.

7. Chế phẩm để sử dụng trong phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó chế phẩm này chứa một hoặc nhiều chủng sau:

(a) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28952; hoặc

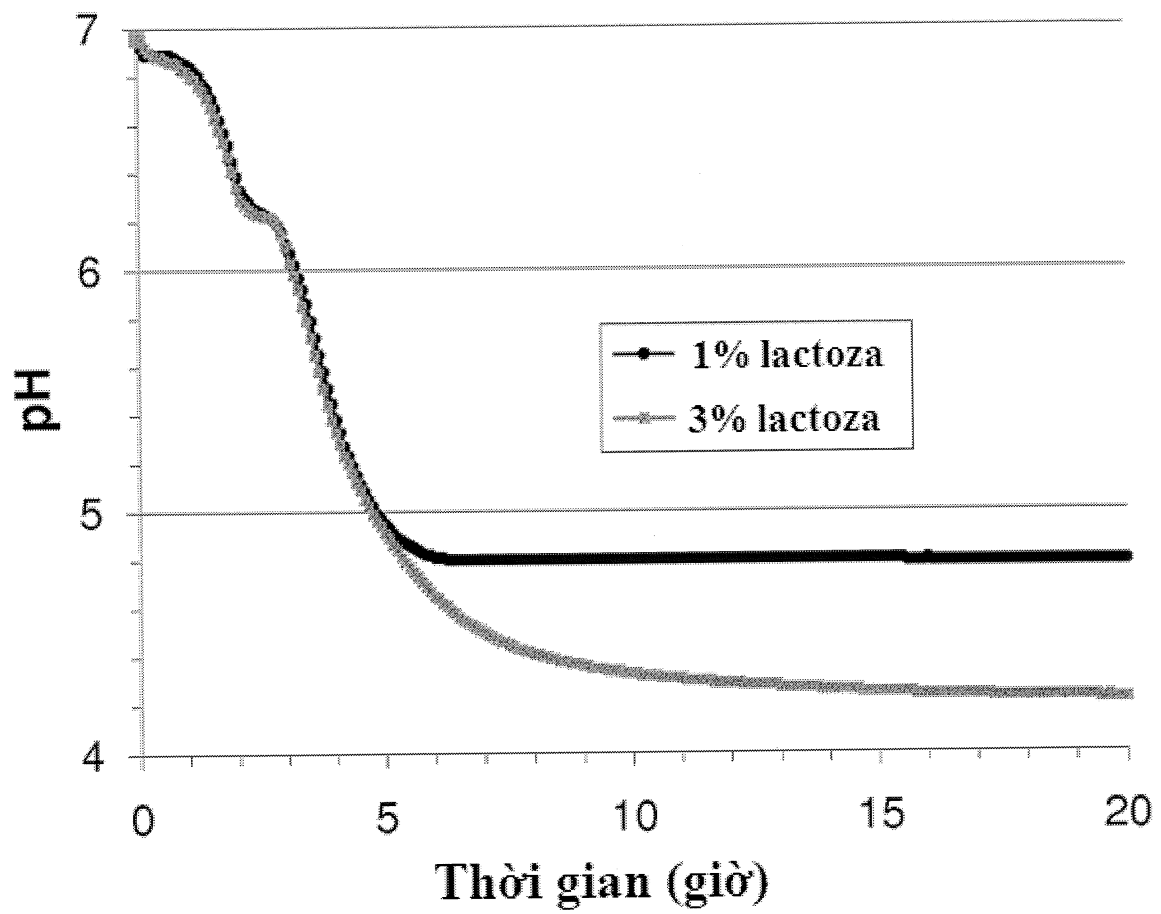
(b) chủng *Streptococcus thermophilus*, chủng này là:

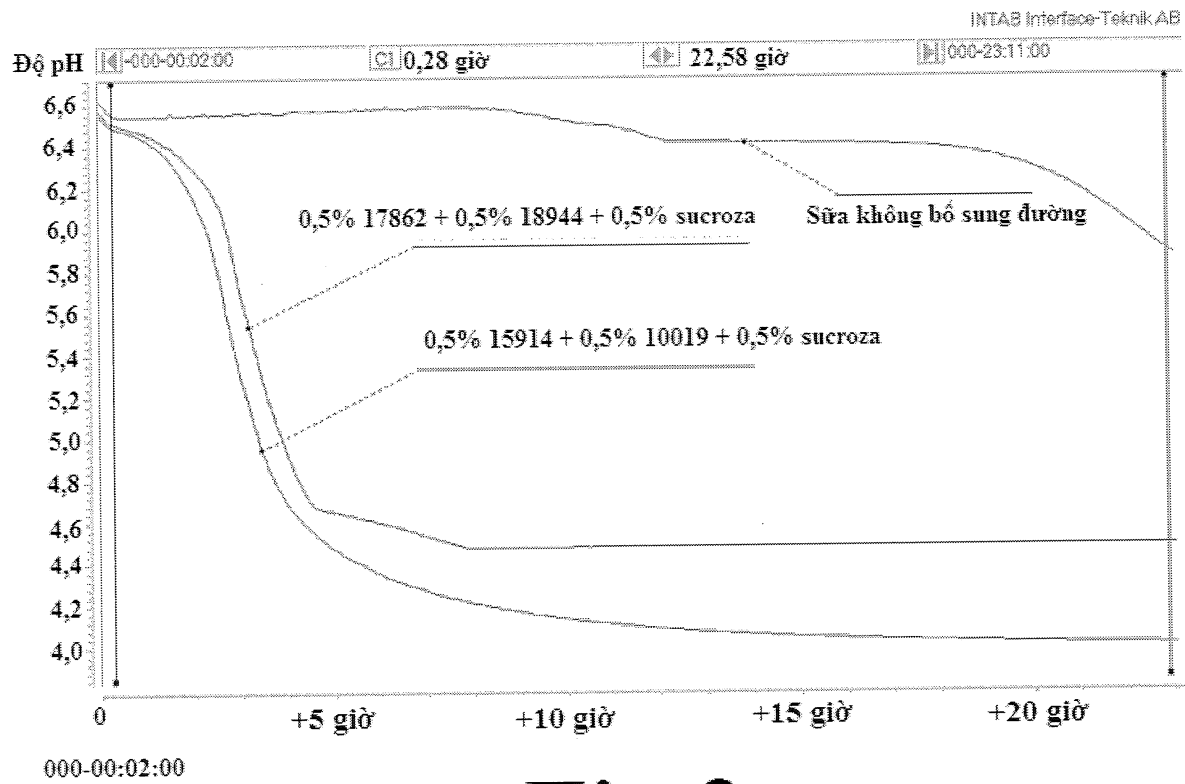
(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28953;

và

(c) chủng *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, chủng này là:

(i) chủng được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Đức có địa chỉ tại Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, vào ngày 12 tháng 06 năm 2014 với mã truy cập là DSM 28910.

CHCC6008 - Hạn chế lactoza**Fig.1**

**Fig.2**

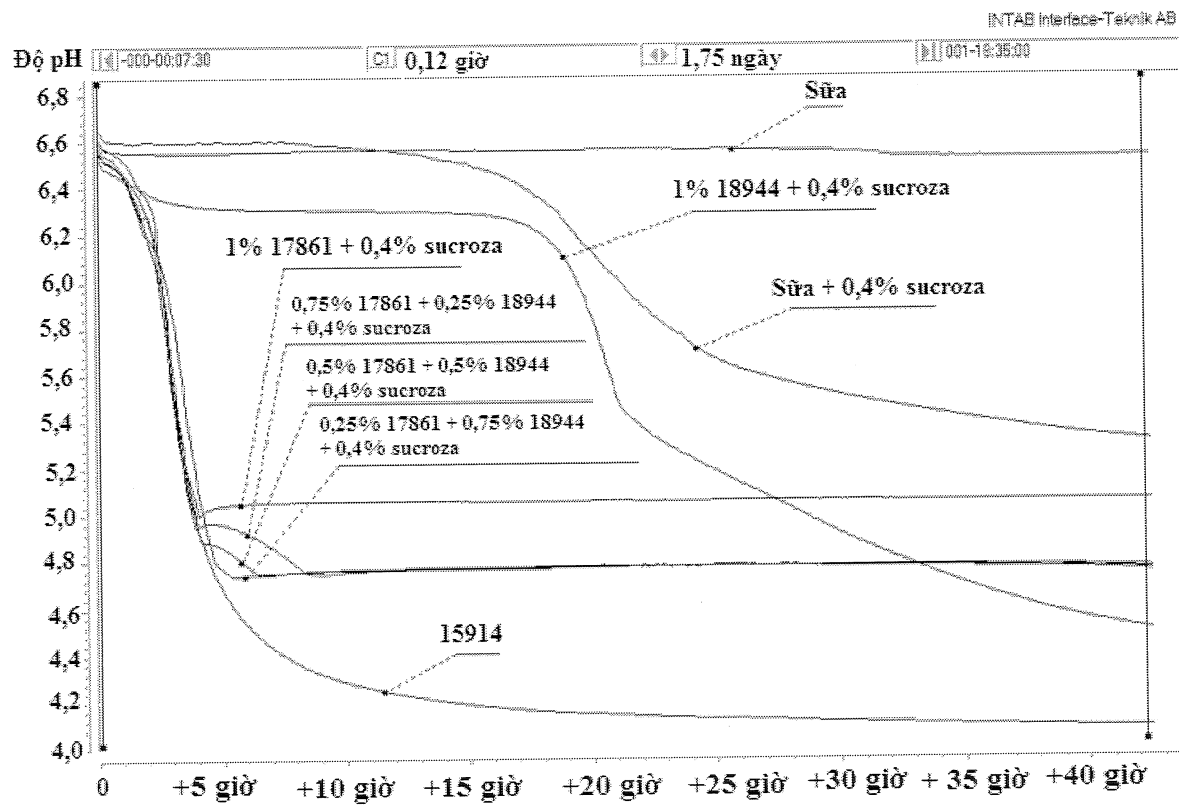


Fig.3

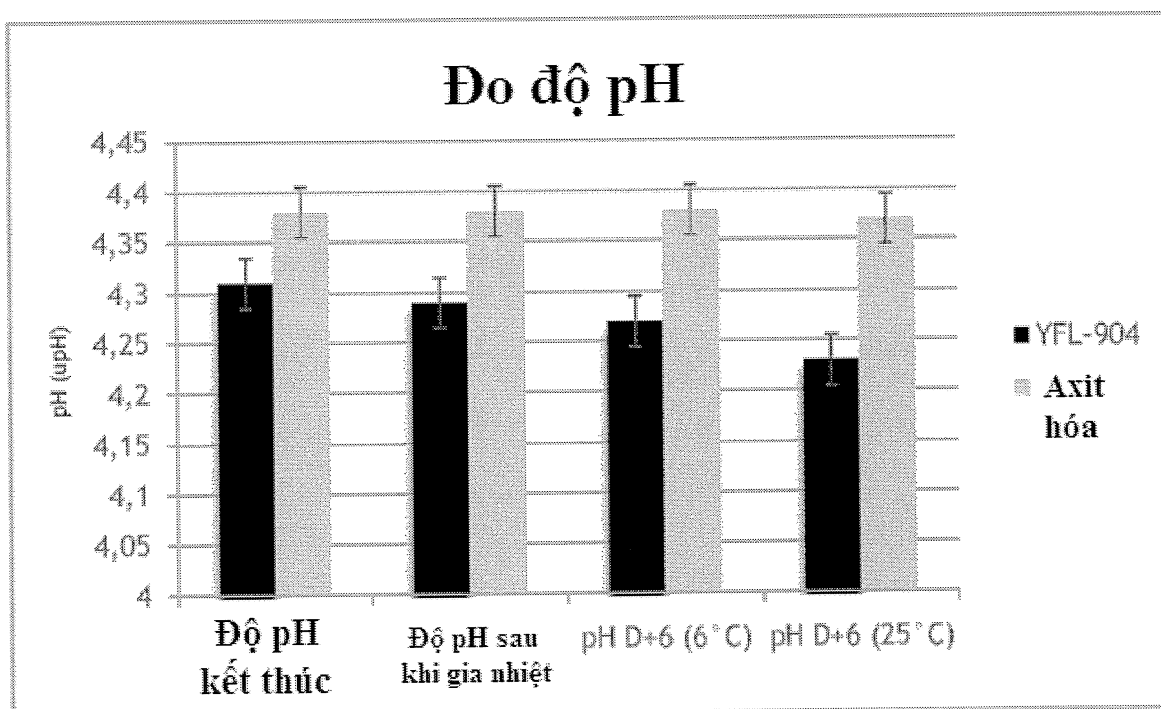


Fig.4

Quá trình sau axit hóa trong
điều kiện bảo quản kéo dài ở nhiệt độ 6°C

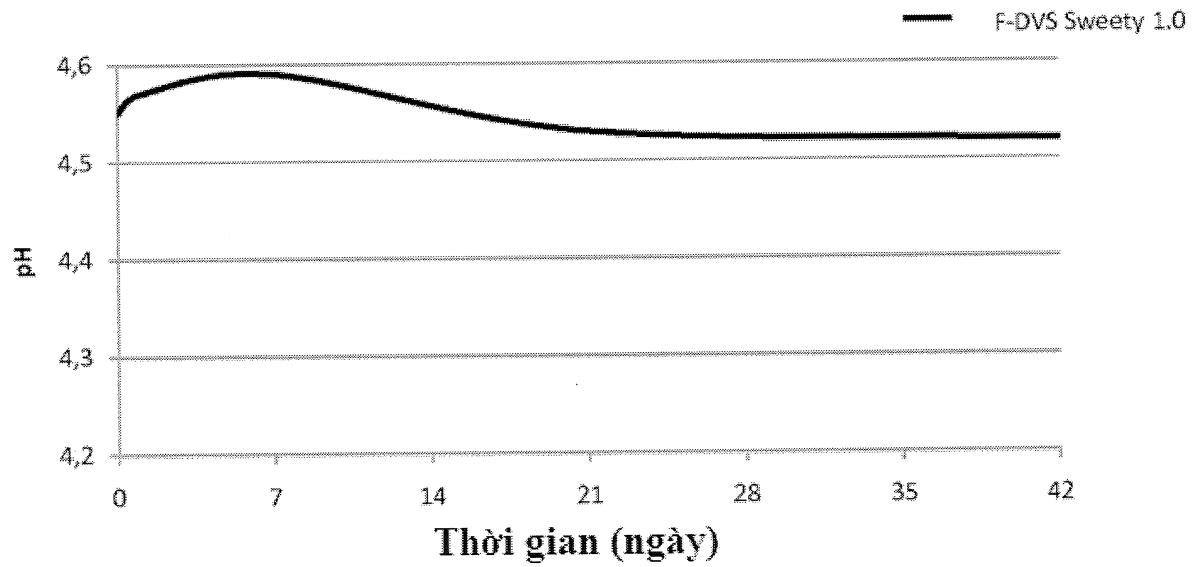
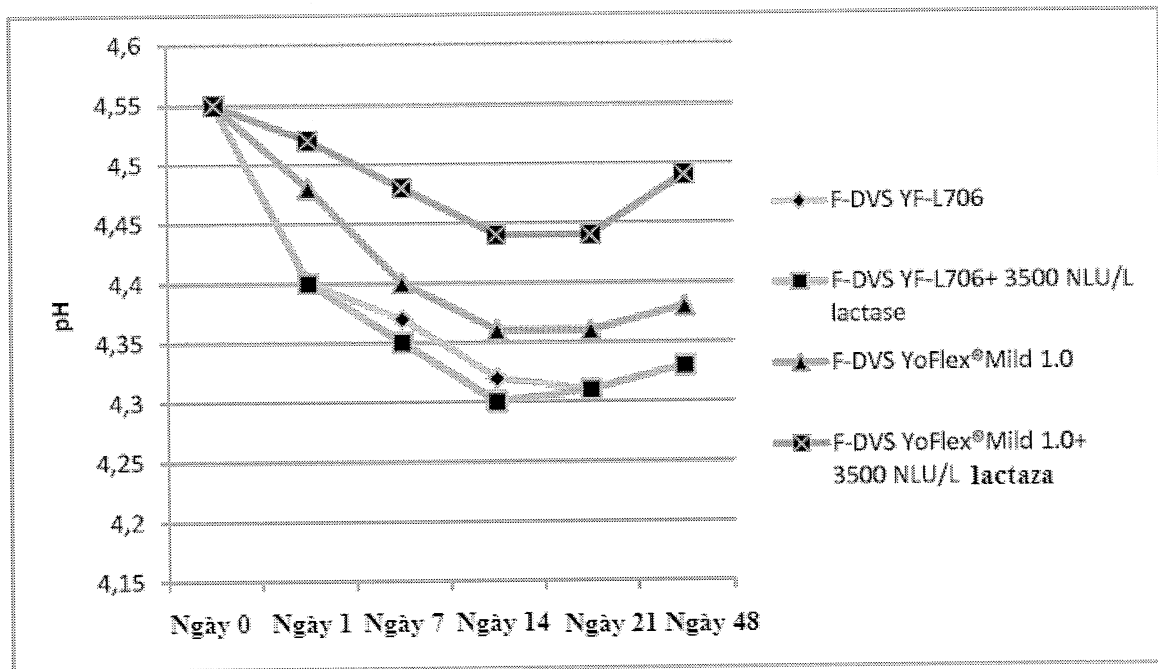


Fig.5

**Fig.6**

Sản xuất sữa lên men cho các ứng dụng ưa nhiệt và ưa nhiệt trung bình
chứa nồng độ protein, chất béo và chất rắn cao

Ví dụ về phương pháp bao gồm bước cô đặc trước khi lên men
và bước cô đặc bằng cách phân tách nước sữa sau khi lên men

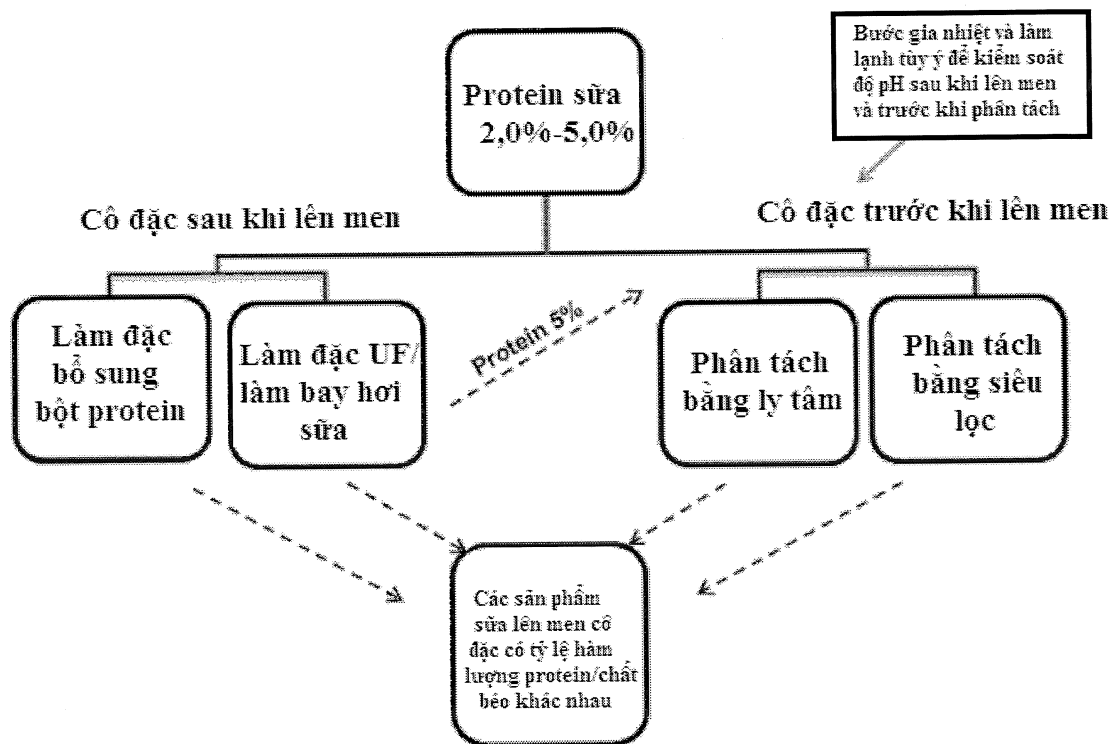


Fig.7

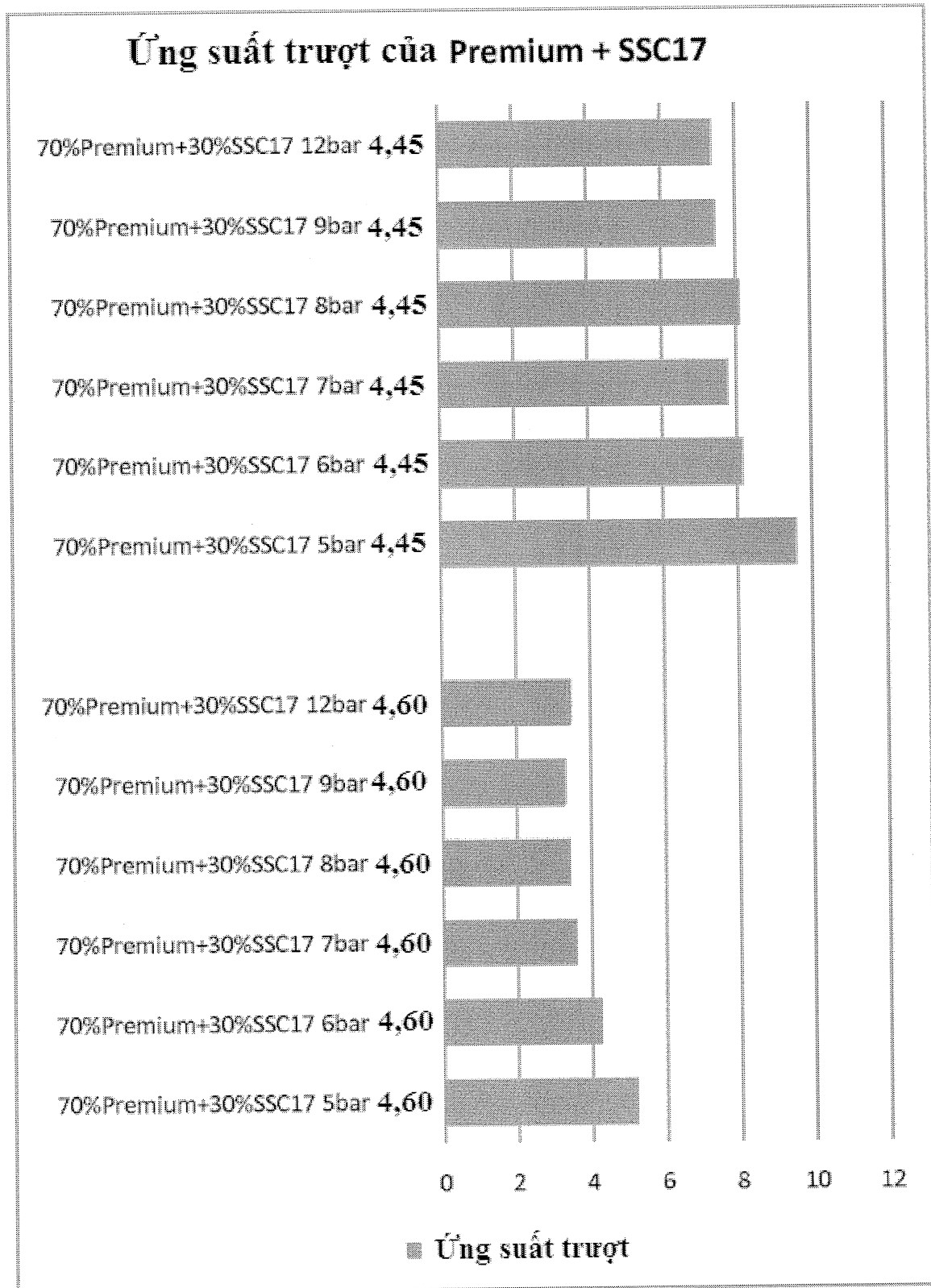


Fig.8

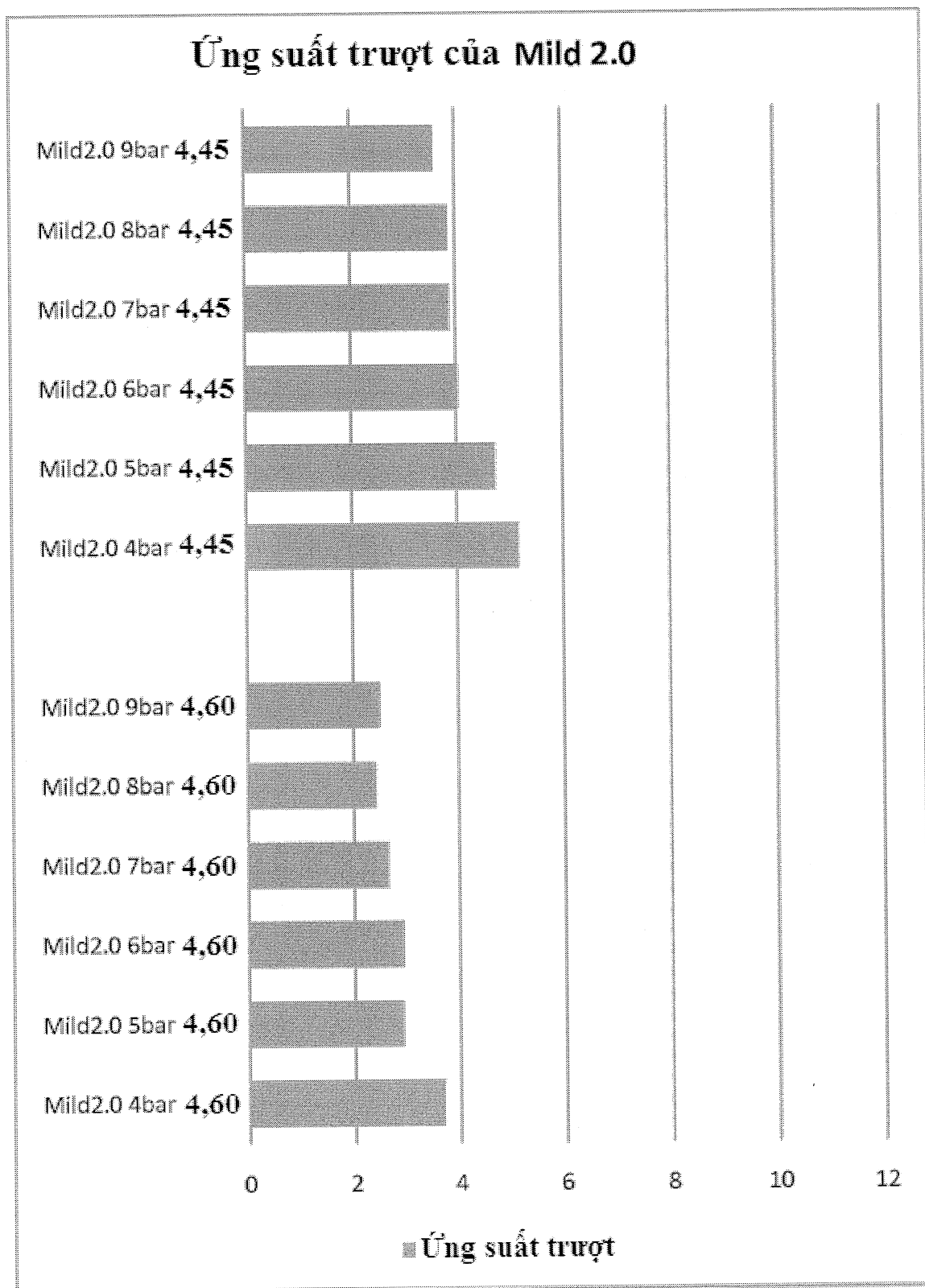


Fig.9

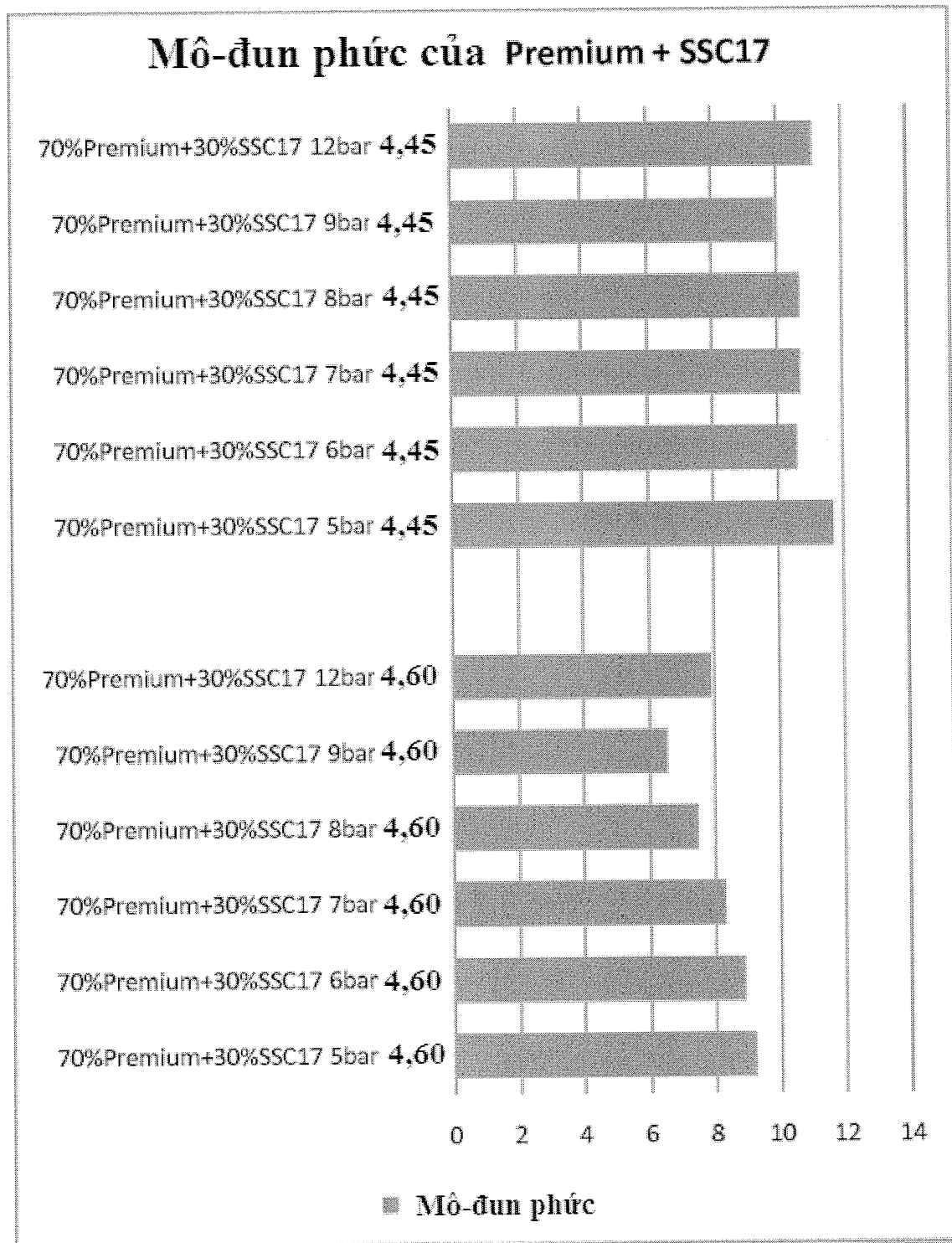
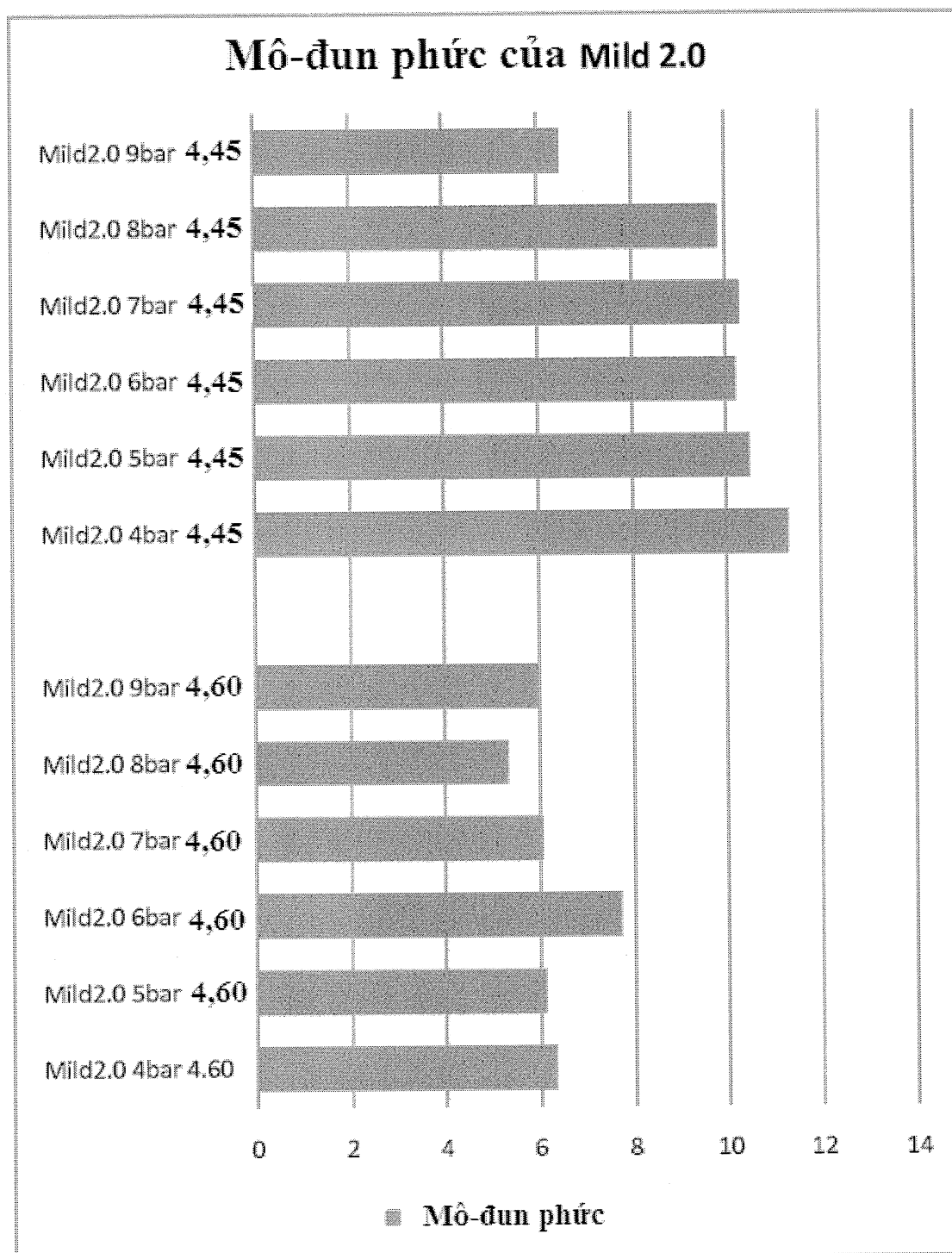


Fig.10

**Fig.11**