



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

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

(11)



1-0050333

(51)^{2017.01} A21D 15/08; A21D 13/24; A21D 8/04; (13) B
A21D 13/00; A21D 13/28

(21) 1-2016-05225

(22) 22/06/2015

(86) PCT/NZ2015/000044 22/06/2015

(87) WO2015/199552 30/12/2015

(30) 626691 25/06/2014 NZ

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/05/2017 350A

(73) GOODMAN FIELDER NEW ZEALAND LIMITED (NZ)

C/- James & Wells, Level 2, 123 Carlton Gore Road, Newmarket, Auckland, 1023,
New Zealand

(72) NAG, Arup (NZ); DAS, Shantanu (NZ).

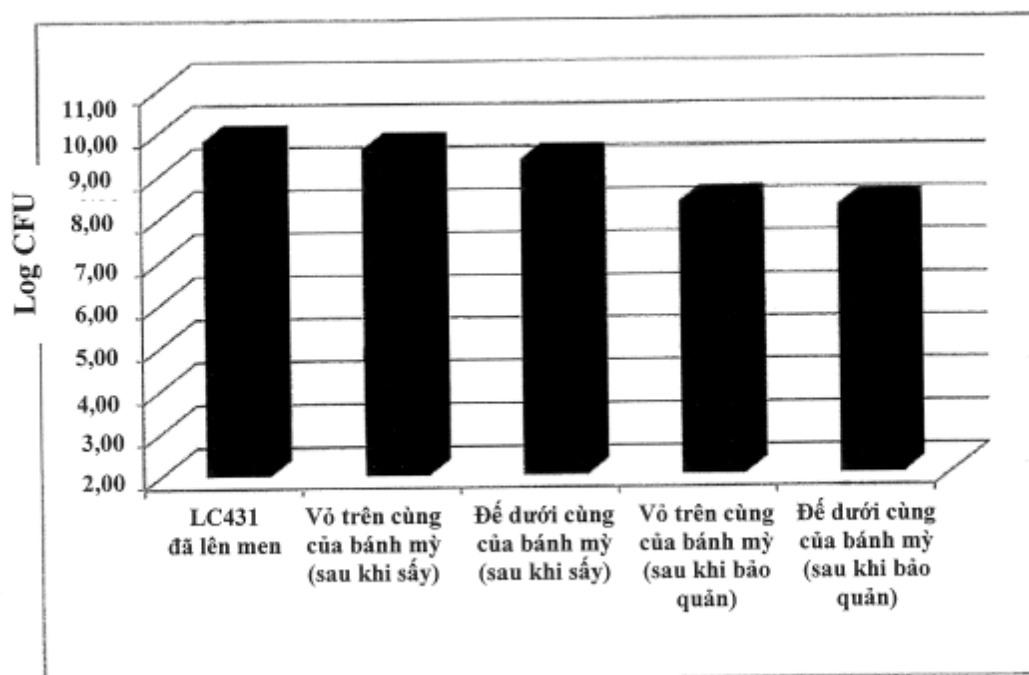
(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) SẢN PHẨM THỰC PHẨM ĐƯỢC LÀM GIÀU LỢI KHUẨN

(21) 1-2016-05225

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn, khác biệt ở bước phủ chế phẩm đã được cấy ít nhất một sinh vật lợi khuẩn lên ít nhất một phần bề mặt của sản phẩm thực phẩm này, trong đó chế phẩm này chứa nền thu được từ sữa nguyên kem và/hoặc bao gồm các thành phần vốn được tìm thấy trong sữa.

Fig.1



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn và quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bánh mỳ là thực phẩm chủ yếu ở hầu hết các nơi trên thế giới. Do đó, trong ngành công nghiệp thực phẩm và sức khỏe có sự quan tâm lớn đến việc sử dụng bánh mỳ như một nền tảng cho các lợi ích sức khỏe mục tiêu và chức năng, bao gồm các lợi khuẩn.

Lợi khuẩn là vi sinh vật sống bổ sung vào gây tác động có lợi đến người nhận nhờ tác dụng của nó trên đường ruột. Ngoài ra, lợi khuẩn là một trong ba thành phần thực phẩm được sử dụng để tăng cường sức khỏe đường ruột (các thành phần còn lại là hydrat cacbon không tiêu hóa được và các chất chuyển hóa từ thực vật có hoạt tính sinh học).

Đến nay, các nỗ lực để phát triển bánh mỳ chức năng hữu ích về mặt thương mại chứa các vi sinh vật sống vẫn chưa tiến triển và/hoặc được tiếp thị thành công.

Trước hết, đó là vì trong 5-10 năm qua chủ yếu tập trung vào phát triển loại bánh mỳ chứa lợi khuẩn được trộn nguyên vẹn vào trong bánh mỳ này trước khi nướng.

Vấn đề chính, như đã được minh họa bởi Zhang et., al., 2014 (Journal of Food Engineering), là hầu hết các chủng nuôi cấy lợi khuẩn mà an toàn cho người sử dụng đều nhạy cảm với nhiệt. Do đó, khả năng sống sót của tế bào bị giảm đáng kể trong quá trình nướng, điều này tất yếu làm giảm hiệu quả của lợi khuẩn trong ruột khi được sử dụng. Đó là so với sữa chua chứa lợi khuẩn sống, chẳng hạn, mà có log CFU (đơn vị tạo khuẩn lạc, ước tính số lượng tế bào vi khuẩn sống trong mẫu) chấp nhận được trong điều trị là cao hơn 6.

Các nỗ lực đã được thực hiện để giải quyết vấn đề này.

Ví dụ, trong Altamirano-Fortoul et al., 2012 (Food Hydrocolloids), các tác giả mô tả lợi khuẩn được bao trong vi nang và/hoặc việc sử dụng tinh bột làm lớp bảo vệ vi khuẩn, trước khi nướng bánh mì. Tuy nhiên, với phương pháp bao nang này, khả năng sống của tế bào vi khuẩn bị giảm do gia nhiệt.

Với mục đích thương mại, việc bao nang vi khuẩn cũng rất khó thực hiện, và phương pháp này không chắc có thể được sản xuất hiệu quả trên quy mô lớn hoặc sử dụng nồng độ/số lượng lợi khuẩn lớn để cải thiện số lượng tế bào sống. Chưa có cơ chế bao nang có khả năng áp dụng thương mại nào được phát triển để bảo vệ trong bước nướng ở nhiệt độ cao.

Ngoài ra, tác giả đã báo cáo những thay đổi gây ra vấn đề về các đặc điểm hóa lý của vỏ bánh, sự tăng hoạt độ nước và sự giảm tác dụng gây hồng bánh mì. Tác giả gợi ý rằng việc đánh giá bằng cảm quan sẽ giúp bánh mì dễ được chấp nhận hơn. Tuy nhiên, chủ đơn thấy rằng tinh bột được bổ sung vào sẽ làm giảm đáng kể thông số cảm quan (ví dụ, mùi vị, cảm giác và/hoặc hình thức bên ngoài) của bánh mì.

Theo cách tương tự, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20130115334 mô tả thành phần lợi khuẩn được tạo hạt đã được báo cáo là chịu được quá trình xử lý ở nhiệt độ cao. Khi được bổ sung vào bột bánh mì và nướng ở 200°C trong 10 phút, đã được báo cáo là 50-80% số lượng tế bào còn sống sót.

Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2010/0210000 đã nỗ lực giải quyết vấn đề gia nhiệt bằng cách sử dụng lợi khuẩn tạo bào tử, chịu được nhiệt, gọi là *Bacillus coagulans* trong quá trình nướng.

Nhược điểm chính của việc sử dụng *Bacillus* là ở chỗ nó là loài hoặc chủng đơn, và không hữu hiệu bằng hỗn hợp của các chủng nuôi cấy khác như vi sinh vật *Lactobacillus* và *bifido* mà có thể hướng đến nhiều người tiêu dùng có profin vi sinh đường ruột hoặc profin bệnh đường ruột khác nhau. Đã chứng minh được là hiệu quả của lợi khuẩn thay đổi khá nhiều theo hệ miễn dịch hoặc tiêu hóa của vật chủ. Do đó, chủng vi khuẩn đơn lẻ rất đặc hiệu như chủng đã được mô tả trong US 2010/0210000 đã được thừa nhận là có những lợi ích điều trị rất hạn chế cho toàn bộ nhóm người sử dụng cuối cùng.

Ngoài ra, một số loài thuộc chi *Bacillus* là các mầm bệnh (ví dụ, *Bacillus subtilis* gây ngộ độc thực phẩm). Tổng giám đốc Ủy ban Châu Âu về y tế và bảo vệ người tiêu dùng (cập nhật đến ngày 17, tháng 10, năm 2002) đã xác nhận là một số chủng *Bacillus* “có thể gây ra các vấn đề và chỉ nên chấp nhận các chủng đã được xác định rõ ràng, mà đã được kiểm tra là âm tính với độc tố và khả năng gây bệnh *in vitro* và *in vivo*.” Do đó, được cho là do nguy cơ tiềm ẩn và/hoặc nhận thức của cộng đồng về nguy cơ tiềm ẩn này, bánh mỳ được làm giàu *Bacillus coagulans* không trở nên phổ biến. Rõ ràng là bánh mỳ được làm giàu lợi khuẩn đáng tin cậy nhất (ví dụ, *Lactobacillus*) hiện nay vẫn chưa xuất hiện, có thể là do thiếu các giải pháp kỹ thuật sẵn có, chẳng hạn kỹ thuật bao nang như đã thảo luận trước đây.

WO 1998009839 mô tả việc sử dụng chế phẩm kiểu bột nhào được phủ lên sản phẩm thực phẩm, hoặc bên trong sản phẩm thực phẩm để làm chất độn, ví dụ trong lát bánh mỳ mỏng. Mục đích của việc sử dụng bột nhào đã được thảo luận là có ưu điểm vì nó làm giảm sự sinh trưởng của lợi khuẩn, và đồng thời, hỗ trợ khả năng sống sót trong quá trình bảo quản. Lợi khuẩn được trộn với chất béo để tạo ra độ sệt kiểu bột nhào.

Tương tự, EP1269857 và WO 2007/058614 mô tả chế phẩm kiểu chất độn hoặc bột nhào tương tự được sử dụng để độn hoặc phủ lên sản phẩm thực phẩm.

Vấn đề chính của các bột nhào này là chúng sẽ làm thay đổi mùi vị và hình thức bên ngoài của sản phẩm thực phẩm một cách không mong muốn. Trong trường hợp bánh mỳ, mục đích thương mại là tạo ra bánh mỳ chứa lợi khuẩn không làm thay đổi đáng kể mùi vị hoặc hình thức bên ngoài so với bánh mỳ bình thường.

Thứ hai, các thành phần được sử dụng để tạo ra độ sệt giống bột nhào thường đòi hỏi bổ sung chất béo, chất làm đặc không tự nhiên hoặc các chất phụ gia khác, và/hoặc cần chất làm ngọt để che giấu mùi vị của sản phẩm. Đây lại là một nhược điểm, vì nó làm giảm tác dụng có lợi cho sức khỏe chung của sản phẩm, hoặc ít nhất là được nhận thức như vậy bởi người sử dụng.

Soukoulis et al., 2014 (Food Hydrocolloids) mô tả chế phẩm hỗ trợ các màng lợi khuẩn sống (với *Lactobacillus rhamnosus* GG) được phủ lên bề mặt của bánh mỳ. Chế phẩm này bao gồm hydrogel như natri alginat đã được đề cập là có vai trò

quan trọng trong việc duy trì tốt độ ổn định và khả năng sống sót của vi sinh vật. Mặc dù các kết quả gợi ý là bánh mỳ có màng lợi khuẩn không thể hiện sự khác biệt quan sát được bằng mắt thường và khác biệt về độ ổn định so với bánh mỳ đối chứng, nhưng vẫn chưa chứng minh được là màng này có tác dụng bất kỳ nào trên profin cảm quan của bánh mỳ hay không.

Ngoài ra, quy trình sản xuất để tạo ra thành phẩm, như được chỉ ra trong đoạn 2.2 và 2.3 của Soukoulis et al., là không thuận tiện và mất nhiều thời gian. Các môi trường nuôi cấy ban đầu (dung dịch đệm PBS và sau đó là canh trường MRS) được sử dụng để nuôi cấy và tạo ra các phần phân ước được làm đông lạnh để sử dụng tiếp. Sau đó trong bước tiếp theo, các dung dịch tạo màng mỏng cần được điều chế bằng cách phân tán lại các nguyên liệu khô (ví dụ, natri alginat và các chất phụ gia khác) trong nước, và sau đó các phần phân ước đông lạnh của *L. Rhamnosus* được bổ sung vào trước khi phủ lên bánh mỳ.

WO 2002/065840 mô tả chế phẩm được sử dụng trên ngũ cốc, ngay sau quá trình lên men. Quy trình này được xem là có lợi vì nó không đòi hỏi bước sấy ở nhiệt độ cao. Ngũ cốc được chứng minh là thể hiện độ ổn định tốt khi bảo quản, giữ được CFU cao và hình thức tương tự như ngũ cốc không có lợi khuẩn.

Quan trọng là phải xem xét để các thành phẩm ngũ cốc trong WO 2002/065840 có hoạt độ nước là 0,2, sao cho ngũ cốc này có thể hấp thu lượng ẩm còn lại đi vào theo lợi khuẩn (không bao gồm bước sấy khô) và nói chung, hoạt độ nước của hỗn hợp cuối cùng không vượt quá 0,2. Mặt khác, sản phẩm bánh mỳ có hoạt độ nước cao hơn nhiều, ít nhất là 0,5 và thông thường là khoảng 0,8 đến 0,9. Ví dụ, hoạt độ nước của ruột bánh mỳ là 0,8 đến 0,9¹, của vỏ bánh mỳ là khoảng từ 0,7 đến 0,8² và các thanh ngũ cốc là khoảng 0,6 đến 0,7³.

Do đó thách thức trong việc duy trì độ ổn định của lợi khuẩn khi bảo quản ở môi trường xung quanh và hoạt độ nước cao hơn, khoảng trên 0,5, trong các sản phẩm bánh mỳ, là khó hơn nhiều. Phần mô tả của WO 2002/065840 không cung cấp

¹Curti và đồng tác giả, Sử dụng chất xơ khoai tây để cải thiện các đặc điểm lý hóa của bánh mỳ trong quá trình bảo quản, Hóa thực phẩm, 2005 (trong Tạp chí)

²Curti và đồng tác giả, Tác dụng của việc bổ sung các tỉ lệ cám trên các đặc tính của bánh mỳ. Tạp chí khoa học về ngũ cốc, 2013

³Aigester và đồng tác giả, Các đặc điểm hóa lý và thuộc tính cảm quan của ngũ cốc và thanh ngũ cốc nướng được bổ sung tinh bột kháng tiêu hóa. Khoa học và công nghệ thực phẩm, 2011.

các thông tin hữu ích về các sản phẩm có hoạt độ nước cao hơn như bánh mỳ.

Thêm vào đó, chế phẩm trong WO 2002/065840 chứa nhiều loại chất phụ gia bao gồm chất chống tạo bọt, dịch chiết nấm men, pepton thịt, và các muối đệm (trong số các chất phụ gia khác).

Do đó, sẽ có lợi nếu phát hiện được một sản phẩm (và quy trình liên quan) mà:

- cho phép đạt được số lượng lợi khuẩn sống (log đơn vị tạo khuẩn lạc, CFU) chấp nhận được trong điều trị và thương mại để thực phẩm thu được như bánh mỳ có hoạt độ nước cao, cụ thể là trên 0,5;
- tạo ra mùi vị và/hoặc hình thức bên ngoài rất giống hoặc gần như giống với sản phẩm thực phẩm thông thường (không chứa lợi khuẩn);
- ổn định khi bảo quản;
- không đòi hỏi bổ sung chất phụ gia hoặc chất làm đặc tổng hợp;
- đơn giản và hiệu quả khi thực hiện và chỉ đòi hỏi máy móc sản xuất thực phẩm cơ bản;
- có thể thích ứng với nhiều loại sản phẩm thực phẩm ngoài các sản phẩm nướng hoặc bánh mỳ; và/hoặc
- có thể thích hợp để sử dụng với khoảng rộng hoặc hỗn hợp các chủng lợi khuẩn.

Nói rộng hơn, mục đích của sáng chế là giải quyết vấn đề trên đây hoặc ít nhất là cung cấp cho cộng đồng một lựa chọn hữu ích.

Toàn bộ các tài liệu tham khảo, bao gồm các patent và đơn yêu cầu cấp patent được trích dẫn trong phần mô tả này được nộp kèm theo đây để tham khảo. Không thừa nhận tài liệu tham khảo bất kỳ là tình trạng kỹ thuật. Phần mô tả của các tài liệu tham khảo này thể hiện điều mà các tác giả của chúng xác nhận, và chủ đơn bảo lưu quyền đảm bảo độ chính xác và thích hợp của các tài liệu được trích dẫn. Sẽ được hiểu rõ là, mặc dù nhiều công bố trong lĩnh vực kỹ thuật trước được đề cập ở đây, việc tham chiếu này không thừa nhận rằng bất kỳ trong các tài liệu này tạo ra một

phần của nhận thức chung thông thường trong lĩnh vực này, ở New Zealand hoặc quốc gia khác bất kỳ.

Trong toàn bộ phần mô tả, từ “bao gồm” hoặc các biến thể của nó như “chứa” hoặc “có”, sẽ được hiểu là ám chỉ việc bao gồm các yếu tố, số nguyên hoặc bước, hoặc nhóm các yếu tố, số nguyên hoặc bước được đề cập, nhưng không loại trừ yếu tố, số nguyên hoặc bước hoặc nhóm các yếu tố, số nguyên hoặc bước bất kỳ khác.

Các khía cạnh khác và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần mô tả được đưa ra chỉ bằng cách lấy ví dụ minh họa sau đây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn khác biệt ở bước

- a) phủ chế phẩm được cấy bằng ít nhất một sinh vật lợi khuẩn lên ít nhất là một phần bề mặt của sản phẩm thực phẩm này, trong đó chế phẩm này bao gồm nền thu được từ sữa nguyên kem và/hoặc chứa các thành phần vốn tìm thấy trong sữa.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn khác biệt ở chỗ ít nhất một phần bề mặt của sản phẩm thực phẩm này chứa chế phẩm có ít nhất là một vi sinh vật là lợi khuẩn, trong đó chế phẩm này chứa nền thu được từ sữa nguyên kem và/hoặc bao gồm các thành phần vốn được tìm thấy trong sữa.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng chế phẩm thu được từ sữa nguyên kem để sản xuất sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn như được mô tả ở đây, để cải thiện, điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn hoặc hoạt động bất thường của đường ruột và/hoặc các tình trạng liên quan đến nó.

Việc sử dụng chế phẩm thu được từ sữa nguyên kem để sản xuất sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn như được mô tả ở đây, để cải thiện khả năng miễn dịch, có tác dụng chống dị ứng, điều trị eczema và/hoặc hỗ trợ làm giảm cholesterol.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị, cải thiện hoặc phòng ngừa rối loạn hoặc hoạt động bất thường của đường ruột và các tình trạng liên quan đến nó bằng cách sử dụng sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn như đã mô tả ở đây cho người hoặc động vật khác cần được điều trị.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bằng cách sử dụng sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn như được mô tả ở đây để cải thiện khả năng miễn dịch, chống dị ứng, điều trị eczema, và/hoặc hỗ trợ giảm cholesterol cho người hoặc động vật khác cần được điều trị.

Ưu điểm chính của sáng chế là khả năng tạo ra sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn như bánh mì có mức hoạt độ nước trên 0,5, với vi sinh vật lợi khuẩn có số lượng tế bào sống được chấp nhận trong điều trị và thương mại (trên 7,0 log CFU cho mỗi khẩu phần).

Sáng chế cũng được thực hiện dễ dàng và không có tác động bất lợi lên cảm quan chung về mùi vị, màu sắc hoặc hình thức bên ngoài quan sát được bằng mắt thường của sản phẩm thực phẩm. Thuận lợi là, sáng chế chỉ dựa vào chế phẩm thu được từ sữa.

Các ưu điểm khác và các dấu hiệu được ưu tiên của sáng chế được mô tả dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các khía cạnh khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn từ phần mô tả sau đây, phần mô tả này được minh họa bằng các ví dụ và tham chiếu đến các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 Phân tích Log CFU sau khi tạo ra và bảo quản bánh mì được làm giàu lợi khuẩn LC431; và

Fig.2 Phân tích Log CFU sau khi tạo ra và bảo quản bánh mì được làm giàu bằng hỗn hợp lợi khuẩn LC431, BB12 và LA05.

Fig.3 Phân tích Log CFU sau khi tạo ra và bảo quản chế phẩm được làm giàu LC431 so với các đồ uống lợi khuẩn Yakult và Activate đã có trên thị trường ở các

giai đoạn khác nhau của quy trình sản xuất bánh mỳ lợi khuẩn.

Fig.4 Phân tích Log CFU sau khi tạo ra và bảo quản bánh mỳ được làm giàu lợi khuẩn *Lactobacillus plantarum* 299V.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa và các phương án được ưu tiên

Trong toàn bộ phần mô tả này, thuật ngữ nền (khi đề cập đến nền của chế phẩm) có nghĩa là toàn bộ các thành phần, hoặc chất có mặt trong chế phẩm mà không phải là (các) vi sinh vật lợi khuẩn, và nếu cần một chất lỏng như nước có thể được sử dụng để hoàn nguyên dạng bột của chế phẩm thành dạng lỏng.

Trong toàn bộ phần mô tả, thuật ngữ sữa có nghĩa là chất lỏng được sản xuất từ tuyến vú của động vật có vú. Các dấu hiệu thu được từ sữa theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ nhiều động vật có vú bất kỳ; tuy nhiên, sữa của động vật có vú được sử dụng phổ biến nhất trên thị trường bao gồm sữa bò, dê, cừu, hươu, lạc đà, trâu và v.v..

Trong toàn bộ phần mô tả này, thuật ngữ sản phẩm thực phẩm nên có ý nghĩa là chất ăn được bất kỳ được sử dụng để cung cấp chất dinh dưỡng cho cơ thể.

Trong phần còn lại của phần mô tả, sản phẩm thực phẩm sẽ được gọi đơn giản là bánh mỳ nướng. Tuy nhiên, nên được hiểu là giải pháp của sáng chế được mô tả ở đây có thể được áp dụng tương tự cho các loại sản phẩm thực phẩm khác (nướng hoặc không nướng), ví dụ, thanh ngũ cốc, ngũ cốc ăn sáng, bánh quy, bánh nướng xốp, đế pizza, thanh kẹo và v.v., đặc biệt là các sản phẩm thực phẩm có hoạt độ nước cao hơn, trên 0,5. Sáng chế đặc biệt được sử dụng cho các sản phẩm có bột. Người nộp đơn cũng dự kiến là giải pháp theo sáng chế có thể được sử dụng thương mại cho người đang thực hiện chế độ ăn FODMAP thấp⁴, được cho là làm giảm đáng kể hội chứng ruột kích thích (irritable bowel syndrome: IBS). Tuy nhiên, nhược điểm của chế độ ăn FODMAP là nó thường ít chất xơ và prebiotic (thức ăn của lợi khuẩn). Điều này có thể tác động tiêu cực đến hệ vi sinh đường ruột. Do đó, bánh mỳ

⁴FODMAP là viết tắt của "Oligosacarit lên men được (các fructan và galacto-oligosacarit) Disacarit (lactoza) Monosacarit (fructoza) và các Polyol (sorbitol, mannitol, xylitol và maltitol).

FODMAP thấp được làm giàu lợi khuẩn theo sáng chế có thể là đặc biệt hữu ích để sử dụng trong chế độ ăn FODMAP thấp vì nó cũng có thể cung cấp lợi khuẩn để duy trì hệ vi sinh đường ruột khỏe mạnh.

Trong toàn bộ phần mô tả này, thuật ngữ sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn nên được hiểu là sản phẩm thực phẩm bất kỳ như bánh mỳ mà có thể được cải biến theo sáng chế để chứa chế phẩm lợi khuẩn trên một phần bề mặt của nó.

Trong toàn bộ phần mô tả này, thuật ngữ bề mặt nên được hiểu là phần bên ngoài của bánh mỳ, còn được biết là vỏ được tạo ra bằng cách nướng. Vỏ tạo thành toàn bộ bề mặt xung quanh bánh mỳ, bao gồm phần đế, bên cạnh và mặt trên của bánh mỳ nướng.

Trong toàn bộ phần mô tả này, thuật ngữ lớp mỏng nên được hiểu là lớp bao ngoài, màng, màng mỏng hoặc vỏ mà được phủ (ví dụ bằng cách xịt hoặc bằng cách trải hoặc bằng cách quét chế phẩm) lên ít nhất một phần bề mặt của bánh mỳ.

Trong toàn bộ phần mô tả này, thuật ngữ "gần như được sấy khô (hoặc được sấy khô)" nên được hiểu là lớp mỏng có phần lớn, hoặc gần như toàn bộ hoặc toàn bộ độ ẩm được loại bỏ khỏi lớp mỏng này sau khi phủ nó lên bề mặt của bánh mỳ.

Do đó, nên được hiểu là thuật ngữ khô, được sấy khô, hoặc gần như được sấy khô cho phép một lượng ẩm nhất định vẫn còn lại trong lớp mỏng này, nhưng lượng ẩm này không sẵn có một cách tùy ý. Thuật ngữ khô hoặc được sấy khô liên quan đến lớp mỏng nên được xem xét để tạo ra sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn có hàm ẩm và/hoặc hoạt độ nước (a_w) tương tự so với sản phẩm thực phẩm không được cải biến.

Hoạt độ nước được định nghĩa là tỉ lệ giữa áp suất bay hơi riêng phần của nước trong vật chất chia cho áp suất bay hơi riêng phần của nước ở trạng thái chuẩn. Trong khoa học thực phẩm, trạng thái chuẩn thường được định nghĩa là áp suất bay hơi riêng phần của nước tinh khiết ở cùng một nhiệt độ. Nước tinh khiết có hoạt độ nước là một.

Trong toàn bộ phần mô tả này, và như được định nghĩa bởi Tổ chức Nông Lương của Liên Hợp Quốc và WHO, thuật ngữ lợi khuẩn nên được hiểu là tập hợp

các vi sinh vật sống (vi khuẩn và/hoặc nấm men) mà khi được sử dụng bằng đường miệng với lượng đủ, có thể gây ra các lợi ích về sức khỏe trên vật chủ. Tập hợp này nên được hiểu là bao gồm các chủng vi sinh vật đơn lẻ hoặc hỗn hợp của các chủng vi sinh vật.

Nói chung, một vi sinh vật cụ thể có thể được coi là lợi khuẩn khi nó thỏa mãn nhiều tiêu chuẩn khác nhau. Các tiêu chuẩn này bao gồm khả năng sống sót hợp lý theo các yêu cầu về mặt sinh lý và sản xuất, cũng như khả năng gây ra các tác động có lợi trên vật chủ (B. O'Grady, 2005).

Hiện nay, một số lượng lớn chủng đã được biết là lợi khuẩn. Các chủng này bao gồm *Lactobacilli* và *Bifidobacterium* - các chủng này rất quan trọng về thương mại. Do đó, chúng đã được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm để làm sinh vật lợi khuẩn. Chủng *L. acidophilus*, *L. casei*Shirota, *L. rhamnosus* và *L. Reuteri* là các lựa chọn phổ biến và có lịch sử sử dụng lâu dài, sau đó là các loài *Bifidobacterium*, và một số chủng không tạo axit lactic mà chủ yếu được sử dụng trong dược phẩm (Holzapfel *et al.*, 1998). Lợi khuẩn đã được đưa ra thị trường ở dạng đông khô hoặc ở dạng sản phẩm thực phẩm lên men.

Các tài liệu khoa học thường tập trung vào các lợi ích về sức khỏe do một chủng hoặc hỗn hợp các chủng vi sinh vật lợi khuẩn khác nhau đối với sự điều hòa miễn dịch và cải thiện khả năng bảo vệ của hàng rào niêm mạc ruột. Các tác dụng này đạt được nhờ cải biến hệ vi sinh đường ruột, khả năng bám vào niêm mạc ruột, điều này lại giúp ngăn cản mầm bệnh bám vào hoặc hoạt động, bằng cách biến đổi các protein trong chế độ ăn và hiệu quả của enzym vi khuẩn và bằng cách tác động lên khả năng thấm của niêm mạc ruột (Holzapfel *et al.*, 1998).

Năm 2000, bài báo của Kailasapathy và Chin đã phát hiện ra là lợi khuẩn đã được báo cáo là cũng có lợi đối với hệ miễn dịch, làm giảm cholesterol, cải thiện khả năng dung nạp lactoza và thậm chí phòng ngừa một số bệnh ung thư. Ngoài ra, lợi khuẩn có liên quan đến chức năng tiêu hóa và hô hấp, và phòng ngừa các bệnh nhiễm trùng ở trẻ em và các cộng đồng dân cư có nguy cơ cao khác (nguồn từ WHO, 2001). Trên cơ sở này, sáng chế được xem là cũng có lợi ích điều trị để điều trị bất kỳ một hoặc kết hợp của nhiều loại tình trạng và/hoặc đơn giản là cải thiện sức khỏe chung như được mô tả trong tài liệu này.

Trong toàn bộ phần mô tả này, thuật ngữ cấy, được cấy nên được hiểu là quy trình bổ sung ít nhất một chủng vi khuẩn vào chế phẩm, và sau đó thường là nhân giống (các) chủng vi khuẩn lợi khuẩn này bằng quy trình lên men đến mức độ thương mại và điều trị là trên $7,0 \log \text{CFU ml}^{-1}$, và lý tưởng hơn là trên $9,0 \log \text{CFU ml}^{-1}$. Nên được hiểu là quy trình ủ trước để đạt được $7,0 \log \text{CFU ml}^{-1}$ không cần phải được thực hiện như một phần của sáng chế, và có thể được cung cấp bởi bên thứ ba và sau đó được bổ sung vào chế phẩm này với lượng/nồng độ đủ để tạo ra tác dụng điều trị theo sáng chế. Tuy nhiên, với các lý do đã đề cập trong phần mô tả này, tốt hơn, nếu thực hiện bước ủ trước tại cơ sở, vì nó cho phép kiểm soát hiệu quả pha sinh trưởng của vi khuẩn, thuận tiện, và các kết quả thể hiện khả năng sống của tế bào theo thời gian được cải thiện - đặc biệt là sau khi phủ lên bề mặt của bánh mỳ. Ví dụ, bước ủ trước trong khoảng 16 giờ có thể được thực hiện qua đêm, và vào buổi sáng hôm sau, chế phẩm đã lên men có thể được phủ ngay lên bánh mỳ.

Quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn

Quy trình sản xuất sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn này khác biệt ở chỗ:

- a) phủ chế phẩm được cấy bằng ít nhất một sinh vật lợi khuẩn lên ít nhất là một phần bề mặt của sản phẩm thực phẩm này, trong đó chế phẩm này bao gồm nền thu được từ sữa nguyên kem và/hoặc chứa các thành phần vốn tìm thấy trong sữa.

Tốt hơn, nếu bước a) được thực hiện sau khi nấu sản phẩm thực phẩm. Tuy nhiên, nên hiểu là sáng chế không bị giới hạn ở sản phẩm thực phẩm được nấu hoặc nướng, và do đó có thể áp dụng được cho các sản phẩm không cần nấu hoặc nướng.

Khác biệt có lợi quan trọng của quy trình theo sáng chế so với các quy trình của tình trạng kỹ thuật là ở chỗ chỉ cần bước sấy khô vừa phải sau khi chế phẩm được phủ thành lớp mỏng lên sản phẩm thực phẩm, như được thảo luận dưới đây.

Trong trường hợp bánh mỳ, khác với tình trạng kỹ thuật, lợi khuẩn về bản chất không được đưa vào trong bánh mỳ và sau đó nướng, điều này gây ra nhiều bất lợi bao gồm mất khả năng sống của tế bào lợi khuẩn. Do đó, sáng chế cho phép

không cần sử dụng các lợi khuẩn chịu được nhiệt trong quá trình nướng, và/hoặc không phải thay đổi các điều kiện nướng cần thiết để đạt được bánh mì nướng tối ưu.

So với các phương pháp sử dụng bột nhào của tình trạng kỹ thuật, lợi ích của sáng chế có thể đạt được vì đã phát hiện ra rằng khi chế phẩm này được phủ thành lớp mỏng, nó có thể khô nhanh, dính vào bề mặt bánh mì và vẫn duy trì được khả năng sống của tế bào một cách bất ngờ.

Khả năng sống của tế bào vẫn tiếp tục được duy trì ngay cả sau khi bảo quản trong thời gian dài và khi vẫn duy trì mức hoạt độ nước cao hơn nhiều so với các chế phẩm lợi khuẩn dựa trên ngũ cốc của tình trạng kỹ thuật. Cũng có sự thay đổi hoạt độ nước rất nhỏ so với hoạt độ nước quan sát được ở bánh mì không chứa lợi khuẩn thông thường, mà tùy theo loại bánh mì, thường thay đổi từ trị số a_w nằm trong khoảng từ 0,5 đến 0,9. Như đã đề cập trên đây, hầu hết ruột/vỏ bánh mì đều có hoạt độ nước nằm trong khoảng từ 0,7 đến 0,9. Các mẫu thử nghiệm được kiểm tra bởi người nộp đơn trên bánh bao nhân nho/bánh mì hình chiếc dép (ciabatta) đã xác nhận hoạt độ nước là khoảng từ 0,7 đến 0,8.

Ngoài ra, không giống bột được thấy trong tình trạng kỹ thuật, sản phẩm thực phẩm tạo thành vẫn giữ được mùi vị và hình thức gần như giống với bánh mì không chứa lợi khuẩn như được minh họa trong các ví dụ. Điều này là không thể với bột nhào.

Cuối cùng, quy trình này rất hiệu quả và chỉ cần các dụng cụ nướng và nhà bếp tiêu chuẩn.

Tốt hơn, nếu bước a) bao gồm phủ từ 200 μ l đến 2ml dịch nuôi cấy lợi khuẩn lên bánh mì.

Nên được hiểu là lượng được phủ lên bánh mì phụ thuộc nhiều vào kích thước của bánh mì. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu mục đích là cung cấp tế bào sống với lượng hoặc liều có tác dụng điều trị trên mỗi khẩu phần, cụ thể là trên 7,0 log CFU trên mỗi khẩu phần. Kích thước một khẩu phần bánh mì thông thường là từ 10 đến 100gam, và phổ biến hơn là từ 30 đến 50 gam. Do đó, đối với một khẩu phần bánh mì đơn lẻ, lượng phủ lên thường ít hơn so với ở

bánh mỳ lớn hơn. Đối với ổ bánh mỳ lớn hơn, quan trọng hơn là phải đảm bảo chế phẩm này được trải đều lên bề mặt (ví dụ, bề mặt trên cùng) để đảm bảo là khi một miếng bánh mỳ được cắt ra, nó có thể cung cấp đủ lượng lợi khuẩn trên mỗi khẩu phần.

Tốt hơn nữa, nếu bước a) bao gồm phủ từ 500µl đến 1ml dịch nuôi cấy lợi khuẩn lên bánh mỳ.

Trong các thử nghiệm sơ bộ, tác giả sáng chế đã phát hiện ra các lượng này là đặc biệt có lợi để tránh sự tăng không cần thiết hàm ẩm của bánh mỳ, hàm ẩm này cần được làm khô để tạo ra bánh mỳ gần với hàm ẩm ban đầu của nó mà không làm hỏng kết cấu bánh mỳ và các đặc điểm về cảm quan khác.

Ngoài ra, các điều kiện sấy khô kéo dài hơn/khắc nghiệt hơn sẽ là cần thiết nếu lượng chế phẩm lớn hơn được bổ sung vào (hoặc nếu chế phẩm này có độ nhớt cao hơn giống như bột nhão). Việc sấy khô khắc nghiệt hơn cũng có thể dẫn đến mất khả năng sống của lợi khuẩn nhiều hơn.

Cùng với các hàng rào công nghệ, tác giả sáng chế cũng cần đảm bảo lượng lợi khuẩn thích hợp có mặt trong lớp mỏng trên bề mặt bánh mỳ (tốt hơn, nếu ít nhất đi qua toàn bộ bề mặt trên cùng của bánh mỳ), và vẫn duy trì khả năng sống của tế bào và liều thích hợp.

Tốt hơn, nếu bước a) bao gồm việc đảm bảo là lớp mỏng này có độ dày nhỏ hơn 0,1mm.

Tốt hơn nữa, nếu, bước a) bao gồm việc đảm bảo là lớp mỏng này có độ dày nhỏ hơn 0,05mm.

Như đã thảo luận trên đây, các tác giả sáng chế đã xác định được là việc tạo ra lớp mỏng có độ dày nhỏ 0,1mm, hoặc tốt hơn nữa, nếu nhỏ hơn 0,05mm là có lợi để cải thiện hiệu quả của quy trình sấy khô, tránh các vấn đề về hơi nước trong khi đó cũng tránh được sự giảm số lượng tế bào sống sót, và giúp đảm bảo chế phẩm dính vào bề mặt của bánh mỳ, và giúp tránh được các thay đổi về mùi vị và hình thức bên ngoài của bánh mỳ chứa lợi khuẩn.

Tốt hơn, nếu bước a) bao gồm trải lớp mỏng này qua toàn bộ mặt bên của sản

phẩm thực phẩm.

Ví dụ, mặt bên này có thể là phần trên cùng của bánh mỳ nướng. Trong các trường hợp khác, có thể phủ lớp mỏng này qua cả phần trên cùng cùng với nhiều bề mặt khác (ví dụ, mặt kéo dài, phần đầu cùng, và mặt dưới) của bánh mỳ nướng. Trong một ví dụ khác về ổ bánh mỳ hình ovan, lớp mỏng này có thể được phủ lên toàn bộ bề mặt ngoài của ổ bánh mỳ này. Điều này có thể là hữu ích trong trường hợp liều lợi khuẩn lớn hơn được yêu cầu, hoặc khi lợi khuẩn có tuổi thọ ngắn hơn.

Tốt hơn, nếu bước a) bao gồm xịt chế phẩm lên bề mặt của sản phẩm thực phẩm.

Điều này là có lợi vì nó cho phép phủ nhanh hơn, và cũng giúp tạo ra lớp mỏng bằng quy trình xịt. Kỹ thuật tự động hóa cũng có thể là hữu ích, tạo ra sự đồng đều trên toàn bộ bề mặt của bánh mỳ.

Ngoài ra, bước a) có thể được thực hiện bằng cách sử dụng dụng cụ đóng (ví dụ, pipet) và sau đó chế phẩm này có thể được trải thành lớp mỏng bằng cách sử dụng dao bay hoặc bàn chải.

Tốt hơn, nếu quy trình này còn bao gồm bước sấy khô chế phẩm sau khi nó được phủ lên bề mặt của sản phẩm thực phẩm này.

Để cải thiện các kết quả, các điều kiện của bước sấy khô nên tính đến nhiều yếu tố, bao gồm việc cố gắng tránh tác động lên các hiệu quả cảm quan của sản phẩm, khả năng sống sót tối ưu của vi khuẩn trong quá trình sấy khô, cũng như cải thiện khả năng sống của vi khuẩn.

Tốt hơn, nếu quy trình này còn bao gồm thêm bước b), bao gồm sấy khô bánh mỳ đến khi lớp mỏng này có mức hoạt độ nước (a_w) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 0,9. Khoảng này được lựa chọn vì nó thể hiện hoạt độ nước điển hình của sản phẩm kiểu bánh mỳ. Mục đích là để làm cho hoạt độ nước của chế phẩm phù hợp với hoạt độ nước của bánh mỳ, nhờ đó giúp tránh được thay đổi bất kỳ về cảm quan của bánh mỳ.

Như đã thảo luận trên đây, một trong các ưu điểm đáng kể và các dấu hiệu khác biệt của sáng chế là khả năng duy trì độ ổn định của chế phẩm và khả năng

sống của lợi khuẩn ở các mức hoạt độ nước cao hơn của sản phẩm thực phẩm, ví dụ, ở khoảng từ 0,7 đến 0,9 trong trường hợp bánh mỳ. Điều này rất khác với mục đích của WO 2002/065840 mà có nền chế phẩm khác biệt nhiều và được sử dụng cho ngũ cốc có hoạt độ nước rất thấp là khoảng 0,2. Tuy nhiên, nên được hiểu là chế phẩm này có thể sử dụng được cho các sản phẩm thực phẩm có mức hoạt độ nước thấp hơn 0,5. Tuy nhiên, khả năng áp dụng cho các sản phẩm thực phẩm có mức hoạt độ nước cao hơn trên 0,5 được xem là đặc biệt có lợi và quan trọng về mặt thương mại.

Tốt hơn, nếu bước b) bao gồm sấy chế phẩm đến khi lớp mỏng chế phẩm có hoạt độ nước (a_w) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 0,8.

Như được thảo luận trên đây, mục đích ưu tiên là đạt đến trị số gần nhất với hoạt độ nước (a_w) ban đầu của bánh mỳ trước khi phủ lớp mỏng chế phẩm.

Tốt hơn, nếu, bước b) bao gồm sấy lớp mỏng này ở nhiệt độ dưới 70°C.

Nhiệt độ sấy cao hơn, trên 70°C không những có thể phá hủy tế bào lợi khuẩn sống, mà còn làm thay đổi kết cấu bánh mỳ trở nên giòn hơn với vỏ bị vỡ vụn.

Tốt hơn nữa, nếu, bước b) bao gồm sấy lớp mỏng này ở nhiệt độ từ 30°C đến 70°C.

Bước sấy có thể được thực hiện ở dưới 30°C, nhưng các thử nghiệm sơ bộ gợi ý là nó có thể tác động tiêu cực đến chất lượng sản phẩm, và làm tăng không cần thiết thời gian sấy khô được yêu cầu.

Tốt nhất, nếu bước b) bao gồm sấy lớp mỏng này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 60°C.

Các nhiệt độ sấy được ưu tiên này rất khác với các nhiệt độ được sử dụng cho bánh mỳ nướng, thường là khoảng 180°C.

Tốt hơn, nếu, bước b) được thực hiện trong khoảng từ 10 đến 30 phút.

Thời gian sấy có thể phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm nhiệt độ không khí, dòng không khí, độ ẩm, quy trình phủ chế phẩm, hình dạng bánh mỳ, và v.v.. Nên được hiểu là các điều kiện và thời gian sấy có thể được thay đổi đáng kể, nhưng mục đích là để làm cho hoạt độ nước của bánh mỳ về gần với hoạt độ nước ban đầu trước

khi chế phẩm được phủ. Ngoài ra, bước sấy khô nên là đủ để đảm bảo chế phẩm này dính hiệu quả vào bánh mỳ. Thời gian sấy trong khoảng từ 10 đến 30 phút, và cụ thể là từ 15 đến 20 phút, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 60°C được phát hiện ra là lý tưởng cho năng suất vận hành và chất lượng sản phẩm.

Tốt nhất, nếu bước b) được thực hiện trong khoảng từ 15 đến 20 phút.

Tác giả sáng chế coi máy thích hợp và thuận tiện để thực hiện bước sấy b) là máy sấy kiểu đối lưu không khí cưỡng bức.

Các lựa chọn khác để thực hiện bước b) bao gồm sử dụng băng tải liên tục đi qua đường hầm khí nóng. Bước sấy này có thể được thực hiện đơn giản bằng cách làm bay hơi nước thụ động, ví dụ trong điều kiện nhiệt độ trong phòng trong khoảng 24 giờ. Tuy nhiên, nhược điểm có thể là vi sinh vật có thể tiếp tục phát triển trong thời gian này, dẫn đến có thể mất khả năng sống của tế bào và hoặc các thay đổi bất lợi về mùi vị của sản phẩm thực phẩm.

Sau bước b), sản phẩm thực phẩm này sau đó có thể được bảo quản trong các điều kiện bánh mỳ bình thường (ví dụ, đến 5 ngày ở 25°C) mà không bị mất đáng kể khả năng sống của tế bào trong dịch nuôi cấy lợi khuẩn. Điều này được minh họa trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Cũng có thể làm lạnh hoặc làm đông sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn tạo thành. Trong các trường hợp này, tuổi thọ có thể kéo dài.

Các tác giả sáng chế dự đoán là sáng chế có thể áp dụng và đặc biệt có lợi cho việc làm giàu sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn. Tuy nhiên, nên được hiểu là sáng chế cũng có thể được sử dụng theo cách tương tự để làm giàu sản phẩm thực phẩm với các thành phần chức năng khác, như vitamin được phủ lên bề mặt bánh mỳ. Ví dụ, một số vitamin như vitamin C nhạy cảm với nhiệt.

Ngoài ra, sáng chế có thể là hữu ích cho hỗn hợp của hai hoặc nhiều thành phần chức năng khác nhau, như lợi khuẩn và vitamin.

Rõ ràng là, sáng chế đặc biệt hữu ích để giải quyết các vấn đề, trong đó (các) thành phần chức năng nhạy cảm với nhiệt, như lợi khuẩn.

Các dấu hiệu ưu tiên của chế phẩm được sử dụng trong quy trình sản xuất

Tốt hơn, nếu chế phẩm này có lượng tế bào sống trên 7,0 log CFU ml⁻¹.

Nên được hiểu là lý tưởng, nếu chế phẩm này được phủ với lượng sao cho một khẩu phần đơn lẻ chứa ít nhất 7,0 log CFU, và tốt hơn nữa, nếu ít nhất là 9,0 log CFU. Điều này tương ứng với FAO/WHO (2003). Tiêu chuẩn cho các sản phẩm sữa lên men (Standard for Fermented Milks). CODEX STAN 243, cung cấp hướng dẫn về sản phẩm thực phẩm bất kỳ chứa chủng nuôi cấy lợi khuẩn, sản phẩm này cần chứa lượng tế bào sống ít nhất là 10⁶ CFU mỗi g để mang lại lợi ích mong muốn cho sức khỏe.

Tốt hơn nữa, nếu chế phẩm này có lượng tế bào sống trên 9,0 log CFU ml⁻¹.

Ưu điểm của việc có lượng tế bào sống cao hơn, trên 9,0 log CFU ml⁻¹ trong dịch nuôi cấy lợi khuẩn là ở chỗ nó cho phép giảm nhẹ số lượng tế bào sống do các điều kiện sấy và/hoặc bảo quản sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn, và vẫn duy trì cao hơn lượng tế bào sống chấp nhận được là 7,0 log CFU ml⁻¹. Tuy nhiên, như đã thảo luận ở đây và như được thể hiện trong phần ví dụ thực hiện sáng chế, các tác giả sáng chế rất ngạc nhiên về mức độ ổn định tốt của lợi khuẩn trên sản phẩm thực phẩm, với sự giảm khả năng sống của tế bào là tối thiểu.

Tốt hơn, nếu (các) vi sinh vật lợi khuẩn trong chế phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn tạo axit lactic, vi khuẩn không tạo axit lactic, và nấm men không gây bệnh hoặc hỗn hợp của chúng. Về bản chất, vi sinh vật lợi khuẩn bất kỳ có thể được sử dụng là an toàn với người sử dụng và thể hiện (hoặc được cho là thể hiện) các hiệu quả điều trị nhờ lợi khuẩn ở ruột. Các vi sinh vật có tuổi thọ cao được ưu tiên hơn.

Tốt hơn nữa, nếu vi sinh vật lợi khuẩn trong chế phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bifidus* (bifidobacterium), *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, và hỗn hợp của chúng.

Các vi sinh vật này thường được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và do đó có thể được chấp nhận về mặt thương mại theo quan điểm của nhà sản xuất và người tiêu dùng. Yakult™ là một ví dụ về sản phẩm lợi khuẩn sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus casei* Shirota. Nó đại diện cho sản phẩm có chủng lợi khuẩn đơn.

Activate™ là ví dụ khác về vi khuẩn bifidobacterium đơn duy nhất, hoặc đã được biết trên thị trường là Bifio-Defenis™, với các lợi ích cho sức khỏe đã được chứng minh. *Lactobactillus plantarum* là vi sinh vật lợi khuẩn có liên quan chặt chẽ với các tác dụng điều trị đối với sức khỏe đường ruột của người mắc hội chứng ruột kích thích, đặc biệt phổ biến ở phương Tây.

Chế phẩm này có thể chỉ bao gồm một chủng lợi khuẩn đơn, hoặc hỗn hợp của các chủng lợi khuẩn.

Ưu điểm thương mại của việc sử dụng một chủng đơn có thể là yêu cầu thành phẩm là bánh mỳ được làm giàu lợi khuẩn. Tuy nhiên, hỗn hợp các chủng lợi khuẩn có thể là hữu ích để tạo ra tác dụng điều trị hiệp đồng hoặc phổ rộng cho ruột.

Chế phẩm này chứa nền thu được từ sữa. Nền này được tạo ra từ nhiều tá được thu được từ sữa hoặc các tá được có thể được bổ sung vào nền này, nhưng vốn được tìm thấy trong sữa.

Thuận lợi là, nền của chế phẩm này có thể

- a) đóng vai trò là môi trường sinh trưởng để lên men vi khuẩn, nếu cần, đến trên mức CFU được ưu tiên và có ích ngay khi kết thúc pha sinh trưởng ban đầu;
- b) tạo ra độ nhớt thấp có lợi cho phép trải dễ dàng và phủ lớp mỏng lên bề mặt của sản phẩm thực phẩm;
- c) cho phép dính đủ và hiệu quả vào bề mặt của sản phẩm thực phẩm và; duy trì số lượng lợi khuẩn còn sống trong khoảng thời gian hữu ích về mặt thương mại sau khi phủ lên sản phẩm thực phẩm. Ví dụ, trong các thử nghiệm sơ bộ trên bánh mỳ, chế phẩm này vẫn duy trì CFU tối ưu trong khoảng thời gian bảo quản năm ngày ở 25°C (thời gian bảo quản tiêu chuẩn đối với độ ổn định bảo quản của bánh mỳ), khi phủ Yukult® và Activate® lên bề mặt của bánh mỳ, các kết quả sơ bộ kém hơn (giảm khả năng sống của tế bào nhanh hơn) so với nhóm thử nghiệm, trong đó chế phẩm này được ủ trước ngay trước khi phủ lên bánh mỳ

Các ưu điểm bất ngờ của việc sử dụng (các) thành phần thu được từ sữa làm nền của chế phẩm sẽ được thảo luận sâu hơn trong phần mô tả này. Tuy nhiên, mục

đích thương mại ưu tiên là đạt được CFU mong muốn cần thiết cho lợi khuẩn, ổn định, phủ đủ và hiệu quả lên sản phẩm thực phẩm và vẫn duy trì cảm quan có lợi, mà không phải sử dụng đến các thành phần bất kỳ không phải là từ sữa như được thấy trong tình trạng kỹ thuật - ví dụ trong WO 2002/065840.

Tốt hơn, nếu nền của chế phẩm chứa lượng sữa, (các) chất rắn từ sữa, hoặc sữa hoàn nguyên (tốt hơn, nếu là sữa tách bơ).

Bất ngờ phát hiện ra là các thành phần từ sữa này đủ để tạo ra nền của chế phẩm cho phép quy trình theo sáng chế được thực hiện với các kết quả có lợi.

Ví dụ, chế phẩm này có thể bao gồm khoảng 12% sữa tách bơ được hoàn nguyên.

Tốt hơn, nếu nền của chế phẩm có ít hơn 5% chất béo.

Tốt hơn nữa, nếu nền của chế phẩm gần như không chứa chất béo.

Đối với các chế phẩm này, chất béo là không cần thiết. Điều này rất khác với các kỹ thuật của tình trạng kỹ thuật mô tả về bột nhào, mà sử dụng hàm lượng chất béo cao trong bột nhào để làm tăng độ nhớt và kìm hãm sự sinh trưởng và duy trì các vi sinh vật.

Tốt hơn, nếu nền trong chế phẩm bao gồm chất đông tụ. Trong trường hợp này, chất đông tụ có thể là axit lactic mà được tạo ra bởi sự lên men trong các môi trường này.

Các tác giả sáng chế cũng ngạc nhiên phát hiện ra là sữa đông tụ, protein sữa hoặc thành phần sữa đông tụ khác tạo ra lợi ích đáng kể trong việc giúp chế phẩm dính vào bề mặt của sản phẩm thực phẩm.

Ngoài ra, có lợi là sự đông tụ không tác động quá mức đến quá trình lên men của vi sinh vật (nếu quá trình này là được đòi hỏi như là bước đầu tiên để làm tăng số lượng tế bào), cũng như không tác động quá mức lên độ nhớt và/hoặc khả năng trải của chế phẩm.

Nhiều thành phần khác nhau có thể được sử dụng để đạt được ít nhất là một phần tác dụng đông tụ này, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ

hiểu rõ điều này.

Tốt hơn, nếu thành phần làm đông tụ ít nhất một phần sữa là axit lactic. Ưu điểm của việc sử dụng axit lactic là nó là hợp chất có thể thu được từ sữa. Điều này tương đương với ưu điểm được thấy khi sử dụng các thành phần chủ yếu dựa trên sữa để đạt được các kết quả của sáng chế, mà không phải sử dụng các tá được tổng hợp hoặc được cung cấp từ bên ngoài (nghĩa là, không phải từ sữa). Nói cách khác, nó vẫn giữ được hiệu quả có lợi về mặt thương mại là được tạo ra bằng cách sử dụng các thành phần tự nhiên, và nói chung là đồng nghĩa với việc cung cấp một loại sản phẩm thực phẩm lành mạnh.

Tốt hơn, nếu nền của chế phẩm chứa ít nhất một loại đường.

Sự có mặt của đường đã được phát hiện ra là rất hữu ích để đạt được nhiều tác dụng có lợi, như được liệt kê dưới đây:

- hỗ trợ tích cực quá trình lên men để làm tăng số lượng lợi khuẩn khi chế phẩm được sử dụng cho quá trình ủ trước;
- giúp chế phẩm dính vào bề mặt của bánh mỳ; và/hoặc
- giúp duy trì khả năng sống tốt của lợi khuẩn trong chế phẩm này trước và sau khi phủ lên bề mặt của bánh mỳ.

Tốt hơn, nếu đường này được cung cấp từ sữa.

Điều này phù hợp với mục đích thương mại quan trọng của người nộp đơn là giữ chế phẩm có nguồn gốc hoàn toàn từ sữa hoặc chỉ chứa các thành phần trong nền được tìm thấy trong sữa.

Tốt hơn, nếu đường được chọn từ lactoza, glucoza và/hoặc galactoza.

Thuận lợi là, sữa bao gồm nhiều loại đường. Lactoza chiếm khoảng 40% lượng calo trong sữa bò, và khoảng 5% khối lượng/thể tích của hàm lượng sữa. Lactoza là disacarit được tạo thành từ hai đường đơn - glucoza và galactoza, và do đó một trong hai hoặc cả hai đường bậc một này đều có thể được sử dụng trong sáng chế. Với mục đích thương mại tự đặt ra khi sử dụng các đường thu được từ sữa, người nộp đơn đã bất ngờ có thể tạo ra chế phẩm hoạt động tốt cho phép ủ trước, có

khả năng dính hiệu quả, và duy trì tổ khả năng sống của lợi khuẩn.

Nên được hiểu là nền của chế phẩm có thể được bổ sung một lượng đường. Mặc dù về mặt kỹ thuật, đường đạt tiêu chuẩn sử dụng trong sản phẩm thực phẩm bất kỳ có thể được sử dụng để bổ sung cho chế phẩm này, đường được bổ sung bất kỳ nên thu được từ sữa, hoặc ít nhất là có trong sữa, để vẫn phù hợp với mục đích thương mại của người nộp đơn. Ví dụ, đường đạt tiêu chuẩn sử dụng trong sản phẩm thực phẩm được tìm thấy tự nhiên, hoặc có thể thu được từ sữa (nghĩa là, chẳng hạn lactoza, glucoza hoặc galactoza) có thể được sử dụng. Các đường được bổ sung vào này không cần thiết phải được phân lập, chiết hoặc thu được từ sữa. Ví dụ, glucoza thu được từ nguồn thực vật có thể được sử dụng.

Tốt nhất, nếu đường là lactoza.

Tác giả sáng chế đã xác định được trong các thử nghiệm sơ bộ là chế phẩm chứa 8% sữa tách bơ hoàn nguyên được bổ sung bằng 4% lactoza hoặc glucoza thu được từ sữa vẫn giữ được trên $9,0 \log \text{CFU ml}^{-1}$ sau 24 giờ bảo quản (và sau khi phủ lên bánh mỳ khi số lượng tế bào khởi đầu là khoảng $9,25 \log \text{CFU}$ cho mỗi khẩu phần). Ngạc nhiên là, lactoza hoạt động tốt hơn một chút so với glucoza trong việc duy trì khả năng sống của tế bào. Điều này là so với chế phẩm có 12% sữa tách bơ hoàn nguyên (không bổ sung đường) mà được quan sát thấy sự giảm đáng kể hơn đến $8,7 \log \text{CFU ml}^{-1}$ sau 24 giờ bảo quản. Việc lactoza là đường thu được từ sữa dễ dàng sẵn có nhất nghĩa là nó có thể là lựa chọn khả thi nhất về mặt thương mại và phù hợp với mục đích thương mại của sản phẩm và hệ phương pháp. Trong trường hợp các chế phẩm có lượng lactoza giảm hoặc không chứa lactoza, có thể thay thế lactoza bằng glucoza.

Tốt hơn, nếu nền của chế phẩm chứa tổng lượng đường khoảng từ 2% đến 20% khối lượng/thể tích, hoặc tốt hơn nữa, nếu tổng lượng đường từ 3 đến 10% khối lượng/thể tích.

Sữa tách bơ hoàn nguyên vốn chứa đường với lượng khoảng 3% khối lượng/thể tích (trong trường hợp bột sữa tách bơ được phaloãng 10 lần). Người nộp đơn đã nhận ra là mặc dù một mình sữa tách bơ hoàn nguyên (vốn chủ yếu chứa lactoza) đã đạt được các kết quả có lợi, việc bổ sung thêm vào chế phẩm này để chứa

thêm một lượng đường (ví dụ, đường được bổ sung vào là 4-10% khối lượng/thể tích) cải thiện các kết quả như được minh họa đối với số lượng tế bào sống sót.

Do đó, trong một phương án, chế phẩm là chất rắn từ sữa hoàn nguyên và được làm giàu bằng lactoza. Chế phẩm này đã được phát hiện ra là đặc biệt hiệu quả trong việc đạt được các kết quả mong muốn, và cụ thể là về khả năng sống sót của tế bào. Có lợi là, chế phẩm này hoàn toàn thu được từ sữa.

Tốt hơn, nếu chế phẩm này có độ nhớt thấp hơn 4 cP (centipoise).

Độ nhớt được ưu tiên này giúp chế phẩm được phủ thành lớp mỏng lên bề mặt của bánh mì. Ví dụ, vì độ nhớt thấp, chế phẩm này có thể được phủ lên bằng cách xịt, hoặc bằng pipet và sau đó được trải dễ dàng bằng dao phết, như dao bay.

Tốt hơn, nếu chế phẩm này có độ nhớt nằm trong khoảng từ 1 đến 3 cP.

Độ nhớt được ưu tiên của chế phẩm tạo thành là tương đương với sữa, vì nó giúp cho chế phẩm được trải và làm khô dễ dàng trên sản phẩm thực phẩm, như được giải thích dưới đây.

Độ nhớt được ưu tiên này giúp phân biệt thêm với các loại bột nhào mà rõ ràng là thể hiện cách tiếp cận khác với sáng chế. Các chế phẩm tương tự bột nhào của tình trạng kỹ thuật dựa vào độ nhớt cao để kiểm soát sự sinh trưởng và khả năng sống của tế bào trong dầu nhẹ/chất độn được sử dụng cho sản phẩm thực phẩm. Điều này không giải quyết được vấn đề chính của sáng chế về việc cung cấp sản phẩm bánh mì được làm giàu lợi khuẩn mà gần như không khác biệt về mùi vị và hình thức với các sản phẩm thông thường. Dầu nhẹ/chất độn tương tự bột nhào hoàn toàn khác với sáng chế.

Ngoài ra, độ nhớt này giúp lớp mỏng trên bánh mì được làm khô hiệu quả hơn, nhờ đó làm giảm hàm ẩm để đưa nó về mức của bánh mì ban đầu trước khi lớp mỏng này được phủ lên. Vì đây là thực hành công nghiệp chuẩn để duy trì hàm ẩm và/hoặc hoạt độ nước của bánh mì bất kỳ ở mức giữ nó ổn định trong ít nhất là năm ngày ở nhiệt độ xung quanh, quy trình theo sáng chế nhằm mục đích duy trì hàm ẩm sau khi sấy gần hết mức có thể với bánh mì ban đầu. Bất ngờ là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra là khả năng sống của tế bào có thể được giữ ở mức chấp nhận được

về mặt điều trị và thương mại sau các quá trình sấy vừa phải. Ngoài ra, bất ngờ là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra là khả năng sống của tế bào có thể được giữ ở mức chấp nhận được trong điều trị và thương mại sau các quá trình sấy vừa phải.

Ngoài ra, khả năng phủ chế phẩm thành lớp mỏng (được hỗ trợ bởi độ nhớt thấp) giúp chế phẩm này gần như là trong suốt và/hoặc không nhìn thấy được trên bánh mỳ khi được làm khô. Điều này cũng giúp tránh được các tác động bất lợi đến mùi vị, cảm giác hoặc hình thức của bánh mỳ được làm giàu lợi khuẩn so với bánh mỳ bình thường.

Ủ trước

Nên được hiểu là các vi sinh vật lợi khuẩn có thể được ủ trước trong chế phẩm, hoặc có thể được bổ sung vào ở mức thích hợp để đạt được CFU trên $7,0 \log \text{ ml}^{-1}$, hoặc tốt hơn, nếu trên $9,0 \log \text{ ml}^{-1}$.

Do đó, việc sử dụng thuật ngữ “được ủ trước” trong trường hợp này có thể được thực hiện trong một bước riêng, ví dụ bởi bên thứ ba cung cấp mẫu vi khuẩn đậm đặc hoặc bởi nhà sản xuất sản phẩm thực phẩm, như là một bước riêng.

Bất kể thế nào, kết quả cuối cùng của chế phẩm nên là lượng và nồng độ của vi khuẩn được bổ sung vào chế phẩm là đủ để tạo ra mức lợi khuẩn điều trị thích hợp (nghĩa là, trên $7,0 \log \text{ CFU ml}^{-1}$).

Ví dụ, dạng đông khô, đông lạnh hoặc dạng khác của vi khuẩn đậm đặc là nguồn tế bào sống có thể được bổ sung vào để mang nguyên liệu.

Ngoài ra, quy trình bào chế chế phẩm nuôi cấy lợi khuẩn bao gồm ủ trước vi sinh vật này trong nền của chế phẩm để đạt được số lượng tế bào mong muốn là trên $7,0 \log \text{ CFU ml}^{-1}$.

Như đã đề cập trên đây, ưu điểm của chế phẩm này là ở chỗ nền của chế phẩm cũng có thể đóng vai trò là môi trường sinh trưởng cho phép quá trình lên men của vi sinh vật. Do đó, để thuận tiện cho việc sản xuất, không cần phải cải biến chế phẩm từ bước lên men thành chế phẩm mới để phủ lên bề mặt bánh mỳ.

Nền của chế phẩm thường được tiệt trùng trước khi sử dụng vì mục đích an

toàn và kiểm soát. Ví dụ, việc tiệt trùng có thể bao gồm gia nhiệt ở khoảng 90°C trong khoảng 15 phút.

Tốt hơn, nếu chất cấy (hoặc nguyên liệu khởi đầu) chứa vi sinh vật lợi khuẩn được bổ sung vào nền của chế phẩm sau khi nó gần như đã nguội từ nhiệt độ tiệt trùng. Các tác giả sáng chế thấy rằng việc cấy 0,05% khối lượng/khối lượng có thể là thích hợp.

Tốt hơn, nếu quy trình này bao gồm ủ nền của chế phẩm trong pha sinh trưởng ổn định sớm.

Ví dụ, trong trường hợp của *Lactobacillus casei* 431 hoặc LC431, bước ủ có thể được thực hiện trong 16 giờ ở 37°C để thu được lượng tế bào thích hợp.

Tốt hơn, nếu quy trình này bao gồm ủ nền của chế phẩm đến khi dịch nuôi cấy lợi khuẩn có lượng tế bào sống trên 7 log CFU ml⁻¹.

Tốt hơn, nếu quy trình này bao gồm ủ nền của chế phẩm đến khi dịch nuôi cấy lợi khuẩn có số lượng tế bào sống trên 9,0 log CFU ml⁻¹.

Lợi ích của số lượng tế bào sống này được thảo luận trên đây.

Tốt hơn, nếu quy trình này bao gồm đồng nhất hoặc khuấy môi trường tạo thành (thường là sữa đông) để tạo ra chế phẩm trải được hoặc xịt được.

Độ pH của môi trường sữa đông tạo thành được ghi nhận là 4,45 sau 16 giờ ủ thử nghiệm sử dụng *Lactobacillus casei* 431. Độ pH này không ảnh hưởng tiêu cực đến khả năng sống sót của tế bào lợi khuẩn.

Tóm lại, các ưu điểm của sáng chế có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở một hoặc nhiều đặc điểm sau đây:

- nền của chế phẩm đơn giản thu được từ sữa, có lợi ích là dễ dàng thu được, dễ dàng sản xuất và sử dụng, và có khả năng cao được cộng đồng chấp nhận;
- nền thu được từ sữa, cho phép ủ trước vi khuẩn, giúp giữ cho độ nhớt của chế phẩm nằm trong khoảng được ưu tiên giúp phủ và/hoặc trải lên bề mặt của bánh mỳ, giúp nó dính lên bề mặt của bánh mỳ, và giúp duy trì khả năng sống tốt của lợi khuẩn trong một khoảng thời gian hữu ích về mặt thương mại;

- có thể duy trì khả năng sống tối ưu của lợi khuẩn (số lượng CFU) ở mức hoạt độ nước cao của sản phẩm thực phẩm như bánh mỳ;
- có khả năng tạo ra sản phẩm thực phẩm như bánh mỳ được làm giàu bằng lợi khuẩn với lượng tế bào sống chấp nhận được trong thương mại và điều trị (trên $7,0 \log \text{CFU ml}^{-1}$);
- độ ổn định tốt của tế bào lợi khuẩn sống sau thử nghiệm chuẩn năm ngày ở 25°C (tuổi thọ bình thường của bánh mỳ);
- tránh sử dụng các bột nhào bất lợi (ảnh hưởng đến mùi vị và hình thức bên ngoài) hoặc nhu cầu phủ nguyên vẹn lên bánh mỳ trước khi nướng (làm giảm đáng kể khả năng sống của tế bào);
- phủ thành lớp mỏng cho phép làm khô hiệu quả, điều này là quan trọng để sản phẩm thu được không có hàm ẩm và/hoặc hoạt độ nước bị thay đổi đáng kể;
- không cần đến thiết bị đặc biệt hoặc chủng lợi khuẩn chịu được nhiệt độ cao;
- không tác động bất lợi đáng kể lên cảm quan chung của bánh mỳ được làm giàu bằng lợi khuẩn so với bánh mỳ đối chứng thông thường (mùi vị, cảm giác hoặc hình thức bên ngoài) và/hoặc
- không ảnh hưởng đến độ ổn định khi bảo quản của bánh mỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế môi trường sinh trưởng

Môi trường sinh trưởng cho *Lactobacillus casei* LC431 được điều chế theo các bước sau đây.

1. Điều chế môi trường chứa 8,0% khối lượng/khối lượng sữa tách bơ đã hoàn nguyên và 4,0% khối lượng/khối lượng glucoza hoặc lactoza.
2. Gia nhiệt môi trường đến 90°C trong 15 phút.
3. Để nguội đến nhiệt độ trong phòng.

Ví dụ 2: Bào chế chế phẩm lợi khuẩn được ủ trước

Chế phẩm lợi khuẩn *Lactobacillus casei* LC431 được điều chế như sau:

1. Bổ sung 0,05% khối lượng/khối lượng chất cấy là chủng nuôi cấy LC431 đông khô vào môi trường sinh trưởng đã được điều chế trước trong Ví dụ 1.
2. Ủ môi trường sinh trưởng đã được cấy lợi khuẩn trong 16 giờ ở 37°C.
3. Đồng nhất sữa đông mềm tạo thành để tạo ra chất lỏng trải được/xịt được.

Ví dụ 3: Tạo ra bánh mỳ được làm giàu lợi khuẩn

Bánh mỳ được làm giàu lợi khuẩn *Lactobacillus casei* LC431 được tạo ra như sau:

- a) Xịt 500µl đến 1ml chế phẩm (xem Ví dụ 2) lên bề mặt ổ bánh mỳ đã được nướng trước, đảm bảo lớp mỏng được phủ đều lên bề mặt này.
- b) Sấy khô lớp mỏng trên bề mặt bánh mỳ trong lò sấy đối lưu không khí cưỡng bức trong 15 phút ở 50°C.
- c) Bảo quản bánh mỳ được làm giàu lợi khuẩn này ở 25°C hoặc thấp hơn.

Ví dụ 4: Phân tích Log CFU sau khi tạo ra và bảo quản bánh mỳ được làm giàu lợi khuẩn *L. casei* 431(LC431)

Bánh mỳ được làm giàu lợi khuẩn được tạo ra theo Ví dụ 3. Tác giả sáng chế đã kiểm tra khả năng sống của tế bào LC431 (Log CFU) trong ba thử nghiệm khác nhau. Log CFU được ghi lại cho LC431 đối chứng, sau khi phủ/sấy khô, cũng như sau khi bảo quản trong 5 ngày ở 25°C (điều kiện kiểm tra bảo quản chuẩn cho bánh mỳ).

Như có thể thấy trong Bảng 1 dưới đây (và sau đây trong Fig.1), Log CFU, quy trình phủ và sau đó là sấy khô chế phẩm trên vỏ trên cùng và đế dưới cùng của bánh mỳ gây mất khả năng sống của tế bào rất ít. Sau khi bảo quản, sự mất thêm khả năng sống của tế bào được ghi nhận trong cả hai mẫu, nhưng vẫn cao hơn nhiều mức thương mại và điều trị là 7,0 Log CFU được yêu cầu. Nên chú ý là nhiều loại bánh mỳ khác nhau được kiểm tra bằng cách sử dụng phương pháp này có các kết quả về khả năng sống của lợi khuẩn tương tự nhau được quan sát thấy. Hoạt độ nước của

bánh mỳ trước khi phủ lợi khuẩn thường thay đổi trong khoảng từ 0,75 đến 0,94, và sau khi sấy khô, hoạt độ nước thay đổi từ 0,66 đến 0,74.

Mẫu	Thử nghiệm 1	Thử nghiệm 2	Thử nghiệm 3	Trung bình
LC431 đã được lên men (đối chứng)	9,98	9,7	9,82	9,83
Vỏ trên cùng của bánh mỳ (sau khi sấy)	9,7	9,65	9,5	9,62
Đế dưới cùng của bánh mỳ (sau khi sấy)	9,43	9,3	9,32	9,35
Vỏ trên cùng của bánh mỳ (sau khi bảo quản)	8,42	8,26	8,38	8,35
Đế dưới cùng của bánh mỳ (sau khi bảo quản)	8,3	8,22	8,21	8,24

Bảng 1: Phân tích Log CFU

Ví dụ 5: Phân tích Log CFU sau khi tạo ra và bảo quản bánh mỳ được làm giàu bằng hỗn hợp lợi khuẩn LC431, *B. lactis*12 (BB12) và *L. acidophilus* 05(LA05)

Bánh mỳ được làm giàu bằng hỗn hợp lợi khuẩn LC431, BB12 và LA05 được tạo ra theo Ví dụ 3, tuy nhiên sử dụng cả ba vi sinh vật này làm chất cấy, không chỉ LC431. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2 (và cả Fig.2).

Tương tự Ví dụ 4, sau đó tác giả sáng chế kiểm tra khả năng sống của các tế bào trong hỗn hợp lợi khuẩn làm giàu. Các kết quả có lợi và đáng ngạc nhiên tương tự nhau được quan sát thấy trong thử nghiệm này chỉ ra rằng giải pháp của sáng chế không chỉ giới hạn ở các loại lợi khuẩn cụ thể mà còn có thể bao gồm cả hỗn hợp lợi khuẩn.

Mẫu	Thử nghiệm 1	Thử nghiệm 2	Trung bình
LC431 + BB12 + LA05 đã được lên men	9,42	9,6	9,5
Vỏ trên cùng của bánh mỳ (sau khi sấy)	9,1	9,3	9,2
Đế dưới cùng của bánh mỳ (sau khi sấy)	9,3	9,45	9,4
Vỏ trên cùng của bánh mỳ (sau khi bảo quản)	8,02	8,23	8,1
Đế dưới cùng của bánh mỳ (sau khi bảo quản)	8,3	8,25	8,3

Bảng 2: Phân tích Log CFU

Ví dụ 6: Phân tích Log CFU sau khi tạo ra và bảo quản bánh mỳ được làm giàu *Lactobacillus plantarum* 299V

Thử nghiệm tương tự như được thực hiện cho Ví dụ 5, nhưng lần này sử dụng *Lactobacillus plantarum* 299V. Như đã thảo luận trên đây, vi sinh vật lợi khuẩn này là mục tiêu hấp dẫn do tính hữu ích của nó trong việc điều trị IBS. Các kết quả được thể hiện trong Fig.4.

Các giá trị tuyệt đối sau 5 ngày là 9,12 và 9,07 log CFU cho mỗi bánh mỳ (lần lượt cho vỏ trên cùng và dưới cùng sau khi bảo quản), được chuyển thành 1,3 tỉ và 1,17 tỉ tế bào sống được phân phối cho mỗi bánh mỳ. Đây là thành tựu quan trọng về mặt thương mại, vì người nộp đơn đã có thể thực hiện sáng chế bằng cách sử dụng nhiều sinh vật lợi khuẩn khác nhau, và trong trường hợp của *Lactobacillus plantarum* 299V, các kết quả thể hiện số lượng tế bào lợi khuẩn sống cực kỳ tốt sau thử nghiệm bảo quản trong năm ngày.

Do đó việc phân phối chủng lợi khuẩn *Lactobacillus plantarum* 299v phổ biến và có hiệu lực lâm sàng bằng bánh mỳ được làm giàu có thể là lựa chọn rất hấp dẫn

cho các khách hàng mục tiêu đang bị mắc rối loạn dạ dày-ruột phổ biến được gọi là Hội chứng ruột kích thích.

Ví dụ 7: So sánh chế phẩm được ủ trước mới được phủ lên bánh mỳ với các đồ uống lợi khuẩn đã có trên thị trường

Để kiểm tra độ ổn định của các chủng lợi khuẩn khác nhau và lợi ích của việc ủ trước các vi khuẩn trong chế phẩm này, chế phẩm thử nghiệm với LC431 (được lên men trong 8,0% (khối lượng/khối lượng) sữa tách bơ hoàn nguyên và 4,0% (khối lượng/khối lượng) dextroza monohydrat như được mô tả trên đây) được so sánh với hai đồ uống đã có trên thị trường (Yakult và Activate).

Với mỗi nhóm, 1ml chế phẩm này được trải trên mỗi mẫu bánh mỳ và được sấy khô ở 50°C trong 15 phút trong lò sấy kiểu đối lưu không khí cưỡng bức. Pipet vi thể được sử dụng để phân phối 1ml chất lỏng ở dạng những giọt nhỏ trên toàn bộ bề mặt của bánh mỳ và trải đồng đều với sự trợ giúp của dao bay. Sau đó các mẫu được sấy khô ở 50°C trong 15 phút trong lò sấy kiểu đối lưu không khí cưỡng bức. Sau đó các mẫu bánh mỳ được đóng vào túi LDPE và được bảo quản trong máy ủ phòng thí nghiệm được duy trì ở nhiệt độ hằng định là 25°C trong 5 ngày. Khả năng sống của lợi khuẩn được kiểm tra trước và sau khi phủ lên vỏ trên cùng và dưới cùng của bề mặt bánh mỳ, và cả sau khi bảo quản trong 5 ngày.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.3. Sữa đông lên men chứa chủng đơn *L. Casei* 431 tạo ra nồng độ tế bào sống rất cao tới 9,9 log CFU. Sự mất khả năng sống do sấy khô là rất nhỏ và được ghi nhận là 9,7 và 9,43 lần lượt đối với vỏ trên cùng và dưới cùng của bánh mỳ. Ngoài ra, sự giảm lượng tế bào chỉ 1,3 và 1,1 log được quan sát thấy lần lượt trên vỏ trên cùng và dưới cùng, sau thời gian bảo quản. Điều này được so sánh với các sản phẩm đã có trên thị trường bị mất khả năng sống của tế bào mạnh hơn nhiều. Đối với chế phẩm thử nghiệm, các giá trị tuyệt đối sau 5 ngày là 8,4 và 8,3 log CFU, chuyển thành 250 triệu và 200 triệu tế bào sống được phân phối cho mỗi bánh mỳ. Các kết quả này cao hơn 10 lần so với tiêu chuẩn phân phối ít nhất là 10 triệu tế bào cho mỗi bánh mỳ.

Ví dụ 8: Phân tích cảm quan về bánh mỳ lợi khuẩn

Thử nghiệm cảm quan được thực hiện để xác định khả năng chấp nhận được về

mùi vị, cảm giác và hình thức bên ngoài của mẫu bánh mỳ được làm giàu lợi khuẩn 1 (như được sử dụng trong Ví dụ 4) và mẫu bánh mỳ lợi khuẩn 2 (như được sử dụng trong Ví dụ 5) so với đối chứng (bánh mỳ bình thường, không chứa lợi khuẩn). Điểm được tính cho khả năng được chấp nhận theo thang điểm bắt đầu từ 1 (khả năng được chấp nhận thấp) đến 9 (khả năng được chấp nhận rất cao).

Như có thể thấy trong Bảng 3 dưới đây, mẫu bánh mỳ lợi khuẩn 1 và 2 có thể so sánh được với mẫu bánh mỳ đối chứng về mỗi thử nghiệm cụ thể, và khả năng chấp nhận được chung.

Thử nghiệm	Đối chứng	Mẫu bánh mỳ lợi khuẩn 1	Mẫu bánh mỳ lợi khuẩn 2
Hình thức vỏ	6	6	6,5
Mùi	7,5	7	6,7
Màu sắc vỏ	6,5	6,85	6,55
Độ giòn	7	7,2	6,8
Độ cứng vỏ	8	7	6,7
Mùi vị	7,6	7,2	7,8
Khả năng chấp nhận được chung	7,4	7,1	6,9

Bảng 3: Phân tích cảm quan

Ví dụ 9: Phân tích độ ẩm của bánh mỳ lợi khuẩn

Hàm ẩm của vỏ (%) và hoạt độ nước của mẫu bánh mỳ lợi khuẩn 1 và 2 chỉ cao hơn một chút so với đối chứng. Các giá trị này có thể chấp nhận được với mục đích thương mại, và không chắc chắn là người tiêu dùng sẽ có thể nhận ra được bất kỳ khác biệt đáng kể nào, như được minh họa bằng phân tích về khả năng chấp nhận được được thể hiện trong Ví dụ 6.

Hàm ẩm cao hơn một chút trong các mẫu thử nghiệm sẽ không tác động bất lợi

đến tuổi thọ của bánh mỳ, và vẫn dự kiến là bánh mỳ được làm giàu lợi khuẩn sẽ vẫn đáp ứng được các yêu cầu về tuổi thọ trong 5 ngày.

Thử nghiệm	Đối chứng	Mẫu bánh mỳ lợi khuẩn 1	Mẫu bánh mỳ lợi khuẩn 2
Hàm ẩm của vỏ %	7,2	8,1	7,85
Hoạt độ nước của vỏ	0,75	0,74	0,72

Bảng 4: Phân tích độ ẩm

Các khía cạnh của sáng chế chỉ được mô tả bằng cách lấy ví dụ và nên được hiểu là các cải biến và bổ sung có thể được tạo ra cho sáng chế này mà không vượt quá phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ.

1. Sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn,

trong đó ít nhất một phần bề mặt của sản phẩm thực phẩm chứa chế phẩm được phủ lên bao gồm ít nhất một vi sinh vật lợi khuẩn,

trong đó, ngoài (các) vi sinh vật lợi khuẩn, chế phẩm được phủ lên còn bao gồm nền chứa các thành phần có nguồn gốc từ sữa nguyên kem hoặc vốn tìm thấy trong sữa, bao gồm sữa, chất rắn trong sữa hoặc sữa hoàn nguyên;

trong đó chế phẩm được phủ lên có số lượng tế bào vi sinh vật lợi khuẩn là trên $7 \log \text{CFU ml}^{-1}$;

trong đó sản phẩm thực phẩm là sản phẩm thực phẩm được nướng;

trong đó chế phẩm trên bề mặt của sản phẩm thực phẩm có độ dày nhỏ hơn 0,1mm; và

trong đó chế phẩm này gần như trong suốt trên sản phẩm thực phẩm được nướng khi được sấy khô.

2. Sản phẩm thực phẩm theo điểm 1, trong đó sản phẩm thực phẩm được nướng là bánh mỳ.

3. Sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm được phủ có số lượng tế bào vi sinh vật lợi khuẩn là trên $9,0 \log \text{CFU ml}^{-1}$.

4. Sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó sản phẩm này có mức hoạt độ nước (water activity - a_w) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 0,9.

5. Sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ít nhất một loài vi sinh vật lợi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn axit lactic, vi khuẩn không sinh axit lactic và nấm men không gây bệnh và tùy ý trong đó ít nhất một vi sinh vật lợi khuẩn được chọn từ nhóm gồm có *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bifidus* (bifidobacterium), *Streptococcus thermophilus*, hoặc hỗn hợp của chúng.

6. Sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm bao gồm sữa hoàn nguyên và/hoặc ít nhất một thành phần đông tụ, trong đó ít nhất một thành phần đông tụ bao gồm sữa đông tụ, protein từ sữa đông tụ hoặc các thành phần từ sữa đông tụ khác.
7. Sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn theo điểm 6, trong đó chế phẩm này bao gồm chất làm đông tụ, ví dụ, axit lactic.
8. Sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nền của chế phẩm được phủ bao gồm đường với lượng nằm trong khoảng từ 3 đến 20% (trọng lượng/thể tích) hoặc tốt hơn là từ 7 đến 10% (trọng lượng/thể tích).
9. Sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nền của chế phẩm được phủ bao gồm chất béo với lượng nhỏ hơn 5% (trọng lượng/thể tích).
10. Sản phẩm thực phẩm được làm giàu lợi khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này bao gồm đường có nguồn gốc từ sữa, ví dụ, được chọn từ nhóm bao gồm lactoza, glucoza và/hoặc galactoza.

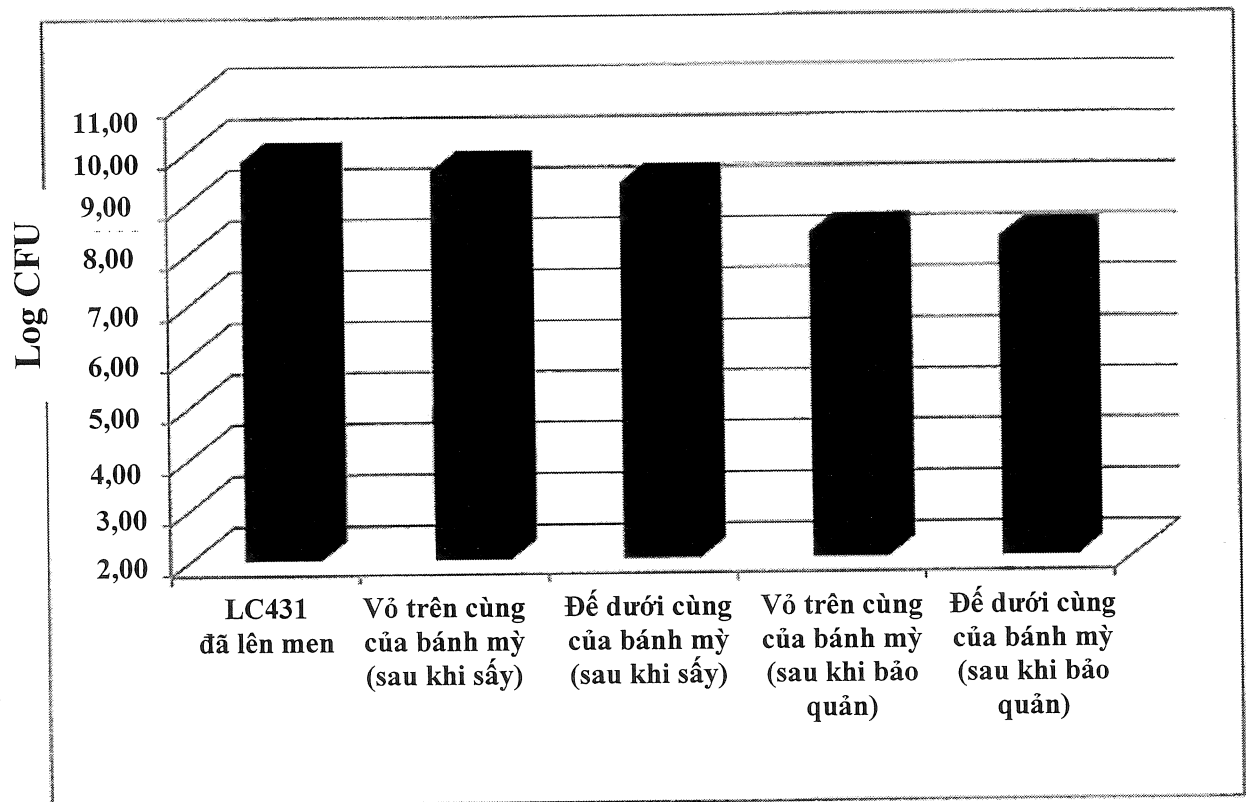
Fig.1

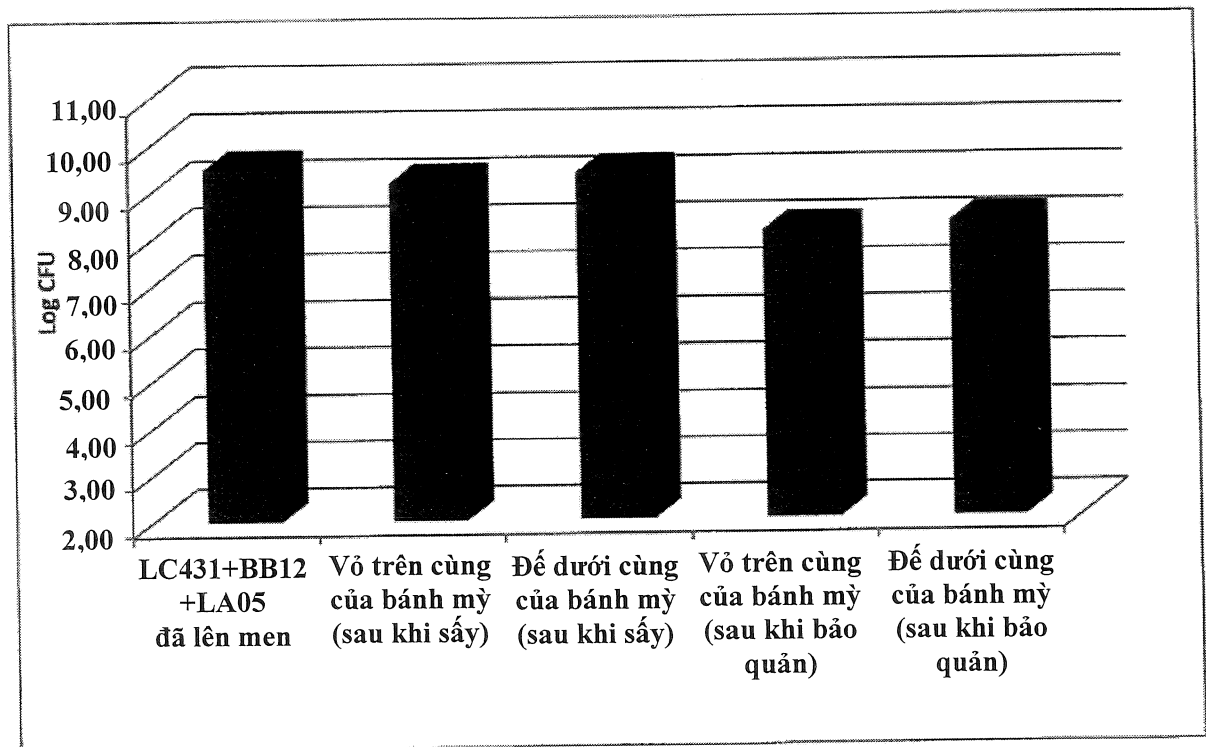
Fig.2

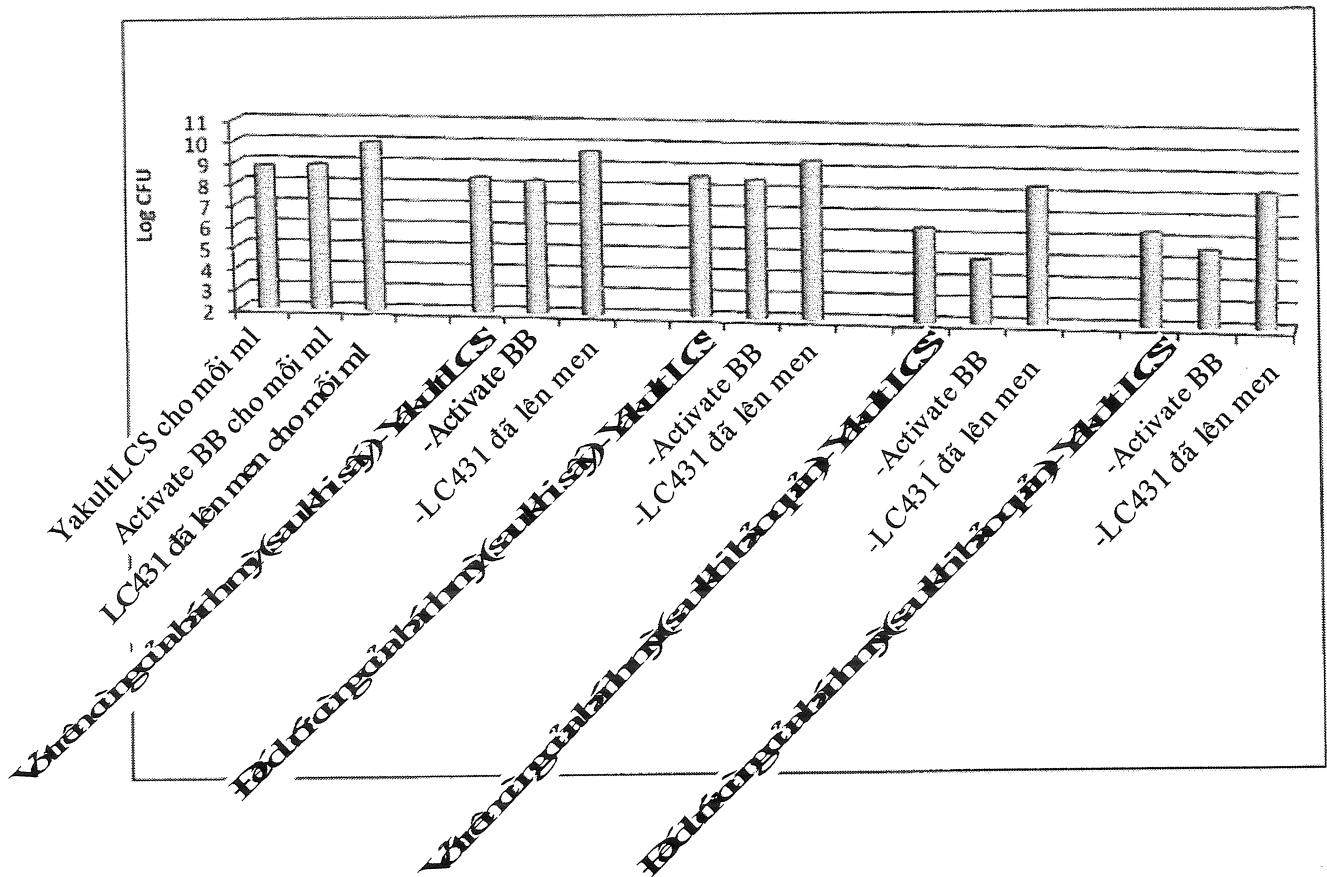
Fig.3

Fig.4