



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0049658
(51)¹⁹ A23C 9/12; C12R 1/46; C12R 1/225; (13) B
A23C 9/123; C12N 9/38
-

- (21) 1-2019-04319 (22) 12/01/2018
(86) PCT/EP2018/050708 12/01/2018 (87) WO2018/130630 19/07/2018
(30) 17151378.1 13/01/2017 EP
(45) 25/08/2025 449 (43) 30/01/2020 382A
(73) Kerry Group Services International Ltd (IE)
Prince's Street, Tralee, Co. Kerry, V92 EH11, IRELAND
(72) BA, Zhaoyong (DK); BUCHHORN, Gaelle Lettier (DK); BULDO, Patrizia (DK);
HOEGHOLM, Tina (DK); RUNGE, Mette Oehrstroem (DK); SCHOELER, Jeppe
(DK); VOJINOVIC, Vojislav (DK).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)
-

- (54) SẢN PHẨM SỮA LÊN MEN VÀ QUY TRÌNH TẠO RA SẢN PHẨM SỮA LÊN
MEN NÀY

(21) 1-2019-04319

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình tạo ra sản phẩm sữa lên men, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- 1) thêm men cái chứa ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic vào nền sữa,
- 2) lên men sữa trong khoảng thời gian cho đến khi đạt được độ pH đích,
- 3) bằng cách sử dụng men cái chứa ít nhất một chủng thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và
- 4) thêm lactaza có độ pH ổn định thấp vào quy trình tại thời điểm bắt đầu, trong hoặc cuối của bước lên men, trong đó lactaza có độ pH ổn định thấp vẫn giữ được hoạt tính của nó ở độ pH = 5,0 và nhiệt độ là 37°C ở lượng ít nhất là 5% so với hoạt tính của nó tại độ pH tối ưu của lactaza.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình tạo ra sản phẩm sữa lên men, và sản phẩm sữa lên men này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Công bố đơn quốc tế số WO 2009/071539 mô tả lactaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium bifidum*, có khả năng thủy phân sữa rất hiệu quả, và nó có hoạt tính với khoảng pH rộng, bao gồm cả độ pH thấp, ví dụ, độ pH thấp dưới 5. Lactaza được sử dụng trong các quy trình sản xuất sữa và các sản phẩm sữa lên men, như phô mai, sữa chua, bơ, sữa bơ, kem chua, v.v. để làm giảm hàm lượng lactoza.

Công bố đơn quốc tế số WO 2013/160413 mô tả phương pháp tạo ra sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng hỗn hợp chủng vi khuẩn axit lactic âm tính với glucoza và lactaza thông thường với mục đích làm giảm hàm lượng lactoza trong sản phẩm sữa lên men trong khi vẫn làm tăng hàm lượng glucoza.

Đơn yêu cầu cấp patent châu Âu EP-A1-2 957 180 trong 1 phương án của mình mô tả phương pháp tạo ra sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng hỗn hợp men cái và lactaza thông thường với mục đích làm giảm hàm lượng lactoza và lượng sau axit hóa trong sản phẩm sữa lên men. Đơn yêu cầu cấp patent châu Âu EP-A1-2 957 180 trong phương án thứ 2 của mình mô tả phương pháp tạo ra sản phẩm sữa lên men bằng cách sử dụng vi khuẩn axit lactic thiếu hụt lactoza.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình cải tiến để tạo ra sản phẩm sữa lên men.

Mục đích của sáng chế là thu được quy trình tạo ra sản phẩm sữa lên men, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- 1) thêm men cái chứa ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic vào nền sữa,
- 2) lên men sữa trong khoảng thời gian cho đến khi đạt được độ pH đích,
- 3) trong đó men cái chứa ít nhất một chủng thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và
- 4) thêm lactaza có độ pH ổn định thấp vào quy trình tại thời điểm bắt đầu, trong hoặc cuối của bước lên men, trong đó lactaza có độ pH ổn định thấp vẫn giữ được hoạt tính của nó ở độ pH là 5,0 và nhiệt độ là 37°C ở lượng ít nhất là 5% so với hoạt tính của nó tại độ pH tối ưu của lactaza.

Vi khuẩn axit lactic thiếu hụt lactoza thường sinh trưởng trên nguồn hydrat cacbon không phải lactoza, như sucroza, galactoza và glucoza, được thêm vào sữa với lượng được xác định sao cho chấm dứt quá trình lên men và sự tăng trưởng của vi khuẩn axit lactic bằng cách tháo rút nguồn hydrat cacbon được thêm vào. Nhờ đó, lượng hậu axit hóa trong việc bảo quản tiếp theo được giảm đáng kể hoặc thậm chí được ngăn ngừa hoàn toàn. Lactaza có độ pH ổn định thấp sẽ trở nên hoạt động trong toàn bộ quá trình lên men và do đó cho phép chuyển hóa hầu hết hoặc tất cả các lactoza có mặt trong sữa thành glucoza và galactoza. Nhờ đó, có thể tạo ra sản phẩm sữa lên men bằng lactoza có hàm lượng giảm hoặc sản phẩm không có lactoza. Ngoài ra, có thể tạo ra sản phẩm sữa lên men bằng chất tạo ngọt tự nhiên với lượng tăng, như glucoza và galactoza có độ ngọt cao hơn so với lactoza.

Sáng chế dựa trên cơ sở nhận thức là bằng cách sử dụng hỗn hợp lactaza có độ pH ổn định thấp và vi khuẩn axit lactic thiếu hụt lactoza, có thể thu được sản phẩm sữa lên men, tại cùng thời điểm mà có hàm lượng lactoza giảm, độ ngọt tăng và hậu axit hóa giảm. Hơn nữa, đáng ngạc nhiên là đã phát hiện ra rằng, sự kết hợp nêu trên dẫn đến sản phẩm sữa lên men có cấu trúc gia tăng so với việc sử dụng vi khuẩn axit lactic thiếu hụt lactoza và không có lactaza và so với việc sử dụng lactaza có độ pH ổn định thấp và vi khuẩn axit lactic dương tính với lactoza.

Hơn nữa, khi lactaza được thêm vào trước bước lên men, quy trình theo sáng chế sẽ tạo ra khả năng làm giảm hoặc thậm chí loại bỏ lượng hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào sữa. Do đó, glucoza và galactoza được hình thành nhờ tác động enzym của lactaza sẽ trở nên hữu hiệu đối với sự tăng trưởng của vi khuẩn axit lactic thiếu hụt lactoza.

Cuối cùng, khi lactaza được thêm vào sau bước lên men, có thể có được lợi ích trọn vẹn về khả năng của vi khuẩn axit lactic thiếu hụt lactoza để tránh tình trạng hậu axit.

Trên thế giới, một số lượng đáng kể khách hàng là không dung nạp hoặc nhạy cảm với lactoza. Do đó, vẫn có một nhu cầu lớn với các sản phẩm sữa, bao gồm cả sản phẩm sữa lên men, bằng lactoza có hàm lượng giảm hoặc hầu như không có lactoza. Sáng chế cũng đề xuất một cách tiếp cận mới để tạo ra sản phẩm sao cho đơn giản và hiệu quả về giá thành.

Mô tả chi tiết sáng chế

Lactaza

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

Theo sáng chế, hoạt tính trong LAU của lactaza được xác định như được thể hiện trong phần “Định nghĩa” dưới đây.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, lactaza vẫn giữ được hoạt tính của nó ở độ pH là 5,0 và nhiệt độ là 37°C ở lượng ít nhất là 10%, tốt hơn là ít nhất 20%, tốt hơn nữa là ít nhất 30%, tốt hơn nữa là ít nhất 40%, tốt hơn nữa là ít nhất 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60%, tốt hơn nữa là ít nhất 70%, và tốt nhất là ít nhất 80%, so với hoạt tính của nó tại độ pH tối ưu của lactaza.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, lactaza vẫn giữ được hoạt tính của nó ở độ pH là 4,0 và nhiệt độ là 37°C ở lượng ít nhất là 5%, tốt hơn là ít nhất 10%, tốt hơn nữa là ít nhất 20%, tốt hơn nữa là ít nhất 30%, tốt hơn nữa là ít nhất 40%, tốt hơn nữa là ít nhất 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60%, tốt hơn nữa là ít nhất 70%, và tốt nhất là ít nhất 80%, so với hoạt tính của nó tại độ pH tối ưu của lactaza.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, lactaza vẫn giữ được hoạt tính của nó ở độ pH là 3,0 và nhiệt độ là 37°C ở lượng ít nhất là 5%, tốt hơn là ít nhất 10%, tốt hơn nữa là ít nhất 20%, tốt hơn nữa là ít nhất 30%, tốt hơn nữa là ít nhất 40%, tốt hơn nữa là ít nhất 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60%, tốt hơn nữa là ít nhất 70%, và tốt nhất là ít nhất 80%, so với hoạt tính của nó tại độ pH tối ưu của lactaza.

Theo sáng chế, độ pH tối ưu của lactaza được xác định bằng cách đo hoạt tính của lactaza ở độ pH bằng cách sử dụng phương pháp được thể hiện trong phần “Định nghĩa” dưới đây và xác định độ pH có hoạt tính tối ưu.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, lactaza vẫn giữ được hoạt tính của nó ở nhiệt độ là 10°C và độ pH là 6,0 ở lượng ít nhất là 10% so với hoạt tính của nó ở nhiệt độ tối ưu của lactaza. Tốt hơn là, lactaza vẫn giữ được hoạt tính của nó ở nhiệt độ là 10°C và độ pH là 6,0 ở lượng ít nhất là 20%, tốt hơn nữa là ít nhất 30%, tốt hơn nữa là ít nhất 40%, tốt hơn nữa là ít nhất 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60%, tốt hơn nữa là ít nhất 70%, và tốt nhất là ít nhất 80%, so với hoạt tính của nó ở nhiệt độ tối ưu của

lactaza.

Theo sáng chế, nhiệt độ tối ưu của lactaza được xác định bằng cách đo hoạt tính của lactaza ở các nhiệt độ khác nhau bằng cách sử dụng phương pháp được thể hiện trong phần “Định nghĩa” dưới đây và xác định nhiệt độ có hoạt tính tối ưu.

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

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

Theo phương án được ưu tiên khác, lactaza được sử dụng trong sản phẩm của sáng chế có sự tối ưu về độ pH của hoạt tính của lactaza ở 37°C mà là lớn hơn độ pH = 5,5.

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

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, Km của lactaza ở 5°C là thấp hơn 25mM, như thấp hơn 20mM, thấp hơn 15mM hoặc thấp hơn 10mM. Theo phương án được ưu tiên khác, Km của lactaza ở 37°C là thấp hơn 25mM, như thấp hơn 20mM hoặc thấp hơn 15mM. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách để xác định Km đối với hoạt tính của lactaza ở nhiệt độ cụ thể. Km có thể được xác định bằng phương pháp được mô tả trong công bố đơn quốc tế số

WO2009/071539.

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

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

Lactaza trong bản mô tả của sáng chế là glycosit hydrolaza có khả năng thủy phân disaccarit lactoza thành các galactoza và glucoza cấu thành. Nhóm các lactaza, mà lactaza theo sáng chế thuộc về nó, chứa nhưng không chỉ giới hạn ở các enzym được phân vào các phân nhóm phụ EC 3.2.1.108. Các enzym được phân vào các phân nhóm phụ khác, như, ví dụ, EC 3.2.1.23, cũng có thể là lactaza trong bản mô tả của sáng chế. Lactaza trong bản mô tả của sáng chế có thể có các hoạt tính khác không phải hoạt tính thủy phân lactoza, như ví dụ hoạt tính transgalactosyl hóa. Trong bản mô tả của sáng chế, hoạt tính thủy phân lactoza của lactaza có thể được nhắc đến là hoạt tính lactaza của nó hoặc hoạt tính beta-galactosidaza của nó.

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

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

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

Theo một phương án ưu tiên, enzym có hoạt tính lactaza được sử dụng trong sản phẩm của sáng chế chứa trình tự axit amin mà ít nhất giống 50% với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin 28-1931 của SEQ ID NO: 1, các axit amin 28-1331 của SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và các đoạn hoạt tính lactaza của nó. Theo một phương án được ưu tiên hơn, enzym chứa trình tự axit amin mà là ít

nhất 60%, như ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95% hoặc ít nhất 98% giống với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin 28-1931 của SEQ ID NO: 1, các axit amin 28-1331 của SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và các đoạn hoạt tính lactaza của nó.

Enzym được ưu tiên là lactaza có trình tự mà là ít nhất 50%, như ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95% hoặc ít nhất 98% giống với các axit amin 28-1931 của SEQ ID NO: 1 hoặc với đoạn hoạt tính lactaza của nó. Đoạn hoạt tính lactaza của SEQ ID NO: 1 này có thể là đoạn bất kỳ của SEQ ID NO: 1 có hoạt tính của lactaza. Đoạn hoạt tính lactaza của SEQ ID NO: 1 có thể là, ví dụ, các axit amin 28-979, các axit amin 28-1170, các axit amin 28-1323, các axit amin 28-1331, hoặc các axit amin 28-1600 của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án ưu tiên, enzym có hoạt tính của lactaza được sử dụng trong sản phẩm của sáng chế chứa trình tự axit amin mà ít nhất giống 50% với các axit amin 28-1331 của SEQ ID NO: 2, Theo một phương án được ưu tiên hơn, enzym chứa trình tự axit amin mà là ít nhất 60%, như ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95% hoặc ít nhất 98% giống với các axit amin 28-1331 của SEQ ID NO: 2.

Theo phương án khác, enzym có hoạt tính của lactaza được sử dụng trong sản phẩm của sáng chế có trình tự axit amin mà ít nhất giống 50% với SEQ ID NO: 3, Tốt hơn là, enzym có trình tự axit amin mà là ít nhất 60%, như ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95% hoặc ít nhất 98% giống với SEQ ID NO: 3,

Theo phương án khác, enzym có hoạt tính của lactaza được sử dụng trong sản phẩm của sáng chế có trình tự axit amin mà ít nhất giống 50% với SEQ ID NO: 4, Tốt hơn là, enzym có trình tự axit amin mà là ít nhất 60%, như ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95% hoặc ít nhất 98% giống với SEQ ID NO: 4.

Đối với mục đích của sáng chế, lượng đồng nhất giữa 2 trình tự axit amin được xác định bằng cách sử dụng algorit Needleman-Wunsch (Needleman and

Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) như được thực hiện trong chương trình Needle của gói EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al. (2000) *Trends in Genetics* 16: 276-277), tốt hơn là version 3,0,0 hoặc cao hơn. Các tham số tùy chọn được sử dụng là độ phạt mở là 10, khoảng phạt mở rộng là 0,5, và cơ chất thay thế EBLOSUM62 (EMBOSS version của BLOSUM62). Công suất của Needle được ghi nhận “độ đồng nhất dài nhất” (thu được bằng cách sử dụng tùy chọn không ngắn gọn) được sử dụng làm phần trăm đồng nhất và được tính như sau:

$$\frac{(\text{Gốc đồng nhất} \times 100)}{(\text{Chiều dài sắp hàng} - \text{Tổng số khoảng trống trong sắp hàng})}$$

Lactaza cụ thể có trên thị trường thích hợp để sử dụng trong sáng chế là Lactaza F “Amano” 100SD của Amano Enzyme Europe.

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

Lactaza được sử dụng trong phương pháp của sáng chế có thể thu được từ nguồn bất kỳ được nêu ở đây. Thuật ngữ “có nguồn gốc” trong bản mô tả này có nghĩa là enzym có thể được phân lập từ sinh vật mà có mặt một cách tự nhiên, tức là nhận dạng trình tự axit amin của enzym giống hệt với enzym bẩm sinh. Thuật ngữ có nguồn gốc và cũng có nghĩa là các enzym có thể được tạo ra tái tổ hợp trong cơ thể vật chủ, enzym được tạo ra tái tổ hợp có độ đồng nhất giống hệt enzym bẩm sinh hoặc có trình tự axit amin bị biến đổi, ví dụ, có một hoặc nhiều axit amin bị xóa, chèn và/hoặc thay thế, tức là enzym được tạo ra tái tổ hợp là một thể đột biến và/hoặc một đoạn của chuỗi axit amin tự nhiên. Trong ý nghĩa của một enzym bẩm sinh cũng được bao gồm các biến thể tự nhiên. Hơn nữa, thuật ngữ “có nguồn gốc” bao gồm các enzym được tổng hợp bởi, ví dụ, tổng hợp peptit. Thuật ngữ “có nguồn gốc” cũng bao gồm các enzym đã được biến đổi, ví dụ bằng cách glycosyl hóa, phosphoryl hóa, v.v, cho dù *in*

vivo hoặc *in vitro*. Đối với enzym được tạo ra tái tổ hợp, thuật ngữ “có nguồn gốc từ” là để chỉ độ đồng nhất của enzym và không phải là độ đồng nhất của sinh vật chủ trong đó nó được tạo ra tái tổ hợp.

Lactaza có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật bằng cách sử dụng kỹ thuật thích hợp bất kỳ. Ví dụ, chế phẩm lactaza enzym có thể thu được bằng cách lên men vi sinh vật thích hợp và tiếp theo phân tách chế phẩm lactaza ra khỏi canh trường lên men hoặc vi sinh vật tạo thành hoặc bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Lactaza cũng có thể là thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Phương pháp này thường bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được biến đổi bằng vector ADN tái tổ hợp chứa trình tự AND mã hóa lactaza đang được quan tâm và trình tự ADN được liên kết tùy ý với tín hiệu biểu hiện thích hợp sao cho nó có khả năng biểu hiện lactaza trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện cho phép biểu thị enzym và phục hồi enzym từ môi trường nuôi cấy. Trình tự ADN cũng có thể được đưa vào hệ gen của tế bào chủ. Trình tự AND có thể là có nguồn gốc hệ gen, ADN bổ trợ (cADN) hoặc nguồn gốc tổng hợp hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng, và có thể được phân tách hoặc được tổng hợp theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Lactaza được sử dụng trong phương pháp của sáng chế có thể được tinh chế. Thuật ngữ “được tinh chế” được sử dụng trong bản mô tả này bao hàm lactaza enzym protein về cơ bản không có các thành phần không hòa tan từ vi sinh vật sản sinh. Thuật ngữ “được tinh chế” còn bao hàm lactaza enzym protein về cơ bản không có các thành phần không hòa tan từ vi sinh vật tự nhiên mà thu được từ đó. Tốt hơn là, nó còn được tách ra khỏi một số các thành phần hòa tan của vi sinh vật và môi trường nuôi cấy mà nó thu được từ đó. Tốt hơn nữa là, nó được tách ra bằng một hoặc nhiều quy trình đơn vị: lọc, kết tủa hoặc sắc ký.

Do đó, enzym có hoạt tính của lactaza có thể được tinh chế, chỉ bằng một lượng nhỏ protein khác mà có mặt trong đó. Sự biểu hiện của “các protein khác” có liên quan đặc biệt với các enzym khác. Thuật ngữ “tinh chế” như được sử dụng ở đây

cũng đề cập đến việc loại bỏ các thành phần khác, đặc biệt là các protein khác và đặc biệt nhất là các enzym khác có trong tế bào có nguồn gốc của enzym. Lactaza có thể là “tinh khiết đáng kể”, tức là không có các thành phần khác từ sinh vật mà nó được tạo ra, ví dụ, một sinh vật chủ để tạo ra theo cách tái tổ hợp lactaza. Tốt hơn là, lactaza là một chế phẩm protein enzym tinh khiết ít nhất 40% (khối lượng), tốt hơn nữa là ít nhất 50%, 60%, 70%, 80% hoặc thậm chí ít nhất 90%.

Thuật ngữ enzym có hoạt tính của lactaza bao gồm bất kể hợp chất phụ trợ mà có thể là cần thiết đối với hoạt tính xúc tác của enzym, như, ví dụ, acceptor hoặc đồng nhân tố thích hợp, mà có thể không không có mặt trong tự nhiên trong hệ phản ứng.

Enzym có thể ở dạng bất kỳ thích hợp cho việc sử dụng đang được bàn đến, ở dạng bột khô hoặc viên cốm, viên cốm không bụi, dạng lỏng, dạng lỏng được làm ổn định hoặc enzym được bảo vệ.

Vi khuẩn axit lactic thiếu hụt lactoza

Thuật ngữ “thiếu hụt cơ chế chuyển hóa lactoza” và “thiếu hụt lactoza” được sử dụng trong bản mô tả của sáng chế mô tả LAB mà một phần hoặc hoàn toàn mất đi khả năng sử dụng lactoza làm nguồn đôi với sự tăng trưởng của tế bào hoặc duy trì khả năng sống của tế bào. LAB tương ứng có khả năng chuyển hóa một hoặc nhiều hydrat cacbon được chọn từ sucroza, galactoza và/hoặc glucoza hoặc hydrat cacbon lên men khác. Do các nguồn hydrat cacbon này là không có mặt một cách tự nhiên trong sữa với lượng đủ để hỗ trợ quá trình lên men bằng thể đột biến thiếu hụt lactoza, vẫn cần phải thêm các hydrat cacbon vào sữa. Thiếu hụt lactoza và LAB thiếu hụt một phần có thể được đặc trưng bởi tập đoàn trắng trong môi trường chứa lactoza và X-Gal.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, chủng thiếu hụt lactoza có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza được chọn từ nhóm bao gồm sucroza, galactoza và glucoza, tốt hơn là sucroza. Theo phương án cụ thể của sáng chế, chủng thiếu hụt lactoza có khả năng chuyển hóa galactoza.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, chủng thiếu hụt lactoza được chọn từ nhóm bao gồm *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, chủng thiếu hụt lactoza được chọn từ nhóm bao gồm:

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

(i) chủng được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu lưu giữ No. DSM 28952;

(ii) hoặc chủng thu được từ DSM 28952, trong đó chủng thu được này còn được mô tả là có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trong môi trường chứa lactoza và X-Gal;

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

(i) chủng được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu lưu giữ No. DSM 28953;

(ii) hoặc chủng thu được từ DSM 28953, trong đó chủng thu được này còn được mô tả là có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trong môi trường chứa lactoza và X-Gal;

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

(i) chủng được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu lưu giữ No. DSM 28910;

(ii) hoặc chủng thu được từ DSM 28910, trong đó chủng thu được này còn được mô tả là có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trong môi trường chứa lactoza và X-Gal.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, men cái chứa ít nhất một *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza lẫn ít nhất một *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, men cái chứa ít nhất một *Streptococcus thermophilus* lẫn ít nhất một *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, và trong đó tất cả các chủng *Streptococcus thermophilus* và tất cả các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* đều thiếu hụt lactoza.

Các bước của quy trình theo sáng chế

Theo phương án cụ thể của sáng chế, bước lên men được kết thúc bằng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm 1) axit hóa sữa lên men biểu hiện ít nhất một chủng của men cái không thể tăng trưởng, 2) xử lý làm lạnh và 3) làm rút kiệt hydrat cacbon không phải lactoza.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa ở giai đoạn bắt đầu của bước lên men.

Tốt hơn là, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa với

lượng được xác định sao cho được rút kiệt và do đó dẫn đến làm ngừng sự tăng trưởng của vi khuẩn axit lactic và làm chấm dứt sự lên men. Tốt hơn là, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa với lượng được xác định sao cho được rút kiệt và do đó dẫn đến làm ngừng sự tăng trưởng của vi khuẩn axit lactic và làm chấm dứt sự lên men ở giá trị độ pH đích đã chọn.

Lượng hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa tùy thuộc vào các thông số, bao gồm chủng vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong men cái, thành phần của nền sữa, nhiệt độ lên men và độ pH đích mong muốn. Ngoài ra, lượng hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa có thể tùy thuộc vào loại và lượng lactaza được sử dụng trong quy trình. Lượng hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa có thể được xác định bằng thử nghiệm, và đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để thực hiện các thử nghiệm này.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào được chọn từ nhóm bao gồm sucroza, galactoza và glucoza, tốt hơn là sucroza.

Theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, lactaza có hđộ pH ổn định thấp được thêm vào nền sữa ở giai đoạn bắt đầu của bước lên men. Theo khía cạnh này, lactaza được thêm vào sẽ chuyển hóa lactoza của nền sữa thành glucoza và galactoza, là sẵn có cho việc chuyển hóa đối với men cái ngoài hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào. Trong trường hợp này, sẽ không thể chấm dứt sự lên men bằng cách tháo rút hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào. Do đó, theo phương án cụ thể của khía cạnh thứ nhất của sáng chế, bước lên men được thực hiện bằng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm 1) axit hóa sữa lên men biểu hiện ít nhất một chủng của men cái không thể tăng trưởng, và 2) xử lý làm lạnh.

Theo phương án cụ thể của khía cạnh thứ nhất của sáng chế, không có hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào bước lên men và ít nhất một chủng axit lactic thiếu hụt lactoza của men cái có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon được chọn

từ nhóm bao gồm glucoza và galactoza. Theo phương án này, chủng axit lactic thiếu hụt lactoza của men cái chỉ phát triển trên glucoza và/hoặc galactoza được hình thành nhờ tác động enzym của lactaza có độ pH thấp. Theo phương án này của sáng chế, sự lên men được chấm dứt ở giá trị độ pH đích bằng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm 1) axit hóa sữa lên men biểu hiện ít nhất một chủng của men cái không thể tăng trưởng, 2) xử lý làm lạnh và 3) làm rút kiệt glucoza và/hoặc galactoza được hình thành nhờ lactaza có độ pH ổn định thấp.

Theo khía cạnh thứ hai của sáng chế, lactaza có độ pH ổn định thấp được thêm vào sữa lên men tại giai đoạn cuối của sự lên men. Trong trường hợp này, sản phẩm sữa lên men chứa lactaza tốt hơn là được bảo quản ở nhiệt độ là ít nhất 2°C trong ít nhất 1 ngày. Theo phương án cụ thể của quy trình theo sáng chế, sản phẩm sữa lên men chứa lactaza được bảo quản trong ít nhất 2 ngày, tốt hơn là ít nhất 3 ngày, tốt hơn nữa là ít nhất 4 ngày, tốt hơn nữa là ít nhất 5 ngày, tốt hơn nữa là ít nhất 6 ngày, và tốt nhất là ít nhất 7 ngày.

Theo phương án cụ thể của khía cạnh thứ hai của sáng chế, bước lên men được kết thúc bằng cách tháo rút hydrat cacbon không phải lactoza.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, độ pH đích là nằm trong khoảng từ 3,2 đến 4,8, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3,6 đến 4,6, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3,8 đến 4,5 và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 4,0 đến 4,4.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, nhiệt độ lên men nằm trong khoảng từ 35°C đến 45°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 37°C đến 43°C, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 40°C đến 43°C.

Theo phương án cụ thể khác của sáng chế, nhiệt độ lên men nằm trong khoảng từ 15°C đến 35°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25°C đến 35°C, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30°C đến 33°C.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, sản phẩm sữa lên men được bao gói ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15 và 45°C.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, giá trị độ pH của sản phẩm sữa lên men được duy trì ở khoảng đơn vị độ pH 0,3, tốt hơn là trong khoảng đơn vị độ pH 0,2 và tốt nhất là trong khoảng đơn vị độ pH 0,1, khi được bảo quản sau khi chấm dứt sự lên men ở nhiệt độ được sử dụng để lên men trong khoảng thời gian 20 giờ.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, lượng hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào là nằm trong khoảng từ 1mg/g đến 30mg/g, tốt hơn là từ 2mg/g đến 0mg/g, và tốt hơn nữa là từ 3mg/g đến 10mg/g nền sữa.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, lượng hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào là nằm trong khoảng từ 0,1% đến 10%, tốt hơn là từ 0,2% đến 8%, tốt hơn là từ 0,3% đến 2%, tốt hơn là từ 0,4% đến 1,5%, và tốt hơn nữa là từ 0,5% đến 1,2%, trong đó % là (khối lượng) dựa trên cơ sở nền sữa.

Men cái có thể có thành phần chủng của men cái thông thường bất kỳ của vi khuẩn axit lactic, bao gồm chủng nuôi cấy đơn và chủng nuôi cấy hỗn hợp, được sử dụng để tạo ra loại đặc hiệu của sản phẩm sữa lên men. Các vi khuẩn hữu hiệu khác, mà có thể được thêm vào sản phẩm ngoài men cái, bao gồm vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium spp.*

Theo phương án cụ thể của sáng chế, sản phẩm sữa lên men sau khi lên men được đưa vào xử lý nhiệt sao cho làm giảm mức vi khuẩn của men cái để không lớn hơn 1×10^2 CFU trên mỗi g sản phẩm sữa lên men. Trong trường hợp này, phương án cụ thể được đặc trưng ở chỗ lactaza được vào thêm sau khi xử lý nhiệt. Trong trường hợp này, sản phẩm sữa lên men chứa lactaza được bảo quản ở nhiệt độ là ít nhất 2°C trong ít nhất 1 ngày. Theo phương án cụ thể của quy trình theo sáng chế, sản phẩm sữa lên men chứa lactaza được bảo quản trong ít nhất 2 ngày, tốt hơn là ít nhất 3 ngày, tốt hơn nữa là ít nhất 4 ngày, tốt hơn nữa là ít nhất 5 ngày, tốt hơn nữa là

ít nhất 6 ngày, và tốt nhất là ít nhất 7 ngày.

Việc xử lý nhiệt sao cho làm giảm mức vi khuẩn của men cái không lớn hơn $1,0 \times 10^2$ CFU trên mỗi g sữa lên men tốt hơn là được thực hiện bằng cách đưa men cái sản phẩm sữa lên men đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 110°C , tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50°C đến 100°C , tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50°C đến 90°C , tốt hơn là nằm trong khoảng từ 60°C đến 85°C , tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 65°C đến 82°C , và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 70°C đến 80°C . Việc xử lý nhiệt tốt hơn là được thực hiện trong khoảng thời gian nằm trong khoảng từ 5 giây đến 180 giây, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 giây đến 120 giây, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 giây đến 90 giây, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 giây đến 60 giây, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 8 giây đến 50 giây đến tốt nhất là nằm trong khoảng từ 10 đến 40 giây. Tốt hơn là, mức vi khuẩn của men cái được làm giảm để không lớn hơn $1,0 \times 10^1$ CFU trên mỗi g sữa lên men, tốt hơn nữa là 0 CFU trên mỗi g. Sản phẩm sữa lên men được đưa vào xử lý nhiệt sao cho làm giảm mức vi khuẩn để không lớn hơn 1×10^2 CFU trên mỗi g là thích hợp để bảo quản khi sử dụng ở nhiệt độ môi trường, như bảo quản ở nhiệt độ là ít nhất 5°C , tốt hơn là ít nhất 10°C , tốt hơn nữa là ít nhất 15°C , và tốt nhất là ít nhất 20°C .

Lactaza có độ pH ổn định thấp được thêm vào với lượng thích hợp để thu được lượng mong muốn thủy phân lactoza trong các điều kiện được chọn. Theo phương án cụ thể của sáng chế, lactaza được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ 100 và 20000 LAU trên mỗi lít nền sữa, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100 đến 10000 LAU trên mỗi lít nền sữa, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100 đến 5000 LAU trên mỗi lít nền sữa, tốt hơn là nhỏ hơn 3000, như nhỏ hơn 1500, nhỏ hơn 1000, nhỏ hơn 750 hoặc nhỏ hơn 500, LAU trên mỗi lít nền sữa.

Theo một phương án ưu tiên, lactaza được thêm vào ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 400 LAU trên mỗi g lactoza trong nền sữa, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 200 LAU trên mỗi g lactoza trong nền sữa, tốt hơn là nằm trong

khoảng từ 5 đến 100 LAU trên mỗi g lactoza trong nền sữa, tốt hơn là nhỏ hơn 50, như nhỏ hơn 40, nhỏ hơn 30, nhỏ hơn 20 hoặc nhỏ hơn 10, LAU trên mỗi g lactoza trong nền sữa.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, lactaza được thêm vào nền sữa với lượng nằm trong khoảng từ 2,0mg/ml đến 50mg/ml, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5mg/ml đến 48mg/ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10mg/ml đến 46mg/ml, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 20mg/ml đến 45mg/ml.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, mức lactoza còn lại tại giai đoạn cuối của quá trình lên men là nhỏ hơn 40mg/ml, tốt hơn là nhỏ hơn 35mg/ml, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 30mg/ml, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 25mg/ml, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 20mg/ml, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 15mg/ml, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10mg/ml, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 5mg/ml, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 3mg/ml, và tốt nhất là nhỏ hơn 1,5mg/ml.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, nền sữa ở giai đoạn bắt đầu của bước lên men có hàm lượng lactoza nằm trong khoảng từ 30,0mg/ml đến 70mg/ml, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 35mg/ml đến 65mg/ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 40mg/ml đến 60mg/ml, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 50mg/ml đến 60mg/ml.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, trong đó lactaza ổn định ở độ pH thấp được thêm vào quy trình tại giai đoạn cuối của bước lên men, sản phẩm sữa lên men, mà lactaza được thêm vào đó, có độ nhớt, mà cho phép dễ dàng phân phối lactaza trong sản phẩm sữa lên men, ví dụ bằng cách trộn.

Theo một phương án ưu tiên về quy trình theo sáng chế, lactaza được thêm vào quy trình được tạo ra trong chế phẩm vô trùng. Theo phương án được ưu tiên khác về quy trình theo sáng chế lactaza được thêm vào quy trình trong các điều kiện vô trùng, ví dụ bằng cách lọc vô trùng dung dịch chứa lactaza.

Sản phẩm sữa lên men

Sáng chế còn đề cập đến sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng quy trình theo sáng chế.

Trong phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng quy trình theo sáng chế chứa men cái của bước 3) của quy trình nêu trên và lactaza có độ pH ổn định thấp được thêm vào bước 4) của quy trình nêu trên.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, sản phẩm sữa lên men là sản phẩm, mà có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chủng vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, sản phẩm sữa lên men được chọn từ nhóm bao gồm sữa chua, kem phomat, sữa lên men chua, kem lên men chua, sữa bơ, váng sữa lên men, sữa nuôi cấy, Smetana, Kefir, sữa chua uống, và Yakult. Tốt hơn là, sữa chua được chọn từ nhóm bao gồm sữa chua từng set, sữa chua khuấy và sữa chua uống.

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

Sản phẩm sữa lên men thường chứa protein ở mức nằm trong khoảng từ 2,0% khối lượng đến 3,5% khối lượng. Sản phẩm sữa lên men cũng có thể là sản phẩm protein thấp có lượng protein nằm trong khoảng từ 1,0% khối lượng đến 2,0% khối lượng. Theo cách khác, sản phẩm sữa lên men có thể là sản phẩm protein cao với mức protein lớn hơn 3,5% khối lượng.

Sử dụng

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng trong quy trình tạo ra sản phẩm sữa lên men, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- 1) thêm men cái chứa ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic vào nền sữa, và
- 2) lên men sữa trong khoảng thời gian cho đến khi đạt được độ pH đích,
- 3) men cái chứa ít nhất một chủng thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và
- 4) lactaza có độ pH ổn định thấp được thêm vào quy trình tại thời điểm bắt đầu, trong hoặc cuối của bước lên men, trong đó lactaza có độ pH ổn định thấp vẫn giữ được hoạt tính của nó ở độ pH = 5,0 và nhiệt độ là 37°C ở lượng ít nhất là 5% so với hoạt tính của nó tại độ pH tối ưu của lactaza.

Định nghĩa

Theo sáng chế, các định nghĩa sau đây sẽ được áp dụng:

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

Hoạt tính trong LAU của lactaza cụ thể có thể được xác định bằng cách xác định trực tiếp glucoza được giải phóng ra từ lactoza trong các điều kiện được mô tả trên đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách để xác định hoạt tính này. Theo cách khác, hoạt tính có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính của lactaza được mô tả trong Ví dụ 1 của sáng chế này. Ở đây,

hoạt tính thu được bằng cách so sánh với đường cong chuẩn với hoạt tính đã biết của lactaza, và hoạt tính của mẫu chưa biết được tính từ sáng chế này. Lactaza có hoạt tính đã biết, ví dụ, là lactozym có nguồn gốc từ Novozymes A/S, Denmark.

Thuật ngữ “xử lý nhiệt” tức là việc xử lý bất kỳ bằng cách sử dụng nhiệt độ bất kỳ, trong khoảng thời gian bất kỳ và bằng phương tiện hoặc thiết bị bất kỳ, mà làm bất hoạt ít nhất một phần vi khuẩn của men cái. Trong phần mô tả này, thuật ngữ “bất hoạt” tức là việc làm dừng, làm giảm hoặc ức chế bất kỳ sự tăng trưởng của vi khuẩn, ví dụ làm tan tế bào.

Thuật ngữ “vi khuẩn axit lactic” (“LAB”) là để chỉ một loại vi khuẩn gram dương, vi khuẩn kỵ khí hoặc kỵ khí, lên men đường cùng với việc tạo ra axit bao gồm axit lactic là axit chủ yếu được tạo ra, axit axetic và axit propionic. Các vi khuẩn axit lactic hữu ích nhất trong công nghiệp được tìm thấy thuộc bộ “Lactobacillales” bao gồm *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pseudoleuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Enterococcus spp.* và *Propionibacterium spp.* Chúng thường được sử dụng làm nguồn nuôi cấy thực phẩm một mình hoặc kết hợp với các vi khuẩn axit lactic khác

Vi khuẩn lactic, bao gồm cả vi khuẩn của loài *Lactobacillus sp.* và *Lactococcus sp.*, thường được cung cấp cho ngành công nghiệp sữa dưới dạng nuôi cấy đông lạnh hoặc đông khô để nhân giống khởi động số lượng lớn hoặc được gọi là nuôi cấy "Direct Vat Set" (DVS), được cấy trực tiếp vào bình hoặc thùng lên men để tạo ra một sản phẩm sữa, chẳng hạn như sản phẩm sữa lên men hoặc phô mai. Các chủng nuôi cấy vi khuẩn axit lactic như vậy nói chung được gọi “men cái” hoặc “men khởi đầu”. Thông thường, men cái cho sữa chua bao gồm *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, và ở hầu hết các quốc gia, sữa chua theo luật được định nghĩa là một sản phẩm sữa lên men được sản xuất bằng cách sử dụng men cái chứa hai chủng nói trên.

Thuật ngữ “sữa” được hiểu là sự tiết sữa thu được bằng cách vắt sữa của bất

kỳ động vật có vú nào, chẳng hạn như bò, cừu, dê, trâu hoặc lạc đà. Trong phương án được ưu tiên, sữa là sữa bò. Thuật ngữ sữa còn bao gồm dung dịch protein/chất béo làm từ nguyên liệu thực vật, ví dụ sữa đậu nành.

Thuật ngữ “nền sữa” có thể là nguyên liệu sữa thô và/hoặc qua chế biến bất kỳ mà có thể được lên men theo phương pháp của sáng chế. Do đó, các nền sữa hữu hiệu bao gồm, nhưng không giới hạn ở dung dịch/hỗn dịch của sữa hoặc các sản phẩm giống sữa bất kỳ bao gồm protein, như sữa nguyên chất hoặc sữa ít béo, sữa tách béo, sữa bơ, sữa bột hoàn nguyên, sữa đặc, sữa khô, váng sữa, bột váng sữa, lactoza, nước cái từ sự kết tinh của lactoza, dịch cô đặc váng sữa protein, hoặc kem. Rõ ràng, nền sữa có thể bắt nguồn từ bất kỳ động vật có vú nào, ví dụ: là sữa động vật có vú gần như nguyên chất, hoặc sữa bột hoàn nguyên

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

Thuật ngữ “đồng nhất hóa” được sử dụng ở đây có nghĩa là trộn mạnh để thu được hỗn dịch hoặc nhũ tương hòa tan. Nếu đồng nhất hóa được thực hiện trước khi lên men, nó có thể được thực hiện để phá vỡ chất béo sữa thành các kích thước nhỏ hơn để nó không còn tách ra khỏi sữa. Điều này có thể được thực hiện bằng cách buộc sữa ở áp suất cao thông qua các lỗ nhỏ.

Thuật ngữ “thanh trùng” được sử dụng ở đây có nghĩa là xử lý nền sữa để giảm hoặc loại bỏ sự hiện diện của các sinh vật sống, chẳng hạn như vi sinh vật. Tốt hơn là, thanh trùng đạt được bằng cách duy trì nhiệt độ xác định trong một khoảng thời gian xác định. Nhiệt độ quy định thường đạt được bằng cách đun nóng. Nhiệt độ và thời gian có thể được chọn để tiêu diệt hoặc làm bất hoạt một số vi khuẩn, chẳng hạn như vi khuẩn có hại. Một bước làm mát nhanh chóng có thể theo sau đó.

Thuật ngữ “lên men” trong các phương pháp của sáng chế có nghĩa là chuyển hóa hydrat cacbon thành rượu hoặc axit thông qua hoạt động của vi sinh vật. Tốt hơn

là, lên men theo phương pháp của sáng chế bao gồm chuyển hóa lactoza thành axit lactic

Các quy trình lên men được sử dụng trong việc tạo ra các sản phẩm sữa đã được biết đến và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách chọn các điều kiện quy trình phù hợp, như nhiệt độ, oxy, số lượng và đặc điểm của vi sinh vật và thời gian xử lý. Rõ ràng, các điều kiện lên men được chọn để hỗ trợ cho thành tựu của sáng chế, tức là để thu được sản phẩm sữa ở dạng rắn (như phô mai) hoặc dạng lỏng (như sản phẩm sữa lên men).

Việc sử dụng các thuật ngữ "a" và "an" và "the" và các tham chiếu tương tự trong bản mô tả sáng chế (đặc biệt là trong phần Yêu cầu bảo hộ sau đây) phải được hiểu là bao gồm cả số ít và số nhiều, trừ khi có quy định khác được nêu trong tài liệu này hoặc phủ định rõ ràng trong bản mô tả này. Các thuật ngữ "bao gồm", "có", "bao gồm" và "chứa" được hiểu là các thuật ngữ kết thúc mở (nghĩa là "bao gồm, nhưng không giới hạn,") trừ khi có quy định khác. Việc ghi lại các phạm vi của các giá trị trong tài liệu này chỉ nhằm mục đích phục vụ như một phương pháp tốc ký để chỉ riêng từng giá trị riêng biệt nằm trong phạm vi, trừ khi có quy định khác trong tài liệu này và mỗi giá trị riêng biệt được đưa vào đặc tả như thể nó được đọc riêng ở đây. Tất cả các phương pháp được mô tả trong tài liệu này có thể được thực hiện theo bất kỳ thứ tự phù hợp nào trừ khi có quy định khác trong tài liệu này hoặc mâu thuẫn rõ ràng bởi ngữ cảnh này. Việc sử dụng bất kỳ và tất cả các ví dụ hoặc từ mẫu mực (ví dụ: "chẳng hạn như") được cung cấp ở đây, chỉ nhằm mục đích làm sáng tỏ tốt hơn sáng chế và không đặt ra giới hạn về phạm vi của sáng chế trừ khi có quy định khác. Không có từ nào trong bản mô tả sáng chế nên được hiểu là chỉ ra bất kỳ yếu tố bất kỳ không được yêu cầu bảo hộ là thiết yếu đối với thực tiễn của sáng chế.

Thuật ngữ "sản phẩm sữa lên men" có nghĩa là một sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn trong đó việc chuẩn bị thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn liên quan đến quá trình lên men của nền sữa bằng vi khuẩn axit lactic. Sản phẩm sữa lên men có thể được

sử dụng ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các sản phẩm như các sản phẩm sữa lên men ưa nhiệt, ví dụ: sữa chua, các sản phẩm sữa lên men ưa nhiệt, ví dụ: kem chua và bơ sữa, cũng như váng sữa lên men.

Thuật ngữ “ưa nhiệt” ở đây dùng để chỉ các vi sinh vật phát triển mạnh nhất ở nhiệt độ trên 35°C. Các vi khuẩn ưa nhiệt công nghiệp hữu ích nhất bao gồm *Streptococcus spp.* và *Lactobacillus spp.* Thuật ngữ “lên men ưa nhiệt” ở đây đề cập đến quá trình lên men ở nhiệt độ trên khoảng 35°C, chẳng hạn như nằm trong khoảng từ 35°C đến 45°C. Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men ưa nhiệt” dùng để chỉ các sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng phương pháp lên men ưa nhiệt của men cái ưa nhiệt và bao gồm các sản phẩm sữa lên men như sữa chua set, sữa chua khuấy và sữa chua uống, ví dụ Yakult.

Thuật ngữ “ưa nhiệt” ở đây dùng để chỉ các vi sinh vật phát triển mạnh nhất ở nhiệt độ vừa phải (15°C - 35°C). Các vi khuẩn ưa nhiệt công nghiệp hữu ích nhất bao gồm *Lactococcus spp.* và *Leuconostoc spp.* Thuật ngữ “lên men ưa nhiệt” ở đây đề cập đến quá trình lên men ở nhiệt độ khoảng 22°C đến 35°C. Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men ưa nhiệt” đã dùng để chỉ các sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng cách lên men ưa nhiệt của men cái ưa nhiệt và bao gồm các sản phẩm sữa lên men như bơ sữa, sữa chua, sữa nuôi cấy, smetana, kem chua, Kefir và phô mai tươi, như quark, tvarog (*sản phẩm sữa lên men màu trắng không lỏng của châu Âu*) và kem phô mai.

Liên quan đến sáng chế, “ứng suất cắt” có thể được đo bằng phương pháp sau:

Bảy ngày sau khi sản xuất, sản phẩm sữa lên men giảm nhiệt độ xuống 13°C và khuấy nhẹ nhàng bằng thìa (5 lần) cho đến khi đồng nhất mẫu. Các đặc tính lưu biến của mẫu được đánh giá trên máy đo lưu biến (Anton Paar Physica Rheometer với ASC, Automatic Sample Changer, Anton Paar® GmbH, Austria) bằng cách sử dụng cốc bob. Máy đo độ biến thiên được đặt ở nhiệt độ không đổi 13°C trong suốt thời gian đo. Cài đặt như sau:

Thời gian giữ (để xây dựng lại cấu trúc ban đầu)

5 phút mà không có bất kỳ ứng suất vật lý nào (dao động hoặc xoay) áp dụng cho mẫu.

Bước dao động (để đo mô đun đàn hồi và độ nhớt, lần lượt là G' , và G'' , do đó tính được mô đun phức G^*)

Biến dạng không đổi = 0,3%, tần số (f) = [0,5.... 8] Hz

6 điểm đo trong 60 giây (cứ sau 10 giây)

Bước quay (để đo ứng suất cắt ở 300 1/s)

Hai bước đã được thiết kế:

1) Tốc độ cắt = [0,3-300] 1/s và 2) Tốc độ cắt = [275-0,3] 1/s.

Mỗi bước chứa 21 điểm đo trong 210 giây (cứ sau 10 giây).

Ứng suất cắt ở tốc độ 300 1/s được chọn để phân tích sâu hơn, vì điều này tương quan với độ đậm đặc trong miệng khi nuốt sản phẩm sữa lên men.

Liên quan đến sáng chế, “độ chắc gel” có thể được đo bằng phương pháp sau:

Độ chắc gel được đo bằng phép thử đùn ngược bằng máy phân tích cấu trúc (TA.XT Plus, SBảng Micro System, Surrey, UK) được cung cấp với tấm song song 35mm. Khoảng cách di chuyển được đặt ở 15mm và tốc độ di chuyển là 2mm/s. Thử nghiệm được thực hiện sau 7 ngày kể từ khi sản xuất. Sản phẩm sữa lên men giảm nhiệt độ xuống 13°C và khuấy nhẹ bằng tay, và được đo trong hộp nhựa 250g. Lực tối đa (N hoặc g) thu được bằng lực so với đường cong khoảng cách được sử dụng làm tham số “độ chắc gel”, vùng dương (N * mm) là lượng biến dạng, lực âm tối đa (N) là độ dẻo quánh.

Thuật ngữ “lactaza ổn định ở độ pH thấp” ở đây dùng để chỉ một loại lactaza, duy trì hoạt động của nó ở độ pH=5,0 và nhiệt độ 37⁰C ở mức ít nhất 5% so với hoạt động của nó ở độ pH tối ưu của lactaza.

Thuật ngữ “hoạt tính ở độ pH tối ưu” có nghĩa là hoạt tính của lactaza ở độ pH, trong đó hoạt tính của enzym có hoạt tính tối ưu.

Thuật ngữ “hydrat cacbon không phải là lactoza” có nghĩa là hydrat cacbon bất kỳ, không phải là lactoza, và là một loại vi khuẩn axit lactic thiếu lactoza được sử dụng trong quy trình theo sáng chế có khả năng chuyển hóa.

Thuật ngữ “khi bắt đầu bước lên men” có nghĩa là ngay trước đó, cùng lúc hoặc ngay sau khi thêm men cái vào nền sữa. Ở đây, thuật ngữ “ngắn” có nghĩa là ít hơn 30 phút.

Thuật ngữ “trong quá trình lên men” có nghĩa là bất cứ lúc nào trong quá trình lên men sau khi bắt đầu và trước khi kết thúc quá trình lên men.

Thuật ngữ “ở cuối bước lên men” có nghĩa là ngay trước đó, cùng lúc hoặc ngay sau khi đạt được độ pH mục tiêu. Ở đây, thuật ngữ “ngắn” có nghĩa là ít hơn 30 phút.

Thuật ngữ “độ pH đích” có nghĩa là độ pH mà tại đó bước lên men kết thúc. Tùy thuộc vào các thông số khác nhau của quy trình, bước lên men được kết thúc bằng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm 1) axit hóa sữa lên men, làm cho ít nhất một chủng của môi trường nuôi cấy không thể phát triển, 2) xử lý làm mát và 3) làm suy kiệt hydrat cacbon không phải là lactoza.

Thông tin lưu giữ vi sinh vật

Người nộp đơn yêu cầu rằng mẫu của các vi sinh vật được lưu giữ với thông tin dưới đây chỉ có thể được cung cấp cho chuyên gia được phê duyệt bởi Người nộp đơn.

Chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 với số hiệu No. DSM 28952.

Chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 với số hiệu No. DSM 28953.

Chủng *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 với số hiệu No. DSM28910.

Quá trình lưu giữ được thực hiện theo Hiệp ước Budapest về đăng ký lưu giữ vi sinh vật quốc tế dùng cho mục đích đăng ký sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

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

Nguyên lý:

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

LAU được xác định là lượng enzym giải phóng ra 1 micromol glucoza mỗi phút ở 37°C, pH = 6,5 trong dung dịch đệm M (Dung dịch đệm M đã được xác định trong phần mô tả trên của sáng chế). Theo cách khác, hoạt tính trong LAU đối với

lactaza đặc hiệu có thể được xác định bằng phương pháp được mô tả ở đây. Giá trị thu được được so sánh với đường cong chuẩn thực hiện bằng lactaza có hoạt tính đã biết, và hoạt tính của mẫu chưa biết được tính toán từ đường cong này. Lactaza có hoạt tính đã biết có thể, ví dụ, là lactozym thu được từ Novozymes A/S, Denmark.

Dung dịch:

Dung dịch đệm thử nghiệm: 50mM succinat, 50mM HEPES, 50mM CHES, 150mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0,01% Triton X100, pH = 6,5

Dung dịch GOD-Perid: 65mM natri phosphat, pH = 7, 0,4 g/l Glucoza oxidaza, 0,013 g/l HRP (Horse Radish Peroxidaza), 0,65 g/l ABTS (axit 2,2'-azino-bis(3-etylbenzthiazolin-6-sulphonic)).

Cơ chất:

160mM lactoza, 50mM succinat, 50mM HEPES, 50mM CHES, 150mM KCl, 2mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH = 6,5.

Chuẩn:

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

Mẫu:

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

Quy trình:

1. 375μl cơ chất được ủ trong 5 phút ở 37°C.

2. 25µl enzym được pha loãng trong dung dịch đệm thử nghiệm được thêm vào.
3. Phản ứng được ngừng lại sau 30 phút bằng cách thêm 60µl 1M NaOH
4. 20µl được chuyển sang đĩa vi chuẩn 96 lỗ và 200µl dung dịch GOD-Perid được thêm vào. Sau 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, hệ số hấp thụ được xác định ở 420nm.

Ví dụ 2

100ml 15 hoặc 30% (khối lượng) bột váng sữa chứa chủ yếu lactoza và các ion được tạo ra bằng cách trộn 15 hoặc 30g bột váng sữa đã được sấy phun (Variolac, Arla) lần lượt trong 85 hoặc 70ml nước ionic. Dung dịch phản ứng được rót vào bình chứa thanh khuấy từ và được đặt vào thùng nước ở 37°C. Sau 15 phút, enzym được thêm vào. Các enzym được thử nghiệm là Lactozym, lactaza có bán sẵn trên thị trường của Novozymes A/S, Denmark, có hoạt tính là 3060 LAU/g, và thử nghiệm từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và hoạt tính là 295 LAU/g.

Các mức liều là 4225 LAU/l sữa Lactozym và 2025 LAU/l sữa *Bifidobacterium lactaza*. Các mẫu sữa được lấy ở các khoảng đều đặn cho đến 5,5 giờ và enzym được làm bất hoạt bằng cách đun nóng đến 99°C trong 10 phút trong thiết bị trộn có nhiệt. Mẫu được pha loãng một cách thích hợp và được lọc qua bộ lọc 0,20µm.

Thùy phân lactoza được xác định bằng cách sử dụng Dionex BioLC được trang bị cột Dionex PA1 và Pulsed Amperimetric Detektor (PAD). Các đỉnh được nhận dạng và được định lượng bằng cách so sánh với chuẩn đã biết của lactoza, glucoza và galactoza.

Kết quả được cho dưới đây.

Bảng 1: Lactoza, glucoza và galactoza trong 15% DS bột váng sữa sau khi xử lý bằng Lactozym hoặc *Bifidobacterium lactaza*

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

Bảng 2: Lactoza, glucoza và galactoza trong 30% DS bột váng sữa sau khi xử lý bằng Lactozym hoặc *Bifidobacterium lactaza*

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

Ngoài ra khi được thử nghiệm ở nồng độ lactoza cao hơn như trong 15% hoặc 30% bột váng sữa, không có hoặc rất ít galactooligosaccarit được tạo ra. Một lần nữa, nồng độ galactoza và glucoza được tạo ra bằng nhau và phù hợp với lượng lactoza được thủy phân. Để so sánh, Lactozym tạo ra ít galactoza hơn glucoza, cho thấy rõ rằng galactooligosaccarit đã được tạo ra.

Ví dụ 3

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

Nguyên lý:

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

Profil pH

Cơ chất:

167mM lactoza, 50mM succinat, 50mM HEPES, 50mM CHES, 150mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ và độ pH được điều chỉnh đến mức pH = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 và 10 bằng NaOH.

Mẫu enzym:

Lactaza thử nghiệm từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 được pha loãng một cách thích hợp trong 150mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0,01% Triton X100.

Quy trình:

- 10µl mẫu enzym được pha loãng trong dung dịch đệm pha loãng enzym được thêm vào các ống PCR ở nhiệt độ trong phòng
- 90µl cơ chất được thêm vào ở nhiệt độ trong phòng và nhanh chóng được đặt vào Peltier Thermal Cyclor (PCT-200, MJ research) ở 37°C và được ủ trong 30 phút và sau đó được đặt vào nước đá.
- Phản ứng được ngừng bằng cách thêm 100µl 0,25M NaOH.
- 20µl được chuyển sang đĩa vi chuẩn 96 lỗ và 230µl 65mM natri phosphat, pH = 7, 0,4 g/l Glucoza oxidaza, 0,013 g/l HRP, 0,65 g/l dung dịch ABTS được thêm vào. Sau 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, hệ số hấp thụ được xác định ở 420nm.

Bảng 3:

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

Profil nhiệt độCơ chất:

167mM lactoza, 50mM succinat, 50mM HEPES, 50mM CHES, 150mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ và độ pH được điều chỉnh đến pH = 6,5 bằng NaOH.

Mẫu enzym:

Lactaza thử nghiệm từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 được pha loãng một cách thích hợp trong 50mM succinat, 50mM HEPES, 50mM CHES, 150mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0,01% Triton X100 và độ pH được điều chỉnh đến pH = 6,5.

Quy trình:

- 10µl mẫu enzym được pha loãng trong dung dịch đệm pha loãng enzym

được thêm vào các ống PCR ở nhiệt độ trong phòng

- 90 μ l cơ chất đã được đun nóng sơ bộ (trong Peltier Thermal Cycler 30-70°C) được thêm vào và bước ủ được thực hiện với gradien nhiệt độ từ 30 đến 70°C trong 30 phút và sau đó được đặt vào nước đá.

- Phản ứng được ngừng bằng cách thêm 100 μ l 0,25M NaOH.

- 20 μ l được chuyển sang đĩa vi chuẩn 96 lỗ và 230 μ l 65mM natri phosphat, pH = 7, 0,4 g/l Glucoza oxidaza, 0,013 g/l HRP, 0,65 g/l dung dịch ABTS được thêm vào. Sau 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, hệ số hấp thụ được xác định ở 420nm.

Bảng 4:

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

Ví dụ 4

Xác định K_m đối với các enzym lactaza ở 5°C

Nguyên lý:

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

Cơ chất:

Các nồng độ lactaza khác nhau nằm trong khoảng từ $K_m/5$ đến $10 \cdot K_m$, 50mM succinat, 50mM HEPES, 50mM CHES, 150mM KCl, 2mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 và độ pH được điều chỉnh đến pH = 6,5 bằng NaOH.

Mẫu enzym:

Lactaza thử nghiệm từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 được pha loãng một cách thích hợp trong 50mM succinat, 50mM HEPES, 50mM CHES, 150mM KCl, 2mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 0,01% Triton X100, độ pH được điều chỉnh đến pH = 6,5 bằng NaOH.

12 g/l Lactozym (lactaza có bán sẵn trên thị trường từ Novozymes A/S, Denmark) được pha loãng 6000 lần trong dung dịch đệm tương tự.

Quy trình:

- 10 μ l mẫu enzym (5°C) được thêm vào đĩa vi chuẩn 96 lỗ trên nước đá.
- 90 μ l cơ chất (5°C) được thêm vào và được ủ trong 2 giờ ở 5°C.
- Phản ứng được ngừng bằng cách thêm 100 μ l 0,25M NaOH.
- 20 μ l được chuyển sang đĩa vi chuẩn 96 lỗ và 230 μ l 65mM natri phosphat, pH = 7, 0,4 g/l Glucoza oxidaza, 0,013 g/l HRP, 0,65 g/l ABTS solution được thêm

vào. Sau 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, hệ số hấp thụ được xác định ở 420nm.

Xác định Km:

Chương trình làm khớp với bình phương nhỏ nhất phi tuyến và phương trình Michaelis-Menten:

$$v = (V_{\max} \cdot S) / (K_m + S)$$

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

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

Ví dụ 5

Tạo ra sữa chua bằng cách sử dụng lactaza từ Bifidobacterium bifidum và men cái thiếu hụt lactoza – các lượng khác nhau của sucroza và lactaza

Kế hoạch thử nghiệm

Đối với sự kết hợp được lựa chọn của lactaza có độ pH ổn định thấp và men cái thiếu hụt lactoza, hai mức sucroza được thêm vào (0,5% và 0,7%), và hai mức lactaza được thêm vào (800 LAU/L và 1000 LAU/L), được thử nghiệm. Làm lên men đối chứng, lactaza và hai mức sucrose (1,0% và 1,5%) không được thêm vào được thực hiện. Lactaza được thêm vào lúc bắt đầu lên men cùng với men cái.

Nền sữa

Bảng 5: Thành phần của nền sữa

	Lượng (g)	Hàm lượng protein (%)	Hydrat cacbon (%)	Chất béo (%)
Sữa gầy	1000	3,5	4,8	0,1
1,5% sữa	2000	3,4	4,7	1,5
Bột protein “Promilk 802FB”	14	80,0		
Bột protein “Milex 240”	95	34,0		
Nền sữa toàn phần	3109	4,71	4,57	1,00

Men cái

Men cái chứa chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28952, chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28953, và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28910.

Lactaza

Lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa của SEQ ID NO. 2.

Phép xác định

Các mức chất béo, protein và lactoza được xác định bằng cách sử dụng phép phân tích MilkoScan.

Tình trạng hậu axit được xác định trong thời gian là 28 ngày khi bảo quản ở 5°C.

Lượng sucroza, glucoza, galactoza, fructoza và lactoza trong sữa lên men ở ngày 1 và ngày 14 sau khi tạo thành được xác định bằng HPLC.

Độ chắc gel

Độ chắc gel được xác định bằng thử nghiệm ép đùn ngược với máy phân tích cấu trúc (TA.XT Plus, Stable Micro System, Surrey, UK) được cung cấp tám song song 35mm. Khoảng cách di chuyển được đặt đến 15 mm và tốc độ di chuyển là 2mm/s. Thử nghiệm được thực hiện sau 7 ngày kể từ khi tạo ra sản phẩm. Sản phẩm sữa lên men giảm nhiệt độ xuống 13°C và khuấy nhẹ bằng tay, và được đo trong hộp nhựa 250g. Lực tối đa (g) thu được bằng lực so với đường cong khoảng cách được sử dụng làm thông số “độ chắc gel”.

Ứng suất cắt

Bảy ngày sau khi ủ, sản phẩm sữa lên men giảm nhiệt độ xuống 13°C và khuấy nhẹ nhàng bằng thìa (5 lần) cho đến khi đồng nhất mẫu. Các đặc tính lưu biến của mẫu được đánh giá trên máy đo lưu biến (Anton Paar Physica Rheometer với ASC, Automatic Sample Changer, Anton Paar® GmbH, Austria) bằng cách sử dụng cốc bob. Máy đo độ biến thiên được đặt ở nhiệt độ không đổi 13°C trong suốt thời gian đo. Cài đặt như sau:

Thời gian giữ (để xây dựng lại cấu trúc ban đầu)

5 phút mà không có bất kỳ ứng suất vật lý nào (dao động hoặc xoay) áp dụng cho mẫu.

Bước dao động (để đo mô đun đàn hồi và nhớt, lần lượt là G' , và G'' , do đó tính được mô đun phức G^*)

Biến dạng không đổi = 0,3%, tần số (f) = [0,5.... 8] Hz

6 điểm đo trong 60 giây (cứ sau 10 giây)

Bước quay (để đo ứng suất cắt ở 300 1/s)

Hai bước đã được thiết kế:

1) Tốc độ cắt = [0,3-300] 1/s và 2) Tốc độ cắt = [275-0,3] 1/s.

Mỗi bước chứa 21 điểm đo trong 210 giây (cứ sau 10 giây).

Ứng suất cắt ở tốc độ 300 1/s được chọn để phân tích sâu hơn, vì điều này tương quan với độ đậm đặc trong miệng khi nuốt sản phẩm sữa lên men.

Quy trình

Các thành phần của nền sữa được trộn với nhau và được để hydrat hóa trong 2 giờ ở 5°C. Tiếp theo, nền sữa được thanh trùng ở 90°C trong 20 phút. Bước lên men được thực hiện ở 43°C đến độ pH cuối cùng là 4,55 để tạo thành sữa chua. Sữa chua được làm lạnh trong PTU (*Post Treatment Unit*: Thiết bị xử lý hậu) ở nhiệt độ làm lạnh là 25°C ở áp suất 2bar. Sữa chua đã làm lạnh được bảo quản ở 6°C.

Kết quả

Tình trạng hậu axit

Bảng 6: Tình trạng hậu axit

	Tham khảo 1	Tham khảo 2	Mẫu thử nghiệm 1	Mẫu thử nghiệm 2	Mẫu thử nghiệm 3	Mẫu thử nghiệm 4
Sucroza (%)	1	1,5	0,5	0,5	0,7	0,7
Lactaza (LAU/L)	0	0	800	1000	800	1000
Thời gian lên men(Giờ:Phút)	7:25	7:05	7:15	7:15	7:00	7:00
Độ pH cuối cùng	4,58	4,55	4,55	4,55	4,55	4,55
pH ngày 1	4,58	4,53	4,54	4,53	4,50	4,51
pH ngày 7	4,54	4,49	4,50	4,50	4,47	4,49
pH ngày 14	4,49	4,43	4,49	4,49	4,46	4,47
pH ngày 21	4,35	4,34	4,45	4,45	4,42	4,43
pH ngày 28	4,35	4,34	4,45	4,42	4,43	4,42
mức giảm của độ pH	0,23	0,19	0,09	0,11	0,07	0,09

Đối với tất cả 6 mẫu, tức là 2 mẫu tham khảo và 4 mẫu được tạo ra theo sáng chế (mẫu thử nghiệm), độ pH là khoảng 4,55 đạt được trong 7 giờ.

Như thấy rõ được từ Bảng 6, tình trạng hậu axit trong thời gian là 28 ngày giảm mạnh đối với mẫu được tạo ra theo sáng chế so với mẫu tham khảo.

Phân tích hydrat cacbon

Bảng 7: Mức hydrat cacbon còn lại sau 1 ngày từ khi được tạo ra

	Tham khảo 1	Tham khảo 2	Mẫu thử nghiệm 1	Mẫu thử nghiệm 2	Mẫu thử nghiệm 3	Mẫu thử nghiệm 4
Sucroza (%) bắt đầu lên men	1	1,5	0,5	0,5	0,7	0,7
Lactaza (LAU/L)	0	0	800	1000	800	1000
Fructoza (mg/g)	1,62	1,91	0,80*	0,74*	1,27	1,18
Galactoza (mg/g)	<0,9	1,78*	29,01	29,87	28,78	29,29
Glucoza (mg/g)	0,77*	1,73	27,60	27,84	28,08	28,19
Lactoza (mg/g)	54,16	53,37	1,18	0,40	1,20	0,40
Sucroza (mg/g)	<0,3	4,6	<0,3	<0,3	1,3	0,7

*là giá trị nằm trong khoảng từ giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

Tất cả các giá trị trong Bảng 7 là giá trị trung bình của hai mẫu.

Đối với 4 mẫu thử nghiệm, tại giai đoạn cuối của quá trình lên men lượng lactoza là rất thấp và lượng glucoza và galactoza là rất cao so với mẫu tham khảo thể hiện hoạt tính cao của lactaza được thêm vào. Đối với mẫu thử nghiệm sử dụng mức lactaza là 1000 LAU/L, thu được mức lactoza còn lại là khoảng 0,04%, và đối với mẫu thử nghiệm sử dụng mức lactaza là 800 LAU/L, thu được mức lactoza còn lại là khoảng 0,1%.

Sữa lên men có mức lactoza thấp và mức glucoza và galactoza cao có độ ngọt cảm nhận được cao hơn nhiều so với sữa lên men có mức lactoza cao và mức glucoza và galactoza thấp giống như mẫu tham khảo. Lý do của nó là ở chỗ glucoza và galactoza có hệ số ngọt cao hơn nhiều so với lactoza.

Độ chắc gel

Bảng 8: Độ chắc gel

	Tham khảo 1	Tham khảo 2	Mẫu thử nghiệm 1	Mẫu thử nghiệm 2	Mẫu thử nghiệm 3	Mẫu thử nghiệm 4
Sucroza (%) bắt đầu lên men	1	1,5	0,5	0,5	0,7	0,7
Lactaza (LAU/L)	0	0	800	1000	800	1000
Độ chắc gel (g)	45,76	47,42	48,19	54,57	50,19	46,60

Tất cả các giá trị của Bảng 8 là giá trị trung bình của hai mẫu.

Như thấy rõ được từ Bảng 8, 3 trong số 4 mẫu thử nghiệm có độ chắc gel cao hơn đáng kể so với 2 mẫu tham khảo.

Ứng suất cắt

Bảng 9: Ứng suất cắt được đo ở 300 s^{-1}

	Tham khảo 1	Tham khảo 2	Mẫu thử nghiệm 1	Mẫu thử nghiệm 2	Mẫu thử nghiệm 3	Mẫu thử nghiệm 4
Sucroza (%) bắt đầu lên men	1	1,5	0,5	0,5	0,7	0,7
Lactaza (LAU/L)	0	0	800	1000	800	1000
Ứng suất cắt (Pa)	67,1	65,3	78,2	84,4	84,7	77,6

Tất cả các giá trị của Bảng 9 là giá trị trung bình của hai mẫu.

Như thấy rõ được từ Bảng 9, 4 mẫu thử nghiệm có ứng suất cắt được đo ở 300 s^{-1} cao hơn đáng kể so với 2 mẫu tham khảo. Trong nhóm gồm 4 mẫu thử nghiệm, việc kết hợp 1) lượng sucroza được thêm vào là 0,5% và mức lactaza là 1000 LAU/L, và 2) lượng sucroza được thêm vào là 0,7% và mức lactaza là 800 LAU/L, sẽ có ứng suất cắt cao nhất.

Ví dụ 6

*Tạo ra sữa chua bằng cách sử dụng lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* và men cái thiếu hụt lactoza – thêm một lượng dư sucroza trước khi lên men*

Kế hoạch thử nghiệm

Bước lên men được thực hiện với mẫu tham khảo không chứa lactaza và 9,5% sucroza và 2 mẫu thử nghiệm chứa 800 LAU/L của lactaza và 6,5% và 7,0% sucroza. Lactaza được thêm vào ở giai đoạn bắt đầu của bước lên men cùng với men cái.

Nền sữa

Bảng 10: Thành phần của nền sữa cơ bản 1

	Lượng (g)	Hàm lượng protein (%)	Hydrat cacbon (%)	Chất béo (%)
Sữa gầy	984	3,5	4,8	0,1
1,5% sữa	1911	3,4	4,7	1,5
Bột protein “Promilk 802FB”	13,3	80,0		
Bột protein “Milex 240”	91,5	34,0	54,00	1,00
Nền sữa toàn phần	3000	4,71	4,57	1,02

Bảng 11: Thành phần của nền sữa cơ bản 2

	Lượng (g)	Hàm lượng protein (%)	Hydrat cacbon (%)	Chất béo (%)
Sữa gầy	984	3,5	4,8	0,1
1,5% sữa	1911	3,4	4,7	1,5
Bột protein “Promilk 802FB”	17,40	80,0		
Bột protein “Milex 240”	109,50	34,0	5400	1,00
Sucroza	180,00		100,0	
Nền sữa toàn phần	3202	4,70	11,75	0,96

Nền sữa cơ bản 2 được sử dụng để điều chế nền sữa cuối cùng đối với mẫu

tham khảo và hai mẫu thử nghiệm bằng cách thêm sucroza bổ sung.

Men cái

Men cái chứa chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28952, chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28953, và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28910.

Lactaza

Lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa của SEQ ID NO. 2.

Phép đo

Tất cả phép đo được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong Ví dụ 5.

Quy trình

Các thành phần của nền sữa được trộn với nhau và được để hydrat hóa trong 2 giờ ở 5°C. Tiếp theo, nền sữa được thanh trùng ở 95°C trong 5 phút. Tiếp theo, nền sữa được đồng hóa ở 65°C ở áp suất 200bar. Bước lên men được thực hiện ở 43°C đến độ pH cuối cùng là 4,55 để tạo thành sữa chua. Sữa chua được làm lạnh trong PTU (*Post Treatment Unit*) ở nhiệt độ làm lạnh là 25°C ở áp suất 2bar. Sữa chua đã làm lạnh được bảo quản ở 6°C.

Kết quả

Tình trạng hậu axit

Bảng 12: Tình trạng hậu axit

Mẫu	1	2	3
Lactaza (LAU/L)	0	800	800
Thời gian lên men	6 giờ 15 phút	6 giờ 15 phút	6 giờ 15 phút
Độ pH cuối cùng	4,55	4,51	4,51
pH ngày 4	4,54	4,44	4,44
pH ngày 7	4,51	4,42	4,42
pH ngày 14	4,40	4,38	4,37
pH ngày 21	4,38	4,38	4,37
pH ngày 28	4,36	4,37	4,36
mức giảm của độ pH	0,19	0,14	0,15

Phân tích hydrat cacbon

Bảng 13: Phân tích hydrat cacbon

Mẫu	1		2		3	
Lactaza (LAU/L)	0		800		800	
Sucroza (%)	9,5		6,5		7,0	
bắt đầu lên men						
	Ngày 1	Ngày 28	Ngày 1	Ngày 28	Ngày 1	Ngày 28
Fructoza (mg/g)	2,4	3,07	1,7	2,01	1,9	2,00
Galactoza (mg/g)	<2,0	8,99	26,4	29,03	26,4	28,72
Glukoza (mg/g)	<1,0	8,84	26,2	27,52	26,2	27,22
Lactoza (mg/g)	51,4	38,04	2,8	<2	2,7	<2
Sucroza (mg/g)	64,3	64,23	41,7	42,38	46,0	46,26

Tất cả các giá trị của Bảng 13 là giá trị trung bình của hai mẫu.

Như thấy rõ được từ Bảng 13, đối với 2 mẫu thử nghiệm, tại giai đoạn cuối của quá trình lên men lượng lactoza là rất thấp và lượng glucoza và galactoza là rất cao so với mẫu tham khảo thể hiện hoạt tính cao của lactaza được thêm vào.

Sữa lên men có mức lactoza thấp và mức glucoza và galactoza cao có lượng ngọt cao hơn nhiều so với sữa lên men có mức lactoza cao và mức glucoza và galactoza thấp giống như mẫu tham khảo. Lý do của nó là ở chỗ glucoza và galactoza có độ ngọt cao hơn nhiều so với lactoza.

Độ chắc gel và ứng suất cắt

Bảng 14: Độ chắc gel và ứng suất cắt ở 300 s^{-1}

Mẫu	1		2		3	
Lactaza (LAU/L)	0		800		800	
Sucroza (%)	9,5		6,5		7,0	
bắt đầu lên men						
Độ chắc gel (g)	46,36		46,76		45,75	
Ứng suất cắt ở 1 s^{-1} (Pa)	9,4	9,2	9,3	8,8	10,3	10,2
Ứng suất cắt ở $30,2\text{ s}^{-1}$ (Pa)	39,2	38,8	41,6	39,2	44,7	45,1
Ứng suất cắt ở 135 s^{-1} (Pa)	58,3	58,0	67,2	64,5	72,3	72,2
Ứng suất cắt ở 300 s^{-1} (Pa)	69,4	69,1	80,6	78,2	84,4	84,4

Như thấy rõ được từ Bảng 14, ứng suất cắt ở 300 s^{-1} của hai mẫu thử nghiệm chứa lactaza tăng lên đáng kể so với mẫu tham khảo không có lactaza.

Ví dụ 7

*Tạo ra sữa chua bằng cách sử dụng lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* và men cái thiếu hụt lactoza – thêm một lượng dư sucroza trước khi lên men II*

Kế hoạch thử nghiệm

Bước lên men được thực hiện với hai mẫu tham khảo không chứa lactaza và 1,5% và 9,5% sucroza và 3 mẫu thử nghiệm chứa 1000 LAU/L của lactaza và 0,5%, 6,5% và 7,0% sucroza. Lactaza được thêm vào ở giai đoạn bắt đầu của bước lên men cùng với men cái.

Nền sữa

Hai nền sữa cơ bản theo Ví dụ 6 được sử dụng để điều chế nền sữa cuối cùng đối với mẫu tham khảo và ba mẫu thử nghiệm bằng cách thêm sucroza bổ sung.

Men cái

Men cái chứa chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28952, chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28953, và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28910.

Lactaza

Lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa của SEQ ID NO. 2.

Phép đo

Tất cả phép đo được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong Ví dụ 5.

Quy trình

Các thành phần của nền sữa được trộn với nhau và được để hydrat hóa trong 2 giờ ở 5°C. Tiếp theo, nền sữa được thanh trùng ở 90°C trong 20 phút. Bước lên men được thực hiện ở 43°C đến độ pH cuối cùng là 4,55 để tạo thành sữa chua. Sữa chua được làm lạnh trong PTU (*Post Treatment Unit*) ở nhiệt độ làm lạnh là 25°C ở áp suất 2bar. Sữa chua đã làm lạnh được bảo quản ở 6°C.

Kết quả

Tình trạng hậu axit

Bảng 15: Tình trạng hậu axit

Mẫu	1	2	3	4	5
Lactaza (LAU/L)	0	1000	0	1000	1000
Thời gian lên men	6 giờ 50 phút	6 giờ 55 phút	6 giờ 35 phút	6 giờ 10 phút	5 giờ 40 phút
Độ pH cuối cùng	4,55*	4,55*	4,55*	4,55*	4,55*
pH ngày 1	4,54	4,51	4,52	4,48	4,47
pH ngày 7	4,45	4,45	4,40	4,34	4,35
pH ngày 14	4,37	4,44	4,37	4,32	4,34
pH ngày 21	4,35	4,39	4,35	4,29	4,29
pH ngày 28	4,34	4,37	4,33	4,27	4,26
mức giảm của độ pH	0,21	0,18	0,22	0,28	0,29

*Bước lên men được chấm dứt bằng cách làm lạnh ở độ pH = 4,55.

Như thấy rõ được từ Bảng 15, tình trạng hậu axit ở mức tương tự đối với mẫu tham khảo không chứa lactaza và mẫu thử nghiệm chứa lactaza.

Phân tích hydrat cacbon

Bảng 16: Phân tích hydrat cacbon ngày 1

Mẫu	1	2	3	4	5
Lactaza (LAU/L)	0	1000	0	1000	1000
Sucroza (%) bắt đầu lên men	1,5	0,5	9,5	6,5	7,0
Fructoza (mg/g)	1,96	<1	2,70	1,74	1,88
Galactoza (mg/g)	<2	29,19	<2	27,83	27,89
Glucoza (mg/g)	<1	27,37	<1	27,29	27,40
Lactoza (mg/g)	56,11	<2	54,56	<2	<2
Sucroza (mg/g)	5,45	<4	63,44	39,79	45,44

Bảng 17: Phân tích hydrat cacbon ngày 28

Mẫu	1	2	3	4	5
Lactaza (LAU/L)	0	1000	0	1000	1000
Sucroza (%) bắt đầu lên men	1,5	0,5	9,5	6,5	7,0
Fructoza (mg/g)	1,88	<1	4,72	2,95	3,39
Galactoza (mg/g)	3,90	28,83	<2	28,79	29,15
Glucoza (mg/g)	2,69	26,78	1,66	26,83	27,27
Lactoza (mg/g)	50,71	<2	52,42	<2	<2
Sucroza (mg/g)	4,18	<4	62,07	39,91	46,17

Như thấy rõ được từ các Bảng 16 và 17, đối với 3 mẫu thử nghiệm, tại giai đoạn cuối của quá trình lên men lượng lactoza là rất thấp và lượng glucoza và galactoza là rất cao so với mẫu tham khảo thể hiện hoạt tính cao của lactaza được thêm

vào.

Sữa lên men có mức lactoza thấp và mức glucoza và galactoza cao có lượng ngọt cao hơn nhiều so với sữa lên men có mức lactoza cao và mức glucoza và galactoza thấp giống như mẫu tham khảo. Lý do của nó là ở chỗ glucoza và galactoza có độ ngọt cao hơn nhiều so với lactoza.

Độ chắc gel và ứng suất cắt

Bảng 18: Độ chắc gel và ứng suất cắt

Mẫu	1		2		3		4		5	
Lactaza (LAU/L)	0		1000		0		1000		1000	
Sucroza (%) bắt đầu lên men	1,5		0,5		9,5		6,5		7,0	
Độ chắc gel (g)	51,13		49,41		45,04		45,94		47,89	
Ứng suất cắt ở 1 s ⁻¹ (Pa)	9,4	9,3	8,4	8,5	8,1	8,5	7,7	7,8	8,3	8,5
Ứng suất cắt ở 30,2 s ⁻¹ (Pa)	39,4	38,5	38,2	37,6	34,3	34,7	37,3	37,1	38,8	38,9
Ứng suất cắt ở 135 s ⁻¹ (Pa)	61,0	59,5	65,8	65,1	56,8	56,8	72,7	72,3	74,8	74,9
Ứng suất cắt ở 300 s ⁻¹ (Pa)	72,1	70,5	78,8	77,6	69,1	69,1	86,7	86,6	89,4	89,4

Như thấy rõ được từ Bảng 18, ứng suất cắt của 3 mẫu thử nghiệm chứa lactaza tăng lên đáng kể so với mẫu tham khảo không có lactaza.

Ví dụ 8

Tạo ra sữa chua bằng cách sử dụng lactaza từ Bifidobacterium bifidum và thêm men cái thiếu hụt lactoza của lactaza trước và sau khi lên men

Kế hoạch thử nghiệm

Bảng 19: Kế hoạch thử nghiệm

Mẫu	Thời gian thêm lactaza	Nền sữa	Sucroza (%)	Lactaza (LAU/L)
1	Không	1	0,70	0
2	Cùng lúc với nuôi cấy	1	0,70	600
3	Cùng lúc với nuôi cấy	1	0,70	800
4	Cùng lúc với nuôi cấy	1	0,70	1000
5	Cùng lúc với nuôi cấy	1	0,70	1400
6	Không	2	0,97	0
7	Sau khi lên men	2	0,97	800
8	Sau khi lên men	2	0,97	1600
9	Sau khi lên men	2	0,97	2400
10	Sau khi lên men	2	0,97	3200

Nhiệt độ lên men là 43°C. Độ pH cuối cùng là 4,50. Các thành phần của nền sữa được trộn với nhau và được để hydrat hóa trong 2 giờ ở 6°C. Tiếp theo, nền sữa được thanh trùng ở 95°C trong 5 phút và được đồng hóa ở 200/50 bar ở 65°C. Bước lên men được thực hiện ở 43°C đến độ pH cuối cùng là 4,50 để tạo thành sữa chua. Sữa chua được làm lạnh đến 6°C. Sữa chua đã làm lạnh được bảo quản ở 6°C.

Men cái

Men cái chứa chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28952, chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28953, và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28910.

Lactaza

Lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa của SEQ ID NO. 2.

Nền sữa

Bảng 20: Thành phần của nền sữa 1

	Lượng (g)	Hàm lượng protein (%)	Hydrat cacbon (%)	Chất béo (%)
Sucroza	22	0,0	100,0	0,0
0,5% sữa	1500	3,8	4,8	0,5
1,5% sữa	1500	3,6	4,7	1,5
Bột sữa gầy Arla	103	34,0	54,0	1,0
Nền sữa toàn phần	3125	4,67	7,05	0,98

Bảng 21: Thành phần của nền sữa 2

	Lượng (g)	Hàm lượng protein (%)	Hydrat cacbon (%)	Chất béo (%)
Sucroza	30	0,0	100,0	0,0
0,5% sữa	1500	3,8	4,8	0,5
1,5% sữa	1500	3,6	4,7	1,5
Bột sữa gầy Arla	103	34,0	54,0	1,0
Nền sữa toàn phần	3133	4,66	7,30	1,00

Phép đo

Tất cả phép đo được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong Ví dụ 5.

Kết quả

Tình trạng hậu axit

Bảng 22: Tình trạng hậu axit

Mẫu	Thời gian thêm lactaza	Nền sữa	Lactaza (LAU/L)	pH ngày 0	pH Ngày 7	pH Ngày 28	pH Ngày 42	Độ giảm pH
1	Không	1	0	4,89*	4,89*	4,87	4,84	0,05
2	Cùng lúc với nuôi cấy	1	600	4,26	4,23	4,23	4,22	0,04
3	Cùng lúc với nuôi cấy	1	800	4,22	4,26	4,24	4,24	-0,02
4	Cùng lúc với nuôi cấy	1	1000	4,32	4,26	4,26	4,26	0,06
5	Cùng lúc với nuôi cấy	1	1400	4,36	4,30	4,28	4,27	0,09
6	Không	2	0	4,47	4,47	4,47	4,44	0,03
7	Sau khi lên men	2	800	4,43	4,40	4,42	4,38	0,05
8	Sau khi lên men	2	1600	4,44	4,40	4,42	4,39	0,05
9	Sau khi lên men	2	2400	4,41	4,43	4,40	4,40	0,01
10	Sau khi lên men	2	3200	NA	4,43	4,41	4,40	NA

* sucroza không đủ để thu được sự lên men đến pH đích. Do đó, mẫu này không thể được sử dụng làm mẫu tham khảo.

Như thấy rõ được từ Bảng 22, tình trạng hậu axit trong thời gian là 42 ngày ở mức thấp hơn 0,09 đối với tất cả các lượng lactaza được thử nghiệm có thêm lactaza ở giai đoạn bắt đầu của quá trình lên men và thậm chí còn ở mức thấp hơn 0,05 đối với tất cả các lactaza được thử nghiệm có thêm lactaza tại giai đoạn cuối của quá trình lên men. Việc thêm lactaza tại giai đoạn cuối của sự lên men không dẫn đến tình trạng hậu axit khác biệt đáng kể so với mẫu tham khảo không có lactaza được thêm vào. Do đó, thử nghiệm này cho thấy rằng, việc sử dụng lactaza có độ pH ổn định thấp kết hợp với men cái thiếu hụt lactoza không dẫn đến sự gia tăng không thể chấp nhận được của tình trạng hậu axit, mà có thể thu được bằng men cái như vậy. Điều này đúng cả khi lactaza được thêm vào ở giai đoạn bắt đầu và tại giai đoạn cuối của quá trình lên men.

Độ chắc gel và ứng suất cắt

Bảng 23: Độ chắc gel và Ứng suất cắt

Mẫu	Thời gian thêm lactaza	Nền sữa	Sucroza (%)	Lactaza (LAU/L)	Độ chắc gel (g)	Ứng suất cắt (Pa)
1	Không	1	0,70	0	0,187*	46,4*
2	Cùng lúc với nuôi cấy	1	0,70	600	0,281	63,9
3	Cùng lúc với nuôi cấy	1	0,70	800	0,302	65,3
4	Cùng lúc với nuôi cấy	1	0,70	1000	0,318	64,5
5	Cùng lúc với nuôi cấy	1	0,70	1400	0,307	63,7
6	Không	2	0,97	0	0,304	53,1
7	Sau khi lên men	2	0,97	800	0,312	51,4
8	Sau khi lên men	2	0,97	1600	0,322	52,8
9	Sau khi lên men	2	0,97	2400	0,323	52,9
10	Sau khi lên men	2	0,97	3200	0,320	51,7

*sucroza không đủ để thu được sự lên men đến pH đích. Do đó, mẫu này không thể được sử dụng làm mẫu tham khảo.

Như thấy rõ được từ Bảng 23, lượng cao của cả độ chắc gel và ứng suất cắt đã đạt được đối với tất cả các lượng lactaza được thử nghiệm có thêm lactaza ở giai đoạn bắt đầu của quá trình lên men. Đối với mức lactaza được thử nghiệm có thêm lactaza tại giai đoạn cuối của quá trình lên men, lượng chắc gel và ứng suất cắt có phần thấp hơn, điều này là do sự trộn lẫn của lactaza vào sữa chua, một phần phá vỡ cấu trúc của

sữa chua. Đối với tất cả các mức lactaza được thử nghiệm có thêm lactaza tại giai đoạn cuối của quá trình lên men, độ chắc gel cao hơn một chút so với mẫu tham khảo không có lactaza được thêm vào. Đối với tất cả các mức lactaza được thử nghiệm mà có thêm lactaza tại giai đoạn cuối của quá trình lên men, ứng suất cắt được duy trì ở cùng mức hoặc thấp hơn một chút.

Phân tích hydrat cacbon

Bảng 24: Phân tích hydrat cacbon

Mẫu	Lactaza (LAU/L)	Galactoza Ngày 20 (mg/g)	Glucosa Ngày 20 (mg/g)	Sucroza Ngày 20 (mg/g)	Lactoza Ngày 20 (mg/g)	Lactoza 24 giờ (%)	Lactoza Ngày 20 (%)
1	0	2,4	2,3	<1,0	50,7	ND	ND
2	600	29,5	27,7	<1,0	<0,5	>0,1	0,023
3	800	30,2	28,1	<1,0	<0,5	0,028	0,016
4	1000	30,0	27,8	<1,0	<0,5	0,014	0,014
5	1400	29,5	27,4	<1,0	<0,5	0,006	0,013
6	0	4,2	4,2	<1,0	49,2	ND	ND
7	800	31,2	30,7	<1,0	<0,5	>0,2	0,014
8	1600	30,7	30,2	<1,0	<0,5	>0,1	0,012
9	2400	31,2	30,6	<1,0	<0,5	0,029	0,011
10	3200	31,8	31,2	<1,0	<0,5	0,015	0,011

Như thấy rõ được từ Bảng 24, ở ngày 20 nồng độ cao của galactoza và glucosa được tạo ra đối với tất cả các mức lactaza được thử nghiệm đối với cả việc thêm lactaza vào ở giai đoạn bắt đầu và tại giai đoạn cuối của quá trình lên men. Ngoài ra,

vào ngày 20, lượng glucoza thấp hơn giới hạn phát hiện là 0,5mg/g, mà đáp ứng được là không có lactoza ở một số quốc gia. Đối với lượng cao hơn của lactaza, hầu hết việc loại bỏ lactoza sẽ đạt được 24 giờ sau khi kết thúc quá trình lên men.

Ví dụ 9

Tạo ra sữa chua bằng cách sử dụng lactaza từ Bifidobacterium bifidum và thêm men cái thiếu hụt lactoza của lactaza trước khi lên men I

Kế hoạch thử nghiệm

Bảng 25: Kế hoạch thử nghiệm

Mẫu	Sucroza (%)	Lactaza (LAU/L)
1	0	0
2	0	1000
3	0	1200
4	0	1600
5	0,2	0
6	0,2	1000
7	0,2	1200
8	0,2	1600
9	0,7	0
10	0,7	1000
11	0,7	1200
12	0,7	1600

Nhiệt độ lên men là 43°C. Độ pH cuối cùng là 4,45, Các thành phần của nền sữa được trộn với nhau và được để hydrat hóa trong 2 giờ ở 6°C. Tiếp theo, nền sữa được thanh trùng ở 95°C trong 5 phút và được đồng hóa ở 200/50 bar ở 65°C. Bước lên men được thực hiện ở 43°C đến độ pH cuối cùng là 4,45 để tạo thành sữa chua. Sữa chua được làm lạnh đến 5°C. Sữa chua đã làm lạnh được bảo quản ở 6°C.

Men cái

Men cái chứa chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28952, chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28953, và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được lưu giữ với số hiệu lưu giữ No. DSM 28910.

Lactaza

Lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* có trình tự mã hóa của SEQ ID NO. 2.

Nền sữa

Bảng 26: Thành phần của nền sữa

	Lượng (g)	Hàm lượng protein (%)	Hydrat cacbon (%)	Chất béo (%)
0,5% sữa	1500	3,8	4,8	0,5
1,5% sữa	1500	3,6	4,7	1,5
Bột sữa gầy Arla	103	34,0	54,0	1,0
Nền sữa toàn phần	3103	4,70	6,39	0,99

Phép đo

Tất cả phép đo được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như

trong Ví dụ 5.

Kết quả

Tình trạng hậu axit

Bảng 27: Tình trạng hậu axit

Mẫu	Sucroza (%)	Lactaza (LAU/L)	pH Ngày 0	pH Ngày 1	pH Ngày 14	pH Ngày 28	pH Ngày 42	Độ giảm pH
1	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	1000	4,45	4,39	4,36	4,33	4,39	0,06
3	0	1200	4,45	4,39	4,38	4,34	4,39	0,06
4	0	1600	4,46	4,39	4,38	4,34	4,39	0,07
5	0,2	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	0,2	1000	4,50	4,44	4,40	4,40	4,43	0,07
7	0,2	1200	4,53	4,47	4,46	4,42	4,46	0,07
8	0,2	1600	4,53	4,49	4,46	4,44	4,47	0,06
9	0,7	0	4,76	4,73	4,69	4,68	4,70	0,06
10	0,7	1000	4,44	4,40	4,39	4,33	4,38	0,06
11	0,7	1200	4,46	4,40	4,39	4,33	4,39	0,07
12	0,7	1600	4,47	4,41	4,40	4,34	4,41	0,06

Như thấy rõ được từ Bảng 27, tình trạng hậu axit trong thời gian là 42 ngày ở mức rất thấp là khoảng 0,06 đối với tất cả các lượng lactaza được thử nghiệm. Do đó, thử nghiệm này cho thấy rằng, việc sử dụng lactaza có độ pH ổn định thấp kết hợp với

men cái thiếu hụt lactoza không dẫn đến sự gia tăng không thể chấp nhận được của tình trạng hậu axit, mà có thể thu được bằng men cái như vậy.

Độ chắc gel và ứng suất cắt

Bảng 28: Độ chắc gel và Ứng suất cắt

Mẫu	Sucroza (%)	Lactaza (LAU/L)	Độ chắc gel (g)	Ứng suất cắt (Pa)
1	0	0	ND	ND
2	0	1000	0,386	70,3
3	0	1200	0,377	69,8
4	0	1600	0,388	69,5
5	0,20	0	ND	ND
6	0,20	1000	0,380	70,7
7	0,20	1200	0,378	69,5
8	0,20	1600	0,397	70,2
9	0,70	0	ND	ND
10	0,70	1000	0,362	71,2
11	0,70	1200	0,375	72,2
12	0,70	1600	0,362	71,9

Như thấy rõ được từ Bảng 28, lượng cao của cả độ chắc gel và ứng suất cắt thu được đối với tất cả mức lactaza được thử nghiệm. Độ chắc gel và độ bền cắt có thứ tự về độ lớn là giống như đối với tất cả 3 mức lactaza được thử nghiệm.

Phân tích hydrat cacbon

Bảng 29: Phân tích hydrat cacbon

Mẫu	Sucroza (%)	Lactaza (LAU/L)	Fructoza (mg/g)	Galactoza (mg/g)	Glucoza (mg/g)	Lactoza (mg/g)	Sucroza (mg/g)
1	0	0	<0,5	6,3	<0,5	45,5	<2
2	0	1000	<0,5	30,7	26,0	<0,9	<2
3	0	1200	<0,5	31,5	26,6	<0,9	<2
4	0	1600	<0,5	30,9	25,8	<0,9	<2
5	0,20	0	<0,5	11,7	6,7	36,1	<2
6	0,20	1000	<0,5	30,8	27,8	<0,9	<2
7	0,20	1200	<0,5	31,6	28,3	<0,9	<2
8	0,20	1600	<0,5	31,5	28,0	<0,9	<2
9	0,70	0	1,1	9,1	9,1	43,4	<2
10	0,70	1000	1,1	31,1	29,5	<0,9	<2
11	0,70	1200	1,0	32,1	30,3	<0,9	1,8
12	0,70	1600	0,9	31,8	29,9	<0,9	1,9

Như thấy rõ được từ Bảng 29, đối với mẫu thử nghiệm chứa lactaza, tại giai đoạn cuối của quá trình lên men lượng lactoza là rất thấp và lượng glucoza và galactoza là rất cao so với mẫu tham khảo thể hiện hoạt tính cao của lactaza được thêm vào.

Sữa lên men có mức lactoza thấp và mức glucoza và galactoza cao có lượng ngọt cao hơn nhiều so với sữa lên men có mức lactoza cao và mức glucoza và galactoza thấp giống như mẫu tham khảo. Lý do của nó là ở chỗ glucoza và galactoza có độ ngọt cao hơn nhiều so với lactoza.

Danh sách trình tự

SEQ ID NO.: 1 thể hiện trình tự của thể đột biến của SEQ ID NO. 4.

SEQ ID NO.: 2 thể hiện trình tự của thể đột biến của SEQ ID NO. 4.

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

SEQ ID NO.: 4 thể hiện trình tự của lactaza từ *Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171, trình tự nucleotit mà được nêu trong NCBI với số lưu giữ DQ448279.

SEQ ID NO: 4 được bàn luận trong các tài liệu tham khảo sau đây, trong đó nó đề cập đến là bbgIII:

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

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

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

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình tạo ra sản phẩm sữa lên men, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- 1) thêm men cái chứa ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic vào nền sữa,
- 2) lên men sữa trong khoảng thời gian cho đến khi đạt được độ pH đích,
- 3) trong đó men cái chứa ít nhất một chủng thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và
- 4) thêm lactaza có độ pH ổn định thấp vào quy trình tại thời điểm bắt đầu, trong hoặc cuối của bước lên men, trong đó lactaza có độ pH ổn định thấp vẫn giữ được hoạt tính của nó ở độ pH = là 5,0 và nhiệt độ là 37°C ở lượng ít nhất là 5% so với hoạt tính của nó tại độ pH tối ưu của lactaza.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó lactaza có độ pH ổn định thấp vẫn giữ được hoạt tính của nó ở nhiệt độ là 10°C và độ pH = là 6,0 ở lượng ít nhất là 10% so với hoạt tính của nó ở nhiệt độ tối ưu của lactaza.

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chủng thiếu hụt lactoza có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza được chọn từ nhóm bao gồm sucroza, galactoza và glucoza.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa ở giai đoạn bắt đầu của bước lên men.

5. Quy trình theo điểm 4, trong đó hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa với lượng được xác định sao cho được rút kiệt và do đó dẫn đến làm ngừng sự tăng trưởng của vi khuẩn axit lactic và làm chấm dứt sự lên men.

6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lactaza có độ pH ổn định thấp được thêm vào nền sữa ở giai đoạn bắt đầu của bước lên men.

7. Quy trình theo điểm 6, trong đó hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào bước lên men, và trong đó ít nhất một chủng axit lactic thiếu hụt lactoza của men cái có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon được chọn từ nhóm bao gồm glucoza và galactoza.

8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó lactaza có độ pH ổn định thấp được thêm vào nền sữa tại giai đoạn cuối của bước lên men.

9. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó chủng thiếu hụt lactoza được chọn từ nhóm bao gồm *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza.

10. Quy trình theo điểm 9, trong đó chủng thiếu hụt lactoza được chọn từ nhóm bao gồm:

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

(i) chủng được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu lưu giữ No. DSM 28952;

(ii) hoặc chủng thu được từ DSM 28952, trong đó chủng thu được này còn được mô tả là có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trong môi trường chứa lactoza và X-Gal;

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

(i) chủng được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu lưu giữ No. DSM 28953;

(ii) hoặc chủng thu được từ DSM 28953, trong đó chủng thu được này còn được mô tả là có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trong môi trường chứa lactoza và X-Gal;

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

(i) chủng được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu lưu giữ No. DSM 28910;

(ii) hoặc chủng thu được từ DSM 28910, trong đó chủng thu được này còn được mô tả là có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trong môi trường chứa lactoza và X-Gal.

11. Quy trình theo điểm 9 hoặc 10, trong đó men cái chứa ít nhất một *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza và ít nhất một thiếu hụt lactoza *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

12. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó men cái chứa ít nhất một *Streptococcus thermophilus* và ít nhất một *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, và trong đó tất cả các chủng *Streptococcus thermophilus* và tất cả các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* đều thiếu hụt lactoza.

13. Sản phẩm sữa lên men chứa men cái của bước 3) và lactaza có độ pH ổn định thấp được thêm vào trong bước 4) được tạo ra theo quy trình bao gồm các bước:

- 1) thêm men cái chứa ít nhất một chủng vi khuẩn axit lactic vào nền sữa,
- 2) lên men sữa trong khoảng thời gian cho đến khi đạt được độ pH

đích,

3) trong đó men cái chứa ít nhất một chủng thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và

4) thêm lactaza có độ pH ổn định thấp vào quy trình tại thời điểm bắt đầu, trong hoặc cuối của bước lên men, trong đó lactaza có độ pH ổn định thấp vẫn giữ được hoạt tính của nó ở độ pH = là 5,0 và nhiệt độ là 37°C ở lượng ít nhất là 5% so với hoạt tính của nó tại độ pH tối ưu của lactaza.

14. Sản phẩm sữa lên men theo điểm 13, trong đó lactaza có độ pH ổn định thấp vẫn giữ được hoạt tính của nó ở nhiệt độ là 10°C và độ pH = là 6,0 ở lượng ít nhất là 10% so với hoạt tính của nó ở nhiệt độ tối ưu của lactaza.

15. Sản phẩm sữa lên men theo điểm 13 hoặc 14, trong đó chủng thiếu hụt lactoza có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza được chọn từ nhóm bao gồm sucroza, galactoza và glucoza.

16. Sản phẩm sữa lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 15, trong đó hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa ở giai đoạn bắt đầu của bước lên men.

17. Sản phẩm sữa lên men theo điểm 16, trong đó hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa với lượng được xác định sao cho được rút kiệt và do đó dẫn đến làm ngừng sự tăng trưởng của vi khuẩn axit lactic và làm chấm dứt sự lên men.

18. Sản phẩm sữa lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 17, trong đó lactaza có độ pH ổn định thấp được thêm vào nền sữa ở giai đoạn bắt đầu của bước lên men.

19. Sản phẩm sữa lên men theo điểm 18, trong đó hydrat cacbon không phải lactoza

được thêm vào bước lên men, và trong đó ít nhất một chủng axit lactic thiếu hụt lactoza của men cái có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon được chọn từ nhóm bao gồm glucoza và galactoza.

20. Sản phẩm sữa lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 17, trong đó lactaza có độ pH ổn định thấp được thêm vào nền sữa tại giai đoạn cuối của bước lên men.

21. Sản phẩm sữa lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 20, trong đó chủng thiếu hụt lactoza được chọn từ nhóm bao gồm *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza.

22. Sản phẩm sữa lên men theo điểm 21, trong đó chủng thiếu hụt lactoza được chọn từ nhóm bao gồm:

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

(i) chủng được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu lưu giữ No. DSM 28952;

(ii) hoặc chủng thu được từ DSM 28952, trong đó chủng thu được này còn được mô tả là có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trong môi trường chứa lactoza và X-Gal;

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

(i) chủng được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu lưu giữ No. DSM 28953;

(ii) hoặc chủng thu được từ DSM 28953, trong đó chủng thu được này còn được mô tả là có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trong môi trường chứa lactoza và X-Gal;

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

(i) chủng được lưu giữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Đức (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu lưu giữ No. DSM 28910;

(ii) hoặc chủng thu được từ DSM 28910, trong đó chủng thu được này còn được mô tả là có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trong môi trường chứa lactoza và X-Gal.

23. Sản phẩm sữa lên men theo điểm 21 hoặc 22, trong đó men cái chứa ít nhất một *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza và ít nhất một thiếu hụt lactoza *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

24. Sản phẩm sữa lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 21 đến 23, trong đó men cái chứa ít nhất một *Streptococcus thermophilus* và ít nhất một *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, và trong đó tất cả các chủng *Streptococcus thermophilus* và tất cả các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* đều thiếu hụt lactoza.

25. Sản phẩm sữa lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 24, trong đó

sản phẩm sữa lên men được chọn từ nhóm bao gồm sữa chua, kem phomat, sữa lên men chua, kem lên men chua, sữa bơ, váng sữa lên men, sữa nuôi cấy, Smetana, Kefir, sữa chua uống, và Yakult

26. Sản phẩm sữa lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 24, trong đó sản phẩm sữa lên men chứa sản phẩm thực phẩm khác được chọn từ nhóm bao gồm đồ uống hoa quả, sản phẩm ngũ cốc lên men, sản phẩm ngũ cốc axit hóa hóa học, sản phẩm sữa đậu nành và hỗn hợp bất kỳ của nó.

27. Sản phẩm sữa lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 24, trong đó sản phẩm sữa lên men chứa protein với hàm lượng thấp nằm trong khoảng từ 2,0% khối lượng đến 3,5% khối lượng, nằm trong khoảng từ 1,0% khối lượng đến 2,0% khối lượng và 2,0% khối lượng, hoặc lớn hơn 3,5% khối lượng.