



(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)



1-0041629

(51)⁸ A23L 33/135; A23C 9/12

(13) B

(21) 1-2018-04588

(22) 11/05/2017

(86) PCT/EP2017/061270 11/05/2017

(87) WO2017/194650 16/11/2017

(30) 16169215.7 11/05/2016 EP; 16197223.7 04/11/2016 EP

(45) 25/11/2024 440

(43) 25/02/2019 371A

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

Boege Alle 10-12, 2970 Hoersholm, Denmark

(72) GILLELADEN, Christian (DK); TRIHAAS, Jeorgos (DK); JANZEN, Thomas (DE);
OEHRSTROEM RUNGE, Mette (DK).

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

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT THỰC PHẨM DẠNG SỮA LÊN MEN CÓ THỂ BẢO QUẢN Ở NHIỆT ĐỘ MÔI TRƯỜNG

(57) Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất thực phẩm dạng sữa lên men có thể bảo quản ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C và chứa vi khuẩn axit lactic sống, quy trình này bao gồm các bước: - chế biến thực phẩm dạng sữa có độ pH nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,4 - xử lý nhiệt thực phẩm này để làm giảm nồng độ vi khuẩn đến không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ đơn vị tạo khuẩn lạc/g (CFU/g- Colony Forming Unit/g) để thu được thực phẩm được xử lý nhiệt; và - bổ sung trong điều kiện vô trùng một hoặc nhiều chủng vi khuẩn axit lactic duy trì khả năng sống sót ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C vào thực phẩm đã được xử lý nhiệt này ở tổng nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g để thu được thực phẩm có thể bảo quản ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C, trong đó chủng vi khuẩn axit lactic duy trì khả năng sống sót của nó ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C được chọn từ nhóm bao gồm các chủng: (i) trong đó chủng vi khuẩn axit lactic khi được bổ sung ở nồng độ bằng $2,5 \times 10^7$ CFU/g vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm được chế biến bằng cách lên men bằng giống khởi động chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* ở nhiệt độ 43°C đến độ pH bằng 4,3, đã được xử lý nhiệt, ở nhiệt độ 75°C trong 30 giây, có thể duy trì khả năng sống sót ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g khi kết thúc bảo quản sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này trong 150 ngày ở nhiệt độ 25°C; và (ii) trong đó độ pH của sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này giảm tối đa 0,8 đơn vị trong thời gian bảo quản; và (iii) trong đó chủng vi khuẩn axit lactic này được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic, thích hợp để bổ sung vào thực phẩm được xử lý nhiệt có độ pH nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,4 được bảo quản ở nhiệt độ môi trường.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong những năm gần đây, sản phẩm sữa lên men, như sữa chua, có thể được bảo quản, vận chuyển, xử lý và tiêu thụ trong các điều kiện không lạnh, tức là ở nhiệt độ môi trường, trong vài tháng đã được sử dụng rộng rãi. Sữa chua này cho phép người sử dụng có thể vận chuyển sữa chua trong thời gian xác định và không cần bảo quản lạnh như một số đồ uống, do đó sữa chua này tạo ra nhiều tiện ích cho người sử dụng. Để thu được thời hạn sử dụng kéo dài ở nhiệt độ môi trường, sữa chua đã được xử lý nhiệt sau khi kết thúc quy trình lên men để tiêu diệt hoặc ít nhất ức chế sinh trưởng tiếp tục của quần thể vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong quy trình lên men. Phương pháp xử lý nhiệt có thể là phương pháp thanh trùng hoặc phương pháp xử lý ở nhiệt độ rất cao. Các sữa chua này cũng được gọi là sữa chua đã thanh trùng hoặc sữa chua bảo quản ở nhiệt độ môi trường.

Các sản phẩm sữa chua đã thanh trùng không chứa hoặc chỉ chứa rất ít vi khuẩn axit lactic sống. Tuy nhiên, các sản phẩm sữa chua đã thanh trùng cần chứa vi khuẩn axit lactic và/hoặc lợi khuẩn để cung cấp nhiều tác dụng có lợi của vi khuẩn này cho người sử dụng, ví dụ tác dụng bổ sung dinh dưỡng và tăng cường sức khỏe. Tuy nhiên, việc sung vi khuẩn sống vào các sản phẩm sữa chua đã thanh trùng được bảo quản ở nhiệt độ môi trường đã đặt ra vấn đề kỹ thuật bất cập, tức là vi khuẩn sẽ tăng sinh đến mức độ nhất định và làm hỏng sữa chua, ví dụ bằng cách giảm độ pH. Vấn đề kỹ thuật bất cập này đã được giải quyết bằng một số phương pháp khác nhau. Ví dụ, các chủng vi khuẩn ở dạng bào tử đã được bổ sung vào các sản phẩm sữa chua đã thanh trùng. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn đã được bổ sung vào các sản phẩm sữa chua đã thanh trùng ở dạng bột, khan, đông khô, được bao hoặc bao nang. Hơn nữa, các chủng vi khuẩn để bổ sung vào các sản phẩm sữa chua đã thanh trùng đã được bất hoạt bằng phương pháp chiếu xạ, phương pháp xử lý vi sóng, kháng sinh, phương pháp thanh trùng ở nhiệt độ vừa phải, hóa chất ức chế hoặc điều chỉnh độ pH, hoạt độ của nước hoặc nhiệt độ.

WO2009/116864 đề cập đến sản phẩm sữa chứa bào tử lợi khuẩn, trong đó sản phẩm này có thể được bảo quản ở nhiệt độ không lạnh trong thời gian kéo dài.

WO2004/069156 đề cập đến thực phẩm chứa lợi khuẩn, đã được bất hoạt bằng phương pháp chiếu xạ, phương pháp xử lý vi sóng, kháng sinh, phương pháp thanh trùng ở nhiệt độ vừa phải và hóa chất ức chế.

EP-B1-1 289 380 đề cập đến thực phẩm, như sản phẩm sữa, chứa vi khuẩn *Lactobacillus* bất hoạt. Chủng vi khuẩn *Lactobacillus* này có thể được bất hoạt bằng phương pháp xử lý ở nhiệt độ vừa phải, điều chỉnh độ pH hoặc điều chỉnh hoạt độ của nước.

EP-B1-1 514 553 đề cập bột vi khuẩn axit lactic được bao hai lớp có khả năng sống sót cao trong cơ thể người, trong đó vi khuẩn axit lactic này được bao hai lớp bằng protein và polysacarit.

CN101323850 đề cập đến phương pháp sản xuất vi nang chứa *Lactobacillus helveticus* ở dạng được bao vi nang có khả năng kháng nhiệt cao.

EP-B1-0 555 618 đề cập đến thực phẩm chứa vi khuẩn axit lactic đông khô.

CN102492643 đề cập đến chủng *Lactobacillus rhamnosus* GRX19 được sử dụng trong giống khởi động để sản xuất sản phẩm sữa lên men chứa vi khuẩn *Lactobacillus* sống. Sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt, ví dụ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 75°C trong từ 15 đến 20 giây, và chủng *Lactobacillus* kháng nhiệt với nồng độ nhỏ vi khuẩn, ví dụ 10^7 CFU/mL sống sót sau khi xử lý nhiệt. Sau khi xử lý nhiệt, sản phẩm đã được xử lý nhiệt được nạp trong điều kiện vô trùng vào đồ chứa và bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 30 ngày.

WO2015/169928 đề cập đến chế phẩm sữa dạng lỏng thích hợp để sản xuất sản phẩm sữa có bột, trong đó chế phẩm này ổn định trong điều kiện bảo quản ở nhiệt độ môi trường, có độ pH nằm trong khoảng từ 3,8 đến 4,4 và chứa sữa lên men, lên đến 0,12% protein váng sữa được thủy phân, lên đến 5% chất béo, và lên đến 1% pectin giàu metyleste.

US20100009034 đề cập đến quy trình sản xuất đồ uống dạng sữa lên men duy trì nồng độ tế bào sống sót cao ở nhiệt độ môi trường bao gồm bước lên men sữa bằng cách sử dụng giống khởi động thông thường chứa vi khuẩn axit lactic, pha loãng, trộn, vô

trùng, và bổ sung chủng *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 vào sữa uống hỗn hợp ở điều kiện vô trùng.

US20100015285 đề cập đến quy trình sản xuất đồ uống dạng sữa được axit hóa trực tiếp duy trì nồng độ tế bào sống sót cao ở nhiệt độ môi trường bao gồm bước axit hóa trực tiếp bằng cách điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 4,0 đến 4,5 để thu được đồ uống dạng sữa được axit hóa, vô trùng, và bổ sung chủng *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 cùng với các yếu tố kích thích sinh trưởng ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,3%, ví dụ cacbohydrat, vào sữa uống hỗn hợp ở điều kiện vô trùng.

Tuy nhiên, vẫn cần phát triển các sản phẩm sữa chua đã thanh trùng được cải thiện chứa vi khuẩn axit lactic sống.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường, bao gồm bước chế biến thực phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,4, xử lý nhiệt thực phẩm này để làm giảm nồng độ vi khuẩn đến không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ CFU/g để thu được thực phẩm được xử lý nhiệt, bổ sung trong điều kiện vô trùng một hoặc nhiều chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường vào thực phẩm đã được xử lý nhiệt này ở tổng nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g để thu được thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường, và bảo quản thực phẩm này ở nhiệt độ môi trường trong thời gian xác định, trong đó chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường được chọn từ nhóm bao gồm chủng các chủng, (i) chủng vi khuẩn axit lactic khi được bổ sung ở nồng độ bằng $2,5 \times 10^7$ CFU/g vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm được chế biến bằng cách lên men bằng giống khởi động chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* ở nhiệt độ 43°C đến độ pH bằng 4,3, đã được xử lý nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong 30 giây, có thể duy trì khả năng sống sót ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g khi kết thúc bảo quản sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này trong 150 ngày ở nhiệt độ 25°C, và (ii) trong đó độ pH của sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này giảm tối đa 0,8 đơn vị trong thời gian bảo quản, và (iii) chủng vi khuẩn axit lactic này được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn

biến thể của chúng.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng các chủng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus rhamnosus* khi được bổ sung vào sản phẩm sữa chua được xử lý để bảo quản ở nhiệt độ môi trường có thể duy trì khả năng sống sót ở mức độ nhất định và không làm giảm đáng kể độ pH trong thời gian ít nhất bằng 150 ngày. Phát hiện này là đáng ngạc nhiên, do vi khuẩn axit lactic sẽ sinh trưởng trên nguồn cacbohyđrat trong nguyên liệu sữa đồng thời làm giảm độ pH cho đến khi độ pH đạt được trị số nhất định, ở đó vi khuẩn này không thể sống sót, do đó nhìn chung vi khuẩn axit lactic trong nguyên liệu sữa sẽ ở trạng thái sinh trưởng và làm giảm độ pH hoặc chết.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường, trong đó thực phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,4, và chứa chủng vi khuẩn axit lactic này ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g, và thực phẩm này được bảo quản ở nhiệt độ môi trường trong thời gian xác định, và chủng vi khuẩn axit lactic này được chọn từ nhóm bao gồm các chủng, (i) chủng vi khuẩn axit lactic khi được bổ sung ở nồng độ bằng $2,5 \times 10^7$ CFU/g vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm được chế biến bằng cách lên men bằng giống khởi động chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* ở nhiệt độ 43°C đến độ pH bằng 4,3, đã được xử lý nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong 30 giây, có thể duy trì khả năng sống sót ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g khi kết thúc bảo quản sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này trong 150 ngày ở nhiệt độ 25°C, và (ii) trong đó độ pH của sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này giảm tối đa 0,8 đơn vị trong thời gian bảo quản, và (iii) chủng vi khuẩn axit lactic này được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Quy trình sản xuất thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường bao gồm bước chế biến thực phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,4, xử lý nhiệt thực phẩm này để làm giảm nồng độ vi khuẩn đến không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ CFU/g để thu được thực phẩm được xử lý nhiệt, bổ sung trong điều kiện vô trùng một hoặc nhiều

chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường vào thực phẩm đã được xử lý nhiệt này ở tổng nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g để thu được thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường, và bảo quản thực phẩm này ở nhiệt độ môi trường trong thời gian xác định, trong đó chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường được chọn từ nhóm bao gồm chủng các chủng, (i) chủng vi khuẩn axit lactic khi được bổ sung ở nồng độ bằng $2,5 \times 10^7$ CFU/g vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm được chế biến bằng cách lên men bằng giống khởi động chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* ở nhiệt độ 43°C đến độ pH bằng 4,3, đã được xử lý nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong 30 giây, có thể duy trì khả năng sống sót ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g khi kết thúc bảo quản sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này trong 150 ngày ở nhiệt độ 25°C , và (ii) trong đó độ pH của sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này giảm tối đa 0,8 đơn vị trong thời gian bảo quản, và (iii) chủng vi khuẩn axit lactic này được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng.

Theo phương án ưu tiên, chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế có thể duy trì khả năng sống sót ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g, tốt hơn nếu ít nhất bằng $5,0 \times 10^3$ CFU/g, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng $1,0 \times 10^4$ CFU/g, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng $5,0 \times 10^4$ CFU/g và tốt nhất nếu ít nhất bằng $1,0 \times 10^5$ CFU/g ở thời điểm kết thúc quá trình bảo quản.

Tốt hơn nếu, độ pH của sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này giảm tối đa 0,7 đơn vị, tốt hơn nếu 0,6 đơn vị, tốt hơn nếu 0,5 đơn vị, tốt hơn nếu 0,4 đơn vị, tốt hơn nếu 0,3 đơn vị, và tốt nhất nếu 0,2 đơn vị trong thời gian bảo quản.

Theo phương án ưu tiên, chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế khi được bổ sung ở nồng độ bằng $2,5 \times 10^7$ CFU/g vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm gia tăng đến nồng độ ít nhất bằng $5,0 \times 10^7$ CFU/g, tốt hơn nếu $7,5 \times 10^7$ CFU/g, và tốt nhất nếu $1,0 \times 10^8$ CFU/g.

Tốt hơn nếu, nồng độ của tế bào chủng vi khuẩn axit lactic gia tăng trong vòng 45 ngày bổ sung chủng vi khuẩn axit lactic này vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm, tốt hơn nếu trong vòng 40 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 35 ngày, tốt hơn nếu trong vòng

30 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 25 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 20 ngày, và tốt nhất nếu trong vòng 15 ngày. Tốt hơn nếu, nồng độ của tế bào chủng vi khuẩn axit lactic đạt tối đa trong vòng 45 ngày bổ sung chủng vi khuẩn axit lactic này vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm, tốt hơn nếu trong vòng 40 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 35 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 30 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 25 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 20 ngày, và tốt nhất nếu trong vòng 15 ngày.

Theo phương án cụ thể, thực phẩm theo sáng chế được bảo quản ở nhiệt độ môi trường trong thời gian ít nhất 1 ngày, tốt hơn nếu ít nhất 2 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 3 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 4 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 5 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 6 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 7 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 8 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 9 ngày, và tốt nhất nếu ít nhất 10 ngày.

Theo phương án ưu tiên, chủng *Lactobacillus rhamnosus* là chủng lên men lactoza. Thuật ngữ “lên men lactoza” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chủng có khả năng sử dụng một phần hoặc toàn bộ lactoza làm nguồn dinh dưỡng để sinh trưởng tế bào hoặc duy trì khả năng sống sót của tế bào.

Theo phương án ưu tiên, chủng *Lactobacillus paracasei* được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC55544, và chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389.

Theo phương án ưu tiên, chủng *Lactobacillus rhamnosus* được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM23035 và chủng *Lactobacillus rhamnosus* LGG[®] được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC53103. Tốt hơn nếu, chủng *Lactobacillus rhamnosus* là chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM23035.

Theo phương án ưu tiên, chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CHCC18944 được lưu trữ tại Ngân

hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM28910. Theo phương án ưu tiên, chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* là chủng không lên men lactoza.

Theo phương án ưu tiên, chủng *Lactobacillus fermentum* là chủng *Lactobacillus fermentum* CHCC14591 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32086.

Theo phương án cụ thể, chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế được chọn từ nhóm các nhóm sau: nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, và *Lactobacillus fermentum*; nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; nhóm bao gồm *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Theo phương án cụ thể, chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế được chọn từ nhóm các nhóm sau: nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus rhamnosus*; nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus fermentum*; nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; nhóm bao gồm *Lactobacillus rhamnosus* và *Lactobacillus fermentum*, nhóm bao gồm *Lactobacillus rhamnosus*, và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; nhóm bao gồm *Lactobacillus fermentum*, và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM23035, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC55544, chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389, chủng *Lactobacillus rhamnosus* LGG[®] được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC53103, chủng *Lactobacillus fermentum* CHCC14591 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32086, và chủng

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CHCC18944 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM28910, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng. Cụ thể, chủng được chọn từ nhóm bao gồm phân nhóm bất kỳ trong số bảy nhóm nêu trên.

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM23035, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC55544, chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389, chủng *Lactobacillus fermentum* CHCC14591 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32086, và chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CHCC18944 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM28910, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng. Nhóm này không bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus* LGG[®] được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC53103, là chủng không lên men lactoza và không thể lên men lactoza.

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM23035, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC55544, chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389, và chủng *Lactobacillus rhamnosus* LGG[®] được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC53103, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng.

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272 được lưu trữ tại

Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM23035, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC55544, chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389, và chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CHCC18944 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM28910, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng.

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM23035, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC55544, và chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng.

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM23035, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC55544, và chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng. Năm chủng theo khía cạnh này của sáng chế đều có khả năng lên men lactoza.

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* LC-01, CHCC2115 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM19465, chủng

Lactobacillus rhamnosus CHCC12697 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM24616, và chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC7155 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM18875.

Theo phương án cụ thể, chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường là chủng lên men lactoza, tức là có thể lên men lactoza để tạo thành axit lactic, do đó làm giảm độ pH của thực phẩm này. Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng các chủng lên men lactoza theo sáng chế thích hợp để bổ sung vào thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường, do trong quá trình bảo quản kéo dài thực phẩm ở nhiệt độ môi trường các chủng này thường sẽ làm giảm độ pH của thực phẩm một cách không mong muốn.

Theo phương án cụ thể, thực phẩm theo sáng chế có độ pH nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,4 là sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động được chế biến bằng cách lên men nguyên liệu sữa bằng giống khởi động chứa vi khuẩn axit lactic để thu được sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động.

Theo phương án cụ thể, sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động có hàm lượng protein cao hơn 5,1% (khối lượng/khối lượng).

Theo phương án cụ thể, sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động không được pha loãng.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng các chủng lên men lactoza theo sáng chế thích hợp để bổ sung vào thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường ở dạng sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động không được pha loãng, do sản phẩm không được pha loãng này có nồng độ lactoza cao hơn sản phẩm được pha loãng.

Quy trình theo sáng chế được mô tả chi tiết hơn trong phần mô tả dưới đây, cụ thể là quy trình sản xuất sản phẩm sữa lên men được bảo quản ở nhiệt độ môi trường.

Giống khởi động có thể là giống khởi động bất kỳ thông thường chứa vi khuẩn axit lactic, bao gồm chủng đơn và hỗn hợp chủng, được sử dụng để sản xuất sản phẩm sữa lên men cụ thể. Theo phương án ưu tiên, bước lên men được thực hiện để thu được độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 3,9 đến 4,8, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 4,0 đến 4,6 và tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 4,1 đến 4,4.

Tốt hơn nếu bước xử lý nhiệt được thực hiện để làm giảm nồng độ vi khuẩn trong giống khởi động đến không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ CFU/g sữa lên men được thực hiện bằng cách xử lý sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 90°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 60°C đến 85°C, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 65°C đến 82°C, và tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 70°C đến 80°C. Tốt hơn nếu bước xử lý nhiệt được thực hiện trong thời gian nằm trong khoảng từ 10 giây đến 180 giây, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 12 giây đến 120 giây, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 14 giây đến 90 giây, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 16 giây đến 60 giây, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 18 giây đến 50 giây và tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 20 đến 40 giây. Tốt hơn nếu, nồng độ vi khuẩn trong giống khởi động được giảm đến không lớn hơn $1,0 \times 10^1$ CFU/g sữa lên men, tốt hơn nữa nếu nồng độ vi khuẩn trong giống khởi động được giảm đến bằng 0 CFU/g.

Chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường, trong đó thực phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,4, và chứa chủng vi khuẩn axit lactic này ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g, và thực phẩm này được bảo quản ở nhiệt độ môi trường trong thời gian xác định, và chủng vi khuẩn axit lactic này được chọn từ nhóm bao gồm các chủng, (i) chủng vi khuẩn axit lactic khi được bổ sung ở nồng độ bằng $2,5 \times 10^7$ CFU/g vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm được chế biến bằng cách lên men bằng giống khởi động chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* ở nhiệt độ 43°C đến độ pH bằng 4,3, đã được xử lý nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong 30 giây, có thể duy trì khả năng sống sót ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g khi kết thúc bảo quản sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này trong 150 ngày ở nhiệt độ 25°C, và (ii) trong đó độ pH của sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này giảm tối đa 0,8 đơn vị trong thời gian bảo quản, và (iii) chủng vi khuẩn axit lactic này được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng.

Theo phương án cụ thể, thực phẩm theo sáng chế là thực phẩm được axit hóa bằng hóa chất.

Theo phương án cụ thể, thực phẩm này theo sáng chế sản phẩm sữa lên men được chế biến bằng cách lên men nguyên liệu sữa bằng giống khởi động chứa vi khuẩn axit lactic, và thực phẩm này chứa giống khởi động ở nồng độ không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ CFU/g và chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g.

Theo phương án cụ thể, thực phẩm này theo sáng chế sản phẩm sữa lên men được chế biến bằng cách lên men nguyên liệu sữa bằng giống khởi động chứa vi khuẩn axit lactic, và sau khi lên men, sản phẩm sữa lên men này được xử lý nhiệt để làm giảm nồng độ vi khuẩn trong giống khởi động đến không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ CFU/g, và sau khi xử lý nhiệt, chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo điểm 1 được bổ sung vào sản phẩm sữa lên men đã được xử lý nhiệt ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g. Tốt hơn nếu, chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế được bổ sung vào sản phẩm sữa lên men đã được xử lý nhiệt ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^4$ CFU/g, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng $1,0 \times 10^5$ CFU/g, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng $1,0 \times 10^6$ CFU/g, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng $1,0 \times 10^7$ CFU/g, và tốt nhất nếu ít nhất bằng $1,0 \times 10^8$ CFU/g.

Theo phương án cụ thể, chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM23035, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC55544, chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389, chủng *Lactobacillus rhamnosus* LGG[®] được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC53103, chủng *Lactobacillus fermentum* CHCC14591 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32086, và chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CHCC18944 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM28910, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng.

Theo phương án cụ thể, chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt

độ môi trường theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM23035, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC55544, chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389, chủng *Lactobacillus fermentum* CHCC14591 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32086, và chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CHCC18944 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM28910, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng.

Chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng chế phẩm chứa một hoặc nhiều chủng. Do đó, theo một phương án, chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế được bào chế ở dạng chế phẩm chứa chủng đơn. Theo một phương án khác, chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế được bào chế ở dạng chế phẩm chứa hai hoặc nhiều chủng. Chế phẩm này có thể ở dạng hạt đông khô hoặc lạnh đông.

Thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường

Theo phương án ưu tiên, thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm sản phẩm sữa lên men, sản phẩm sữa được axit hóa bằng hóa chất, đồ uống hoa quả, sản phẩm ngũ cốc lên men, sản phẩm ngũ cốc được axit hóa bằng hóa chất, sản phẩm sữa đậu tương và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Sản phẩm sữa lên men thường chứa protein ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 2,0% đến 3,5% khối lượng. Sản phẩm sữa lên men cũng có thể chứa hàm lượng protein thấp nằm trong khoảng từ 1,0% đến 2,0% khối lượng. Ngoài ra, sản phẩm sữa lên men cũng chứa hàm lượng protein cao, tức là cao hơn 3,5% khối lượng, tốt hơn nếu cao hơn 5,1% khối lượng. Theo phương án cụ thể, thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế là hỗn hợp chứa sản phẩm sữa lên men và sản phẩm ngũ cốc, ví dụ sản phẩm yến mạch, trong đó sản phẩm ngũ cốc có thể là sản phẩm ngũ cốc lên men, ví dụ sản phẩm yến mạch lên men.

Theo phương án cụ thể, thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế là sản phẩm ngũ cốc lên men. Sản phẩm ngũ cốc lên men có thể được chế biến bằng cách nghiền các hạt nguyên liệu ngũ cốc có nguồn gốc sinh học để tạo ra bột ngũ cốc, sau đó lên men. Bước lên men bột ngũ cốc có thể được thực hiện bằng cách sử dụng cùng vi khuẩn axit lactic (giống khởi động) được sử dụng để lên men nguyên liệu sữa như được mô tả trong sáng chế.

Theo phương án cụ thể, thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế là đồ uống hoa quả. Đồ uống hoa quả có thể còn chứa sản phẩm yến mạch, sản phẩm đậu tương, sản phẩm hạnh nhân, váng sữa và/hoặc sữa không lên men, ví dụ ở dạng bột sữa. Theo phương án cụ thể, đồ uống hoa quả theo sáng chế không chứa các thành phần sữa, như sữa. Theo một phương án cụ thể khác, đồ uống hoa quả theo sáng chế còn chứa sản phẩm sữa lên men.

Theo phương án khác, thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế là sản phẩm được axit hóa bằng hóa chất. Bước axit hóa có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chất axit hóa bất kỳ thích hợp để bổ sung vào thực phẩm, như axit lactic, axit xitric, nước hoa quả, thịt quả và hợp chất chiết xuất được từ hoa quả. Theo phương án cụ thể, thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường là sữa được axit hóa bằng nước hoa quả.

Theo phương án cụ thể, thực phẩm theo sáng chế là sản phẩm ngũ cốc được axit hóa bằng hóa chất. Sản phẩm ngũ cốc được axit hóa bằng hóa chất có thể được chế biến bằng cách nghiền các hạt nguyên liệu ngũ cốc có nguồn gốc sinh học để tạo ra bột ngũ cốc, sau đó được sử dụng để điều chế hỗn dịch nước, và sau đó hỗn dịch này được điều chỉnh đến độ pH mong muốn. Theo phương án cụ thể, thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường theo sáng chế là sản phẩm ngũ cốc được axit hóa bằng nước hoa quả.

Trừ khi có quy định khác, sáng chế cũng bao gồm tổ hợp bất kỳ của các khía cạnh, phương án, và dấu hiệu nêu trên theo các biến thể của chúng.

Thuật ngữ

Các thuật ngữ theo sáng chế được thể hiện dưới đây:

Thuật ngữ “xử lý nhiệt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình xử lý bất kỳ bằng cách sử dụng nhiệt bất kỳ, trong khoảng thời gian bất kỳ và được thực hiện bằng thiết bị hoặc máy móc bất kỳ để làm bất hoạt ít nhất một phần vi khuẩn trong giống khởi

động. Liên quan đến thuật ngữ này, thuật ngữ “bất hoạt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình bất kỳ để dừng, làm giảm hoặc ức chế sinh trưởng vi khuẩn, ví dụ phân giải tế bào.

Thuật ngữ “bảo quản ở điều kiện môi trường” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình bảo quản ở nhiệt độ môi trường. Thuật ngữ “nhiệt độ môi trường” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ nhiệt độ môi trường xung quanh, ví dụ nhiệt độ phòng. Ví dụ, nhiệt độ môi trường có thể nằm trong khoảng từ 5°C đến 40°C, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 15°C đến 30°C, và tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 18°C đến 27°C. Nhiệt độ môi trường có thể được kiểm soát, tức là nhiệt độ không thay đổi trong toàn bộ thời gian 1 ngày (24 giờ), hoặc có thể không được kiểm soát tức là thay đổi trong toàn bộ thời gian 1 ngày (24 giờ).

Thuật ngữ “khả năng sống sót” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vi khuẩn có khả năng sinh trưởng (tạo khuẩn lạc) trên đĩa thạch aga MRS được ủ trong các điều kiện kỵ khí ở nhiệt độ 37°C trong 3 ngày. Môi trường thạch aga MRS có thành phần như sau (g/L): pepton: 10,0; chiết xuất thịt bò: 10,0; chiết xuất nấm men: 5,0; dextroza: 20,0; polysorbat 80: 1,0; amoni xitrat: 2,0; natri axetat: 5,0; magie sulfat: 0,1; mangan sulfat: 0,05; đikali phosphat: 2,0; thạch aga: 15,0.

Thuật ngữ “chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chủng vi khuẩn axit lactic thích hợp để bảo quản sản phẩm sữa lên men ở nhiệt độ môi trường trong thời gian xác định, khi được bổ sung vào sản phẩm này.

Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm sữa lên men, chứa giống khởi động được sử dụng để lên men sữa.

Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm sữa lên men, đã được xử lý nhiệt.

Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men được bảo quản ở nhiệt độ môi trường” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm sữa lên men, thích hợp để bảo quản ở nhiệt độ môi trường trong thời gian xác định.

Thuật ngữ “vi khuẩn axit lactic” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vi khuẩn gram dương vi hiếu khí hoặc kỵ khí, lên men đường và sản sinh axit bao gồm chủ yếu là

axit lactic, axit axetic và axit propionic. Vi khuẩn axit lactic hữu ích nhất trong công nghiệp bao gồm các vi khuẩn thuộc bộ “*Lactobacillales*” bao gồm *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. và *Propionibacterium* spp. Các chủng này thường được sử dụng làm các chủng nuôi cấy trong thực phẩm riêng hoặc kết hợp với các vi khuẩn axit lactic khác.

Vi khuẩn axit lactic, bao gồm vi khuẩn thuộc các loài *Lactobacillus* sp. và *Lactococcus* sp., thường được cung cấp cho ngành công nghiệp sữa dưới dạng chủng đông khô hoặc lạnh đông để tăng sinh hoặc dưới dạng “chủng bổ sung trực tiếp vào thùng lên men”, để cấy trực tiếp vào thùng lên men hoặc bình lên men để sản xuất sản phẩm sữa, như sản phẩm sữa lên men hoặc pho mát. Các chủng vi khuẩn axit lactic này thường được gọi là “giống khởi động” hoặc “men giống”.

Thuật ngữ “sữa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phần sữa bài tiết được thu nhận bằng cách vắt sữa của động vật có vú bất kỳ, như bò, cừu, dê, trâu hoặc lạc đà. Theo phương án ưu tiên, sữa là sữa bò. Thuật ngữ “sữa” cũng bao gồm dung dịch protein/chất béo được điều chế từ nguyên liệu thực vật, ví dụ sữa đậu tương.

Thuật ngữ “nguyên liệu sữa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ nguyên liệu bất kỳ và hoặc nguyên liệu sữa được xử lý có thể lên men theo phương pháp của sáng chế. Do đó, các nguyên liệu sữa hữu ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch/hỗn dịch chứa sữa hoặc sản phẩm tương tự sữa bất kỳ chứa protein, như sữa ít béo hoặc sữa nguyên chất, sữa tách béo, nước sữa, bột sữa hoàn nguyên, sữa đặc, sữa khô, váng sữa, bột váng sữa, lactoza, dịch cái thu được từ quá trình kết tinh lactoza, protein váng sữa đậm đặc, hoặc kem. Nguyên liệu sữa có thể có nguồn gốc từ động vật có vú bất kỳ, ví dụ sữa động vật có vú gần như nguyên chất, hoặc bột sữa hoàn nguyên.

Trước khi lên men, nguyên liệu sữa có thể được đồng nhất và thanh trùng theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “đồng nhất” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bước trộn kỹ để thu được hỗn dịch hoặc nhũ tương hòa tan. Khi được thực hiện trước khi lên men, bước đồng nhất có thể được thực hiện để phá vỡ chất béo trong sữa đến kích cỡ nhỏ hơn sao cho không thể phân tách khỏi sữa. Bước đồng nhất có thể được thực hiện bằng cách ép sữa ở áp suất cao thông qua các lỗ nhỏ.

Thuật ngữ “thanh trùng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bước xử lý nguyên liệu sữa để làm giảm hoặc loại bỏ các sinh vật sống có mặt, như các vi sinh vật. Tốt hơn nếu, bước thanh trùng được thực hiện bằng cách duy trì nhiệt độ đặc hiệu trong khoảng thời gian đặc hiệu. Nhiệt độ đặc hiệu thường đạt được bằng cách gia nhiệt. Nhiệt độ và thời gian có thể được chọn để tiêu diệt hoặc bất hoạt một số vi khuẩn, như vi khuẩn có hại. Sau đó, bước làm mát nhanh có thể được thực hiện.

Thuật ngữ “lên men” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bước biến đổi cacbohyđrat thành rượu hoặc axit bởi vi sinh vật. Tốt hơn nếu, bước lên men theo các phương của sáng chế bao gồm công đoạn biến đổi lactoza thành axit lactic.

Các phương pháp lên men được sử dụng để sản xuất các sản phẩm sữa là đã biết và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được cách thức chọn lọc các điều kiện quy trình thích hợp, như nhiệt độ, oxy, nồng độ và đặc tính của vi sinh vật và thời gian lên men. Tất nhiên, các điều kiện lên men được chọn lọc để hỗ trợ quy trình theo sáng chế, tức là để thu được sản phẩm sữa ở dạng rắn (như pho mát) hoặc dạng lỏng (như sản phẩm sữa lên men).

Thuật ngữ “chủng vi khuẩn đột biến” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chủng vi khuẩn thu được từ chủng vi khuẩn theo sáng chế bằng cách thiết kế di truyền, xử lý phóng xạ và/hoặc xử lý hóa học, và/hoặc chọn lọc, thích nghi, sàng lọc, v.v. Tốt hơn nếu chủng vi khuẩn đột biến là chủng vi khuẩn đột biến có chức năng tương đương, ví dụ chủng vi khuẩn đột biến gần như có các đặc tính tương đương hoặc được cải thiện thích hợp để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường so với chủng vi khuẩn mẹ. Chủng vi khuẩn đột biến này là một khía cạnh theo sáng chế. Đặc biệt, thuật ngữ “chủng vi khuẩn đột biến” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chủng vi khuẩn thu được bằng cách xử lý chủng vi khuẩn theo sáng chế bằng phương pháp đột biến gen bất kỳ được sử dụng bao gồm phương pháp xử lý bằng tác nhân đột biến hóa học, như etan metan sulphonat hoặc N-metyl-N'-nitro-N-nitroguanidin, tia UV hoặc chủng vi khuẩn đột biến xuất hiện tự phát. Chủng vi khuẩn đột biến có thể được xử lý bằng một số bước đột biến gen (bước xử lý duy nhất được hiểu là một bước đột biến, sau đó là bước sàng lọc/chọn lọc), nhưng tốt hơn nếu không lớn hơn 20, hoặc không lớn hơn 10, hoặc không lớn hơn 5 bước xử lý (hoặc bước sàng lọc/chọn lọc) được thực hiện. Trong chủng vi khuẩn đột biến được ưu tiên theo sáng chế, nhỏ hơn 1%, hoặc nhỏ hơn 0,1%, nhỏ hơn 0,01%, nhỏ hơn 0,001%

hoặc thậm chí nhỏ hơn 0,0001% nucleotit trong bộ gen vi khuẩn đã được thay đổi (như bằng cách thay thế, chèn, loại bỏ hoặc tổ hợp của chúng) so với chủng vi khuẩn mẹ.

Thuật ngữ “chủng vi khuẩn biến thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chủng có chức năng tương đương với chủng của sáng chế, ví dụ gần như có các đặc tính tương đương hoặc được cải thiện thích hợp để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường so với chủng vi khuẩn mẹ. Các chủng vi khuẩn biến thể này có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật sàng lọc thích hợp, là một khía cạnh theo sáng chế.

Tốt hơn nữa, “chủng vi khuẩn đột biến” và “chủng vi khuẩn biến thể” của chủng vi khuẩn axit lactic theo sáng chế khi được bổ sung ở nồng độ bằng $2,5 \times 10^7$ CFU/g vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm được chế biến bằng cách lên men bằng giống khởi động chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* ở nhiệt độ 43°C đến độ pH bằng 4,3, đã được xử lý nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong 30 giây, có thể duy trì khả năng sống sót ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g khi kết thúc bảo quản sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này trong 150 ngày ở nhiệt độ 25°C, và độ pH của sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này giảm tối đa 0,8 đơn vị trong thời gian bảo quản.

Tốt hơn nữa, “chủng vi khuẩn đột biến” và “chủng vi khuẩn biến thể” của chủng vi khuẩn axit lactic theo sáng chế có nhỏ hơn 25, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 10, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 9, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 8, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 7, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 6, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 5, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 4, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 3, tốt hơn nữa nếu nhỏ hơn 2 đột biến trên trình tự axit amin của một hoặc nhiều protein của chủng. Liên quan đến thuật ngữ này, thuật ngữ “đột biến” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đột biến được chọn từ nhóm bao gồm đột biến thay thế, đột biến loại bỏ và đột biến chèn.

Thuật ngữ “a”, “an” và “the” và các thuật ngữ tương tự được sử dụng trong phần mô tả sáng chế (đặc biệt trong phần bộ yêu cầu bảo hộ) để bao gồm cả danh từ số ít lẫn danh từ số nhiều, trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ “có”, “bao gồm” và “chứa” được hiểu là các thuật ngữ mở (tức là, có nghĩa “bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn”), trừ khi có quy định khác. Các khoảng trị số được thể hiện bản mô tả này chỉ đóng vai trò là phương pháp viết tắt của việc tham chiếu riêng rẽ đến mỗi trị số riêng biệt nằm trong các khoảng này, trừ khi có quy định khác, và mỗi trị số riêng biệt được kết hợp vào bản mô tả

này khi trị số này được thể hiện riêng trong bản mô tả. Toàn bộ các phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện theo thứ tự thích hợp bất kỳ trừ khi có quy định khác. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và toàn bộ các ví dụ, hoặc ngôn ngữ mô tả (ví dụ, “như”) được đề xuất trong bản mô tả này, chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế, trừ khi có quy định khác. Không có ngôn ngữ trong bản mô tả được hiểu là thể hiện dấu hiệu bất kỳ không được yêu cầu bảo hộ là cần thiết để thực hành sáng chế.

Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi được chế biến bằng cách lên men nguyên liệu sữa bằng vi khuẩn axit lactic. “Sản phẩm sữa lên men” theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở như sản phẩm sữa lên men ưa nhiệt, ví dụ sữa chua, sản phẩm sữa lên men ưa nhiệt độ trung bình, ví dụ kem chua và sữa bơ, pho mát cũng như váng sữa lên men.

Thuật ngữ “vi sinh vật ưa nhiệt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các vi sinh vật phát triển tốt nhất ở nhiệt độ cao hơn 43°C. Các vi khuẩn ưa nhiệt hữu ích nhất trong công nghiệp bao gồm *Streptococcus* spp. và *Lactobacillus* spp. Thuật ngữ “quá trình lên men ưa nhiệt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bước lên men được thực hiện ở nhiệt độ cao hơn khoảng 35°C, như nằm trong khoảng từ 35°C đến 45°C. Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men lên men ưa nhiệt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm sữa lên men được điều chế bằng quá trình lên men ưa nhiệt bằng cách sử dụng chủng giống khởi động ưa nhiệt và bao gồm các sản phẩm sữa lên men, như sữa chua đặc, sữa chua khuấy, và sữa chua uống, ví dụ yakult.

Thuật ngữ “vi sinh vật ưa nhiệt độ trung bình” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các vi sinh vật phát triển tốt nhất ở nhiệt độ vừa phải nằm trong khoảng từ 15°C đến 40°C. Các chủng vi khuẩn ưa nhiệt độ trung bình hữu ích nhất trong công nghiệp bao gồm *Lactococcus* spp. và *Leuconostoc* spp. Thuật ngữ “quá trình lên men ưa nhiệt độ trung bình” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình lên men ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 35°C. Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men ưa nhiệt độ trung bình” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm sữa lên men được điều chế bằng quá trình lên men ưa nhiệt độ trung bình bằng cách sử dụng chủng giống khởi động ưa nhiệt độ trung bình và bao gồm các sản phẩm sữa lên men, như sữa bơ, sữa chua, sữa chua ăn kiêng, váng sữa, kem chua, kefir và pho mát tươi, như pho mát đông tụ, pho mát trắng và pho mát kem.

Thuật ngữ “pho mát” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ pho mát bất kỳ, bao gồm pho mát cứng, pho mát bán cứng và pho mát mềm, như các loại pho mát sau: Cottage, Feta, Cheddar, Parmesan, Mozzarella, Emmentaler, Danbo, Gouda, Edam, Fetatype, pho mát xanh, pho mát mặn, Camembert và Brie. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dễ dàng xác định được phương pháp để biến đổi sữa đông tụ thành pho mát, và các phương pháp này được mô tả trong tài liệu chuyên ngành, ví dụ xem Kosikowski, F. V, và V. V. Mistry, “*Cheese and Fermented Milk Foods*”, 1997, 3rd Ed. F. V. Kosikowski, L. L. C. Westport, CT. Thuật ngữ “pho mát có nồng độ NaCl nhỏ hơn 1,7% (khối lượng/khối lượng)” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ “pho mát ít mặn”.

Thuật ngữ “nước hoa quả” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dịch lỏng chứa tự nhiên trong hoa quả được điều chế bằng cách ép cơ học hoặc ngâm hoa quả tươi trong nước và không sử dụng nhiệt và dung môi. Thuật ngữ “nước hoa quả” có thể bao gồm nước hoa quả từ một hoặc nhiều loại hoa quả.

Thuật ngữ “nước uống hoa quả” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đồ uống có hàm lượng nước hoa quả nằm trong khoảng từ 0% đến 29%.

Thuật ngữ “nước hoa quả đóng hộp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đồ uống có hàm lượng nước hoa quả nằm trong khoảng từ 30% đến 99% nước hoa quả.

Thuật ngữ “đồ uống hoa quả dạng hỗn dịch” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hoa quả được chế biến bằng cách nghiền, ép và/hoặc nén đồng nhất thành dịch lỏng đặc hoặc bột nhão mềm và không sử dụng nhiệt và dung môi. “Đồ uống hoa quả dạng hỗn dịch” được chế biến từ 100% hoa quả là trái ngược với đồ uống được chế biến từ nước hoa quả.

Thuật ngữ “đồ uống hoa quả” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đồ uống chứa nước hoa quả, nước uống hoa quả đậm đặc và/hoặc đồ uống hoa quả dạng hỗn dịch. Thuật ngữ “đồ uống hoa quả” bao gồm “nước hoa quả”, “nước uống hoa quả” và “nước hoa quả đóng hộp” như định nghĩa trong sáng chế. Thuật ngữ “đồ uống hoa quả” có thể là đồ uống chứa thịt quả, hoặc đồ uống đã ly tâm loại bỏ thịt quả.

Thuật ngữ “bổ sung trong điều kiện vô trùng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bước nạp hoặc bổ sung hoàn toàn không bị nhiễm vi sinh vật bất kỳ khác với vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường.

Thuật ngữ “sản phẩm ngũ cốc” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm bất kỳ được chế biến từ ngũ cốc hoặc nguyên liệu dạng hạt có nguồn gốc sinh học, bao gồm yến mạch, ngô, lúa mạch, lúa mạch đen, kiều mạch, lúa mỳ và lúa.

Thuật ngữ “không lên men lactoza” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vi khuẩn axit lactic bị mất hoàn toàn hoặc một phần khả năng sử dụng lactoza làm nguồn dinh dưỡng để sinh trưởng tế bào hoặc duy trì khả năng sống sót của tế bào. Vi khuẩn axit lactic này có khả năng chuyển hóa một hoặc một số cacbohydrat được chọn từ sucroza, galactoza và/hoặc glucoza hoặc cacbohydrat có thể lên men khác. Do các cacbohydrat này không có tự nhiên trong sữa ở lượng đủ để hỗ trợ lên men bằng chủng vi khuẩn đột biến không lên men lactoza, nên cần bổ sung các cacbohydrat này vào sữa. Vi khuẩn axit lactic không lên men một phần và không lên men lactoza được đặc trưng bởi các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal.

Thuật ngữ “X.Xx10expYY” và “X.XEYY” được sử dụng thay thế cho nhau và đều có nghĩa là $X.X \times 10^{YY}$.

Thuật ngữ “CFU” có nghĩa là đơn vị tạo khuẩn lạc.

Sáng chế đề cập đến các phương án cụ thể sau:

1. Chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường, trong đó chủng vi khuẩn axit lactic này khi được bổ sung ở nồng độ bằng $2,5 \times 10^7$ CFU/g vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm được chế biến bằng cách lên men bằng giống khởi động chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* ở nhiệt độ 43°C đến độ pH bằng 4,3, đã được xử lý nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong 30 giây, có thể duy trì khả năng sống sót ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g khi kết thúc bảo quản sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này trong 150 ngày ở nhiệt độ 25°C, và độ pH của sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này giảm tối đa 0,8 đơn vị trong thời gian bảo quản, và chủng vi khuẩn axit lactic này được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng.

2. Chủng vi khuẩn axit lactic theo phương án 1, trong đó chủng này có thể duy trì khả năng sống sót ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g, tốt hơn nếu ít nhất bằng $5,0 \times 10^3$ CFU/g, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng $1,0 \times 10^4$ CFU/g, tốt hơn nữa nếu ít nhất

bằng $5,0 \times 10^4$ CFU/g và tốt nhất nếu ít nhất bằng $1,0 \times 10^5$ CFU/g ở thời điểm kết thúc quá trình bảo quản.

3. Chủng vi khuẩn axit lactic theo phương án 1 hoặc 2, trong đó độ pH của sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này giảm tối đa 0,7 đơn vị, tốt hơn nếu 0,6 đơn vị, tốt hơn nếu 0,5 đơn vị, tốt hơn nếu 0,4 đơn vị, tốt hơn nếu 0,3 đơn vị, và tốt nhất nếu 0,2 đơn vị trong thời gian bảo quản.

4. Chủng vi khuẩn axit lactic theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó chủng vi khuẩn axit lactic này khi được bổ sung ở nồng độ bằng $2,5 \times 10^7$ CFU/g vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm gia tăng đến nồng độ ít nhất bằng $5,0 \times 10^7$ CFU/g, tốt hơn nếu $7,5 \times 10^7$ CFU/g, và tốt nhất nếu $1,0 \times 10^8$ CFU/g.

5. Chủng vi khuẩn axit lactic theo điểm 4, trong đó nồng độ của tế bào chủng vi khuẩn axit lactic gia tăng trong vòng 45 ngày bổ sung chủng vi khuẩn axit lactic này vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm, tốt hơn nếu trong vòng 40 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 35 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 30 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 25 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 20 ngày, và tốt nhất nếu trong vòng 15 ngày.

6. Chủng vi khuẩn axit lactic theo điểm 4 hoặc 5, trong đó nồng độ của tế bào chủng vi khuẩn axit lactic đạt tối đa trong vòng 45 ngày bổ sung chủng vi khuẩn axit lactic này vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm, tốt hơn nếu trong vòng 40 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 35 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 30 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 25 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 20 ngày, và tốt nhất nếu trong vòng 15 ngày.

7. Chế phẩm vi sinh, chứa một hoặc nhiều chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6.

8. Thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường có độ pH nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,4, trong đó thực phẩm này chứa ít nhất $1,0 \times 10^3$ CFU/g chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo phương án 1.

9. Thực phẩm theo phương án 8, trong đó thực phẩm này là sản phẩm được axit hóa bằng hóa chất.

10. Thực phẩm theo phương án 8, trong đó thực phẩm này là sản phẩm sữa lên men được chế biến bằng cách lên men nguyên liệu sữa bằng giống khởi động chứa vi

khuẩn axit lactic, trong đó thực phẩm này chứa giống khởi động với hàm lượng không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ CFU/g và các chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo phương án 1 ở hàm lượng ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g.

11. Thực phẩm theo phương án 8, trong đó thực phẩm này là sản phẩm sữa lên men được chế biến bằng cách lên men nguyên liệu sữa bằng giống khởi động chứa vi khuẩn axit lactic, và sau khi lên men, sản phẩm sữa lên men này được xử lý nhiệt để làm giảm nồng độ vi khuẩn trong giống khởi động đến không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ CFU/g, và sau khi xử lý nhiệt, chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo điểm 1 được bổ sung vào sản phẩm sữa lên men đã được xử lý nhiệt ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g.

12. Quy trình sản xuất thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường, bao gồm bước chế biến thực phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,4, xử lý nhiệt thực phẩm này để làm giảm nồng độ vi khuẩn đến không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ CFU/g để thu được thực phẩm được xử lý nhiệt, và bổ sung trong điều kiện vô trùng một hoặc nhiều chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo phương án 1 vào thực phẩm đã được xử lý nhiệt ở tổng nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g để thu được thực phẩm bảo quản ở nhiệt độ môi trường.

13. Quy trình sản xuất sản phẩm sữa lên men được bảo quản ở nhiệt độ môi trường bao gồm bước lên men nguyên liệu sữa bằng giống khởi động chứa vi khuẩn axit lactic để thu được sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động, xử lý nhiệt sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động này để làm giảm nồng độ vi khuẩn trong giống khởi động đến không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ CFU/g để thu được sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt, và bổ sung trong điều kiện vô trùng một hoặc nhiều chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo phương án 1 vào sản phẩm sữa lên men được xử lý nhiệt ở tổng nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g để thu được sản phẩm sữa lên men được bảo quản ở nhiệt độ môi trường.

14. Sử dụng chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường theo phương án 1 để bổ sung trong điều kiện vô trùng vào thực phẩm được xử lý nhiệt ở tổng nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g, trong đó thực phẩm đã được xử lý nhiệt này có độ pH nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,4 và được xử lý nhiệt để làm giảm nồng độ vi khuẩn trong giống khởi động đến không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ CFU/g.

15. Chủng vi khuẩn axit lactic, trong đó chủng này được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572, chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM23035, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC55544, chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389, chủng *Lactobacillus rhamnosus* LGG® được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC53103*, chủng *Lactobacillus fermentum* CHCC14591 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32086, và chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CHCC18944 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM28910, chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể của chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Đánh giá độ thích hợp để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường của chủng *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus rhamnosus*

Nguyên liệu sữa

Hàm lượng chất béo: 2,8%*.

Hàm lượng protein: 2,8%*.

Lactoza: 3,0%.

Sucroza: 5,0% (được bổ sung).

Tinh bột biến tính E1442 Cargill loại 75720: 1,50%.

Pectin loại LMA CPKelco loại LM 106 AS-YA: 0,25%.

Gôm gellan loại Kelcogel YSS: 0,05%.

* Hàm lượng trong sản phẩm cuối cùng, tức là sau khi xử lý nhiệt, bổ sung chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường và bảo quản trong 150 ngày.

Giống khởi động

Giống khởi động YoFlex® loại YF-L904 chứa hai chủng *Streptococcus*

thermophilus và *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*.

Các chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường được đánh giá:

Chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572.

Chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM23035.

Chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC55544.

Chủng *Lactobacillus acidophilus* La-5, CHCC2169 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM13241.

Chủng *Bifidobacterium animalis* BB-12, CHCC5445 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM15954

Chủng hỗn hợp *Lactobacillus helveticus* (hỗn hợp chứa 4 chủng).

Chủng *Lactococcus lactis* DN-224, CHCC3955 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM11037.

Quy trình sản xuất sản phẩm thử nghiệm

1. Phân tán các thành phần khan vào sữa.
2. Để yên trong 3 giờ kết hợp khuấy nhẹ.
3. Gia nhiệt sữa cho đến khi đạt được nhiệt độ 65°C.
4. Đồng nhất ở áp suất bằng 150 bar.
5. Xử lý nhiệt đến nhiệt độ 95°C trong 5 phút.
6. Làm mát đến nhiệt độ lên men bằng 43°C.
7. Bơm sữa vào thùng lên men.
8. Cấy giống khởi động YoFlex loại YF-L904.
9. Lên men cho đến khi đạt được độ pH bằng 4,30.
10. Phá vỡ sữa đông và khuấy cho đến khi thu được cấu trúc mịn.

11. Xử lý nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong 30 giây.

12. Làm mát đến nhiệt độ 25°C.

Quy trình đánh giá các chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường

13. Nạp trong điều kiện vô trùng vào các đồ chứa có dung tích bằng 100mL.

14. cấy các chủng và các dịch nuôi cấy.

15. Bảo quản trong 6 tháng ở nhiệt độ phòng bằng 25°C.

Phương pháp xác định nồng độ tế bào

1. *L. paracasei* (LC-02, CHCC6272), *L. rhamnosus* (CHCC5366), *L. paracasei* (CRL 431, CHCC23026), *L. acidophilus* (La-5, CHCC2169), và *L. helveticus*

Các mẫu từ sản phẩm thử nghiệm được sinh trưởng trên các đĩa thạch aga MRS được ủ trong các điều kiện kỵ khí ở nhiệt độ 37°C trong 3 ngày.

2. *B. animalis*, BB-12 (CHCC5445)

Các mẫu từ sản phẩm thử nghiệm được sinh trưởng trên các đĩa thạch aga MRS chứa 10% xystein hydroclorua được ủ trong các điều kiện kỵ khí ở nhiệt độ 37°C trong 3 ngày.

3. *Lactococcus lactis*, DN-224 (CHCC3955)

Các mẫu từ sản phẩm thử nghiệm được sinh trưởng trên các đĩa thạch aga M-17 được ủ trong các điều kiện hiếu khí ở nhiệt độ 30°C trong 3 ngày.

Kết quả

Bảng 1: Nồng độ tế bào (CFU/g) để bảo quản ở nhiệt độ 5°C

Chủng được đánh giá	Ngày 4/5	Ngày 14	Ngày 35	Ngày 56
<i>L. paracasei</i> , LC-02, CHCC6272	$5,4 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
<i>L. rhamnosus</i> CHCC5366	$1,0 \times 10^7$	$9,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$
<i>L. paracasei</i> , CRL 431, CHCC23026	$1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
<i>L. acidophilus</i> , La-5, CHCC2169	$7,2 \times 10^6$	$5,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$
<i>B. animalis</i> , BB-12, CHCC5445	$1,4 \times 10^7$	$8,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
<i>L. helveticus</i> (hỗn hợp chứa 4 chủng)	Không có dữ liệu	$7,9 \times 10^6$	$6,4 \times 10^5$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>Lactococcus lactis</i> , DN-224, CHCC3955	Không có dữ liệu	$1,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$

Bảng 2: Nồng độ tế bào (CFU/g) để bảo quản ở nhiệt độ 25°C

Chủng được đánh giá	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 14	Ngày 35	Ngày 56	Ngày 90	Ngày 150
<i>L. paracasei</i> LC-02, CHCC6272	$7,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$5,0 \times 10^6$	$5,9 \times 10^4$
<i>L. rhamnosus</i> CHCC5366	$2,5 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$4,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$	$5,0 \times 10^3$
<i>L. paracasei</i> , CRL 431, CHCC23026	$1,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$7,9 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^5$
<i>L. acidophilus</i> La-5, CHCC2169	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu
<i>B. animalis</i> BB-12, CHCC5445	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	$4,0 \times 10^5$	$<1,0 \times 10^3$	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu
<i>L. helveticus</i> (hỗn hợp chứa 4 chủng)	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	$3,6 \times 10^7$	$9,4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$<1,0 \times 10^1$	Không có dữ liệu
<i>L. lactis</i> , DN-224 CHCC3955	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	$<1,0 \times 10^3$	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu	Không có dữ liệu

Bảng 3: Nồng độ tế bào (CFU/g) để bảo quản ở nhiệt độ 25°C

Giống khởi động lên men sữa chua được đánh giá*	Ngày 14	Ngày 35	Ngày 56	Ngày 90
TC-X11	Lb: $4,0 \times 10^2$ St: $5,7 \times 10^4$	Không có dữ liệu Không có dữ liệu	Không có dữ liệu Không có dữ liệu	Không có dữ liệu Không có dữ liệu
CH-1	Lb: $2,3 \times 10^4$ St: $<1,0 \times 10^3$	Lb: $2,5 \times 10^2$ St: $4,0 \times 10^1$	Lb: $2,5 \times 10^2$ St: $4,0 \times 10^1$	Lb: $<10 \times 10^1$ St: $<10 \times 10^1$
Acidifix	Lb: $5,0 \times 10^1$ St: $<1,0 \times 10^3$	Không có dữ liệu Không có dữ liệu	Không có dữ liệu Không có dữ liệu	Không có dữ liệu Không có dữ liệu
Yoflex Advance 1.2	Lb: $1,6 \times 10^4$ St: $5,0 \times 10^4$	Lb: $<1,0 \times 10^2$ St: $<1,0 \times 10^2$	Không có dữ liệu Không có dữ liệu	Không có dữ liệu Không có dữ liệu
Yoflex Premium 1.0	Lb: $8,0 \times 10^2$ St: $1,0 \times 10^5$	Không có dữ liệu Không có dữ liệu	Không có dữ liệu Không có dữ liệu	Không có dữ liệu Không có dữ liệu
Yoflex Mild 2.0	Lb: $2,0 \times 10^2$ St: $<1,0 \times 10^3$	Không có dữ liệu Không có dữ liệu	Không có dữ liệu Không có dữ liệu	Không có dữ liệu Không có dữ liệu

Toàn bộ các giống khởi động lên men sữa chua do Chr. Hansen A/S cung cấp ở dạng các hỗn hợp chứa *Streptococcus thermophilus* (St) và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb).

Đối với ba chủng được bảo quản ở nhiệt độ 25°C và theo dõi trong 150 ngày, tức là *L. paracasei*, LC-02, CHCC6272, *L. rhamnosus* CHCC5366 và *L. paracasei*, CRL 431, CHCC23026, độ pH bằng 3,55 đối với toàn bộ ba chủng.

Kết quả đánh giá trên Bảng 1 cho thấy sau 56 ngày ở nhiệt độ lạnh tham chiếu chuẩn bằng 5°C ba chủng *L. paracasei*, LC-02, CHCC6272, *L. rhamnosus* CHCC5366 và *L. paracasei*, CRL 431, CHCC23026 đã duy trì nồng độ tế bào cao hơn $1,0 \times 10^7$ CFU/g, và *B. animalis*, BB-12, CHCC5445 cũng đã duy trì nồng độ tế bào cao hơn $1,0 \times 10^6$ CFU/g, trong khi đó ba chủng *L. acidophilus*, La-5, CHCC2169, *L. helveticus* (hỗn hợp chứa 4 chủng), và *Lactococcus lactis*, DN-224, CHCC3955 chỉ duy trì nồng độ

tế bào bằng $1,4 \times 10^3$ CFU/g hoặc thấp hơn.

Kết quả đánh giá trên Bảng 2 cho thấy sau 150 ngày ở nhiệt độ 25°C (nhiệt độ môi trường) ba chủng *L. paracasei*, LC-02, CHCC6272, *L. rhamnosus* CHCC5366 và *L. paracasei*, CRL 431, CHCC23026 đã duy trì nồng độ tế bào bằng 5×10^3 CFU/g hoặc cao hơn. Trong so sánh, đối với 4 chủng khác được đánh giá, nồng độ tế bào ở nhiệt độ môi trường đã giảm nhanh đến nhỏ hơn $1,0 \times 10^3$ CFU/g. Do đó, ba chủng *L. paracasei*, LC-02, CHCC6272, *L. rhamnosus* CHCC5366 và *L. paracasei*, CRL 431, CHCC23026 rất thích hợp để bảo quản thực phẩm trong thời gian dài ở nhiệt độ môi trường đồng thời duy trì độ pH bằng 3,55. Độ pH bằng 3,55 là thích hợp đối với một số sản phẩm sữa lên men. Ngoài ra, kết quả đánh giá trên Bảng 2 cũng cho thấy nồng độ tế bào có đặc tính thời gian đặc trưng, trong đó ban đầu nồng độ tế bào gia tăng để đạt tối đa ở 14 ngày sau đó nồng độ tế bào bắt đầu giảm dần cho đến 56 ngày, sau đó tốc độ giảm nồng độ tế bào bắt đầu tăng từ 150 ngày. Liên quan đến đặc tính axit hóa của các mẫu, các tác giả sáng chế ngạc nhiên phát hiện thấy rằng có thể duy trì độ pH bằng 3,55 với thực tế là 3 chủng này là các chủng lên men lactoza và các mẫu chứa lactoza.

Kết quả đánh giá trên Bảng 3 cho thấy nồng độ tế bào của toàn bộ các chủng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* trong các giống khởi động lên men sữa chua khác nhau đã giảm nhanh.

Ví dụ 2: Đánh giá độ thích hợp để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường của chủng *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Nguyên liệu sữa

Hàm lượng chất béo: 2,7%*.

Hàm lượng protein: 2,9%*.

Lactoza: 3,0%.

Sucroza: 7,0% (được bổ sung).

Tinh bột biến tính E1442 Cargill loại 75720: 1,50%.

Pectin loại LMA CPKelco loại LM 106 AS-YA: 0,30%.

Gôm gellan loại Kelcogel YSS: 0,05%.

* Hàm lượng trong sản phẩm cuối cùng, tức là sau khi xử lý nhiệt, bổ sung chủng

vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường và bảo quản trong 150 ngày.

Giống khởi động

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

Các chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường được đánh giá

Chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389.

Chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM28910.

20 chủng khác được chọn từ các loài sau:

Lactobacillus helveticus

Lactobacillus plantarum

Streptococcus thermophilus

Lactococcus lactis

Pediococcus acidilactici

Quy trình sản xuất sản phẩm thử nghiệm

16. Phân tán các thành phần khan vào sữa.

17. Để yên trong 3 giờ kết hợp khuấy nhẹ.

18. Gia nhiệt sữa cho đến khi đạt được nhiệt độ 65°C.

19. Đồng nhất ở áp suất bằng 150 Bar.

20. Xử lý nhiệt đến nhiệt độ 95°C trong 5 phút.

21. Làm mát đến nhiệt độ lên men bằng 43°C.

22. Bơm sữa vào thùng lên men.

23. Cấy giống khởi động YoFlex loại YF-L904.

24. Lên men cho đến khi đạt được độ pH bằng 4,30.

25. Phá vỡ sữa đông và khuấy cho đến khi thu được cấu trúc mịn

26. Xử lý nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong 20 giây.

27. Làm mát đến nhiệt độ 25°C

Quy trình đánh giá các chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường

28. Nạp trong điều kiện vô trùng vào các đồ chứa có dung tích bằng 100mL.

29. Cấy các chủng và các dịch nuôi cấy.

30. Bảo quản trong 6 tháng ở nhiệt độ phòng bằng 25°C.

Phương pháp xác định nồng độ tế bào

Nồng độ tế bào được xác định bằng phương pháp xử lý lỏng tự động trên thiết bị Hamilton. Phương pháp bao gồm bước cấy trải mẫu cần đánh giá lên lớp cơ chất thạch aga thích hợp ở một số độ pha loãng liên tiếp và đếm số lượng khuẩn lạc ở độ pha loãng liên tiếp thứ nhất khi ít nhất một khuẩn lạc mọc.

Kết quả

Trong số 22 chủng được đánh giá, chỉ 5 các chủng có nồng độ tế bào lớn hơn $1,0 \times 10^3$ CFU/g sau 6 tháng. Trong số 5 chủng có nồng độ tế bào lớn hơn $1,0 \times 10^3$ CFU/g sau 6 tháng này, chỉ hai mẫu có độ pH cao hơn 3,5:

Chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389.

Chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM28910.

Bảng 4: Nồng độ tế bào (CFU/g) để bảo quản ở nhiệt độ 25°C

Chủng được đánh giá	0 tháng	2 tháng	4 tháng	6 tháng
<i>L. paracasei</i> CHCC5584	$1,00 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$8,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^4$
Độ pH	4,23	3,54	3,60	3,51
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CHCC18944	$3,70 \times 10^5$	$7,00 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6$	$5,50 \times 10^5$
Độ pH	4,19	3,97	3,70	3,51

Ví dụ 3: Đánh giá độ thích hợp để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường của ba chủng *Lactobacillus*

Thiết kế thử nghiệm

Mục đích của thử nghiệm này là để đánh giá tác dụng ảnh hưởng đến khả năng sống sót của ba chủng *Lactobacillus* theo các thông số sau:

- Độ pH của sữa chua nền được xử lý nhiệt: 4,0 và độ pH bằng 4,3 được đánh giá.
- Nồng độ CFU: 10000 CFU và 100000 CFU được đánh giá.
- Nồng độ sucroza trong sữa nền: 0%, 3% và nồng độ sucroza bằng 7% được đánh giá.

Giống khởi động

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

Nguyên liệu sữa

Bảng 5: Thành phần của nguyên liệu sữa

	Tỷ lệ (%)	Khối lượng (g)
3,5% sữa béo	74,3	89160,0
Nước	23,45	28140,0
Tinh bột biến tính-Roquette	1,5	1800
Pectin	0,12	144,0
Gôm gelan	0,03	36,0
Protein vàng sữa đậm đặc (WPC) 80-Nutrilac YO-7830	0,60	720,0
	100,0	120000

Quy trình sản xuất sản phẩm thử nghiệm

1. Loại khí sữa nền ở áp suất nằm trong khoảng từ 350 đến 400 mbar.
2. Đồng nhất ở nhiệt độ 60°C và áp suất bằng 150 bar.
3. Xử lý nhiệt ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút trong thiết bị thanh trùng kiểu tấm.
Làm lạnh đến nhiệt độ 5°C.
4. Cấy với giống khởi động.
5. Nhiệt độ lên men: 43°C.
6. Xử lý nhiệt cuối cùng: 74°C trong 20 giây trong ống giữ.
7. Đóng gói vào các cốc vô trùng trong tủ hút.

Các chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường được đánh giá

Chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC6272 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572.

Chủng *Lactobacillus fermentum* CHCC14591 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32084.

Chủng *Lactobacillus rhamnosus* LGG® được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC53103.

Phân tích

Xác định nồng độ CFU bằng phương pháp cấy trải RAPID-CFU: phát triển (mỗi 2 tháng).

Xác định nồng độ cacbohydrat và axit khối lượng phân tử nhỏ bằng phương pháp HPLC: mỗi 2 tháng.

Đo độ pH bằng thay đổi chỉ thị màu (sắc độ): phát triển (mỗi 1 tháng).

Xác định nồng độ CFU

Nồng độ CFU được xác định bằng phương pháp bao gồm bước cấy trải tự động bằng robot Hamilton.

Đo độ pH

Độ pH được đo bằng thay đổi màu sắc của chỉ thị màu. Bromocresol màu đỏ tía/màu xanh lá cây được sử dụng làm chỉ thị màu dưới dạng hỗn hợp theo tỷ lệ 50/50. Dung dịch chỉ thị màu được điều chế như sau: Bình định mức (1000mL) được nạp một phần với nước milli-Q, sau đó bromocresol màu xanh lá cây (1,00g) và bromocresol màu đỏ tía (1,0g) được bổ sung vào bình định mức này. NaOH 4N (2mL) được bổ sung vào bình định mức này, sau đó khuấy và bổ sung nước milli-Q đến 1000mL.

Cường độ màu của các mẫu được đọc bằng máy quét phẳng. Sắc độ thay đổi 1 đơn vị là tương đương với độ pH thay đổi 0,05 đơn vị.

Kết quả

Bảng 6: Nồng độ CFU và độ pH sau 4 tháng bảo quản sản phẩm sữa chua được xử lý nhiệt ở nhiệt độ môi trường (sản phẩm thử nghiệm) với độ pH ban đầu bằng 4,0 và nồng độ CFU bằng 10000

Chủng được đánh giá	0 tháng			2 tháng			4 tháng		
Sucroza (%)	0	3	7	0	3	7	0	3	7
Không bổ sung chủng được đánh giá	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Độ pH	138,9	138,9	138,9	140,9	140,7	140,1	139,0	141,6	140,5
<i>L. paracasei</i> CHCC6272	$7,0 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$
Độ pH	139,4	139,0	138,8	134,9	134,4	134,9	140,6	140,0	138,9
<i>L. fermentum</i> CHCC14591	$1,75 \times 10^7$	$1,65 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$5,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
Độ pH	139,5	138,8	138,8	139,7	141,3	140,2	140,7	138,2	140,2
<i>L. rhamnosus</i> LGG®	$2,55 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$8,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	Không có dữ liệu	$1,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$
Độ pH	139,3	138,8	138,7	131,6	Không có dữ liệu	134,9	130,9	121,6	131,6

Bảng 7: Nồng độ CFU và độ pH sau 4 tháng bảo quản sản phẩm sữa chua được xử lý nhiệt ở nhiệt độ môi trường (sản phẩm thử nghiệm) với độ pH ban đầu bằng 4,3 và nồng độ CFU bằng 10000

Chủng được đánh giá	0 tháng			2 tháng			4 tháng		
Sucroza (%)	0	3	7	0	3	7	0	3	7
Không bổ sung chủng được đánh giá	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Độ pH	145,7	145,3	144,7	146,4	147,1	146,6	142,6	145,0	145,3
<i>L. paracasei</i> CHCC6272	$1,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,05 \times 10^7$	$1,45 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
Độ pH	146,3	145,6	145,3	137,7	136,6	136,9	147,3	148,1	146,4
<i>L. fermentum</i> CHCC14591	$1,55 \times 10^6$	$3,15 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	$5,05 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$9,5 \times 10^4$	$1,95 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$
Độ pH	146,3	145,7	145,3	147,3	147,5	147,1	147,2	150,1	149,3
<i>L. rhamnosus</i> LGG®	$1,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$1,45 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
Độ pH	146,3	145,7	145,1	137,5	136,9	137,5	134,7	133,4	136,2

Bảng 8: Nồng độ CFU và độ pH sau 4 tháng bảo quản sản phẩm sữa chua được xử lý nhiệt ở nhiệt độ môi trường (sản phẩm thử nghiệm) với độ pH ban đầu bằng 4,0 và nồng độ CFU bằng 100000

Chủng được đánh giá	0 tháng			2 tháng			4 tháng		
Sucroza (%)	0	3	7	0	3	7	0	3	7
Không bổ sung chủng được đánh giá	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Độ pH	140,3	139,3	139,3	139,9	140,2	141,0	136,6	138,6	138,5
<i>L. paracasei</i> CHCC6272	$5,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$
Độ pH	140,0	139,8	139,7	134,4	134,1	135,0	136,6	138,6	138,5
<i>L. fermentum</i> CHCC14591	$1,5 \times 10^7$	$1,25 \times 10^7$	$8,5 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$	$5,5 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$
Độ pH	140,7	139,9	139,8	136,8	140,6	140,5	139,7	140,5	140,4
<i>L. rhamnosus</i> LGG®	$4,5 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,35 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$
Độ pH	139,9	139,7	139,5	134,8	135,8	136,8	134,9	135,7	142,6

Bảng 9: Nồng độ CFU và độ pH sau 4 tháng bảo quản sản phẩm sữa chua được xử lý nhiệt ở nhiệt độ môi trường (sản phẩm thử nghiệm) với độ pH ban đầu bằng 4,3 và nồng độ CFU bằng 100000

Chủng được đánh giá	0 tháng			2 tháng			4 tháng		
Sucroza (%)	0	3	7	0	3	7	0	3	7
Không bổ sung chủng được đánh giá	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Độ pH	144,4	144,3	143,9	143,9	143,0	143,0	141,7	141,5	140,0
<i>L. paracasei</i> CHCC6272	$8,0 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$
Độ pH	144,5	144,1	143,5	135,7	135,2	136,0	141,7	141,5	140,0
<i>L. fermentum</i> CHCC14591	$1,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^4$
Độ pH	144,4	144,4	143,9	143,3	144,4	143,9	139,5	143,7	145,3
<i>L. rhamnosus</i> LGG®	$4,5 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^5$
Độ pH	144,8	144,1	144,1	135,9	136,4	137,5	135,1	135,1	138,0

Kết quả đánh giá được thể hiện trên Bảng 6-9 cho thấy đối với toàn bộ các tổ hợp thông số mẫu bao gồm 1) chủng *Lactobacillus* được đánh giá, 2) độ pH của sữa chua nền được xử lý nhiệt, 3) Nồng độ CFU và 4) nồng độ sucroza trong sữa chua được xử lý nhiệt, thì nồng độ CFU/g nằm trong khoảng từ $2,5 \times 10^4$ đến $1,6 \times 10^7$ sau 4 tháng bảo quản.

So sánh độ pH ban đầu của sữa chua nền: Đối với cả nồng độ CFU và sucroza không được bổ sung, độ pH ban đầu của sữa chua nền bằng 4,0 dẫn đến nồng độ CFU cao hơn so với độ pH ban đầu của sữa chua nền bằng 4,3 sau 4 tháng đối với toàn bộ các chủng được đánh giá. Đối với cả nồng độ CFU và 3% sucroza được bổ sung, độ pH ban đầu của sữa chua nền bằng 4,0 dẫn đến nồng độ CFU cao hơn so với độ pH ban đầu của sữa chua nền bằng 4,3 sau 4 tháng đối với chủng *L. rhamnosus* và chủng *L. fermentum*. Đối với nồng độ CFU bằng 10000 CFU/g và nồng độ 7% sucroza được bổ sung, độ pH ban đầu của sữa chua nền bằng 4,3 dẫn đến nồng độ CFU cao hơn so với độ pH ban đầu của sữa chua nền bằng 4,0 sau 4 tháng đối với toàn bộ các chủng được đánh giá.

So sánh nồng độ CFU: Đối với chủng *L. rhamnosus*, nồng độ CFU bằng 10000 CFU/g đối với cả hai độ pH ban đầu của sữa chua nền dẫn đến nồng độ CFU cao hơn sau 4 tháng so với nồng độ CFU bằng 100000 CFU/g đối với toàn bộ các nồng độ sucroza được bổ sung. Đối với nồng độ sucroza được bổ sung bằng 7% và độ pH ban đầu của sữa chua nền bằng 4,3, nồng độ CFU bằng 10000 CFU/g dẫn đến nồng độ CFU cao hơn sau 4 tháng so với nồng độ CFU bằng 100000 CFU/g đối với toàn bộ các chủng được đánh giá.

So sánh nồng độ sucroza được bổ sung: Đối với nồng độ CFU bằng 10000 CFU/g và độ pH ban đầu của sữa chua nền bằng 4,0, nồng độ sucroza bằng 0% dẫn đến nồng độ CFU cao hơn sau 4 tháng so với nồng độ sucroza 3 và 7% (tuy nhiên, đối với chủng *L. rhamnosus* và chủng *L. fermentum* và nồng độ sucroza bằng 3%, nồng độ CFU là tương

đương với nồng độ CFU trong trường hợp nồng độ sucroza bằng 0%). Đối với nồng độ CFU bằng 100000 CFU/g và độ pH ban đầu của sữa chua nền bằng 4,3, nồng độ sucroza bằng 3% dẫn đến nồng độ CFU cao hơn sau 4 tháng so với nồng độ sucroza 0 và 7%.

Để đạt được khả năng sống sót cao của chủng vi khuẩn *Lactobacillus* trong thời gian bảo quản kéo dài sản phẩm sữa chua được xử lý nhiệt ở nhiệt độ môi trường, cần đạt được sự sinh trưởng vừa phải, cân bằng của vi khuẩn. Do đó, khi vi khuẩn này được cấy vào sữa chua nền có điều kiện sinh trưởng hạn chế, chủng vi khuẩn này sẽ không thể tự sinh trưởng và nồng độ tế bào sẽ giảm đến mức độ không chấp nhận được. Trong trường hợp này, mức độ suy giảm độ pH của sữa chua sẽ chỉ thấp do vi khuẩn sinh trưởng hạn chế. Mặt khác, khi vi khuẩn này được cấy vào sữa chua nền có điều kiện tăng cường sinh trưởng, chủng vi khuẩn này sẽ phát triển nhanh và dẫn đến giảm mạnh độ pH, và cuối cùng vi khuẩn sẽ ngừng phát triển và có khả năng bất hoạt hoặc phân giải tế bào vi khuẩn. Ngoài ra, độ pH giảm mạnh như vậy là không mong muốn do có thể tạo ra hương vị quá chua cho sữa chua.

Do đó, cần đạt được sự sinh trưởng vừa phải, cân bằng của vi khuẩn. Một số yếu tố là quan trọng để đạt được sự sinh trưởng vừa phải, cân bằng của vi khuẩn. Một số yếu tố là các thông số được đánh giá trong ví dụ này như nêu trên. Cụ thể, độ pH ban đầu của sữa chua nền là quan trọng, do ảnh hưởng đến cả mức độ sinh trưởng của vi khuẩn và độ pH cuối cùng đạt được trong quá trình bảo quản. Nồng độ CFU là quan trọng do nó thể hiện nồng độ cực đại của vi khuẩn đạt được trong quá trình bảo quản và do đó độ pH giảm. Cuối cùng, chất làm ngọt sucroza thường được bổ sung vào sữa chua được xử lý nhiệt và bảo quản ở nhiệt độ môi trường. Nồng độ sucroza là quan trọng đối với khả năng sống sót của vi khuẩn trong thời gian bảo quản kéo dài do sucroza sẽ chuyển hóa trong quá trình bảo quản thành glucoza và fructoza là nguồn cacbohydrat để vi khuẩn sinh trưởng và làm tăng sự sinh trưởng của vi khuẩn.

Kết quả đánh giá thu được từ ví dụ này cho thấy cả độ pH ban đầu của sữa chua nền bằng 4,0 và 4,3 dẫn đến nồng độ CFU cao nằm trong khoảng từ $2,5 \times 10^4$ đến $1,6 \times 10^7$ sau 4 tháng bảo quản. Liệu độ pH ban đầu của sữa chua nền bằng 4,0 hoặc 4,3 dẫn đến nồng độ tế bào cao hơn sau 4 tháng hay không phụ thuộc vào các yếu tố khác được đánh giá như mô tả chi tiết ở trên.

Kết quả đánh giá thu được từ ví dụ này cho thấy cả nồng độ CFU bằng 10000 và

100000 CFU/g dẫn đến nồng độ CFU cao nằm trong khoảng từ $2,5 \times 10^4$ đến $1,6 \times 10^7$ sau 4 tháng bảo quản. Liều nồng độ CFU bằng 10000 hoặc 100000 CFU/g dẫn đến nồng độ tế bào cao hơn sau 4 tháng hay không phụ thuộc vào các yếu tố khác được đánh giá như mô tả chi tiết ở trên.

Kết quả đánh giá thu được từ ví dụ này cho thấy cả nồng độ sucroza được bổ sung bằng 0, 3 và 7% dẫn đến nồng độ CFU cao nằm trong khoảng từ $2,5 \times 10^4$ đến $1,6 \times 10^7$ sau 4 tháng bảo quản. Liều nồng độ sucroza được bổ sung bằng 0%, 3% hoặc 7% dẫn đến nồng độ tế bào cao hơn sau 4 tháng hay không phụ thuộc vào các yếu tố khác được đánh giá như mô tả chi tiết ở trên.

Ví dụ 4: Đánh giá độ thích hợp để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường của hai chủng *Lactobacillus* trong sản phẩm sữa lên men có độ pH thấp (Yakult)

Sản phẩm sữa lên men nền

Trong ví dụ này, sản phẩm Yakult bán trên thị trường có độ pH thấp (độ pH bằng 3,8) được sử dụng làm sản phẩm sữa lên men nền để bổ sung các chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường để đánh giá khả năng sống sót, khả năng axit hóa sau lên men và khả năng sinh trưởng của chúng trong thời gian bảo quản kéo dài ở nhiệt độ môi trường.

Các thành phần: nước, đường, si-rô, bột sữa không kem, glucoza, *Lactobacillus paracasei* (vi khuẩn axit lactic sống $> 3,0 \times 10^8$ CFU/g), và chất thơm.

Giá trị dinh dưỡng: sản phẩm Yakult này chứa protein (1,2g/100mL), chất béo (0g/100mL) và cacbohydrat (15,4g/100mL).

Các chủng vi khuẩn axit lactic để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường được đánh giá

Chủng *Lactobacillus fermentum* CHCC14591 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32084.

Chủng *Lactobacillus rhamnosus* LGG® được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC53103.

Quy trình sản xuất sản phẩm thử nghiệm

Trước tiên, các mẫu sản phẩm Yakult có bán trên thị trường được thanh trùng ở

nhệt độ 74°C trong 20 giây trên thiết bị Mini Thermisation (MTU). Sau đó, các mẫu đã được thanh trùng được nạp vào các cốc vô trùng dung tích 100mL trong tủ hút LAF. Sau đó, các cốc này được cấy với các chủng thử nghiệm để bảo quản ở nhiệt độ môi trường ở nồng độ bằng $1,0 \times 10^6$ /mL và bảo quản ở nhiệt độ 25°C trong 3 tháng.

Kết quả

Bảng 10

	Tháng	CFU/mL	Độ pH
Chủng <i>L. rhamnosus</i> LGG®	0	$3,70 \times 10^7$	3,55
	1,5	$1,08 \times 10^7$	
	3	$1,30 \times 10^6$	3,15
Chủng <i>L. fermentum</i> CHCC14591	0	$1,05 \times 10^7$	3,5
	1,5	$3,70 \times 10^7$	
	3	$9,80 \times 10^7$	3,4

Kết quả đánh giá trên Bảng 10 cho thấy nồng độ tế bào là rất cao sau 3 tháng bảo quản ở nhiệt độ 25°C đối với cả hai chủng được đánh giá, tức là cao hơn nồng độ được cấy. Đối với chủng *L. fermentum* CHCC14591, độ pH chỉ giảm 0,1 đơn vị trong 3 tháng bảo quản ở nhiệt độ 25°C, và phải được coi là có mức độ axit hóa sau lên men rất thấp ở nhiệt độ 25°C, cụ thể với thực tế là nồng độ tế bào đã gia tăng trong thời gian này. Đối với chủng *L. rhamnosus* LGG®, độ pH giảm trong 3 tháng bảo quản ở nhiệt độ 25°C cao hơn một chút, tức là 0,4 đơn vị, là thích hợp đối với một số sản phẩm sữa lên men.

Thông tin lưu trữ vi sinh vật

Người nộp đơn yêu cầu rằng mẫu của các vi sinh vật được lưu trữ với thông tin dưới đây chỉ có thể được cung cấp cho thị trường khi được chấp thuận bởi người nộp đơn.

Các chủng theo sáng chế đã được lưu trữ có các mã đăng ký như sau:

Chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig với mã đăng ký DSM16572 vào ngày 10 tháng 05 năm 2016.

Chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig với mã đăng ký DSM23035 vào ngày 02 tháng 02 năm 2012.

Chủng *Lactobacillus acidophilus* La-5, CHCC2169 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig với mã

đăng ký DSM13241 vào ngày 30 tháng 09 năm 2003.

Chủng *Bifidobacterium animalis* BB-12, CHCC5445 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig với mã đăng ký DSM15954 vào ngày 30 tháng 09 năm 2003.

Chủng *Lactococcus lactis* DN-224, CHCC3955 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig với mã đăng ký DSM11037 vào ngày 26 tháng 06 năm 1996.

Chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig với mã đăng ký DSM32389 vào ngày 02 tháng 11 năm 2016.

Chủng *Lactobacillus fermentum* CHCC14591 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig với mã đăng ký DSM32086 vào ngày 16 tháng 07 năm 2015.

Chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig với mã đăng ký DSM28910 vào ngày 12 tháng 06 năm 2014.

Chủng *Lactobacillus paracasei* LC-01, CHCC2115 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig với mã đăng ký DSM19465 vào ngày 27 tháng 06 năm 2007.

Chủng *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig với mã đăng ký DSM24616 vào ngày 01 tháng 03 năm 2011.

Chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC7155 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig với mã đăng ký DSM18875 vào ngày 19 tháng 12 năm 2006.

Quá trình lưu trữ được thực hiện theo hiệp ước Budapest về đăng ký lưu trữ vi sinh vật quốc tế dùng cho mục đích đăng ký cấp Patent.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất thực phẩm dạng sữa lên men có thể bảo quản ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C và chứa vi khuẩn axit lactic sống, quy trình này bao gồm các bước:

- chế biến thực phẩm dạng sữa có độ pH nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,4
- xử lý nhiệt thực phẩm này để làm giảm nồng độ vi khuẩn đến không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ đơn vị tạo khuẩn lạc/g (CFU/g- Colony Forming Unit/g) để thu được thực phẩm được xử lý nhiệt; và
- bổ sung trong điều kiện vô trùng một hoặc nhiều chủng vi khuẩn axit lactic duy trì khả năng sống sót ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C vào thực phẩm đã được xử lý nhiệt này ở tổng nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g để thu được thực phẩm có thể bảo quản ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C,

trong đó chủng vi khuẩn axit lactic duy trì khả năng sống sót của nó ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C được chọn từ nhóm bao gồm các chủng:

(i) trong đó chủng vi khuẩn axit lactic khi được bổ sung ở nồng độ bằng $2,5 \times 10^7$ CFU/g vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm được chế biến bằng cách lên men bằng giống khởi động chứa *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* ở nhiệt độ 43°C đến độ pH bằng 4,3, đã được xử lý nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong 30 giây, có thể duy trì khả năng sống sót ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g khi kết thúc bảo quản sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này trong 150 ngày ở nhiệt độ 25°C; và

(ii) trong đó độ pH của sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này giảm tối đa 0,8 đơn vị trong thời gian bảo quản; và

(iii) trong đó chủng vi khuẩn axit lactic này được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó chủng vi khuẩn axit lactic duy trì khả năng sống sót của nó ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C có thể duy trì khả năng sống sót ở nồng độ ít nhất bằng $1,0 \times 10^3$ CFU/g, tốt hơn nếu ít nhất bằng $5,0 \times 10^3$ CFU/g, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng $1,0 \times 10^4$ CFU/g, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng $5,0 \times 10^4$

CFU/g và tốt nhất nếu ít nhất bằng $1,0 \times 10^5$ CFU/g khi kết thúc bảo quản sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này trong 150 ngày.

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó độ pH của sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này giảm tối đa 0,7 đơn vị, tốt hơn nếu 0,6 đơn vị, tốt hơn nếu 0,5 đơn vị, tốt hơn nếu 0,4 đơn vị, tốt hơn nếu 0,3 đơn vị, và tốt nhất nếu 0,2 đơn vị khi bảo quản sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm này trong 150 ngày.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chủng vi khuẩn axit lactic khi được bổ sung ở nồng độ bằng $2,5 \times 10^7$ CFU/g vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm gia tăng đến nồng độ ít nhất bằng $5,0 \times 10^7$ CFU/g, tốt hơn nếu $7,5 \times 10^7$ CFU/g, và tốt nhất nếu $1,0 \times 10^8$ CFU/g.

5. Quy trình theo điểm 4, trong đó nồng độ của tế bào chủng vi khuẩn axit lactic đạt tối đa trong vòng 45 ngày bổ sung chủng vi khuẩn axit lactic này vào sản phẩm sữa chua lên men thử nghiệm, tốt hơn nếu trong vòng 40 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 35 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 30 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 25 ngày, tốt hơn nếu trong vòng 20 ngày, và tốt nhất nếu trong vòng 15 ngày.

6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó thực phẩm này có thể bảo quản ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C có thể được bảo quản ở nhiệt độ môi trường trong thời gian ít nhất 1 ngày, tốt hơn nếu ít nhất 2 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 3 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 4 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 5 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 6 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 7 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 8 ngày, tốt hơn nữa nếu ít nhất 9 ngày, và tốt nhất nếu ít nhất 10 ngày.

7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chủng vi khuẩn axit lactic duy trì khả năng sống sót của nó ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM16572, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hoa Kỳ với mã đăng ký ATCC 55544, chủng *Lactobacillus paracasei* CHCC5584 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32389, chủng *Lactobacillus fermentum* CHCC14591 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM32086, và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944 được lưu trữ tại Ngân

hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức với mã đăng ký DSM28910, và chủng vi khuẩn đột biến và chủng vi khuẩn biến thể có chức năng tương đương của chúng có các đặc tính tương đương thích hợp để bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ môi trường nằm trong khoảng từ 10°C đến 35°C so với chủng vi khuẩn mẹ.

8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó thực phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ 3,4 đến 4,4 là sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động được chế biến bằng cách lên men nguyên liệu sữa bằng giống khởi động chứa vi khuẩn axit lactic để thu được sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động.

9. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động có hàm lượng protein cao hơn 5,1% (khối lượng/khối lượng).

10. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó sản phẩm sữa lên men bằng giống khởi động không được pha loãng.