



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

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

(11)



1-0048626

(51)^{2020.01} A23C 9/123; C12N 1/20; A23C 9/13

(13) B

(21) 1-2021-05684

(22) 03/02/2020

(86) PCT/JP2020/003848 03/02/2020

(87) WO2020/170776 27/08/2020

(30) 2019-027288 19/02/2019 JP

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/11/2021 404A

(73) KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (JP)

1-10-30, Kaigan, Minato-ku, Tokyo 1058660 Japan

(72) SAITO Junki (JP); HOSHI Ryotaro (JP).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO RA HỖN HỢP NUÔI CẤY BẰNG CÁCH NUÔI CẤY VI KHUẨN AXIT LACTIC VÀ/HOẶC VI KHUẨN THUỘC GIỐNG VI KHUẨN BIFIDUS VÀ HỖN HỢP NUÔI CẤY ĐƯỢC TẠO RA BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY

(21) 1-2021-05684

(57) Sáng chế đề cập tới phương pháp tạo ra hỗn hợp nuôi cấy bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* và sản phẩm tạo bởi phương pháp này. Theo sáng chế, phương pháp tạo ra hỗn hợp nuôi cấy bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* trong môi chất chứa peptit sữa, khác biệt ở chỗ, nhiệt độ nuôi cấy thấp hơn từ 3°C trở lên so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus*, thay đổi của độ axit trong quá trình bảo quản của sản phẩm không bị đẩy nhanh, và số lượng vi khuẩn ở thời điểm điều chế sản phẩm có thể được duy trì ở mức cao, thậm chí khi vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự được nuôi cấy trong môi chất chứa peptit sữa đã bổ sung vào đó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới phương pháp tạo ra hỗn hợp nuôi cấy bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* và sản phẩm tạo bởi phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã biết rằng, khi sữa lên men được tạo ra bằng cách sử dụng hỗn hợp nuôi cấy của vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus*, việc bổ sung peptit sữa làm chất nuôi cấy phụ trợ vào môi chất có thể đẩy nhanh sự tăng trưởng của vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự, làm tăng số lượng vi khuẩn ban đầu và rút ngắn chu kỳ lên men.

Tuy nhiên, việc bổ sung peptit sữa gây ra các vấn đề như sự suy giảm chất lượng của sản phẩm do gia tăng đáng kể của thay đổi độ axit trong quá trình bảo quản của sản phẩm và khó khăn trong việc duy trì số lượng vi khuẩn ở mức cao ở thời điểm điều chế sản phẩm bởi sự gia tăng của độ axit trong quá trình bảo quản của sản phẩm.

Để làm phương pháp ngăn chặn sự gia tăng của độ axit của sữa lên men trong quá trình bảo quản của sản phẩm, phương pháp bổ sung dung dịch nuôi cấy đơn của vi khuẩn axit lactic thuộc giống *Lactobacillus* vào dung dịch môi vi khuẩn axit lactic (dung dịch môi hỗn hợp) hiện đã được áp dụng cho đến thời điểm này. Tuy nhiên, các hiệu quả tương ứng là không đủ, và trong ứng dụng thực tế, đã thấy rằng sự gia tăng của độ axit không được ngăn chặn khi bổ sung riêng peptit sữa (tài liệu sáng chế 1).

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO2013/133313.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất kỹ thuật mà nhờ đó thay đổi của độ axit trong quá trình bảo quản của sản phẩm không bị đẩy nhanh và nhờ đó số lượng vi khuẩn ở thời điểm điều chế sản phẩm có thể được duy trì ở mức cao thậm chí khi vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự được nuôi cấy trong môi chất chứa peptit sữa đã bổ sung vào đó.

Dựa trên nghiên cứu chuyên sâu để đạt được mục đích như nêu trên, tác giả sáng chế đã thấy rằng có thể đạt được mục đích này bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự trong môi chất chứa peptit sữa đã bổ sung vào đó ở nhiệt độ thấp hơn từ 3°C trở lên so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự, mặc dù hoạt động nuôi cấy nói chung được thực hiện ở nhiệt độ nuôi cấy tối ưu. Sáng chế đã được hoàn thành dựa trên cơ sở này.

Cụ thể hơn, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra hỗn hợp nuôi cấy bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* trong môi chất chứa peptit sữa, khác biệt ở chỗ, nhiệt độ nuôi cấy thấp hơn từ 3°C trở lên so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus*.

Hơn nữa, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thực phẩm và đồ uống lên men, khác biệt ở chỗ, thực phẩm và đồ uống lên men này chứa hỗn hợp nuôi cấy được tạo ra bằng phương pháp như nêu trên để tạo ra hỗn hợp nuôi cấy.

Hơn nữa, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hỗn hợp nuôi cấy được tạo ra bằng phương pháp như nêu trên để tạo ra hỗn hợp nuôi cấy, khác biệt ở chỗ, độ axit của hỗn hợp nuôi cấy trước khi bảo quản nằm trong khoảng từ 4 tới 12 và thay đổi của độ axit sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày là nhỏ hơn 1,45.

Hơn nữa, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hỗn hợp nuôi cấy được tạo ra bằng phương pháp như nêu trên để tạo ra hỗn hợp nuôi cấy, khác biệt ở chỗ, số tế bào sống của hỗn hợp nuôi cấy trước khi bảo quản là lớn hơn hoặc bằng $1,2 \times 10^9$ cfu/ml và khả năng sống sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày là lớn hơn hoặc bằng 80%.

Ngoài ra, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thực phẩm và đồ uống lên men, khác biệt ở chỗ, thực phẩm và đồ uống lên men này chứa hỗn hợp nuôi cấy như nêu trên.

Các hiệu quả có lợi của sáng chế

Liên quan tới phương pháp tạo ra hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế, nhờ phương pháp nuôi cấy đơn giản ở nhiệt độ thấp hơn từ 3°C trở lên so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* trong môi chất chứa peptit sữa, có thể thu được hỗn hợp nuôi cấy trong đó thay đổi của độ axit trong quá trình bảo quản được ngăn chặn và trong đó khả năng sống của vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* có trong đó ở mức cao.

Hơn nữa, hỗn hợp nuôi cấy được tạo ra bằng phương pháp tạo ra hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế có các đặc trưng như nêu trên và vì thế có thể được sử dụng để sản xuất thực phẩm và đồ uống lên men để có thể duy trì chất lượng của sản phẩm cả trong quá trình bảo quản.

Nói chung, theo phương pháp tạo ra hỗn hợp nuôi cấy bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus*, kiến thức kỹ thuật phổ biến là việc nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ nuôi cấy tối ưu, nhiệt độ này được xem là làm tăng tối đa số lượng vi khuẩn, và hoạt động nuôi cấy ở nhiệt độ khác thường không được thực hiện. Khi chất nuôi cấy phụ trợ như peptit sữa được bổ sung vào môi chất, dự kiến rằng hoạt động nuôi cấy ở nhiệt độ khác với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu sẽ chỉ làm tăng (phục hồi) tốc độ tăng trưởng và vì vậy làm tăng (hoặc xáo đi trong một số trường hợp) độ axit, và các hiệu quả của sáng chế (cả sự phục hồi của tốc độ tăng trưởng lẫn ngăn chặn sự gia tăng của độ axit) sẽ không được dễ dàng kỳ vọng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp tạo ra hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế (sau đây được gọi tắt là “phương pháp của sáng chế”) là phương pháp tạo ra hỗn hợp nuôi cấy bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* (đôi

khi được gọi là “vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự” dưới đây) trong môi chất chứa peptit sữa trong đó nhiệt độ nuôi cấy thấp hơn từ 3°C trở lên, tốt hơn là thấp hơn từ 5°C trở lên, tốt hơn nữa là thấp hơn từ 5 tới 15°C so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus*. Theo phương pháp của sáng chế, khi hai hoặc nhiều hơn các vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự có các nhiệt độ nuôi cấy tối ưu khác nhau được sử dụng, nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn bất kỳ trong số các vi khuẩn axit lactic có thể được dùng làm cơ sở. Ví dụ, nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic mà nhờ đó thu được các hiệu quả của sáng chế (ngăn chặn thay đổi của độ axit và cải thiện khả năng sống), nghĩa là vi khuẩn axit lactic rõ ràng góp phần vào thay đổi của độ axit của thực phẩm và đồ uống lên men hoặc vi khuẩn axit lactic có khả năng sống được cải thiện về mặt hữu ích ở dạng chế phẩm sinh học, có thể được dùng làm cơ sở. Theo cách khác, để thu được các hiệu quả của sáng chế (ngăn chặn thay đổi của độ axit và cải thiện khả năng sống) đối với tất cả các vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự, nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự có nhiệt độ nuôi cấy tối ưu thấp nhất có thể được dùng làm cơ sở.

Môi chất được sử dụng theo phương pháp của sáng chế có thể là môi chất trong đó vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự có thể phát triển và chứa peptit sữa. Các ví dụ về môi chất như vậy bao gồm môi chất sữa động vật có vú bao gồm sữa thô như sữa bò, sữa dê, sữa ngựa và sữa cừu, sản phẩm từ sữa như sữa bột đã khử chất béo, sữa bột nguyên kem và kem tươi hoặc sản phẩm tương tự và môi chất tổng hợp. Trong số các môi chất này, sữa bột đã khử chất béo được ưu tiên.

Peptit sữa chứa trong môi chất không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ bao gồm các peptit thu được từ casein, váng sữa hoặc sản phẩm tương tự nhờ xử lý như thủy phân và xử lý tương tự. Phân tử lượng của peptit sữa cũng không bị giới hạn cụ thể. Hàm lượng peptit sữa của môi chất không bị giới hạn cụ thể và, ví dụ, từ 0,025 tới 0,25% theo khối lượng, tốt hơn là từ 0,05 tới 0,10% theo khối lượng.

Phụ thuộc vào yêu cầu, môi chất có thể chứa sacarit mà vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự có thể đồng hóa. Các ví dụ về sacarit như vậy bao gồm

glucoza, fructoza, manosa, galactoza, arabinoza, riboza, xyloza, lactoza, maltoza, sucroza, palatinoza, trehaloza, rafinoza và chất tương tự. Lượng của sacarit mà vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự có thể đồng hóa chứa trong môi chất không bị giới hạn cụ thể và có thể được thiết lập phù hợp phụ thuộc vào vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự được sử dụng để nuôi cấy, và lượng này, ví dụ, từ 0 tới 20% theo khối lượng, tốt hơn là từ 2 tới 8% theo khối lượng.

Tốt hơn là, môi chất còn chứa chất nuôi cấy phụ trợ như chiết xuất trà ngọt Trung Quốc, chiết xuất trà Ô long, chiết xuất trà xanh, chiết xuất trà đen, chiết xuất trà nhài và axit oleic hoặc axit tương tự vì số tế bào sống của hỗn hợp nuôi cấy trước khi bảo quản trở thành cao. Một hoặc nhiều loại của các chất nuôi cấy phụ trợ có thể được sử dụng.

Liên quan tới chiết xuất trà ngọt Trung Quốc, chiết xuất trà Ô long, chiết xuất trà xanh, chiết xuất trà đen và chiết xuất trà nhài trong số các chất nuôi cấy phụ trợ, các sản phẩm có sẵn trên thị trường và các sản phẩm thu được bằng các phương pháp được mô tả trong các tài liệu JP-A-2001-178413, JP-A-2016-174589 và tài liệu tương tự có thể được sử dụng. Hàm lượng chiết xuất của môi chất không bị giới hạn cụ thể, và ví dụ, hàm lượng chiết xuất trà ngọt Trung Quốc hoặc chiết xuất trà Ô long từ 0,1 tới 2% theo khối lượng, tốt hơn là từ 0,22 tới 0,33% theo khối lượng.

Trong số các chất nuôi cấy phụ trợ, axit oleic hoặc axit tương tự không bị giới hạn cụ thể, và bổ sung vào axit oleic tự do và các muối vô cơ của axit oleic, este đường, glycerit, sorbitan este, propylen glycol este và chất tương tự thường được sử dụng làm chất nhũ hóa và trong đó axit béo moiety là axit oleic có thể được sử dụng. Thực phẩm chứa lượng lớn của axit oleic hoặc axit tương tự cũng có thể được sử dụng.

Các ví dụ cụ thể về axit oleic hoặc axit tương tự có các muối của axit oleic như natri oleat và kali oleat và oleat este như glyxeryl oleat, polyglyxeryl oleat và sucroza oleat. Một hoặc nhiều loại của axit oleic và tương tự có thể được sử dụng.

Lượng của axit oleic hoặc axit tương tự chứa trong môi chất không bị giới hạn cụ thể và, ví dụ, từ 5 tới 200 ppm, tốt hơn là từ 10 tới 100 ppm.

Môi chất có thể còn chứa thành phần có thể được bổ sung vào môi chất thông thường được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự, như các vitamin bao gồm vitamin A, vitamin B, vitamin C, vitamin E và vitamin tương tự, các peptit khác với các peptit sữa, axit amin và các muối của canxi, magie và kim loại tương tự.

Phương án ưu tiên của môi chất chứa peptit sữa được sử dụng theo phương pháp của sáng chế có thành phần như sau:

peptit sữa: từ 0,025 tới 0,25% theo khối lượng,

sữa bột đã khử chất béo: từ 10 tới 20% theo khối lượng, và

glucoza: từ 0 tới 8% theo khối lượng.

Vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự được nuôi cấy trong môi chất chứa peptit sữa theo phương pháp của sáng chế không bị giới hạn cụ thể và, ví dụ, có thể là các vi khuẩn bất kỳ được thấy trong tự nhiên, các vi khuẩn được gửi ở các cơ quan nhận gửi, các sản phẩm có sẵn trên thị trường và các đột biến của chúng.

Các ví dụ về các vi khuẩn axit lactic có vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus* như *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus jugurti*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* và *Lactobacillus johnsonii*; vi khuẩn thuộc giống *Streptococcus* như *Streptococcus thermophilus*; vi khuẩn thuộc giống *Lactococcus* như *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*, *Lactococcus plantarum* và *Lactococcus raffinolactis* và các vi khuẩn thuộc giống *Enterococcus* như *Enterococcus faecalis* và *Enterococcus faecium*. Một hoặc nhiều loại của các vi khuẩn axit lactic có thể được sử dụng.

Trong số các vi khuẩn axit lactic, một hoặc nhiều loại của vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus*, vi khuẩn thuộc giống *Streptococcus* và vi khuẩn thuộc giống *Lactococcus* được ưu tiên. Một hoặc nhiều loại của vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* và *Streptococcus thermophilus* được ưu tiên hơn, và một hoặc nhiều loại của vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus*

casei YIT9029 (FERM BP-1366, ngày ký gửi là ngày 12 tháng 1 năm 1981, nhiệt độ nuôi cấy tối ưu là 37°C), *Lactococcus lactis* YIT2027 (FERM BP-6224, ngày ký gửi là ngày 10 tháng 2 năm 1997, nhiệt độ nuôi cấy tối ưu là 30°C) và *Streptococcus thermophilus* YIT2021 (FERM BP-7537, ngày ký gửi là ngày 1 tháng 11 năm 1996, nhiệt độ nuôi cấy tối ưu là 37°C) được đặc biệt ưu tiên. Các vi khuẩn axit lactic cũng có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều loại của các vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* dưới đây.

Các ví dụ về vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* có vi khuẩn *Bifidus breve*, vi khuẩn *Bifidus bifidum*, vi khuẩn *Bifidus longum*, vi khuẩn *Bifidus infantis*, vi khuẩn *Bifidus adolescentis*, vi khuẩn *Bifidus catenulatum*, vi khuẩn *Bifidus pseudocatenulatum*, vi khuẩn *Bifidus angulatum*, vi khuẩn *Bifidus gallicum*, vi khuẩn *Bifidus lactis*, vi khuẩn *Bifidus animalis* và vi khuẩn tương tự. Trong số các vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus*, vi khuẩn *Bifidus breve* được ưu tiên. Một hoặc nhiều loại của các vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* có thể được sử dụng. Các vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* cũng có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều loại của các vi khuẩn axit lactic nêu trên.

Trong số các vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus*, vi khuẩn *Bifidus breve* được ưu tiên hơn, và vi khuẩn *Bifidus breve* YIT12272 (FERM BP-11320, ngày ký gửi là ngày 20 tháng 1 năm 2011, nhiệt độ nuôi cấy tối ưu là 37°C) được đặc biệt ưu tiên. Các vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* cũng có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều loại của các vi khuẩn axit lactic nêu trên.

Theo phương pháp của sáng chế, vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* được sử dụng, và *Lactobacillus casei* và/hoặc vi khuẩn *Bifidus breve* được ưu tiên.

Tất cả các vi khuẩn axit lactic và vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* được mô tả trên đây có ngày ký gửi tương ứng đều đã được gửi ở Cơ quan Lưu ký Tổ chức Sáng chế Quốc tế, Viện Công nghệ và Đánh giá Quốc gia (#120, 2-5-8 Kazusakamataru, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản).

Theo phương pháp của sáng chế, các điều kiện để nuôi cấy vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự trong môi chất chứa peptit sữa có thể phụ thuộc vào

loại vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự được sử dụng, ngoại trừ chi tiết là việc nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ thấp hơn từ 3°C trở lên so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu, và các điều kiện không bị giới hạn cụ thể.

Cụ thể là, khi vi khuẩn axit lactic được nuôi cấy trong môi chất chứa peptit sữa, các điều kiện bao gồm vi khuẩn axit lactic được cấy mầm theo cách sao cho số lượng vi khuẩn của môi chất trở thành xấp xỉ 5×10^6 cfu/ml và vi khuẩn được nuôi cấy ở nhiệt độ thấp hơn từ 3°C trở lên so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự cho đến khi độ pH trở thành xấp xỉ 3,6 hoặc cho đến khi độ axit trở thành xấp xỉ 24. Liên quan tới các điều kiện nuôi cấy ở đây, phương pháp phù hợp để nuôi cấy vi khuẩn axit lactic được sử dụng có thể được chọn thích hợp từ phương pháp tĩnh, khuấy, lắc, sục khí và phương pháp tương tự.

Khi vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* được nuôi cấy trong môi chất chứa peptit sữa, các điều kiện là vi khuẩn được cấy mầm theo cách sao cho số lượng vi khuẩn của môi chất trở thành xấp xỉ 5×10^6 cfu/ml và vi khuẩn được nuôi cấy ở nhiệt độ thấp hơn từ 3°C trở lên so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự cho đến khi độ pH trở thành xấp xỉ 4,9. Liên quan tới các điều kiện nuôi cấy ở đây, phương pháp phù hợp để nuôi cấy vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* được sử dụng có thể được chọn thích hợp từ phương pháp tĩnh, khuấy, lắc và phương pháp tương tự, và các điều kiện cũng có thể là các điều kiện kỵ khí.

Khi vi khuẩn axit lactic và vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* đều được nuôi cấy trong môi chất chứa peptit sữa, các điều kiện là các vi khuẩn được cấy mầm theo cách sao cho số lượng vi khuẩn của vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* của môi chất trở thành 5×10^6 cfu/ml và số lượng vi khuẩn của vi khuẩn axit lactic trở thành xấp xỉ 5×10^6 cfu/ml và các vi khuẩn được nuôi cấy ở nhiệt độ thấp hơn từ 3°C trở lên so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự cho đến khi độ pH trở thành xấp xỉ 4,4.

Nhờ phương pháp của sáng chế được giải thích trên đây, có thể thu được hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế. Thay đổi của độ axit của hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế được ngăn chặn cả trong quá trình bảo quản, và khả năng sống của vi

khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* chứa trong hỗn hợp nuôi cấy cũng ở mức cao.

Cụ thể là, hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế là hỗn hợp nuôi cấy trong đó thay đổi của độ axit của hỗn hợp nuôi cấy sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày là nhỏ hơn so với thay đổi của độ axit của hỗn hợp nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* ở nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày, tốt hơn là từ 1,40 tới 1,45, và tốt hơn là, ngoài điều kiện nêu trên, số tế bào sống của hỗn hợp nuôi cấy trước khi bảo quản là lớn hơn hoặc bằng $1,2 \times 10^9$ cfu/ml, tốt hơn là từ $1,2 \times 10^9$ cfu/ml tới $2,0 \times 10^9$ cfu/ml và lớn hơn hoặc bằng 110%, tốt hơn là từ 110 tới 130% số tế bào sống của hỗn hợp nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* ở nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày.

Hơn nữa, hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế là hỗn hợp nuôi cấy trong đó độ axit trước khi bảo quản nằm trong khoảng từ 4 tới 12 và trong đó thay đổi của độ axit sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày là nhỏ hơn 1,45, tốt hơn là từ 1,40 tới 1,45. Tốt hơn là, ngoài điều kiện nêu trên, hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế là hỗn hợp nuôi cấy trong đó số tế bào sống của hỗn hợp nuôi cấy trước khi bảo quản là lớn hơn hoặc bằng $1,2 \times 10^9$ cfu/ml, tốt hơn là $1,2 \times 10^9$ cfu/ml tới $1,5 \times 10^9$ cfu/ml và trong đó khả năng sống sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày là lớn hơn hoặc bằng 80%, tốt hơn là từ 80 tới 90%.

Hơn nữa, hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế là hỗn hợp nuôi cấy trong đó số tế bào sống của hỗn hợp nuôi cấy trước khi bảo quản là lớn hơn hoặc bằng $1,2 \times 10^9$ cfu/ml, tốt hơn là $1,2 \times 10^9$ cfu/ml tới $2,0 \times 10^9$ cfu/ml, và trong đó khả năng sống sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày là lớn hơn hoặc bằng 80%, tốt hơn là từ 80 tới 90%.

Theo sáng chế, số tế bào sống, thay đổi của độ axit và khả năng sống là các giá trị được đo bằng các phương pháp được mô tả theo các Ví dụ thực hiện.

Hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế được giải thích trên đây có thể được sử dụng làm thực phẩm và đồ uống lên men theo cách trực tiếp hoặc sau khi trộn thực phẩm như chất làm ngọt như sirô, đường, chất làm đặc, chất nhũ hóa, vitamin và gia vị bằng phương pháp đã biết thông thường phụ thuộc vào yêu cầu. Các ví dụ về thực phẩm và đồ uống lên men có không chỉ sữa lên men được quy định bởi Pháp lệnh về tiêu chuẩn thành phần, v.v., đối với sữa và các sản phẩm sữa mà cả các đồ uống như các đồ uống từ sữa có vi khuẩn axit lactic và các đồ uống có vi khuẩn axit lactic và các sản phẩm chứa vi khuẩn sống như đồ uống Kefir và sữa chua. Các ví dụ về hình thức sản phẩm bao gồm loại cứng, loại mềm, loại tự nhiên, loại thêm ngọt, loại hoa quả, loại đồ uống, loại đông lạnh và loại tương tự.

Các thực phẩm có thể được trộn trong hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế là các sacarit như sucroza, glucoza, fructoza, palatinoza, trehaloza, lactoza, xyloza và maltoza; các rượu ngọt như sorbitol, xylitol, erythritol, lactitol, Palatinit, sirô tinh bột khử và sirô maltoza khử; các chất làm ngọt cường độ cao như aspartam, thaumatin, sucraloza, acesulfam K và Stevia; các chất làm đặc (chất ổn định hóa) như agar, gelatin, carrageenan, gôm guar, gôm xanthan, pectin, gôm đậu locust, gôm gellan, carboxymethylcelluloza, polysacarit đậu tương và propylen glycol alginat; chất nhũ hóa như sucroza axit béo este, glycerol axit béo este, polyglyxerol axit béo este, sorbitan axit béo este và lecithin; chất béo sữa như kem, bơ và kem chua; chất làm chua như axit xitric, axit lactic, axit axetic, axit malic, axit tartaric và axit gluconic; các vitamin như vitamin A, vitamin B, vitamin C và vitamin E; các chất khoáng như canxi, magie, kẽm, sắt và mangan và các gia vị như gia vị sữa chua, gia vị quả mọng, gia vị cam, gia vị mộc qua Tàu, gia vị tía tô, gia vị cam quýt, gia vị táo, gia vị bạc hà, gia vị nho, gia vị mơ, quả lê, kem na, quả đào, quả dưa, quả chuối, gia vị nhiệt đới, gia vị thảo mộc, trà đen và gia vị cà phê.

Để làm hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế, thay đổi của độ axit của các đồ ăn và các đồ uống lên men trong quá trình bảo quản được ngăn chặn, và khả năng sống của các vi khuẩn axit lactic và/hoặc các vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* chứa trong các đồ ăn và các đồ uống lên men ở mức cao.

Các Ví dụ thực hiện

Sáng chế được giải thích chi tiết sau đây có dựa vào các Ví dụ thực hiện, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các Ví dụ thực hiện này.

Ví dụ thực hiện 1

Tạo ra các hỗn hợp nuôi cấy và các đồ uống có vi khuẩn axit lactic:

Bổ sung vào môi chất thu được bằng cách hòa tan 15% sữa bột đã khử chất béo (sau đây ký hiệu “%” theo thành phần môi chất nghĩa là “% theo trọng lượng”), 2,0% glucoza và 4,7% fructoza trong nước bằng cách sử dụng các thành phần được thể hiện trên Bảng 1, và các hỗn hợp được tiệt trùng ở nhiệt độ 100°C trong 62 phút. Đối với môi chất này, hỗn hợp môi *Lactobacillus casei* YIT9029 (FERM BP-1366: nhiệt độ nuôi cấy tối ưu là 37°C) được cấy mầm ở tỷ lệ 0,5% (số lượng vi khuẩn ban đầu: $5,0 \times 10^6$ cfu/ml). Hoạt động nuôi cấy được bắt đầu ở các nhiệt độ được thể hiện trên Bảng 1, và hoạt động nuôi cấy được thực hiện với tiêu chuẩn độ axit là 24,0. Với 70 phần theo khối lượng của các hỗn hợp nuôi cấy thu được, 30 phần theo khối lượng của dung dịch polysacarit đậu tương 3% được trộn vào, và các hỗn hợp được đồng nhất hóa ở áp suất 15 MPa. Bằng cách trộn 35 phần theo khối lượng của các hỗn hợp đã đồng nhất hóa và 65 phần theo khối lượng của sirô (chứa 14% sucroza), thu được các đồ uống có vi khuẩn axit lactic có số tế bào sống lớn hơn hoặc bằng $1,2 \times 10^9$ cfu/ml và độ axit từ 5,5 tới 6,8 (các sản phẩm 1 tới 3). Các đồ uống có vi khuẩn axit lactic được phân phối vào các bình chứa trong suốt về quang học (được làm bằng polystyren), từng đồ uống này có thể tích là 100 ml, và sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C, thay đổi của độ axit và số tế bào sống (và khả năng sống) được đo nhờ các phương pháp sau đây. Các kết quả cũng được thể hiện trên Bảng 1.

Bảng 1

		Sản phẩm 1	Sản phẩm 2	Sản phẩm 3
Thành phần	Peptit sữa ^{*1}	0	0,1%	0,1%
	Chiết xuất trà Ô long ^{*2}	0,1%	0,2%	0,2%
	Monoglyxeryl axit béo este ^{*3}	0,02%	0,02%	0,02%
Nhiệt độ nuôi cấy		35°C	35°C	30°C
Độ axit	0 ngày	5,84	5,80	5,93
	7 ngày	6,63	6,53	6,63
	14 ngày	7,09	7,10	7,03
	21 ngày	7,32	7,40	7,36
	28 ngày	7,52	7,79	7,56
	35 ngày	7,72	7,99	7,78
Δ độ axit	21 ngày	1,48	1,60	1,43
	28 ngày	1,68	1,99	1,63
	35 ngày	1,88	2,19	1,85
Số tế bào sống	0 ngày	1,70E+09	1,83E+09	1,85E+09
	7 ngày	1,55E+09	1,51E+09	1,65E+09
	21 ngày	1,29E+09	1,42E+09	1,59E+09
	28 ngày	1,32E+09	1,41E+09	1,44E+09
Khả năng sống	21 ngày	75,9%	77,6%	86,0%
	28 ngày	77,6%	77,0%	77,8%

*1: CE90-GMM (được sản xuất bởi Nippon Shinyaku Co., Ltd.: có nguồn gốc từ casein, phân tử lượng trung bình là 640)

*2: được sản xuất bởi Yakult Material Co., Ltd.

*3: DIMODAN MO90/D (được sản xuất bởi Danisco Nhật Bản Ltd.), axit béo chủ yếu là axit oleic

Phương pháp để đo độ axit

Độ chuẩn (đơn vị: ml) thu được bằng cách bổ sung 40 g nước trao đổi ion vào 9 g của hỗn hợp nuôi cấy và thực hiện thiết lập độ chuẩn trung hòa với natri hydroxit 0,1 N cho đến khi độ pH trở thành 8,5.

Phương pháp để đo số tế bào sống

Phép đo được thực hiện bằng cách sử dụng môi chất BCP (Eiken Chemical Co., Ltd.).

Phương pháp để tính toán khả năng sống

Khả năng sống (%) vào ngày X = (số tế bào sống vào ngày X/số tế bào sống vào ngày 0) x 100

Phương pháp để tính toán thay đổi của độ axit

Thay đổi của độ axit (%) vào ngày X = (độ axit vào ngày X/độ axit vào ngày 0) x 100

Đối với sản phẩm 3, chứa hỗn hợp nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy trong môi chất thu được bằng cách bổ sung peptit sữa và chiết xuất trà Ô long vào môi chất cơ bản ở nhiệt độ 30°C, nhiệt độ này thấp hơn 7°C so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của *Lactobacillus casei* YIT9029, số tế bào sống trước khi bảo quản (ngày 0) ở mức cao. Hơn nữa, thay đổi của độ axit sau khi bảo quản trong 21 ngày ở mức nhỏ, và khả năng sống cũng ở mức cao.

Mặt khác, đối với sản phẩm 2, chứa hỗn hợp nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy trong môi chất thu được bằng cách bổ sung peptit sữa và chiết xuất trà Ô long vào môi chất cơ bản ở nhiệt độ 35°C, nhiệt độ này thấp hơn 2°C so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của *Lactobacillus casei* YIT9029, mặc dù số tế bào sống trước khi bảo quản (ngày 0) ở mức cao như của sản phẩm 3, thay đổi của độ axit sau khi bảo quản trong 21 ngày là lớn hơn, và khả năng sống là thấp hơn so với khả năng sống của sản phẩm 3.

Hơn nữa, đối với sản phẩm 1, chứa hỗn hợp nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy trong môi chất cơ bản ở nhiệt độ 35°C, nhiệt độ này thấp hơn 2°C so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của *Lactobacillus casei* YIT9029 là 37°C, vì hỗn hợp nuôi cấy đã thu được bằng cách nuôi cấy trong môi chất cơ bản, không chứa peptit sữa hoặc chiết xuất trà Ô long, số tế bào sống trước khi bảo quản (ngày 0) là thấp hơn so với số tế bào sống của sản phẩm 2. Tuy nhiên, thay đổi của độ axit sau khi bảo quản trong 21 ngày là nhỏ hơn, và khả năng sống là tương đương.

Các kết quả của sản phẩm 1 và sản phẩm thể hiện rằng số tế bào sống trước khi bảo quản cũng tăng và thay đổi của độ axit trở thành lớn hơn, khi *Lactobacillus casei* YIT9029 được nuôi cấy trong môi chất thu được bằng cách bổ sung peptit sữa và chiết xuất trà Ô long vào môi chất cơ bản ở nhiệt độ 37°C, là nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của *Lactobacillus casei* YIT9029.

Các kết quả thu được thể hiện các hiệu quả bất ngờ như sau. Trong trường hợp thông thường trong đó peptit sữa và chiết xuất trà Ô long được bổ sung vào môi chất ở nhiệt độ xấp xỉ nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn axit lactic hoặc vi khuẩn tương tự, số tế bào sống trước khi bảo quản ở mức cao, nhưng thay đổi của độ axit cũng lớn tương ứng. Tuy nhiên, khi việc nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ

thấp hơn từ 3°C trở lên so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu, thường không được sử dụng, thay đổi của độ axit sau khi bảo quản là nhỏ, và khả năng sống ở mức cao, mặc dù số tế bào sống trước khi bảo quản ở mức cao.

Ví dụ thực hiện 2

Tạo ra các hỗn hợp nuôi cấy và các đồ uống có vi khuẩn axit lactic

Sản phẩm 4 và sản phẩm 5 đã thu được theo cách giống như khi tạo ra sản phẩm 3 theo Ví dụ thực hiện 1 ngoại trừ chi tiết là lượng của peptit sữa được bổ sung vào môi chất cơ bản là 0,025% hoặc 0,2%.

Số tế bào sống của các sản phẩm trước khi bảo quản là $1,7 \times 10^9$ cfu/ml (sản phẩm 4) và $1,7 \times 10^9$ cfu/ml (sản phẩm 5), và thay đổi của độ axit và khả năng sống sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày có thể so sánh được với các đặc điểm tương ứng của sản phẩm 3. Đã thấy rằng thay đổi của độ axit là nhỏ hơn khi hàm lượng peptit sữa từ 0,1 tới 0,2% thay cho 0,025%.

Ví dụ thực hiện 3

Tạo ra hỗn hợp nuôi cấy và đồ uống có vi khuẩn axit lactic

Sản phẩm 6 đã thu được theo cách giống như khi tạo ra sản phẩm 3 theo Ví dụ thực hiện 1 ngoại trừ chi tiết là lượng của chiết xuất trà Ô long, là chất nuôi cấy phụ trợ, được bổ sung vào môi chất cơ bản là 0,15%.

Số tế bào sống của sản phẩm trước khi bảo quản là $1,5 \times 10^9$ cfu/ml (sản phẩm 6), và thay đổi của độ axit và khả năng sống sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày có thể so sánh được với các đặc điểm tương ứng của sản phẩm 3.

Các kết quả cho thấy rằng việc thay đổi lượng của chiết xuất trà Ô long, là chất nuôi cấy phụ trợ, được bổ sung vào môi chất cơ bản không làm ảnh hưởng đến sản phẩm.

Ví dụ thực hiện 4

Tạo ra các hỗn hợp nuôi cấy và các đồ uống có vi khuẩn axit lactic

Sản phẩm 7 và sản phẩm 8 đã thu được theo cách giống như khi tạo ra sản phẩm 6 theo Ví dụ thực hiện 3 ngoại trừ chi tiết là loại peptit sữa được bổ sung vào môi chất cơ bản được thay đổi từ CE90-GMM thành MCH-30 (được sản xuất bởi

Morinaga Sữa Industry Co., Ltd.: có nguồn gốc từ casein, phân tử lượng trung bình là 230) hoặc LF80GF-US (được sản xuất bởi Nippon Shinyaku Co., Ltd.: có nguồn gốc từ váng sữa, phân tử lượng trung bình là 7800).

Số tế bào sống của các sản phẩm trước khi bảo quản là $1,5 \times 10^9$ cfu/ml (sản phẩm 7) và $1,6 \times 10^9$ cfu/ml (sản phẩm 8), và thay đổi của độ axit và khả năng sống sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày có thể so sánh được với các đặc điểm tương ứng của sản phẩm 3.

Các kết quả cho thấy rằng việc thay đổi loại peptit sữa được bổ sung vào môi chất cơ bản không làm ảnh hưởng đến sản phẩm.

Ví dụ thực hiện 5

Tạo ra các hỗn hợp nuôi cấy và các đồ uống có vi khuẩn axit lactic

Sản phẩm 9, sản phẩm 10, sản phẩm 11 và sản phẩm 12 đã thu được theo cách giống như khi tạo ra sản phẩm 6 theo Ví dụ thực hiện 3 ngoại trừ chi tiết là nhiệt độ nuôi cấy là 22°C , 24°C , 30°C hoặc 34°C .

Số tế bào sống của các sản phẩm trước khi bảo quản là $1,7 \times 10^9$ cfu/ml (sản phẩm 9), $1,7 \times 10^9$ cfu/ml (sản phẩm 10), $1,8 \times 10^9$ cfu/ml (sản phẩm 11) và $1,8 \times 10^9$ cfu/ml (sản phẩm 12), và thay đổi của độ axit và khả năng sống sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày có thể so sánh được với các đặc điểm tương ứng của sản phẩm 3.

Các kết quả thể hiện các đặc điểm sau. Khi nhiệt độ nuôi cấy thấp hơn từ 3°C trở lên so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của *Lactobacillus casei* YIT9029 là 37°C , số tế bào sống trước khi bảo quản ở mức cao. Hơn nữa, thay đổi của độ axit sau khi bảo quản trong 21 ngày là nhỏ, và khả năng sống ở mức cao. Trong khoảng nhiệt độ này, cụ thể là, có xu hướng là số tế bào sống cao hơn trước khi bảo quản khi nhiệt độ nuôi cấy là cao hơn, trong khi có xu hướng là thay đổi của độ axit nhỏ hơn khi nhiệt độ nuôi cấy là thấp hơn. Hơn nữa, khả năng sống trở thành mức cao ở nhiệt độ khoảng từ 30 tới 34°C . Bằng cách xem xét số tế bào sống trước khi bảo quản, thay đổi của độ axit sau khi bảo quản và khả năng sống, nhiệt độ nuôi cấy tốt hơn là thấp hơn từ 5°C trở lên, tốt hơn nữa là thấp hơn từ 5 tới 15°C so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của *Lactobacillus casei* YIT9029 là 37°C .

Ví dụ thực hiện 6

Tạo ra các hỗn hợp nuôi cấy

Môi chất cơ bản đã thu được bằng cách tiệt trùng bằng nhiệt dung dịch sữa bột đã khử chất béo 9,7% ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Hỗn hợp môi là vi khuẩn *Bifidus breve* YIT12272 (FERM BP-11320: nhiệt độ nuôi cấy tối ưu là 37°C) được cấy mầm ở môi chất cơ bản ở 1% (số lượng vi khuẩn ban đầu: $7,0 \times 10^6$ cfu/ml) và được nuôi cấy ở các nhiệt độ được thể hiện trên Bảng 2 cho đến khi độ pH trở thành từ 4,9 tới 5,0, và nhờ đó thu được các hỗn hợp nuôi cấy 1 và 2.

Hơn nữa, các hỗn hợp nuôi cấy 3 tới 6 đã thu được theo cách giống hệt ngoại trừ chi tiết là peptit sữa (CE90-GMM (được sản xuất bởi Nippon Shinyaku Co., Ltd.: có nguồn gốc từ casein, phân tử lượng trung bình là 640)) với các lượng được thể hiện trên Bảng 2 được bổ sung vào môi chất cơ bản.

Bảng 2

	Hỗn hợp nuôi cấy 1	Hỗn hợp nuôi cấy 2	Hỗn hợp nuôi cấy 3	Hỗn hợp nuôi cấy 4	Hỗn hợp nuôi cấy 5	Hỗn hợp nuôi cấy 6
Peptit sữa	Không được bổ sung		0,10%		0,30%	
Nhiệt độ	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
Chu kỳ nuôi cấy	65,0	23,5	39,5	19,0	25,0	17,5
Độ pH	4,92	4,95	4,99	4,97	4,98	4,94
Số tế bào sống (cfu/ml)	$2,1 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$

Các kết quả cho thấy rằng, không chỉ khi vi khuẩn axit lactic được sử dụng mà còn khi vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* được sử dụng, số tế bào sống của hỗn hợp nuôi cấy tăng bằng cách nuôi cấy vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus* trong môi chất chứa peptit sữa ở nhiệt độ 30°C, nhiệt độ này thấp hơn 7°C so với nhiệt độ tối ưu.

Ví dụ thực hiện 7

Tạo ra các hỗn hợp nuôi cấy

Các hỗn hợp nuôi cấy 7 tới 10 đã thu được theo cách giống như các hỗn hợp nuôi cấy 1, 2, 5 và 6 theo Ví dụ thực hiện 6 ngoại trừ chi tiết là môi chất cơ bản đã thu được bằng cách tiệt trùng dung dịch chứa 11,5% sữa bột đã khử chất béo, 0,1% chiết xuất nấm men (được sản xuất bởi BD), 0,03% L-cystein hydroclorua (được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và 0,2% canxi carbonat (được

sản xuất bởi Kanto Chemical Co., Inc.) trong bình chứa kín được nạp đầy thông tin ở nhiệt độ 115°C trong 15 phút.

Bảng 3

	Hỗn hợp nuôi cấy 7	Hỗn hợp nuôi cấy 8	Hỗn hợp nuôi cấy 9	Hỗn hợp nuôi cấy 10
Peptit sữa	Không được bổ sung		0,30%	
Nhiệt độ	30°C	37°C	30°C	37°C
Chu kỳ nuôi cấy	18,0	11,5	12,0	7,0
Độ pH	4,71	4,76	4,75	4,77
Số tế bào sống (cfu/ml)	$3,0 \times 10^9$	$3,2 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$

Ngoài ra, các kết quả cho thấy rằng khi thu được số lượng vi khuẩn đủ cao bằng cách nuôi cấy trong môi chất phù hợp hơn đối với vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Bifidus*, số tế bào sống của hỗn hợp nuôi cấy 9, được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, nhiệt độ này thấp hơn 7°C so với nhiệt độ tối ưu, là cao hơn so với nhiệt độ của hỗn hợp nuôi cấy 10 được nuôi cấy ở nhiệt độ tối ưu là 37°C.

Khả năng áp dụng

Phương pháp tạo ra hỗn hợp nuôi cấy theo sáng chế và hỗn hợp nuôi cấy được tạo ra bằng phương pháp này có thể được sử dụng để tạo ra thực phẩm và đồ uống lên men có số tế bào sống cao ở thời điểm sản xuất và có thể duy trì chất lượng của sản phẩm cả trong quá trình bảo quản.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo ra hỗn hợp nuôi cấy bằng cách nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus casei* và/hoặc vi khuẩn *Bifidus breve* trong môi chất chứa peptit sữa với lượng từ 0,025 tới 0,25% trọng lượng thu được bằng cách thủy phân casein hoặc váng sữa, khác biệt ở chỗ, nhiệt độ nuôi cấy thấp hơn từ 5 tới 15°C so với nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn *Lactobacillus casei* và/hoặc vi khuẩn *Bifidus breve*.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi chất còn chứa một hoặc nhiều loại của chất nuôi cấy phụ trợ được chọn từ nhóm bao gồm chiết xuất trà ngọt Trung Quốc, chiết xuất trà Ô long, chiết xuất trà xanh, chiết xuất trà đen, chiết xuất trà nhài, và axit oleic hoặc loại tương tự.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vi khuẩn *Lactobacillus casei* là vi khuẩn *Lactobacillus casei* YIT9029 (FERM BP-1366).
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 3, trong đó vi khuẩn *Bifidus breve* là vi khuẩn *Bifidus breve* YIT12272 (FERM BP-11320).
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 4, trong đó thay đổi của độ axit của hỗn hợp nuôi cấy sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày là nhỏ hơn so với thay đổi của độ axit của hỗn hợp nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus casei* và/hoặc vi khuẩn *Bifidus breve* ở nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn *Lactobacillus casei* và/hoặc vi khuẩn *Bifidus breve* sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 5, trong đó số tế bào sống của hỗn hợp nuôi cấy trước khi bảo quản là lớn hơn hoặc bằng $1,2 \times 10^9$ cfu/ml và lớn hơn hoặc bằng 110% số tế bào sống của hỗn hợp nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus casei* và/hoặc vi khuẩn *Bifidus breve* ở nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của vi khuẩn *Lactobacillus casei* và/hoặc vi khuẩn *Bifidus breve* sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày.
7. Hỗn hợp nuôi cấy được tạo ra bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 4, khác biệt ở chỗ, độ axit của hỗn hợp nuôi cấy trước khi bảo quản nằm trong khoảng từ 4 tới 12 và thay đổi của độ axit sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày là nhỏ hơn 1,45.

8. Hỗn hợp nuôi cấy theo điểm 7, trong đó số tế bào sống của hỗn hợp nuôi cấy trước khi bảo quản là lớn hơn hoặc bằng $1,2 \times 10^9$ cfu/ml, và khả năng sống sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày là lớn hơn hoặc bằng 80%.
9. Hỗn hợp nuôi cấy được tạo ra bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 4, khác biệt ở chỗ, số tế bào sống của hỗn hợp nuôi cấy trước khi bảo quản là lớn hơn hoặc bằng $1,2 \times 10^9$ cfu/ml và khả năng sống sau khi bảo quản ở nhiệt độ 10°C trong 21 ngày là lớn hơn hoặc bằng 80%.
10. Thực phẩm và đồ uống lên men, khác biệt ở chỗ, thực phẩm và đồ uống lên men này chứa hỗn hợp nuôi cấy được tạo ra bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 6.
11. Thực phẩm và đồ uống lên men, khác biệt ở chỗ, thực phẩm và đồ uống lên men này chứa hỗn hợp nuôi cấy theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 tới 9.