



(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)



1-0051537

(51)^{2020.01} A23C 9/123

(13) B

(21) 1-2021-07913

(22) 26/05/2020

(86) PCT/EP2020/064567 26/05/2020

(87) WO2020/239761 03/12/2020

(30) 19177015.5 28/05/2019 EP

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/04/2022 409A

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

Boege Alle 10-12, 2970 Hoersholm, Denmark

(72) CURIC-BAWDEN, Mirjana (US); NICHOLSON, Matt; (US).

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

(54) QUY TRÌNH TẠO RA SẢN PHẨM SỮA LÊN MEN BẰNG MỨC VI KHUẨN
PROBIOTIC GIA TĂNG VÀ SẢN PHẨM SỮA LÊN MEN ĐƯỢC TẠO RA
BẰNG QUY TRÌNH NÀY

(21) 1-2021-07913

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm và phương pháp để tạo ra sản phẩm sữa lên men có lượng vi khuẩn probiotic gia tăng. Cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình tạo ra sữa lên men, quy trình này bao gồm thêm vào nền sữa (i) men cái bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, (ii) một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic, với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5 và (iii) chủng probiotic được chọn từ chủng *Lactobacillus* và chủng *Bifidobacterium*. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm và đến thực phẩm sữa lên men hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi được tạo ra bằng quy trình theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm và quy trình tạo ra sản phẩm sữa lên men bằng một lượng vi khuẩn probiotic gia tăng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chủng probiotic, như *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* và *Bifidobacterium infantis* được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm sữa lên men.

Các chủng probiotic này, khi được nuôi cấy trong sữa dưới dạng các chủng đơn, sẽ phát triển rất chậm. Ngoài ra, một số chủng không có khả năng axit hóa dưới pH 6,0 trong 24 giờ, ví dụ, xem Fig. 1, cho thấy rằng BB-12® và LGG® (BB-12® và LGG® là các nhãn hiệu đã đăng ký của Chr. Hansen A/S), tương ứng, không sinh trưởng/axit hóa tốt khi chúng được nuôi cấy mà không có môi trường nuôi cấy sữa chua. Kết hợp với môi trường nuôi cấy sữa chua, (các) chủng probiotic có thể phát triển tốt hơn một chút so với một dòng đơn, nhưng hiếm khi phát triển nhiều hơn 1 log. Do vị và hương mong muốn của người tiêu dùng, quá trình lên men sữa chua điển hình được dừng lại ở pH=4,60-4,55. Ngoài ra, vì lý do an toàn, điều quan trọng là phải đạt được độ pH thấp, ví dụ pH dưới xấp xỉ 5,5, chẳng hạn như pH=4,60-4,55. Tại thời điểm này (pH=4,60-4,55) các loài sữa chua, *Streptococcus thermophilus* (ST) và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB) chiếm ưu thế so với (các) chủng probiotic. Nói chung, sữa chua probiotic cuối cùng chứa khoảng 5×10^8 đến 1×10^9 CFU/ml ST và LB, và từ $2-3 \times 10^7$ đến 1×10^8 CFU/ml chủng probiotic.

Ngoài ra, quá hạn sử dụng (tức là bảo quản trên 50-60 ngày, là thời hạn sử dụng điển hình của các sản phẩm lên men tươi ở Bắc Mỹ và một số khu vực khác trên thế giới) trong sữa chua probiotic điển hình, số lượng tế bào của probiotic bị giảm. Ví dụ, trong suốt thời hạn sử dụng, số lượng tế bào của *Bifidobacterium*, BB-12® thường giảm từ 0,5-1 log trong vòng 50-60 ngày, tùy thuộc vào môi trường nuôi cấy sữa chua, nền sữa, điều kiện nuôi cấy và bảo quản. Số lượng tế bào của LA-5® (LA-5® là nhãn hiệu đã đăng ký của Chr. Hansen A/S) thường giảm từ 1-2 log trong thời hạn sử dụng 50-60 ngày.

Vẫn có nhu cầu trên một số thị trường hoặc một số loại sản phẩm nhất định, để đạt được số lượng probiotic cao hơn mức có thể đạt được bằng cách pha trộn môi trường nuôi cấy sữa chua truyền thống với chủng probiotic ($2-3 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ CFU (*colony forming unit*: đơn vị hình thành khuẩn lạc)/ml), cụ thể trong đó số lượng tế bào được duy trì trong thời hạn sử dụng của sản phẩm. Ví dụ về các sản phẩm này là:

1) Các mũi probiotic lên men trong đó mức probiotic được ghi nhận (1×10^9 CFU/khẩu phần) phải có trong 65 ml sản phẩm, sau 60 ngày kể từ ngày của thời hạn sử dụng;

2) Sữa chua probiotic trong đó có hàm lượng probiotic được ghi nhận (1×10^9 CFU/khẩu phần) trong thời gian dài hơn 50-60 ngày;

3) Sữa chua probiotic với số lượng rất cao ($10-20 \times 10^9$ CFU/khẩu phần);
và

4) Sữa chua đông khô ‘trân châu’ (viên) và giọt (bánh xốp). Sữa chua probiotic được đưa vào sáng chế này phải chứa số lượng tế bào rất cao của một chủng probiotic (5×10^8 CFU/g) để đảm bảo liều lượng hiệu quả (1×10^9 CFU/khẩu phần tại thời điểm cuối cùng của hạn sử dụng) sau khi chế biến, đông lạnh và đông khô.

Môi trường nuôi cấy và hỗn hợp các chủng được thiết kế đặc biệt có thể hỗ trợ sự tăng trưởng của, ví dụ, *Bifidobacterium*, BB-12® lên đến $1-2 \times 10^8$ CFU/ml (xem, ví dụ, WO 2008/148561). Số lượng cao hơn của một số chủng probiotic cũng có thể đạt được bằng cách tăng tỷ lệ nuôi cấy (cao hơn 5-10 lần, 0,05% -0,1%), nhưng giải pháp này tốn kém và hầu như không bao giờ được sử dụng.

Công bố đơn quốc tế số WO 2017/125600 cho thấy rằng việc đồng nuôi cấy Lactoza (-) Sucroza (+) *S. thermophilus* (ST) kết hợp với *L. paracasei* CRL 431 trong các điều kiện cụ thể dẫn đến số lượng tế bào *L. paracasei* CRL 431 tăng lên so với việc đồng nuôi cấy Lactoza (+) *S. thermophilus* (ST) kết hợp với *L. paracasei* CRL 431.

Vẫn cần có các chế phẩm và phương pháp khác nữa để tạo ra sản phẩm sữa lên men với số lượng tế bào probiotic có thể sống được gia tăng như *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis*, BB-12®, *Lactobacillus acidophilus*, LA-5®, hoặc *Lactobacillus rhamnosus*, LGG®, cụ thể trong đó, số lượng tế bào có thể sống được tăng lên trong thời hạn sử dụng của sản phẩm sữa lên men, thường là 60 ngày, tốt hơn là ở 4°C.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa trên phát hiện thử nghiệm đáng ngạc nhiên rằng khi sử dụng:

a) men cái bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza; và

b) một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong a), trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như

nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3 (ví dụ, khoảng 0,41% sucroza, trong đó, % là tính theo trọng lượng trên thể tích của tổng lượng của nền sữa (% trọng lượng/thể tích), và khi nền sữa bao gồm khoảng 2% trọng lượng (wt.) chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein, men cái trong bước a) được thêm vào tốt hơn là dưới dạng môi trường nuôi cấy được cô đông lạnh với lượng là khoảng 0,01% trọng lượng trên thể tích của tổng lượng của nền sữa (% trọng lượng/thể tích) và nhiệt độ lên men là khoảng 38°C), trong quá trình lên men nền sữa với sự có mặt của chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm *chủng Lactobacillus* và *chủng Bifidobacterium*, lượng của vi khuẩn probiotic có mặt trong sản phẩm sữa lên men gia tăng như được so sánh với lượng vi khuẩn probiotic có mặt trong sản phẩm sữa lên men, được lên men bằng:

- chỉ bằng vi khuẩn probiotic (như được nêu trên, các chủng probiotic, khi được cấy trong sữa dưới dạng chủng đơn, tăng trưởng rất chậm, xem thêm Fig. 1), hoặc
- bằng men cái bao gồm ít nhất một *chủng Streptococcus thermophilus*, mà không thiếu hụt lactoza, và ít nhất một *chủng Lactobacillus* mà không thiếu hụt lactoza, ví dụ, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain (lactoza truyền thống (+) môi trường nuôi cấy sữa chua), hoặc
- bằng men cái bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, như *chủng Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, với sự có mặt của sucroza với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sữa lên men là thấp hơn 4,9, như khoảng 4,55 (ví dụ, 0,9% sucroza, trong đó, % là phần trăm trọng lượng/thể tích (trọng lượng/thể tích %) trên cơ sở nền sữa, khi nền sữa bao gồm khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein, men cái được thêm vào tốt hơn là dưới dạng môi trường nuôi cấy được

cô đông lạnh với lượng là 0,01% trọng lượng/thể tích của tổng lượng của nền sữa và nhiệt độ lên men là 38°C).

Ngoài ra, có sự cải thiện hoặc tăng khả năng sống sót của các tế bào probiotic theo thời gian, ví dụ trong thời hạn sử dụng (bảo quản) trong ít nhất 60 ngày ở khoảng 4°C. Sự gia tăng số lượng vi khuẩn probiotic sống được có mặt trong sản phẩm sữa lên men được duy trì theo thời gian, ví dụ, ngay sau khi quá trình lên men hoàn thành, tốt hơn là hơn 1 ngày sau khi quá trình lên men hoàn thành, chẳng hạn như hơn 15 ngày, hoặc hơn hơn 45 ngày, thậm chí hơn 60 ngày sau khi quá trình lên men đã hoàn thành. Theo đó, tổng số tế bào của các chủng probiotic có thể sống được với sự có mặt của men cái theo sáng chế như được xác định trong bước a) ở trên được tăng lên so với tổng số tế bào của các probiotic có thể sống được trong trường hợp không có mặt men cái theo sáng chế như định nghĩa ở mục a) ở trên, và sự gia tăng này được duy trì theo thời gian, ví dụ, sau 60 ngày bảo quản (thời hạn sử dụng), tốt hơn là ở khoảng 4°C.

Do đó, sáng chế đề xuất quy trình tạo ra sản phẩm sữa lên men, quy trình này bao gồm các bước:

i. Thêm vào nền sữa:

a. men cái chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza;

b. một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong mục a., trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3; và

c. chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm *chủng Lactobacillus* và *chủng Bifidobacterium*;

ii. và lên men nền sữa trong một khoảng thời gian cho đến khi độ pH đích (tốt hơn là từ khoảng 4,8 đến khoảng 4,0, tốt hơn nữa là từ khoảng 4,6 đến khoảng 4,3, thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 4,55) đạt được để thu được sản phẩm sữa lên men.

Sáng chế còn đề xuất sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng quy trình theo sáng chế, và thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, và chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm *chủng Lactobacillus* và *chủng Bifidobacterium*, tốt hơn là trong đó, chủng *Lactobacillus* probiotic không phải là chủng *Lactobacillus paracasei*, thậm chí tốt hơn nữa là trong đó, chủng *Lactobacillus* probiotic không phải là chủng *L. paracasei* CRL 431, được lưu giữ dưới tên ATCC 55544 hoặc *chủng L. paracasei* CHCC 2115, được lưu giữ dưới tên DSM 19465, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi bao gồm lớn hơn $1,3E+08$ CFU vi khuẩn probiotic/g của sản phẩm sữa lên men (CFU/g), tốt hơn là lớn hơn $2E+08$ CFU/g, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn $5E+08$ CFU/g chủng probiotic sau khi lên men, tốt hơn là sau ít nhất 1 ngày bảo quản ở khoảng 4°C.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm để tạo ra sản phẩm sữa lên men bao gồm:

a) men cái chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, như chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza; và

b) một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong a), trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3,

Ngoài ra, sáng chế đề xuất việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế để làm tăng số lượng tế bào probiotic sống được trong sản phẩm sữa lên men, hoặc để làm cải thiện sự tồn tại của các tế bào probiotic theo thời gian tốt hơn là trong 60 ngày, tốt hơn là ở 4°C, như được so sánh với sản phẩm sữa lên men được lên men bằng chế phẩm chứa

a) men cái chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus*, mà không thiếu hụt lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* mà không thiếu hụt lactoza, tốt hơn là a *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* strain mà không thiếu hụt lactoza; và/hoặc

b) i. men cái chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, và

ii. một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong i), trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig 1. Profil axit hóa của *Bifidobacterium*, BB-12® (chủng *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12® được lưu giữ dưới tên DSM 15954) (BB-12®, A, đường nét liền) và *L. rhamnosus*, LGG® (chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG®, được lưu giữ dưới tên ATCC 53103) (LGG®, A, đường nét đứt), được cấy trong nền sữa ở 0,01% và được ủ ở 38°C.

Fig 2. Profil axit hóa của hỗn hợp chứa Acidifix® 1,0 (Acidifix® là chủng đã được đăng ký Nhãn hiệu của Chr. Hansen A/S) và *Bifidobacterium*, BB-12® (chủng *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954) (“Acidifix® 1,0, BB-12®”, đường chấm chấm), Acidifix® 1,0, BB-12® và LA-5® (chủng *Lactobacillus acidophilus*, LA-5®, được lưu giữ dưới tên DSM 13241) (“Acidifix® 1,0, BB-12® và LA-5®”, đường nét liền) hoặc Acidifix® 1,0, BB-12® và *L. rhamnosus*, LGG® (chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG®, được lưu giữ dưới tên ATCC 53103) (“Acidifix® 1,0, BB-12® và LGG®”, đường nét đứt), được cấy trong nền sữa và được ủ ở 38°C.

Fig 3. Profil axit hóa của Acidifix® 1,0 + 0,01% BB-12® trong sữa với 0,41% (B) và 0,90% sucroza (D). YoFlex® Mild® 1,0 + 0,01 BB-12® (E) được sử dụng làm đối chứng (YoFlex® Mild là chủng đã được đăng ký Nhãn hiệu của Chr. Hansen A/S). % sucroza là (trọng lượng/thể tích) trên cơ sở nền sữa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Quy trình để tạo ra sản phẩm sữa lên men

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

- i. Thêm vào nền sữa:
 - a. men cái chứa vi khuẩn axit lactic (LAB) bao gồm ít nhất một chủng

Streptococcus thermophilus thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza;

b. một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong mục a., trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3; và

c. chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus* và chủng *Bifidobacterium*;

ii. lên men nền sữa trong một khoảng thời gian cho đến khi đạt target hoặc desired pH đạt được để thu được sản phẩm sữa lên men.

Trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó, thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men” tức là thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi trong đó, việc điều chế thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi liên quan đến quá trình lên men nền sữa bằng vi khuẩn axit lactic. “Sản phẩm sữa lên men” được sử dụng ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các sản phẩm như sản phẩm sữa lên men ưa nhiệt, ví dụ, sữa chua, sữa chua uống, sữa chua khuấy, sữa chua đặc và sữa chua giống đồ uống. Ví dụ, sữa chua có thể được lọc để loại bỏ hầu hết váng sữa, dẫn đến độ đặc hơn so với sữa chua chưa qua lọc (sữa chua “đã lọc” hoặc “độ rắn cao”).

Trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó, thuật ngữ “sữa” cần được hiểu trong bản mô tả này của sáng chế, là chất tiết của vi khuẩn thu được bằng cách vắt sữa động vật có vú bất kỳ, chẳng hạn như bò, cừu, dê, trâu hoặc lạc đà. Theo phương án được ưu tiên, sữa là sữa bò. Theo sáng chế, sữa có thể đã được chế biến và thuật ngữ “sữa” bao gồm sữa nguyên chất, sữa tách béo, sữa không béo, sữa ít béo, sữa nguyên kem, sữa đã khử lactoza (ví dụ, sữa siêu lọc (UF'd), miễn là lactoza không bị enzym lactaza tiêu hóa thành glucoza và galactoza), hoặc sữa cô đặc.

Sữa không béo là sản phẩm sữa không béo hoặc sữa gầy. Sữa ít béo thường được định nghĩa là sữa có chứa từ khoảng 1% đến khoảng 2% chất béo. Sữa nguyên chất béo thường chứa 2% chất béo trở lên. Thuật ngữ "sữa" được dùng để chỉ các loại sữa từ các nguồn khác nhau. Nguồn sữa của động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở bò, cừu, dê, trâu, lạc đà, lạc đà llama, ngựa cái và hươu.

Thuật ngữ “nền sữa” có thể là bất kỳ nguyên liệu sữa nào có thể được lên men theo sáng chế. Do đó, nền sữa hữu ích bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phần đoạn và dung dịch/hỗn dịch của sữa hoặc các sản phẩm giống chứa protein bất kỳ, chẳng hạn như sữa nguyên chất hoặc ít béo, sữa tách béo, sữa tách bơ, sữa bột hoàn nguyên, sữa đặc, sữa khô, whey, whey permeate (*là sản phẩm thu được bằng cách tách protein và chất béo sữa ra khỏi sữa, sữa tách một phần chất béo hoặc sữa tách béo bằng siêu lọc*), lactoza, nước cái từ sự kết tinh của lactoza, dịch cô đặc whey protein hoặc kem. Rõ ràng, nền sữa có thể có nguồn gốc từ bất kỳ động vật có vú nào, ví dụ, về cơ bản là sữa động vật có vú nguyên chất, hoặc sữa bột đã hoàn nguyên.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, nền sữa mà men cái (ia), hydrat cacbon không phải lactoza (i.b.) chủng probiotic (ic) trong bước i của quy trình theo sáng chế được thêm vào 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. Mức độ lactoza là không quan trọng. Lactoza có thể được thêm vào nền sữa, nhưng chỉ một phần sẽ được men bằng probiotic.

Tốt hơn là, nền sữa bao gồm ít nhất khoảng 2,5% trọng lượng protein, tốt hơn là từ khoảng 2,9 đến khoảng 4,5% trọng lượng protein, thậm chí tốt hơn nữa là, từ khoảng 4 đến khoảng 4,5% trọng lượng protein, như khoảng 4,1% trọng lượng protein. Các lượng protein này trong nền sữa dẫn đến sữa chua khuấy được tốt hoặc sữa chua uống. Tốt hơn là, nền sữa bao gồm từ khoảng 0 đến khoảng 3,8% trọng lượng chất béo, như từ khoảng 0,5 đến khoảng 3,25% trọng lượng chất béo. Tốt hơn nữa là, nền

sữa bao gồm khoảng 2% trọng lượng chất béo. Theo phương án được ưu tiên, nền sữa bao gồm khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein.

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

Thuật ngữ “đồng 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.

“Đồng hóa hóa” như được sử dụng trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó, có nghĩa là trộn mạnh để thu được huyền phù hoặc nhũ tương hòa tan. Nếu quá trình đồng hóa được thực hiện trước khi lên men, nó có thể được thực hiện để phân tách 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 ép sữa ở áp suất cao qua các lỗ nhỏ.

Thuật ngữ “thanh trùng” được sử dụng trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó, có nghĩa là xử lý nền sữa để giảm hoặc loại bỏ sự có mặt 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. Ví dụ, nền sữa có thể được xử lý nhiệt ở 92°C trong 3 phút, làm nguội đến 38°C và sau đó được cấy như mô tả trong bước i. của quá trình của sáng chế.

Bước i. của quy trình theo sáng chế bao gồm việc thêm vào nền sữa:

a. men cái chứa vi khuẩn axit lactic (LAB) bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, như chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza.

Tốt hơn là, men cái bao gồm hai chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza và một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là một chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza.

Việc thêm các chủng vào nền sữa còn có thể được đề cập đến trong bản mô tả này của sáng chế, là “cây”.

Trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó, thuật ngữ “vi khuẩn axit lactic” (“LAB”) là để chỉ vi khuẩn loại thực phẩm tạo ra axit lactic là sản phẩm cuối cùng của quá trình trao đổi chất chính của quá trình lên men hydrat cacbon. Các vi khuẩn này có liên quan với nhau bởi các đặc điểm chung về chuyển hóa và sinh lý và thường là Gram dương, GC thấp, chịu được axit, không tạo bào tử, không hô hấp, trực khuẩn hình que hoặc cầu khuẩn. Trong giai đoạn lên men, việc tiêu thụ hydrat cacbon bởi các vi khuẩn này gây ra sự hình thành axit lactic, làm giảm độ pH và dẫn đến sự hình thành cục đông protein. Do đó, những vi khuẩn này chịu trách nhiệm về quá trình axit hóa sữa và kết cấu của sản phẩm sữa. Các vi khuẩn axit lactic hữu ích nhất trong công nghiệp được tìm thấy với các bộ “Lactobacillales” bao gồm *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. và *Propionibacterium* spp. Chúng thường được sử dụng làm môi trường nuôi cấy thực phẩm riêng lẻ hoặc kết hợp với các vi khuẩn axit lactic khác.

Vi khuẩn axit lactic, bao gồm vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus* sp. và *Streptococcus* sp., thường được cung cấp cho ngành công nghiệp sữa dưới dạng nuôi

cấy đông lạnh (F-DVS) hoặc đông khô (FD-DVS) 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. 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* (sau đây còn gọi là "LB" hoặc "Lb") 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.

"Men cái" của vi khuẩn axit lactic (LAB) theo sáng chế theo phương án bất kỳ của nó bao gồm hoặc, theo cách khác, bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza. Các men cái này chịu trách nhiệm đối với việc axit hóa nền sữa. Các men cái này có thể là mới, đông lạnh, hoặc được đông khô.

Để tạo ra sản phẩm sữa lên men, men cái có thể được thêm vào với lượng bất kỳ. Thông thường, men cái được thêm vào với lượng để đạt được nồng độ nằm trong khoảng từ 0,001 đến 3%, như 0,05%, 0,01%, 0,015%, 0,02%, 1%, 2%, 3%, tốt hơn là từ 0,001 đến 0,025%, trong đó, % là tính theo trọng lượng trên thể tích của tổng lượng của nền sữa (% trọng lượng/thể tích), như từ 0,0015 đến 0,15% trọng lượng/thể tích, như từ 0,01 đến 0,015% trọng lượng/thể tích, hoặc từ 0,01 đến 0,02% trọng lượng/thể tích, hoặc từ 0,01 đến 0,025% trọng lượng/thể tích của tổng lượng của nền sữa. Tốt hơn là, men cái được thêm vào dưới dạng môi trường nuôi cấy được cô đông lạnh với lượng từ 0,01% trọng lượng/thể tích đến 0,04% trọng lượng/thể tích của tổng lượng của nền sữa, như 0,01% trọng lượng/thể tích hoặc 0,02% trọng lượng/thể tích. Dịch nuôi cấy cô đặc đông lạnh thông thường chứa từ $6E+10$ đến $1,5E+11$ CFU/g. Theo cách khác, men cái được thêm vào dưới dạng dịch nuôi cấy làm khô đông lạnh với lượng từ 0,001 đến 0,0025% trọng lượng/thể tích của tổng lượng của nền sữa. Tốt hơn

nữa là, men cái được thêm vào dưới dạng môi trường nuôi cấy được cô đông lạnh với lượng để đạt được nồng độ là khoảng 0,01% trọng lượng trên thể tích (% trọng lượng/thể tích) của tổng lượng của sữa, tốt hơn là trong đó, sữa có hàm lượng chất béo là khoảng 2% trọng lượng và hàm lượng protein là khoảng 4,1% trọng lượng.

Theo phương án được ưu tiên, men cái được thêm vào nền sữa với lượng là từ khoảng $1\text{E}+06$ đến khoảng $1\text{E}+08$ CFU/ml nền sữa (tổng lượng vi khuẩn, tức là, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza), tốt hơn là với lượng là từ khoảng $5\text{E}+06$ đến khoảng $1\text{E}+07$ CFU/ml nền sữa, như từ khoảng $6\text{E}+06$ CFU/ml đến khoảng $1,5\text{E}+07$ CFU/ml, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng là từ khoảng $1,2$ đến khoảng $1,3\text{E}+07$ CFU/ml, tốt hơn là khi nền sữa có hàm lượng chất béo là khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein.

Như được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO 2005/003327, sẽ có lợi khi thêm một số tác nhân bảo vệ lạnh vào men cái. Do đó, men cái theo bước i.a. của quy trình theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều tác nhân bảo vệ lạnh được chọn từ nhóm bao gồm inosin-5'-monophosphat (IMP), adenosin -5'-monophosphat (AMP), guanosin-5'-monophosphat (GMP), uranosin-5'-monophosphat (UMP), xytidin-5'-monophosphat (CMP), adenin, guanin, uraxil, xytosin, adenosin, guanosin, uridin, xytidin, hypoxanthin, xanthin, hypoxanthin, orotidin, thymidin, inosin và dẫn xuất của hợp chất bất kỳ này.

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 đối 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. LAB thiếu hụt lactoza và thiếu hụt một phần có thể được đặc trưng bởi tập đoàn trắng trong môi trường chứa lactoza và X-Gal. LAB thiếu hụt lactoza và phương pháp tạo ra nó được mô tả chung, làm ví dụ và lưu giữ trong các đơn yêu cầu cấp patent được công bố trước đó, bao gồm WO 2013/160413, PCT/EP2015/063767 và PCT/EP2015/063742, trong đó mô tả các phương pháp tạo ra LAB với sự thiếu hụt trong chuyển hóa lactoza và các chủng cụ thể thu được bởi các phương pháp này.

Thuật ngữ "có khả năng chuyển hóa một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải là lactoza có trong sữa" được sử dụng trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó để mô tả hoạt động chuyển hóa của LAB thiếu hụt lactoza gây ra hình thành axit lactic là sản phẩm chuyển hóa cuối cùng chính của quá trình lên men hydrat cacbon bằng cách sử dụng hydrat cacbon không phải là lactoza.

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

Theo phương án được ưu tiên, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà chứa men cái được thêm vào nền sữa trong bước a của quy trình theo sáng chế, có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza tương tự, tốt hơn là sucroza. Theo phương án khác, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là chủng *Lactobacillus delbrueckii*

subsp. bulgaricus thiếu hụt lactoza, mà chứa men cái được thêm vào nền sữa trong bước a của quy trình theo sáng chế, có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon khác không phải lactoza, tốt hơn là trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza không phải là glucoza. Ví dụ, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza có khả năng chuyển hóa sucroza và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza có khả năng chuyển hóa galactoza, hoặc ngược lại.

Tốt hơn là, chủng thiếu hụt lactoza *Streptococcus thermophilus* được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28952;

(ii) chủng thu được từ DSM 28952, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(b) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28953;

(ii) chủng thu được từ DSM 28953, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(c) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2017-08-22 với số hiệu DSM 32599;

(ii) chủng thu được từ DSM 32599, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal; và

(d) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2017-08-22 với số hiệu DSM 32600; và

(ii) chủng thu được từ DSM 32600, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal.

Tốt hơn là, chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza có mặt trong men cái là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza. Tốt hơn nữa là, chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28910; và

(ii) chủng thu được từ DSM 28910, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal.

Trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó, thuật ngữ “chủng có nguồn gốc từ” hoặc “chủng mà có thể thu được từ” (“các chủng có nguồn gốc từ đó”) hoặc “chủng đột biến” tức là các chủng mà có thể thu được từ các chủng khác (ví dụ các chủng được lưu giữ nêu trên) bằng cách, ví dụ như kỹ thuật di truyền, bức xạ và/hoặc xử lý hóa học. Thuật ngữ “các chủng có nguồn gốc từ đó” hoặc “chủng đột biến” cũng có thể là các thể đột biến xuất hiện một cách tự nhiên. Điều ưu tiên là

“các chủng có nguồn gốc từ đó” hoặc “chủng đột biến” là các thể đột biến tương đương về mặt chức năng, ví dụ như các đột biến về cơ bản giống hoặc được cải thiện các đặc tính như dòng mẹ của chúng. Ví dụ, chủng thu được hoặc chủng đột biến này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal. Đặc biệt, “các chủng có nguồn gốc từ đó” hoặc “chủng đột biến” đề cập đến các chủng thu được bằng cách đưa một chủng theo sáng chế (ví dụ, các chủng được lưu giữ nêu trên) theo bất kỳ xử lý gây đột biến được sử dụng thông thường bao gồm xử lý bằng chất gây đột biến hóa học như etan metan sulphonat (EMS) hoặc N-metyl-N'-nitro-N-nitroguanidin (NTG), ánh sáng tia cực tím (UV), hoặc đối với một thể đột biến tự phát. Thể đột biến có thể trải qua một số phương pháp xử lý gây đột biến (phương pháp điều trị duy nhất nên được hiểu là một bước gây đột biến sau đó một bước sàng lọc/lựa chọn), nhưng hiện nay được ưu tiên là không quá 20, hoặc không quá 10 hoặc không quá 5, phương pháp điều trị (hoặc bước sàng lọc/lựa chọn) được thực hiện. Trong thể đột biến được ưu tiên hiện nay, ít hơn 1%, ít hơn 0,1%, dưới 0,01%, ít hơn 0,001% hoặc thậm chí ít hơn 0,0001% nucleotit trong bộ gen vi khuẩn đã được thay thế bằng một nucleotit khác, hoặc bị xóa, so sánh với chủng mẹ.

Theo phương án được ưu tiên theo sáng chế ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và/hoặc ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, là chủng phân giải protein, tốt hơn chủng phân giải protein cao.

Trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó, LAB là chủng “LAB phân giải protein” nếu nó chứa một proteinaza thành tế bào hoạt tính. Proteinaza của thành tế bào thủy phân các protein sữa, chẳng hạn như casein, và do đó cải thiện chất lượng sữa như một môi trường để LAB phát triển nhanh chóng có các chất hỗ trợ axit amin. Proteinaza thành tế bào đã được xác định và đặc trưng chi tiết trong nhiều LAB, bao gồm PrtP của *L. lactis*, PrtS của *S. thermophilus* và PrtB của *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*). Do đó, có thể xác định

được LAB phân giải protein bằng sự hiện diện của gen mã hóa proteinaza của thành tế bào. Ngoài ra, LAB phân giải protein có thể được xác định bằng chất nền huỳnh quang florescein isothiocyanat đánh dấu casein hoặc thử nghiệm casein FITC, trong đó sự gia tăng huỳnh quang do sự phát triển của chủng trong 6 giờ trong môi trường có chứa casein được đánh dấu huỳnh quang so với các mẫu đối chứng không có tế bào biến dạng được xác định. Chi tiết đầy đủ về thử nghiệm được cung cấp, ví dụ, trong Ví dụ 1 của công bố đơn quốc tế WO 2017/125600.

Tốt hơn là, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, được thêm vào nền sữa trong bước i.a. của quy trình theo sáng chế với lượng từ $1\text{E}+04$ đến $1\text{E}+10$ CFU (*colony forming units*: đơn vị hình thành tập đoàn)/ml nền sữa, tốt hơn là từ $1\text{E}+05$ đến $1\text{E}+10$ CFU/ml, hoặc từ $1\text{E}+06$ đến $1\text{E}+10$ CFU/ml, hoặc từ $1\text{E}+07$ đến $1\text{E}+09$ CFU/ml, tốt hơn là khi nền sữa có hàm lượng chất béo là khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein. Tốt hơn nữa là, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là sucroza, được thêm vào nền sữa trong bước i.a. của quy trình theo sáng chế với lượng từ $1\text{E}+06$ - $1\text{E}+08$ CFU/ml nền sữa, tốt hơn là khi nền sữa có hàm lượng chất béo là khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein.

Tốt hơn là, ít nhất một chủng *Lactobacillus* mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, được thêm vào nền sữa trong bước i.a. của quy trình theo sáng chế với lượng từ $1\text{E}+04$ đến $1\text{E}+10$ CFU/ml nền sữa, tốt hơn là từ $1\text{E}+05$ đến $1\text{E}+10$ CFU/ml, hoặc từ $1\text{E}+06$ đến $1\text{E}+10$ CFU/ml, hoặc từ $1\text{E}+07$ đến $1\text{E}+09$ CFU/ml, tốt hơn là khi nền sữa có hàm lượng chất béo là khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein. Tốt hơn nữa là, ít nhất một chủng *Lactobacillus* mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, được thêm vào nền sữa trong bước i.a. của quy trình theo sáng chế với lượng từ $1\text{E}+06$ –

1E+08 CFU/ml nền sữa, tốt hơn là khi nền sữa có hàm lượng chất béo là khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein.

Như được mô tả ở trên, theo phương án được ưu tiên của quy trình theo sáng chế, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa (“mức liều cấy”), tốt hơn là có hàm lượng chất béo là khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein, với tổng lượng từ khoảng 1E+06 đến khoảng 1E+08 CFU/ml nền sữa, tốt hơn là với tổng lượng từ khoảng 5E+06 đến khoảng 1E+07 CFU/ml nền sữa, như khoảng 6E+06 CFU/ml đến khoảng 1,5E+07 CFU/ml, thậm chí tốt hơn nữa là với tổng lượng từ khoảng 1,2E+07 CFU/ml đến khoảng 1,3E+07 CFU/ml.

Tỷ lệ của các số đếm tế bào vi khuẩn của ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza (ST) và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (LB) (ST:LB) trong men cái hoặc nền sữa ở lúc bắt đầu lên men có thể dễ dàng xác định được bằng một chuyên gia thông thường. Theo một phương án cụ thể, the ratio is nằm trong khoảng từ 99:1 đến 1:99, như 95:5 đến 5:95, 80:20 đến 20:80, hoặc 70:30 đến 30:70, hoặc 60:40 đến 40:60, hoặc 50:50 (ST:LB). Tỷ lệ ưu tiên nằm trong khoảng 90:10 đến 99:1 (ST:LB).

b. hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong mục a

Trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó, thuật ngữ “hydrat cacbon không phải lactoza” tức là hydrat cacbon bất kỳ, không phải là lactoza, và là LAB thiếu hụt lactoza theo sáng chế có khả năng chuyển hóa. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, hydrat cacbon không phải lactoza được chọn từ nhóm bao gồm

sucroza, galactoza và glucoza. Tốt hơn là, hydrat cacbon không phải lactoza không phải là glucoza. Thậm chí tốt hơn nữa là, hydrat cacbon không phải lactoza là sucroza.

Hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào đến nền sữa với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là khoảng 5,3. Profil axit hóa của nền sữa có thể được tuân theo tiêu chuẩn tức là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, như, ví dụ thiết bị xác định độ pH online.

Trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó, thuật ngữ “làm suy kiệt” liên quan đến hydrat cacbon không phải lactoza tức là nồng độ của hydrat cacbon không phải lactoza là 0 hoặc thấp đến mức sao cho men cái như được xác định trong bước i.a. không có khả năng phát triển nữa, hoặc quá thấp đến mức men cái như được xác định trong bước i.a. không còn khả năng axit hóa nền sữa nữa. Lưu ý, tốc độ/hồ sơ tăng trưởng và axit hóa có tương quan trực tiếp. Dấu hiệu không có sự phát triển của men cái sữa chua được hiển thị trên profil axit hóa. Một khi (các) hydrat cacbon có thể lên men (ví dụ, sucroza) bị suy kiệt, sẽ có một điểm đứt gãy trong đường cong axit hóa. Từ thời điểm đó, độ dốc/hình dạng của đường cong được thay đổi, cho thấy rằng chỉ một phần khác (probiotic) của hỗn hợp nuôi cấy đang phát triển. Việc thiếu sự tăng trưởng của men cái của bước a của quy trình theo sáng chế cũng có thể được xác định, ví dụ, bằng cách dàn lên đĩa các chủng ST (*Streptococcus thermophilus*). Theo một phương án cụ thể của sáng chế, khi kết thúc quá trình lên men, nồng độ của hydrat cacbon không phải lactoza mà tại đó nó bị “suy kiệt” có thể nằm trong khoảng dưới 100mg/g, chẳng hạn như dưới 30mg/g, bao gồm nằm trong khoảng từ 25mg/g đến 0,01mg/g, hoặc trong khoảng từ 5mg/g 0,01mg/g.

Trong bản mô tả này, khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là khoảng 5,3, quá trình lên men do quá trình trao đổi chất của

men cái kết thúc. Theo sáng chế này, quá trình lên men của men cái do đó kết thúc bằng cách làm suy kiệt một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza. Tuy nhiên, vì nền sữa còn bao gồm các chủng probiotic, có thể chuyển hóa hydrat cacbon có mặt trong chế phẩm, như lactoza, nên quá trình lên men do sự chuyển hóa của các chủng probiotic sẽ tiếp tục. Trên thực tế, trong phần mô tả của quy trình theo sáng chế, quá trình lên men nền sữa do sự chuyển hóa của các chủng probiotic, tốt nhất là chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm *chủng Lactobacillus* và *chủng Bifidobacterium*, xem dưới đây, là được mong muốn, và sẽ tốt hơn là xảy ra theo bước ii. của quy trình của quy trình theo sáng chế.

Do đó, quá trình lên men nền sữa do quá trình chuyển hóa men cái (quá trình dị hóa của hydrat cacbon không phải lactoza) sẽ dừng lại ở độ pH từ 4,9 đến 5,5, chẳng hạn như từ 5,0 đến 5,4, tốt nhất là khoảng 5,3, bởi vì hydrat cacbon không phải lactoza (đã) bị suy kiệt, và men cái về cơ bản không còn khả năng phát triển/axit hóa nền sữa. Tuy nhiên, vì nền sữa bao gồm các chủng khác, tức là, được chọn từ nhóm bao gồm *chủng Lactobacillus* và *chủng Bifidobacterium*, có thể/có khả năng chuyển hóa một hoặc nhiều hydrat cacbons vẫn có trong nền sữa, như lactoza, quá trình lên men nền sữa sẽ tiếp tục, xem bên dưới.

Lượng hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa phụ thuộc vào một số thông số, bao gồm chủng vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong men cái, chế phẩm nền sữa, nhiệt độ lên men và độ pH đích mong muốn, trong trường hợp hiện tại là từ 4,9 đến 5,5, chẳng hạn như từ 5,0 đến 5,4, tốt nhất là khoảng 5,3. Lượng hydrat cacbon không phải lactoza sẽ được thêm vào nền sữa có thể được xác định bằng thử nghiệm và việc thực hiện thử nghiệm đó nằm trong hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tính toán lượng hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là sucroza, cần được thêm vào nền sữa trong bước i.b. của quy trình theo sáng chế sao cho men cái được bổ sung ở bước i.a. ngừng phát triển vì hydrat cacbon không phải lactoza đã bị suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng

từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là khoảng 5,3.

Do đó, có thể dễ dàng xác định lượng hydrat cacbon không phải lactoza trên cơ sở LAB được sử dụng và quá trình axit hóa mong muốn (độ pH đích từ 4,9 đến 5,5, chẳng hạn như từ 5,0 đến 5,4, tốt nhất là khoảng 5,3) chủ yếu do men cái bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Trong hầu hết các trường hợp, sucroza, galactoza và/hoặc glucoza, tốt hơn là sucroza, được thêm vào sữa với lượng dẫn đến nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4g/L đến 10g/L, hoặc nằm trong khoảng từ 1g/L đến 8g/L hoặc nằm trong khoảng từ 2g/L đến 6g/L.

Theo phương án được ưu tiên, hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là sucroza, được thêm vào nền sữa trong bước i.b. của quy trình theo sáng chế với lượng là nhỏ hơn 0,9% trong đó, % là tính theo trọng lượng trên thể tích của tổng lượng của nền sữa (% trọng lượng/thể tích), tốt hơn là với lượng là nhỏ hơn 0,7%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng là nhỏ hơn 0,5%, như 0,41%, tốt hơn là trong đó, nền sữa bao gồm khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein, men cái trong bước i.a. được thêm vào tốt hơn là dưới dạng môi trường nuôi cấy được cô đông lạnh với lượng là 0,01% trọng lượng/thể tích (ví dụ, khoảng $1,2-1,3E+07$ CFU/ml) của tổng lượng của sữa và nhiệt độ lên men là khoảng 38°C.

Ví dụ, khi lượng men cái được thêm vào trong bước i.a. là 0,01% trọng lượng/thể tích (ví dụ, khoảng $1,2-1,3E+07$ CFU/ml), hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào trong bước i.b., tốt hơn là sucroza, được thêm vào với lượng là nhỏ hơn 0,9%, tốt hơn là với lượng là nhỏ hơn 0,7%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng là nhỏ hơn 0,5%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5% và 0,41%, tốt nhất là khoảng 0,41%, trong đó, % là tính theo trọng lượng trên thể tích (trọng lượng/thể tích) trên cơ sở nền

sữa (% trọng lượng/thể tích), tốt hơn là trong đó, nên sữa bao gồm khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein và nhiệt độ lên men là khoảng 38°C.

c. chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm *chủng Lactobacillus* và *chủng Bifidobacterium*.

Trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó, thuật ngữ “vi khuẩn probiotic” hoặc “chủng probiotic” dùng để chỉ các vi khuẩn sống được sử dụng với lượng vừa đủ cho người tiêu dùng nhằm mục đích đạt được tác dụng nâng cao sức khỏe ở người dùng. Vi khuẩn probiotic có khả năng tồn tại trong các điều kiện của đường tiêu hóa sau khi uống vào và xâm nhập vào ruột của người dùng.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế chủng probiotic theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus*, như *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* và *Lactobacillus johnsonii*, giống *Bifidobacterium*, như *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* và *Bifidobacterium infantis*, và các loại tương tự khác.

Theo phương án được ưu tiên, chủng *Lactobacillus* probiotic được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* và *Lactobacillus johnsonii*.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, chủng *Lactobacillus* probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus*, chủng *Lactobacillus acidophilus* và chủng *Lactobacillus paracasei*.

Theo phương án được ưu tiên theo sáng chế, chủng probiotic là *chủng Lactobacillus rhamnosus*, LGG®, được lưu giữ dưới tên ATCC 53103. Theo phương án được ưu tiên khác của sáng chế, chủng probiotic là chủng *Lactobacillus acidophilus*, LA-5®, được lưu giữ dưới tên DSM 13241. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, chủng probiotic is *chủng Lactobacillus paracasei* CRL 431 được lưu giữ dưới tên ATCC 55544, loại này là có bán sẵn ở quy mô công nghiệp. Theo phương án được ưu tiên, chủng *Lactobacillus* probiotic không phải là chủng *L. paracasei* CRL 431, được lưu giữ dưới tên ATCC 55544 hoặc *chủng L. paracasei* CHCC 2115, được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2007-06-27, với số hiệu lưu giữ DSM 19465.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, chủng probiotic *Bifidobacterium* được chọn từ nhóm bao gồm *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* và *Bifidobacterium infantis*.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, chủng *Bifidobacterium* probiotic là *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, còn được gọi là BB-12®, được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg. 1b, D-38124 Braunschweig, on 2003-09-30 với số hiệu lưu giữ DSM 15954. *Bifidobacterium*, BB-12®, là chủng vi khuẩn probiotic đã biết, có thể thu được từ Chr. Hansen A/S, Horsholm, DK. Trong trường hợp BB-12®, các bằng chứng lâm sàng sẵn có cho thấy rằng cần có liều lượng hàng ngày ít nhất $1E + 09 - 1E + 10$ CFU vi khuẩn probiotic có thể sống được. Do đó, cần có mức vi khuẩn probiotic cao, ví dụ: $1E + 08$ CFU trên mỗi gam sản phẩm sữa lên men (ví dụ, sản phẩm sữa chua sữa lên men).

Theo phương án được ưu tiên, bước i.c. bao gồm việc thêm vào nền sữa *chủng Bifidobacterium*, tốt hơn là chủng *Bifidobacterium* được chọn từ nhóm bao gồm

Bifidobacterium longum, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* và *Bifidobacterium infantis*, thậm chí tốt hơn nữa là, việc thêm vào nền sữa chứa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg. 1b, D-38124 Braunschweig, on 2003-09-30 với số hiệu lưu giữ DSM 15954.

Ví dụ, bước i.c. có thể bao gồm việc thêm vào nền sữa chủng probiotic thuộc về giống *Bifidobacterium*, tốt hơn là thuộc về loài *Bifidobacterium animalis*, thậm chí tốt hơn nữa là *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, như được mô tả ở trên, và chủng probiotic thuộc về giống *Lactobacillus*, như *Lactobacillus rhamnosus* và/hoặc *Lactobacillus acidophilus*, tốt hơn là trong đó, chủng probiotic thuộc về giống *Lactobacillus* không phải là chủng *L. paracasei*, thậm chí tốt hơn nữa là trong đó, chủng *Lactobacillus* probiotic không phải là chủng *L. paracasei* CRL 431, được lưu giữ dưới tên ATCC 55544 hoặc chủng *L. paracasei* CHCC 2115, được lưu giữ dưới tên DSM 19465,

Thậm chí tốt hơn nữa là, chế phẩm theo sáng chế bao gồm chủng probiotic thuộc về loài *Bifidobacterium animalis*, tốt hơn là *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954, và chủng probiotic thuộc về loài *Lactobacillus rhamnosus*, tốt hơn là chủng, LGG®, được lưu giữ dưới tên ATCC53103 và/hoặc chủng probiotic thuộc về loài *Lactobacillus acidophilus*, tốt hơn là strain LA-5®, được lưu giữ dưới tên DSM 13241.

Tốt hơn là, chủng probiotic *Bifidobacterium* được thêm vào nền sữa trong bước i.c. của quy trình theo sáng chế với lượng từ 1E+06 đến 1E+08 CFU/ml nền sữa, tốt hơn là từ 5E+06 đến 5E+07 CFU/ml, tốt hơn nữa là khoảng 1,2E+07 CFU/ml nền sữa.

Tốt hơn là, chủng probiotic được thêm vào nền sữa trong bước i.c. của quy trình theo sáng chế với lượng từ 0,001 đến 2%, trong đó,% là tính theo trọng lượng

trên thể tích của tổng lượng của nền sữa (% trọng lượng/thể tích), như 0,005%, 0,01%, 0,015%, 0,02%, tốt hơn là từ 0,001 đến 0,025% trọng lượng trên thể tích của tổng lượng của nền sữa, như từ 0,0015 đến 0,15%, như từ 0,01 đến 0,015%, hoặc từ 0,01 đến 0,02%, hoặc từ 0,01 đến 0,025% trọng lượng trên thể tích của tổng lượng của nền sữa. Tốt hơn là, chủng probiotic được thêm vào nền sữa với lượng để đạt được nồng độ là khoảng 0,01% trọng lượng trên thể tích của tổng lượng của nền sữa, tốt hơn là trong đó, chủng probiotic được thêm vào dưới dạng mô trường cấy được cô lạnh, tốt hơn là trong đó, nền sữa có hàm lượng chất béo là khoảng 2% trọng lượng và hàm lượng protein là khoảng 4,1% trọng lượng. Nếu chủng probiotic được thêm vào nền sữa trong bước i.c của quy trình theo sáng chế với lượng là khoảng 0,001% trọng lượng trên thể tích của tổng lượng của nền sữa, chủng probiotic tốt hơn là được thêm vào dưới dạng mô trường cấy được cô khô lạnh.

Theo phương án được ưu tiên, số lượng tế bào của BB-12® trong sữa sau khi cấy ở 0,01% F-DVS là khoảng $1,2E+07$ CFU/ml. Theo phương án được ưu tiên, số lượng tế bào của LA-5® trong sữa sau khi cấy ở 0,01% F-DVS là khoảng $7E+06$ CFU/ml. Theo phương án được ưu tiên, số lượng tế bào của LGG® trong sữa sau khi cấy ở 0,001% FD-DVS là khoảng $7E+06$ CFU/ml.

Do đó, theo phương án được ưu tiên, bước i. của quy trình theo sáng chế bao gồm thêm vào nền sữa:

a. Ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là ít nhất một chủng *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là với lượng là khoảng $1,2-1,3E+07$ CFU/ml;

b. Một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong mục a., trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt

khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3; và

c. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954, tốt hơn là với lượng là khoảng $1,2E+07$ CFU/ml;

hoặc:

a. Ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là ít nhất một chủng *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là với lượng là khoảng $1,2-1,3E+07$ CFU/ml;

b. Một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong mục a., trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3; và

c. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954, tốt hơn là với lượng là khoảng $1,2E+07$ CFU/ml đến chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG®, được lưu giữ dưới tên ATCC 53103, tốt hơn là với lượng là khoảng $7E+06$ CFU/ml;

hoặc:

a. Ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là ít nhất một chủng *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là với lượng là khoảng $1,2-1,3E+07$ CFU/ml;

b. Một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong mục a., trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3; và

c. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954 và chủng *Lactobacillus acidophilus*, LA-5®, được lưu giữ dưới tên DSM 13241, tốt hơn là trong đó, BB-12® được thêm vào với lượng là khoảng $1,2E+07$ CFU/ml đến LA-5® được thêm vào với lượng là khoảng $7E+06$ CFU/ml.

Trong các phương án được ưu tiên được mô tả ở trên này, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28952;

(ii) chủng thu được từ DSM 28952, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(b) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28953;

(ii) chủng thu được từ DSM 28953, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(c) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2017-08-22 với số hiệu DSM 32599;

(ii) chủng thu được từ DSM 32599, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal; và

(d) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2017-08-22 với số hiệu DSM 32600; và

(ii) chủng thu được từ DSM 32600, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal.

Tốt hơn là, chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza có mặt trong men cái là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza. Tốt hơn là, chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28910; và

(ii) chủng thu được từ DSM 28910, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal.

Như sẽ được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bước i. của quy trình theo sáng chế bao gồm việc thêm vào nền sữa của bước i.a. (men cái), i.b. (hydrat cacbon không phải lactoza) và i.c. (chủng probiotic). Thứ tự của việc

thêm ba yếu tố này không liên quan; ví dụ: trước tiên có thể thêm men cái vào nền sữa, sau đó là hydrat cacbon không chứa lactoza, và sau đó là chủng probiotic. Hoặc men cái và chủng probiotic có thể được trộn với nhau, sau đó được thêm vào nền sữa chứa hydrat cacbon không chứa lactoza cùng một lúc. Tốt nhất là (i) hydrat cacbon không phải lactoza (tốt nhất là sucroza) được thêm vào nền sữa trước tiên, và sau đó (ii) men cái và chủng probiotic được thêm vào nền sữa, ví dụ, men cái và chủng probiotic được thêm vào cùng một lúc, và tại một thời điểm sau khi hydrat cacbon không phải là lactoza đã được thêm vào nền sữa. Tốt hơn là, hydrat cacbon không phải lactoza (tốt hơn là sucroza) được thêm vào nền sữa trước khi xử lý nhiệt (ví dụ, thanh trùng), nếu có, để đảm bảo không có chất gây ô nhiễm.

Thông thường, môi trường nuôi cấy sữa chua cô đặc lạnh và môi trường nuôi cấy probiotic (F-DVS) chứa từ $6E+10$ – $1,5E+11$ CFU/g. Khi được cấy ở 0,01% trọng lượng/thể tích số lượng các tế bào trong sữa trước khi ủ (trước khi lên men) tốt hơn là từ khoảng $6E+06$ CFU/ml đến khoảng $1,5E+07$ CFU/ml. Khi được cấy ở 0,02% trọng lượng/thể tích, số lượng các tế bào trong sữa trước khi ủ (trước khi lên men) tốt hơn là từ khoảng $1,2E+07$ CFU/ml đến khoảng $3E+07$ CFU/ml.

Bước ii của quy trình theo sáng chế bao gồm lên men nền sữa trong một khoảng thời gian cho đến khi độ pH đích (hoặc mong muốn) pH đạt được, để thu được sản phẩm sữa lên men.

Thuật ngữ “lên men” trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó có nghĩa là chuyển hóa hydrat cacbon thành rượu hoặc axit thông qua hoạt động của vi sinh vật. Ví dụ, lên men trong nội dung của men cái theo sáng chế bao gồm chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, ví dụ, sucroza, thành axit lactic.

Trong phần mô tả về bước ii của phương pháp của quy trình theo sáng chế, quá trình lên men bao gồm:

- Giai đoạn thứ nhất trong đó, quá trình lên men chủ yếu là do việc chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào nền sữa trong bước i.b., ví dụ, sucroza, thành axit lactic bằng men cái của LAB bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* strain, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, được thêm vào trong bước i.a.;

- Giai đoạn thứ hai trong đó, quá trình lên men chủ yếu là do chủng probiotic như được xác định trong bản mô tả của sáng chế, được thêm vào nền sữa trong bước i.c., liên quan đến việc chuyển hóa lactoza thành axit lactic bằng chủng probiotic.

Theo quy trình của sáng chế, trong giai đoạn đầu tiên của quá trình lên men, chủng thiếu hụt lactoza sẽ chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza cho đến khi hydrat cacbon không phải lactoza bị suy kiệt. Như đã chỉ ra ở trên, khi kết hợp với môi trường nuôi cấy sữa chua, chủng probiotic có thể phát triển tốt hơn một chút so với một chủng duy nhất, nhưng vẫn phát triển chậm hơn nhiều so với các loài sữa chua, *Streptococcus thermophilus* (ST) và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (LB), ở giai đoạn này sẽ chiếm ưu thế so với chủng probiotic.

Do lượng hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3, giai đoạn thứ nhất của quá trình lên men sẽ kết thúc khi độ pH của sữa là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3. Ở giai đoạn này, chủng thiếu hụt lactoza, chiếm ưu thế hơn chủng probiotic, không thể phát triển thêm, vì về cơ bản chúng không có khả năng chuyển hóa lactoza.

Tuy nhiên, chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus* và chủng *Bifidobacterium* được thêm vào nền sữa trong bước i.c. của quy trình của

quy trình theo sáng chế, bao gồm các chủng probiotic có khả năng chuyển hóa lactoza, sẽ tiếp tục axit hóa nền sữa. Do đó, trong bước thứ hai, quá trình lên men chủ yếu là do hoạt tính trao đổi chất của chủng probiotic. Các chủng probiotic sẽ tiêu thụ lactoza có mặt trong nền sữa và sẽ tiếp tục quá trình axit hóa cho đến khi đạt đến độ pH đích (mong muốn). Độ pH đích (mong muốn) có thể nằm trong khoảng từ 3,2 đến dưới 4,9, tốt nhất là từ khoảng 3,6 đến khoảng 4,8, tốt hơn nữa là từ khoảng 4,0 đến khoảng 4,6, chẳng hạn như khoảng 4,0, hoặc khoảng 4,3, hoặc khoảng 4,4 hoặc khoảng 4,5, tốt hơn là giữa khoảng 4,6 và khoảng 4,5, thậm chí tốt hơn là khoảng 4,55. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH đích (mong muốn) là khoảng 4,55.

Bước lên men thứ hai này (và do đó, bước lên men ii của sáng chế) có thể được kết thúc bằng bất kỳ phương pháp nào mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, chẳng hạn như xử lý làm lạnh hoặc do sữa đạt đến độ pH làm cho (các) chủng probiotic không thể phát triển, hoặc do lactoza trong sữa bị suy kiệt và các chủng probiotic không thể phát triển thêm, v.v. Ví dụ, bước lên men ii của sáng chế có thể được kết thúc bằng cách làm lạnh (ví dụ, khoảng 4°C) và sản phẩm sữa lên men được bảo quản lạnh (ví dụ, ở khoảng 4°C). Làm lạnh thường được sử dụng như một biện pháp để làm chậm hoạt động trao đổi chất và giữ cho các chất nuôi cấy và men vi sinh sống.

Quá trình lên men được sử dụng trong sản xuất các sản phẩm sữa đã được biết đến nhiều và người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách lựa chọn các điều kiện quy trình phù hợp, chẳng hạn như nhiệt độ, oxy, số lượng và đặc điểm của (các) vi sinh vật và thời gian xử lý. Rõ ràng, các điều kiện lên men được lựa chọn để hỗ trợ cho việc đạt được sáng chế, ví dụ, để thu được sản phẩm sữa ở dạng rắn (chẳng hạn như sữa chua đã lọc hoặc có hàm lượng chất rắn cao) hoặc dạng lỏng (chẳng hạn như sữa chua, sữa chua uống, sữa chua khuấy, sữa chua set và một loại sữa chua như thức uống). Theo sáng chế, quá trình lên men được thực hiện ở nhiệt độ từ khoảng 34°C đến khoảng 43°C, chẳng hạn như khoảng 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C,

39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, tốt hơn là ở khoảng 38°C, khoảng 40°C hoặc khoảng 43°C.

Theo phương án được ưu tiên, sản phẩm sữa lên men thu được bằng quy trình theo sáng chế bao gồm $1,3E+08$ CFU tế bào probiotic/g của sản phẩm sữa lên men (CFU/g) hoặc nhiều hơn, tốt hơn là $2E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $3E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $4E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là $5E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, như $6E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn ít nhất một chủng probiotic, ví dụ, ngay sau khi lên men, tốt hơn là tại thời điểm mà là ít nhất 1 ngày sau khi lên men được hoàn thành (tức là, quá trình lên men bước (ii) của quy trình theo sáng chế) được hoàn thành), như 15 ngày, hoặc 30 ngày, hoặc 45 ngày, tốt hơn nữa là 60 ngày sau khi lên men được hoàn thành, trong đó, tốt hơn là thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi được giữ ở khoảng 4°C sau khi lên men theo bước ii của quy trình theo sáng chế kết thúc (được hoàn thành), tốt hơn là trong đó, nền sữa bao gồm khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein, tốt hơn là trong đó, quá trình lên men xảy ra ở khoảng 38°C và tốt hơn là cho đến khi đạt được độ pH là khoảng 4,55.

Sản phẩm sữa lên men

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất sản phẩm sữa lên men, thu được hoặc trực tiếp thu được bằng quy trình của quy trình theo sáng chế.

Thuận lợi là, sản phẩm sữa lên men theo sáng chế sẽ chứa lượng vi khuẩn probiotic sống được cao hơn (số lượng tế bào probiotic có thể sống cao hơn) so với lượng vi khuẩn probiotic có trong sản phẩm sữa lên men chỉ được ủ với vi khuẩn probiotic, hoặc được lên men bằng men cái bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus*, mà không thiếu hụt lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus*, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, mà không thiếu hụt lactoza (ví dụ, lactoza truyền thống (+) môi trường nuôi cấy sữa chua), hoặc bằng men cái bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa

hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là ít nhất một chủng *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza với sự có mặt của hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là sucroza, với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sữa lên men là thấp hơn 4,9, như 4,55 (ví dụ, khoảng 0,9% sucroza). Ngoài ra, một cách thuận lợi, sản phẩm sữa lên men theo sáng chế sẽ có độ ổn định cao hơn về số lượng probiotic theo thời gian, ví dụ, thời hạn sử dụng ít nhất 60 ngày, tốt nhất là ở khoảng 4°C (bảo quản ở khoảng 4°C).

Do đó, sáng chế đề xuất thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi (sản phẩm sữa lên men) bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là ít nhất một chủng *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza và chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus* và chủng *Bifidobacterium*, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi bao gồm $1,3E+08$ CFU hoặc nhiều tế bào probiotic/g của sản phẩm sữa lên men (CFU/g), tốt hơn là $2E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $3E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $4E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là $5E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, như $6E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn ít nhất một chủng probiotic có mặt trong thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi, ngay sau khi lên men (tức là, quá trình lên men bước (ii) của quy trình theo sáng chế), tốt hơn là tại thời điểm mà là ít nhất 1 ngày sau khi lên men được hoàn thành, như 15 ngày, hoặc 30 ngày, hoặc 45 ngày, hoặc 60 ngày sau khi lên men được hoàn thành, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi được giữ ở khoảng 4°C sau khi lên men theo bước ii. của quy trình theo sáng chế kết thúc (hoàn thành), tốt hơn là trong đó, nền sữa bao gồm khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein, tốt hơn là trong đó, quá trình lên men xảy ra ở khoảng 38°C tốt hơn là cho đến khi đạt được độ pH là khoảng 4,55. Do đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có lượng probiotic rất cao (hơn $1,3E + 08$ CFU/g, như được mô tả ở trên). Việc thêm một lượng lớn probiotic

như vậy vào sản phẩm sữa đã lên men sẽ ảnh hưởng đến các đặc tính như mùi vị và hương vị của sản phẩm sữa lên men. Ngoài ra, nó sẽ rất tốn kém, vì nó sẽ liên quan đến việc bổ sung probiotic với số lượng nhiều hơn 30-50 lần so với tỷ lệ cấy vào nền sữa trước khi lên men theo sáng chế. Do đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế cũng cho thấy những ưu điểm này so với thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi chứa về cơ bản cùng một lượng probiotic, nhưng trong đó probiotic đã được thêm vào sau quá trình lên men nền sữa.

Như đã chỉ ra ở trên, trong nội dung của quy trình theo sáng chế, tốt hơn là, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza mà chứa thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi (sản phẩm sữa lên men) của quy trình theo sáng chế, có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza tương tự, tốt hơn là sucroza.

Thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi (sản phẩm sữa lên men) theo sáng chế có thể bao gồm bất kỳ số lượng thành phần nào khác, bao gồm sữa lên men, phụ gia thực phẩm, chất ổn định, chất bảo vệ lạnh, chất tạo hương vị, chất làm ngọt nhân tạo và các loại tương tự khác. Thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể là sản phẩm sữa lên men bất kỳ, bao gồm sữa chua, như sữa chua hoa quả, sữa chua như đồ uống, sữa chua khuấy, sữa chua từng set, sữa chua giống như đồ uống, sữa chua đã lọc, v.v.. Tốt hơn là, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế là sữa chua.

Trong bản mô tả này của sáng chế, theo phương án bất kỳ của nó, thuật ngữ "sữa chua" là để chỉ các sản phẩm bao gồm *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* và tùy ý các vi sinh vật khác như *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*,

Lactococcus lactis, *Lactobacillus acidophilus* và *Lactobacillus paracasei*, hoặc vi sinh vật bất kỳ thu được từ đó. Các chủng axit lactic không phải là *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được bao gồm để cung cấp cho thành phẩm các đặc tính khác nhau, chẳng hạn như đặc tính thúc đẩy trạng thái cân bằng của hệ thực vật. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sữa chua" bao gồm sữa chua theo set, sữa chua khuấy, sữa chua uống, Petit Suisse, sữa chua được xử lý bằng nhiệt, sữa chua kiểu Hy Lạp đã được lọc kỹ hoặc đặc trưng bởi mức độ protein cao và các sản phẩm giống như sữa chua. Cụ thể, thuật ngữ "sữa chua" bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sữa chua như được định nghĩa theo các quy định của Pháp và Châu Âu, ví dụ, các sản phẩm sữa đông tụ thu được bằng quá trình lên men axit lactic bằng phương pháp chỉ của vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt cụ thể (tức là *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*) được nuôi cấy đồng thời và được tìm thấy là sống trong sản phẩm cuối cùng với số lượng ít nhất là 10 triệu CFU (đơn vị hình thành khuẩn lạc)/g. Sữa chua có thể tùy ý chứa các nguyên liệu thô được bổ sung từ sữa (ví dụ như kem) hoặc các thành phần khác như đường hoặc tác nhân tạo ngọt, một hoặc nhiều hương liệu, trái cây, ngũ cốc hoặc các chất dinh dưỡng, đặc biệt là vitamin, khoáng chất và chất xơ, cũng như chất ổn định và chất làm đặc. Theo phương án khác, sữa chua đáp ứng các thông số kỹ thuật cho sữa và sữa chua lên men theo tiêu chuẩn AFNOR NF 04-600 và/hoặc tiêu chuẩn codex StanA-11a-1975. Để đáp ứng tiêu chuẩn AFNOR NF 04-600, sản phẩm không được đun nóng sau khi lên men và nguyên liệu từ sữa phải chiếm tối thiểu 70% (khối lượng) thành phẩm.

Sữa lên men thu được theo quy trình của quy trình theo sáng chế, bao gồm $1,3E+08$ CFU tế bào probiotic/g sữa lên men (CFU/g) hoặc nhiều hơn, tốt hơn là $2E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $3E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $4E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là $5E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, như $6E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn ít nhất một chủng probiotic có mặt trong sữa lên men như được mô tả ở đây còn có thể được sử dụng làm chất phụ gia cho sản phẩm, ví dụ, đưa vào các sản phẩm thực phẩm ăn được khác như pho-mat sữa đông, sô-cô-la, nước trái cây, các sản phẩm thịt và các sản phẩm sữa bột khô cho trẻ nhỏ.

Chủng thiếu hụt lactoza *Streptococcus thermophilus* được ưu tiên đã được xác định trong bản mô tả này về quy trình theo sáng chế, và được áp dụng như nhau cho phương án này.

Tốt hơn là, chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza. Chủng thiếu hụt lactoza *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* được ưu tiên đã được xác định trong bản mô tả này về quy trình theo sáng chế, và được áp dụng như nhau cho phương án này.

Các chủng probiotic được ưu tiên cũng đã được mô tả trong bản mô tả này về quy trình theo sáng chế, và được áp dụng như nhau cho phương án này. Do đó, tốt hơn là, chủng probiotic có mặt trong thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế là một hoặc nhiều trong số các chủng probiotic sau đây:

- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12® được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg. 1b, D-38124 Braunschweig, on 2003-09-30 với số hiệu lưu giữ DSM 15954; và/hoặc
- chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG® được lưu giữ dưới tên ATCC53103; và/hoặc
- *Lactobacillus acidophilus* strain, LA-5®, được lưu giữ dưới tên DSM 13241.

Do đó, theo phương án được ưu tiên, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi (sản phẩm sữa lên men) theo sáng chế bao gồm $1,3E+08$ CFU hoặc nhiều vi khuẩn probiotic/g của sản phẩm sữa lên men (CFU/g), tốt hơn là $2E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $3E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $4E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là $5E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, như $6E+08$ CFU/g hoặc nhiều ít nhất một trong số các chủng probiotic ở trên, tốt hơn là *Bifidobacterium animalis*

subsp. *lactis*, BB-12®, DSM 15954, trực tiếp sau khi lên men, tốt hơn là tại thời điểm mà là ít nhất 1 ngày sau khi lên men theo bước ii theo sáng chế được hoàn thành, như 15 ngày, hoặc 30 ngày, hoặc 45 ngày, hoặc 60 ngày sau khi lên men được hoàn thành, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi được giữ ở khoảng 4°C sau khi lên men theo bước ii. của quy trình theo sáng chế kết thúc, tốt hơn là trong đó, nền sữa bao gồm khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein, tốt hơn là trong đó, quá trình lên men xảy ra ở khoảng 38°C và tốt hơn là cho đến khi đạt được độ pH là khoảng 4,55.

Lưu ý là, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi (sản phẩm sữa lên men) theo sáng chế bao gồm $1,3E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, tốt hơn là $2E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $3E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $4E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là $5E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, như $5,7E+08$ CFU/g hoặc nhiều ít nhất một trong số các chủng probiotic có mặt trong the product ở 60 ngày sau khi lên men được hoàn thành (60 ngày bảo quản), trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi được giữ ở khoảng 4°C sau khi lên men theo bước ii. của quy trình theo sáng chế kết thúc, và tốt hơn là trong đó, nền sữa có khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein, tốt hơn là trong đó, quá trình lên men xảy ra ở khoảng 38°C và tốt hơn là cho đến khi đạt được độ pH là khoảng 4,55. Do đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế (sản phẩm sữa lên men) cho thấy tính ổn định cao hơn (số lượng vi khuẩn probiotic tăng lên được duy trì theo thời gian) trong hơn 60 ngày bảo quản (ở khoảng 4°C) so với thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi được lên men bằng cách sử dụng cùng một loại nền sữa, trong cùng điều kiện lên men, với cùng một lượng tế bào probiotic ban đầu, nhưng với một trong những các chất sau đây:

- Không có men cái, tức là, nền sữa được ủ chỉ với vi khuẩn probiotic;
- Men cái bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus*, mà không thiếu hụt lactoza (lac+), và ít nhất một chủng *Lactobacillus* mà không thiếu hụt

lactoza, tốt hơn là (lac+) *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, (ví dụ, lactoza truyền thống (+) môi trường nuôi cấy sữa chua);

- Men cái bao gồm ít nhất một thiếu hụt lactoza (lac-) chủng *Streptococcus thermophilus*, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một thiếu hụt lactoza (lac-) chủng *Lactobacillus*, tốt hơn là ít nhất một chủng *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, với sự có mặt của hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là sucroza, với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sữa lên men là thấp hơn 4,9, như 4,55.

Chế phẩm

Sáng chế đề xuất chế phẩm (hereinafter “chế phẩm theo sáng chế”) để tạo ra sản phẩm sữa lên men bao gồm

a) men cái chứa vi khuẩn axit lactic (LAB) bao gồm hoặc, theo cách khác, consisting of, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* strain, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza; và

b) một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong a), trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3.

Như được nêu trên đây, trong phần mô tả về quy trình theo sáng chế, tốt hơn là, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus*

thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà chứa thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi (sản phẩm sữa lên men) của quy trình theo sáng chế, có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza tương tự, tốt hơn là sucroza. Theo phương án khác, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà chứa men cái được thêm vào nền sữa trong bước a của quy trình theo sáng chế, có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon khác không phải lactoza, tốt hơn là trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza không phải là glucoza. Ví dụ, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza có khả năng chuyển hóa sucroza và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza có khả năng chuyển hóa galactoza, hoặc ngược lại.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm chứa hai hoặc nhiều hơn chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza và một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là one chủng *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza.

Men cái của chế phẩm theo sáng chế được mô tả chi tiết ở trên, khi mô tả men cái được thêm vào trong bước i.a. của quy trình của quy trình theo sáng chế. Do đó, men cái (a) chứa chế phẩm theo sáng chế tương ứng với men cái được thêm vào nền sữa trong bước i.a. của quy trình của quy trình theo sáng chế, đã được mô tả chi tiết ở trên, và áp dụng như nhau đối với chế phẩm theo sáng chế.

Ngoài ra, hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic của men cái, chứa chế phẩm theo sáng chế (b) đã được mô tả chi tiết trong phần mô tả quy trình theo sáng chế (bước i.b.).

Chủng thiếu hụt lactoza *Streptococcus thermophilus* được ưu tiên đã được xác định trong bản mô tả này về quy trình theo sáng chế, và được áp dụng như nhau cho phương án này.

Tốt hơn là, chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza là chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza. Chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza được ưu tiên đã được xác định trong bản mô tả này về quy trình theo sáng chế, và được áp dụng như nhau cho phương án này.

Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế còn bao gồm ít nhất chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus* và chủng *Bifidobacterium*.

Chủng probiotic tốt hơn là chứa chế phẩm theo sáng chế đã được mô tả chi tiết trong phần mô tả của quy trình theo sáng chế (bước i.c.). Do đó, chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus* và chủng *Bifidobacterium*, tốt hơn là chứa chế phẩm theo sáng chế tương ứng với chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus* và chủng *Bifidobacterium* được thêm vào nền sữa trong bước i.c. của quy trình của quy trình theo sáng chế, mà đã được mô tả chi tiết ở trên, và áp dụng như nhau đối với chế phẩm theo sáng chế.

Do đó, theo phương án được ưu tiên của quy trình theo sáng chế, chế phẩm chứa:

a) Ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza;

b) một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong a), trong đó, hydrat

cacbon không phải lactoza có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3; và

c) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954,

Hoặc chế phẩm chứa:

a) Ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza;

b) một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong a), trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3;

c) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954; và

d) chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG®, được lưu giữ dưới tên ATCC 53103,

Hoặc chế phẩm chứa:

a) Ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza;

b) một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong a), trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3;

c) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954; và

d) *Lactobacillus acidophilus* strain, LA-5®, được lưu giữ dưới tên DSM 13241.

Lượng các chủng có mặt trong men cái và/hoặc lượng của các chủng probiotic have đã được mô tả ở trên trong phần mô tả về quy trình theo sáng chế, và được áp dụng như nhau đối với chế phẩm theo sáng chế.

Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế bao gồm từ 1E+04 đến 1E+09 CFU chủng *Streptococcus thermophilus*/g chế phẩm hoặc nhiều hơn, tốt hơn là từ 1E+05 đến 1E+07 CFU/g, hoặc từ 1E+06 đến 1E+07 CFU/g chủng *Streptococcus thermophilus*. Tốt hơn nữa là, chế phẩm theo sáng chế bao gồm khoảng 6-7E+08 CFU/g chủng *Streptococcus thermophilus* hoặc ít hơn.

Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế bao gồm từ 1E+04 đến 1E+09 CFU chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*/g chế phẩm, tốt hơn là từ 1E+05 đến 1E+07 CFU/g, hoặc từ 1E+06 đến 1E+07 CFU/g chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Tốt hơn nữa là, chế phẩm theo sáng chế bao gồm khoảng 1E+07 CFU chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*/g chế phẩm.

Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế bao gồm tổng lượng CFU ít nhất 1E+10 CFU/g (tức là, cân nhắc lượng *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và các chủng probiotic, nếu có).

Như được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO 2005/003327, sẽ có lợi khi thêm một số tác nhân bảo vệ lạnh vào men cái. Do đó, men cái chứa trong chế phẩm theo sáng chế (a) có thể bao gồm một hoặc nhiều (các) chất bảo vệ lạnh được chọn từ nhóm bao gồm inosin-5'-monophosphat (IMP), adenosin -5'-monophosphat (AMP), guanosin-5'-monophosphat (GMP), uranosin-5'-monophosphat (UMP), xytidin-5'-monophosphat (CMP), adenin, guanin, uraxil, xytosin, adenosin, guanosin, uridin, xytidin, hypoxanthin, xanthin, hypoxanthin, orotidin, thymidin, inosin và dẫn xuất bất kỳ của các hợp chất này.

Hơn nữa, men cái có thể được cung cấp dưới dạng men cái đông lạnh hoặc khô ngoài men cái lỏng. Do đó, chế phẩm theo sáng chế có thể ở dạng đông lạnh, đông khô hoặc lỏng.

Sử dụng sáng chế

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế để làm tăng số lượng tế bào probiotic sống được của ít nhất một trong số các chủng probiotic có mặt trong sản phẩm sữa lên men, như được so sánh với sản phẩm sữa lên men được lên men bằng chế phẩm chứa

a) men cái chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một *chủng* *Streptococcus thermophilus*, mà không thiếu hụt lactoza, và ít nhất một *chủng* *Lactobacillus*, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, mà không thiếu hụt lactoza; hoặc

b) i. men cái chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và

ii. một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong i), trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3; hoặc

c) Nền sữa được ủ với ít nhất một vi khuẩn probiotic (tức là, không có mặt “men cái” như được mô tả ở trên).

Do đó, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để làm tăng số lượng tế bào sống được của ít nhất một trong số các chủng probiotic có mặt trong sản phẩm sữa lên men, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi bao gồm $1,3E+08$ CFU hoặc nhiều vi khuẩn probiotic/g sản phẩm sữa lên men (CFU/g), tốt hơn là $2E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $3E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $4E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là $5E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, như $6E+08$ CFU/g hoặc nhiều ít nhất một chủng probiotic có mặt trong thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi, ngay lập tức sau khi lên men, tốt hơn là tại thời điểm mà là ít nhất 1 ngày sau khi lên men theo bước ii của quy trình theo sáng chế được hoàn thành, như 15 ngày, hoặc 30 ngày, hoặc 45 ngày, hoặc 60 ngày sau khi lên men được hoàn thành, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi được giữ ở khoảng 4°C sau khi lên men theo bước ii. của quy trình theo sáng chế kết thúc, tốt hơn là trong đó, nền sữa bao gồm khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein, tốt hơn là trong đó, quá trình lên men xảy ra ở khoảng 38°C và tốt hơn là cho đến khi đạt được độ pH là khoảng 4,55.

Tốt hơn là, chế phẩm theo sáng chế được sử dụng để làm tăng số lượng tế bào sống được (làm gia tăng hoặc làm cải thiện khả năng sống sót) của ít nhất chủng probiotic được chọn từ:

- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,

Mascheroder Weg. 1b, D-38124 Braunschweig, on 2003-09-30 với số hiệu lưu giữ DSM 15954; và/hoặc

- chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG® được lưu giữ dưới tên ATCC 53103; và/hoặc

- *Lactobacillus acidophilus* strain, LA-5®, được lưu giữ dưới tên DSM 13241,

Do đó, theo phương án được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế được sử dụng để làm tăng số lượng tế bào sống được (làm gia tăng hoặc làm cải thiện khả năng sống sót) của ít nhất một trong số các chủng probiotic ở trên có mặt trong sản phẩm sữa lên men, như được mô tả ở trên, trong đó, sản phẩm sữa lên men bao gồm $1,3E+08$ CFU hoặc nhiều hơn các tế bào sống được vi khuẩn của probiotic/g sản phẩm sữa lên men (CFU/g), tốt hơn là $2E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $3E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, hoặc $4E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là $5E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, như $6E+08$ CFU/g hoặc nhiều ít nhất một trong số các chủng probiotic ở trên, tốt hơn là of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, DSM 15954, ngay lập tức sau khi lên men, tốt hơn là tại thời điểm mà là ít nhất 1 ngày sau khi lên men theo bước ii của quy trình theo sáng chế được hoàn thành, như 15 ngày, hoặc 30 ngày, hoặc 45 ngày, hoặc 60 ngày sau khi lên men được hoàn thành, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi được giữ ở khoảng 4°C sau khi lên men theo bước ii. của quy trình theo sáng chế kết thúc, tốt hơn là trong đó, nền sữa bao gồm khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein, tốt hơn là trong đó, quá trình lên men xảy ra ở khoảng 38°C và tốt hơn là cho đến khi đạt được độ pH là khoảng 4,55.

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp để làm tăng số lượng tế bào probiotic sống được của ít nhất một trong số các chủng probiotic có mặt trong sản phẩm sữa lên men using chế phẩm theo sáng chế, như được mô tả chi tiết trên đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “để làm tăng hoặc làm cải thiện khả năng sống sót của tế bào probiotic sống được theo thời gian” tức là số lượng tế bào probiotic sống được trong sản phẩm được lên men bằng men cái theo sáng chế được giữ cao hơn theo thời gian so với số lượng tế bào probiotic trong sản phẩm lên men mà được lên men bằng cách sử dụng cùng một loại nền sữa, trong cùng một điều kiện lên men, với cùng một lượng tế bào probiotic ban đầu, nhưng với một trong các điều kiện sau:

- Không có men cái, tức là, nền sữa được ủ chỉ bằng vi khuẩn probiotic (như được thể hiện trong Fig. 1, probiotic không dễ dàng phát triển trong sữa, hoặc tăng trưởng rất chậm);

- Men cái bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus*, mà không thiếu hụt lactoza (lac+), và ít nhất một chủng *Lactobacillus* mà không thiếu hụt lactoza, tốt hơn là (lac+) *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, (ví dụ, lactoza truyền thống (+) môi trường nuôi cấy sữa chua);

- Men cái bao gồm ít nhất một thiếu hụt lactoza (lac-) chủng *Streptococcus thermophilus*, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một thiếu hụt lactoza (lac-) chủng *Lactobacillus*, tốt hơn là ít nhất một chủng *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, với sự có mặt của hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là sucroza, với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sữa lên men là thấp hơn 4,9, như 4,55.

Trong bản mô tả này, “theo thời gian” tức là trong ít nhất 1 ngày sau khi lên men theo bước ii của quy trình theo sáng chế được hoàn thành, như 15 ngày, hoặc 30 ngày, hoặc 45 ngày, hoặc 60 ngày sau khi lên men được hoàn thành, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi được giữ ở khoảng 4°C sau khi lên men theo bước ii. của quy trình theo sáng chế kết thúc, tốt hơn là trong đó, nền sữa bao gồm khoảng 2% trọng lượng chất béo và khoảng 4,1% trọng lượng protein.

Được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khoảng” (hoặc “xung quanh”) tức là giá trị được chỉ định $\pm 1\%$ giá trị của nó hoặc thuật ngữ “khoảng” có nghĩa là giá trị được chỉ định $\pm 2\%$ giá trị của nó hoặc thuật ngữ “khoảng” có nghĩa là giá trị được chỉ định $\pm 5\%$ giá trị của nó, thuật ngữ “khoảng” có nghĩa là giá trị được chỉ định $\pm 10\%$ giá trị của nó hoặc thuật ngữ “khoảng” có nghĩa là giá trị được chỉ định $\pm 20\%$ giá trị của nó, hoặc thuật ngữ “khoảng” có nghĩa là giá trị được chỉ định $\pm 30\%$ giá trị của nó; tốt nhất là thuật ngữ “khoảng” có nghĩa là chính xác giá trị được chỉ định ($\pm 0\%$).

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có cùng ý nghĩa như thường được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này mà sáng chế này thuộc về. Phương pháp và vật liệu tương tự hoặc tương đương với những phương pháp được mô tả ở đây có thể được sử dụng trong thực hành quy trình theo sáng chế. Các đối tượng, lợi ích và dấu hiệu bổ sung của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này khi xem xét mô tả hoặc có thể học được bằng cách thực hành theo sáng chế. Các ví dụ và hình vẽ sau đây được cung cấp bằng cách minh họa, và chúng không nhằm giới hạn sáng chế.

Trong toàn bộ Bản mô tả và Yêu cầu bảo hộ, thuật ngữ "bao gồm" và các biến thể của từ này (ví dụ: "bao gồm", "có", "bao gồm", "chứa") thường không hạn chế và do đó không loại trừ các dấu hiệu khác, có thể là, ví dụ các dấu hiệu kỹ thuật, phụ gia, thành phần hoặc các bước. Tuy nhiên, bất cứ khi nào thuật ngữ “bao hàm” được sử dụng ở đây, thì thuật ngữ này cũng bao gồm một phương án đặc biệt, trong đó thuật ngữ này được hiểu là giới hạn; trong phương án cụ thể này, thuật ngữ “bao gồm” có nghĩa của thuật ngữ “chứa”.

Việc sử dụng các thuật ngữ "a" và "an" và "the" và các tham chiếu tương tự trong ngữ cảnh mô tả sáng chế (đặc biệt là trong ngữ cảnh của các yêu cầu sau) được hiểu là bao hàm cả số ít và số nhiều, trừ khi nếu không được chỉ ra ở đây hoặc mâu thuẫn rõ ràng với ngữ cảnh. Việc ghi lại các dải giá trị ở đây chỉ nhằm mục đích phục

vụ như một phương pháp viết tắt đề cập đến từng giá trị riêng biệt nằm trong phạm vi, trừ khi được chỉ định khác ở đây và mỗi giá trị riêng biệt được đưa vào thông số kỹ thuật như thể nó được đọc riêng lẻ ở đây. Tất cả các phương pháp được mô tả ở đây có thể được thực hiện theo bất kỳ thứ tự thích hợp nào trừ khi có chỉ định khác ở đây hoặc có mâu thuẫn rõ ràng theo ngữ cảnh. Việc sử dụng bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ mẫu mực (ví dụ, "chẳng hạn như") được cung cấp ở đây, chỉ nhằm mục đích làm sáng tỏ sáng chế tốt hơn và không đặt ra giới hạn về phạm vi của sáng chế trừ khi có quy định khác. Không có ngôn ngữ nào trong Bản mô tả được hiểu là chỉ ra bất kỳ thành phần nào không được công bố là cần thiết cho việc thực hành sáng chế.

Các phương án được ưu tiên

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

i. Thêm vào nền sữa:

a. men cái chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là trong đó, men cái được thêm vào với lượng là $1,2-1,3E+07$ CFU chủng *Streptococcus thermophilus* và chủng *Lactobacillus*/ml nền sữa, tốt hơn là trong đó, tỷ lệ của ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza (ST) đến ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (LB) trong men cái là từ 1:99 đến 99:1 (ST:LB), như 50:50, tốt hơn nữa là từ 90:10 đến 99:1 (ST:LB);

b. một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong mục a., trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3; và

c. chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus* và chủng *Bifidobacterium*;

ii. lên men nền sữa trong một khoảng thời gian cho đến khi đạt được độ pH đích để thu được sản phẩm sữa lên men.

2. Quy trình theo mục 1, trong đó, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza tương tự.

3. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-2, trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được chọn từ nhóm bao gồm sucroza, galactoza và glucoza, tốt hơn là trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza không phải là glucoza, thậm chí tốt hơn nữa là trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza là sucroza.

4. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-3, trong đó, độ pH đích của bước ii. là khoảng 4,8 đến khoảng 4,0, tốt hơn là khoảng 4,6- đến khoảng 4,55, thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 4,55.

5. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-4, trong đó, chủng thiếu hụt lactoza *Streptococcus thermophilus* được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28952;

(ii) chủng thu được từ DSM 28952, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(b) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28953;

(ii) chủng thu được từ DSM 28953, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(c) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2017-08-22 với số hiệu DSM 32599;

(ii) chủng thu được từ DSM 32599, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal; và

(d) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2017-08-22 với số hiệu DSM 32600; và

(ii) chủng thu được từ DSM 32600, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal.

6. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-5, trong đó, chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza là chủng *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28910; và

(ii) chủng thu được từ DSM 28910, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal.

7. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-6, trong đó, chủng probiotic không phải là chủng *Lactobacillus paracasei*, thậm chí tốt hơn nữa là trong đó, chủng *Lactobacillus* probiotic không phải là chủng *L. paracasei* CRL 431, được lưu giữ dưới tên ATCC 55544 hoặc chủng *L. paracasei* CHCC 2115, được lưu giữ dưới tên DSM 19465,

8. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-7, trong đó, chủng *Lactobacillus* probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus*, chủng *Lactobacillus paracasei* và chủng *Lactobacillus acidophilus* và/hoặc trong đó, chủng probiotic *Bifidobacterium* được chọn từ nhóm bao gồm *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* và *Bifidobacterium infantis*.

9. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-8, trong đó, chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG[®], được lưu giữ dưới tên ATCC 53103, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, được lưu giữ dưới tên ATCC 55544, *Lactobacillus acidophilus*, LA-5[®], được lưu giữ dưới tên DSM 13241 và *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12[®], được lưu giữ dưới tên DSM 15954.

10. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-9, trong đó, chủng probiotic được thêm vào nền sữa trong bước i.c. bao gồm chủng *Bifidobacterium*, tốt hơn là chủng *Bifidobacterium probiotic* được chọn từ nhóm bao gồm *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* và *Bifidobacterium infantis*, thậm chí tốt hơn nữa là *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12[®], được lưu giữ dưới tên DSM 15954.

11. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-10, trong đó, bước i. bao gồm thêm vào nền sữa:

a. Ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là trong đó, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng là $1,2-1,3E+07$ CFU;

b. Một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong mục a., trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3; và

c. *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954, tốt hơn là với lượng là khoảng $1,2E+07$ CFU/ml nền sữa.

12. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-10, trong đó, bước i. bao gồm thêm vào nền sữa:

a. Ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là trong đó, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng là $1,2-1,3E+07$ CFU;

b. Một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong mục a., trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3; và

c. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954 và chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG®, được lưu giữ dưới tên ATCC 53103, tốt hơn là trong đó, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được thêm vào với lượng là khoảng $1,2E+07$ CFU/ml đến chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG®, được thêm vào với lượng là khoảng $7E+06$ CFU/ml.

13. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-10, trong đó, bước i. bao gồm thêm vào nền sữa:

a. Ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là trong đó, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng là $1,2-1,3E+07$ CFU;

b. Một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong mục a., trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3; và

c. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954 và *Lactobacillus acidophilus* strain, LA-5®, được lưu giữ dưới tên DSM 13241, tốt hơn là trong đó, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được thêm vào với lượng là khoảng $1,2E+07$ CFU/ml đến *Lactobacillus acidophilus* strain, LA-5®, được thêm vào với lượng là khoảng $7E+06$ CFU/ml.

14. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 11-13, trong đó, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza là như được xác định trong mục 5, và trong đó, ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza là như được xác định trong mục 6.

15. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-14, trong đó, từ $1E+04$ đến $1E+10$ CFU (đơn vị hình thành tập đoàn)/ml nền sữa của chủng *Streptococcus thermophilus*, tốt hơn là từ $1E+05$ đến $1E+10$ CFU/ml, hoặc từ $1E+06$ đến $1E+10$ CFU/ml, hoặc từ $1E+07$ đến $1E+09$ CFU/ml, tốt hơn là từ khoảng $1E+06$ đến khoảng $1E+08$ CFU/ml chủng *Streptococcus thermophilus* được thêm vào nền sữa trong bước i.a.

16. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-15, trong đó, từ $1E+04$ đến $1E+10$ CFU/ml nền sữa of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain, tốt hơn là từ $1E+05$ đến $1E+10$ CFU/ml, hoặc từ $1E+06$ đến $1E+10$ CFU/ml, hoặc từ $1E+07$ đến $1E+09$ CFU/ml, tốt hơn là từ khoảng $1E+06$ đến khoảng $1E+08$ CFU/ml chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được thêm vào nền sữa trong bước i.a.

17. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-16, trong đó, từ khoảng $1E+06$ đến khoảng $1E+08$ CFU/ml nền sữa của chủng probiotic, tốt hơn là từ khoảng $5E+06$ đến khoảng $5E+07$ CFU/ml, tốt hơn nữa là từ khoảng 1 đến $1,5E+07$ CFU/ml,

nghư khoảng $1,2E+07$ CFU/ml, hoặc trong đó, khoảng $7E+06$ CFU/ml chủng probiotic được thêm vào nền sữa trong bước i.c.

18. Quy trình theo mục bất kỳ trong số các mục 1-17, trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza, tốt hơn là sucroza, được thêm vào nền sữa trong bước i.b. với lượng là nhỏ hơn 0,9%, tốt hơn là với lượng là nhỏ hơn 0,7%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng là nhỏ hơn 0,5%, như 0,41%, trong đó, % là tính theo trọng lượng trên thể tích (% trọng lượng/thể tích) của nền sữa.

19. Sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng quy trình theo các mục 1-18.

20. Thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza và chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus* và chủng *Bifidobacterium*, tốt hơn là trong đó, chủng *Lactobacillus* không phải là chủng *Lactobacillus paracasei*, thậm chí tốt hơn nữa là trong đó, chủng *Lactobacillus* không phải là chủng *L. paracasei* CRL 431, được lưu giữ dưới tên ATCC 55544 hoặc chủng *L. paracasei* CHCC 2115, được lưu giữ dưới tên DSM 19465, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi bao gồm $1,3E+08$ CFU các tế bào sống được vi khuẩn của probiotic/g của sản phẩm sữa lên men (CFU/g) hoặc nhiều hơn, tốt hơn là $2E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, thậm chí tốt hơn nữa là $5E+08$ CFU/g hoặc nhiều hơn, như $6E+08$ CFU/g ít nhất một trong số các chủng probiotic có mặt trong thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi, ngay lập tức sau khi lên men, tốt hơn là tại thời điểm mà là ít nhất 1 ngày sau khi lên men được hoàn thành, như 15 ngày, hoặc 30 ngày, hoặc 45 ngày, hoặc 60 ngày sau khi lên men được hoàn thành, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi được giữ ở khoảng 4°C sau khi lên men được hoàn thành.

21. Thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo mục 20, trong đó, chủng *Lactobacillus* probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus*, chủng *Lactobacillus paracasei* và chủng *Lactobacillus acidophilus* và trong đó, chủng probiotic *Bifidobacterium* được chọn từ nhóm bao gồm *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* và *Bifidobacterium infantis*.

22. Thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo mục bất kỳ trong số các mục 20-21, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi là sản phẩm sữa lên men, tốt hơn là đồ uống sữa lên men, tốt hơn nữa là sữa chua.

23. Thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo mục bất kỳ trong số các mục 20-22, trong đó, chủng thiếu hụt lactoza *Streptococcus thermophilus* là chủng như được xác định trong mục 5; và/hoặc trong đó, chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza là chủng như được xác định trong mục 6; và/hoặc trong đó, chủng *Lactobacillus* probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG[®], được lưu giữ dưới tên ATCC 53103, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, được lưu giữ dưới tên ATCC 55544, *Lactobacillus acidophilus* strain, LA-5[®], s được lưu giữ dưới tên DSM 13241 và *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12[®], được lưu giữ dưới tên DSM 15954.

24. Chế phẩm để tạo ra sản phẩm sữa lên men bao gồm

a) men cái chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza; và

b) một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong a), trong đó, hydrat

cacbon không phải lactoza có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, như nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4, tốt hơn là khoảng 5,3,

25. Chế phẩm theo mục 24, trong đó, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza, tốt hơn là *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza tương tự.

26. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 24-25, trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được chọn từ nhóm bao gồm sucroza, galactoza và glucoza, tốt hơn là trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza không phải là glucoza, thậm chí tốt hơn nữa là trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza là sucroza.

27. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 24-26, trong đó, chủng thiếu hụt lactoza *Streptococcus thermophilus* là chủng như được xác định trong mục 5; và/hoặc trong đó, chủng *Lactobacillus* thiếu hụt lactoza là chủng *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* strain như được xác định trong mục 6.

28. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 24-27, trong đó, chế phẩm còn bao gồm chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus* và chủng *Bifidobacterium*, tốt hơn là trong đó, chủng *Lactobacillus* không phải là chủng *Lactobacillus paracasei*, thậm chí tốt hơn nữa là trong đó, chủng *Lactobacillus* không phải là chủng *L. paracasei* CRL 431, được lưu giữ dưới tên ATCC 55544 hoặc chủng *L. paracasei* CHCC 2115, được lưu giữ dưới tên DSM 19465.

29. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 24-28, trong đó, chủng *Lactobacillus* probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus*, chủng *Lactobacillus paracasei* và chủng *Lactobacillus acidophilus* và trong đó, chủng probiotic *Bifidobacterium* được chọn từ nhóm bao gồm *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* và *Bifidobacterium infantis*.

30. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 28-29, trong đó, chủng *Lactobacillus* probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG[®], được lưu giữ dưới tên ATCC 53103, chủng *Lactobacillus paracasei* CRL 431, được lưu giữ dưới tên ATCC 55544, *Lactobacillus acidophilus* strain, LA-5[®], được lưu giữ dưới tên DSM 13241 và *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12[®], được lưu giữ dưới tên DSM 15954.

31. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 28-30, trong đó, chế phẩm chứa:

a) Ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza; và

b) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12[®], được lưu giữ dưới tên DSM 15954,

32. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 28-30, trong đó, chế phẩm chứa:

a) Ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza;

b) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12[®], được lưu giữ dưới tên DSM 15954; và

c) chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG[®], được lưu giữ dưới tên ATCC 53103.

33. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 28-30, trong đó, chế phẩm chứa:

a) Ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển

hóa hydrat cacbon không phải lactoza;

b) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954; và

c) *Lactobacillus acidophilus* strain, LA-5®, được lưu giữ dưới tên DSM 13241,

34. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 31-33, trong đó, ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza là như được xác định trong mục 5, và trong đó, ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza là như được xác định trong mục 6,

35. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 24-34, trong đó, chế phẩm chứa từ khoảng $6-7E+08$ CFU (đơn vị hình thành tập đoàn)/g chủng *Streptococcus thermophilus* hoặc ít hơn.

36. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 24-35, trong đó, chế phẩm chứa khoảng $1E+07$ CFU/g chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

37. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 24-36, trong đó, chế phẩm chứa từ $1E+06$ đến $1E+08$ CFU/g chủng probiotic, tốt hơn là từ $5E+06$ đến $5E+07$ CFU/g, tốt hơn nữa là khoảng $1,2E+07$ CFU/g chủng probiotic.

38. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 24-37, trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza là có mặt trong chế phẩm với lượng là nhỏ hơn 0,9%, tốt hơn là với lượng là nhỏ hơn 0,7%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng là nhỏ hơn 0,5%, như khoảng 0,41%, trong đó, % là tính theo trọng lượng trên thể tích (% trọng lượng/thể tích) của nền sữa.

39. Sử dụng chế phẩm như được xác định trong mục bất kỳ trong số các mục 24-38 để làm tăng số số lượng tế bào probiotic trong sản phẩm sữa lên men, như được so sánh với sản phẩm sữa lên men được lên men bằng chế phẩm chứa

a) men cái chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một *chủng* *Streptococcus thermophilus*, mà không thiếu hụt lactoza, và ít nhất một *chủng* *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mà không thiếu hụt lactoza; và/hoặc

b) i. men cái chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một *chủng* *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một *chủng* *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và

ii. một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong i), trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là thấp hơn 4,9.

tốt hơn là trong đó, sản phẩm sữa lên men bao gồm ít nhất $2E+08$ CFU tế bào probiotic có khả năng sống được/g sản phẩm sữa lên men, tốt hơn là ít nhất $4E+08$ CFU tế bào probiotic có khả năng sống được/g sản phẩm sữa lên men, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất $5,5E+08$ CFU, như $5,7E+08$ CFU tế bào probiotic có khả năng sống được/g sản phẩm sữa lên men sau 60 ngày trong thời hạn sử dụng (bảo quản) ở 4°C .

Thông tin lưu giữ vi sinh vật

Người nộp đơn yêu cầu rằng sự sẵn có của các vi sinh vật được lưu giữ được đề cập đến trong Quy tắc 33 EPC sẽ chỉ được thực hiện khi cấp một mẫu cho một chuyên gia độc lập do người yêu cầu chỉ định (Quy tắc 32 (1) EPC).

chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28952.

chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28953.

chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2017-08-22 với số hiệu DSM 32599.

chủng *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ với DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2017-08-22 với số hiệu DSM 32600.

chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được lưu giữ với DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28910;

chủng *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, được lưu giữ với DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg. 1b, D-38124 Braunschweig, on 2003-09-30 với số hiệu DSM 15954;

chủng *Lactobacillus acidophilus*, LA-5®, được lưu giữ với DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg. 1b, D-38124 Braunschweig, on 2003-09-30 với số hiệu DSM 13241,

Quá trình lưu giữ được thực hiện bởi người nộp đơn CHR. HANSEN A/S theo Hiệp ước Budapest về về sự công nhận quốc tế đối với việc ký gửi vi sinh vật cho các mục đích của thủ tục cấp bằng sáng chế.

CÁC NHÃN HIỆU ĐÃ ĐĂNG KÝ

BB-12® là chủng đã được đăng ký Nhãn hiệu của Chr. Hansen.

LGG® là chủng đã được đăng ký Nhãn hiệu của Chr. Hansen.

LA-5® là chủng đã được đăng ký Nhãn hiệu của Chr. Hansen.

YoFlex® là chủng đã được đăng ký Nhãn hiệu của Chr. Hansen.

Acidifix® là chủng đã được đăng ký Nhãn hiệu của Chr. Hansen.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Đối tượng của ví dụ này là so sánh hiệu quả của men cái chứa vi khuẩn axit lactic trong số lượng tế bào của môi trường nuôi cấy probiotic BB-12®, LGG® và/hoặc LA-5®, trong đó, men cái bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza và hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic của men cái như được xác định ở trên, trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza là có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là khoảng 5,3.

Men cái

Acidifix®: Môi trường nuôi cấy thiếu hụt lactoza chứa ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* (ST) thiếu hụt lactoza và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (LB) thiếu hụt lactoza, loại này là có bán sẵn ở quy mô công nghiệp dưới tên “F-DVS YoFlex® Acidifix® 1,0”, từ Chr. Hansen A/S. Các chủng này được phân lập như được mô tả, ví dụ, trong Ví dụ 1 của EP 2957180.

YoFlex® Mild 1,0: Thương mại, môi trường nuôi cấy sữa chua dương tính với lactoza bao gồm chủng *Streptococcus thermophilus* dương tính với lactoza và

chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dương tính với lactoza. Chủng thương mại F-DSV (Frozen Direct Vat Set (DVS), môi trường nuôi cấy lạnh cô đặc) YoFlex® Mild 1,0 từ Chr. Hansen A/S. F-DVS YoFlex® Mild 1,0 là có sẵn ở trên thị trường từ Chr. Hansen A/S, GIN 702897.

Môi trường nuôi cấy probiotic

LGG®: chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG®, được lưu giữ dưới tên ATCC 53103.

BB-12®: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain, BB-12®, được lưu giữ dưới tên DSM 15954.

LA-5®: *Lactobacillus acidophilus*, LA-5® được lưu giữ dưới tên DSM 13241.

Chế phẩm nuôi cấy

Các chủng probiotics trên đã được sử dụng để thực hiện thử nghiệm: *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis*, BB-12®, *Lactobacillus acidophilus*, LA-5®, và *Lactobacillus rhamnosus*, LGG®. Chúng được kết hợp với F-DVS YoFlex® Acidifix® 1,0 có chứa các chủng Lac(-) ST và Lac (-) LB, như được nêu trên đây. Môi trường nuôi cấy sữa chua Lactoza (+) F-DSV YoFlex® Mild 1,0, như được mô tả ở trên, + BB-12® và F-DVS BB-12® đơn không có môi trường nuôi cấy sữa chua, được sử dụng làm đối chứng.

Nền cấy (“hỗn hợp nuôi cấy”) được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

	Nền sữa	F-DVS Acidifix® 1,0	F-DVS YF Mild 1,0	F-DVS BB-12®	F-DVS LA-5®	FD-DVS LGG®	Lưu ý
A	Sữa +0,41% sucroza	0,01%		0,01%		0,001%	
B	Sữa +0,41% sucroza	0,01%		0,01%			
C	Sữa +0,41% sucroza	0,01%		0,01%	0,01%		
D	Sữa +0,90% sucroza	0,01%		0,01%			
E	Sữa +0,41% sucroza		0,01%	0,01%			Đối chứng
F	Sữa +0,41% sucroza			0,02%			Đối chứng

Bảng 1. Nền cấy. % cấy là để chỉ trọng lượng trên thể tích (trọng lượng/thể tích) của tổng lượng của nền sữa. % lượng sucroza được cho dưới dạng (trọng lượng/thể tích) trên cơ sở nền sữa.

Khi F-DVS Acidifix® 1,0 (F-DVS YoFlex® Acidifix® 1,0) hoặc F-DVS YF Mild 1,0 (F-DVS YoFlex® Mild 1,0) được cấy ở 0,01%, số lượng tế bào của ST và LB sau khi cấy (trước khi lên men) là $1,2-1,3E+07$ CFU/ml. Số lượng tế bào của BB-12® sau khi cấy ở 0,01% F-DVS là $1,2E+07$ CFU/ml. Số lượng tế bào của LA-5® sau khi cấy ở 0,01% F-DVS là $7E+06$ CFU/ml. Số lượng tế bào của LGG® sau khi cấy ở 0,001% (of the FD -DVS) là $7E+06$ CFU/ml.

Môi trường nuôi cấy được thử nghiệm trong sữa với 2% trọng lượng chất béo và thêm sữa bột tách béo để tiêu chuẩn hóa đến 4,1% trọng lượng protein (nền sữa). Sucroza được thêm vào ở mức 0,41% hoặc 0,90% (trong đó, % là (trọng lượng/thể tích) trên cơ sở nền sữa) để cho phép axit hóa đến khoảng pH tương ứng là 5,3 và 4,55. Nền sữa được xử lý nhiệt ở 92°C trong 3 phút, làm nguội đến 38°C và được cấy như được mô tả. Sữa được ủ ở 38°C. Profil axit hóa được tiếp tục bởi thiết bị đo pH trực tuyến (CINAC) trong 20-24 giờ.

Quá trình lên men được dừng lại ở pH 4,55, sữa chua probiotic được làm lạnh đến 4°C và giữ ở 4°C trong thời hạn sử dụng (bảo quản). Số lượng tế bào được xác định bằng số lượng đĩa ở ngày 1, 15, 30, 45 và 60.

Về mặt lý thuyết, số lượng tế bào cao nhất đạt được bằng cách nuôi cấy một chủng duy nhất. Tuy nhiên, chủng probiotic được lựa chọn dựa trên khả năng tồn tại trong dải tiêu hóa của con người, khả năng bám dính vào niêm mạc ruột và tác dụng có lợi cụ thể đối với sức khỏe. Chúng có hoạt động trao đổi chất khác với vi khuẩn axit lactic được sử dụng để axit hóa sữa và sản xuất sữa chua và các sản phẩm sữa lên men khác. Bởi vì nó không phải là chức năng chính của chúng, chủng probiotic như, ví dụ, BB-12® và LGG®, không thích nghi tốt để phát triển trong sữa, do đó không thể axit hóa nó một cách hiệu quả. Chúng không thể phát triển và axit hóa sữa dưới pH tương ứng là 6,1 và 5,8 trong 24 giờ, xem Fig. 1.

Số lượng tế bào probiotic cao hơn đáng kể đạt được với hỗn hợp chứa probiotic với F-DVS YoFlex® Acidifix® 1,0, tức là, các chủng Lac(-) ST và LB, xem Fig. 2. Các hỗn hợp nuôi cấy được cấy vào sữa có bổ sung vừa đủ sucroza để cho phép axit hóa đến khoảng pH 5,30.

Như được thể hiện trong Fig. 2, có hai giai đoạn axit hóa. Giai đoạn đầu tương ứng với quá trình axit hóa đến pH khoảng 5,30. Điều này là do sự phát triển của các chủng Lac (-) ST và LB (F-DVS YoFlex® Acidifix®1.0). Giai đoạn axit hóa thứ hai từ 5,30 đến 4,55, hoặc thấp hơn, chỉ do sự phát triển của chủng probiotic, ví dụ, *Bifidobacterium*, BB-12®, với hoặc without LA-5® hoặc LGG®. Chủng probiotic này có thể chuyển hóa đường lactoza có trong sữa và tiếp tục quá trình lên men (axit hóa) cho đến khi đạt được độ pH mong muốn, ví dụ: 4,55. Tại thời điểm này, sữa được làm lạnh để ngăn chặn quá trình axit hóa tiếp tục.

Bảng 2 cho thấy thời gian cần thiết của mỗi mẫu cấy được thử nghiệm để đạt đến độ pH là 4,55. Fig. 3 cho thấy profil axit hóa của Acidifix® 1,0 + 0,01% BB-12® trong sữa với 0,41% (B) và 0,90% sucroza (D). % Lượng đường sucroza được cho là (trọng lượng/thể tích) trên cơ sở nền sữa, như được mô tả ở trên.

	Hỗn hợp nuôi cấy	Phút	Giờ
A	Acidifix® 1,0 (sucroza được thêm vào để axit hóa đến pH 5,30) + BB-12® + LGG®	1000	16,7
B	Acidifix® 1,0 (sucroza được thêm vào để axit hóa đến pH 5,30) + BB-12®	1138	19
C	Acidifix® 1,0 (sucroza được thêm vào để axit hóa đến pH 5,30) + BB-12® + LA-5®	668	11,1
D	Acidifix® 1,0 (sucroza được thêm vào để axit hóa đến pH 4,55) + BB-12®	528	8,8
E	Mild 1,0 (Lac (+) môi trường nuôi cấy sữa chua) + BB-12®	450	7,5
F	BB-12®	n/a	n/a

Bảng 2: Thời gian đến pH 4,55

Hỗn hợp chứa F-DVS YoFlex® Acidifix® 1,0 (tức là, chủng *Streptococcus thermophilus* (ST) thiếu hụt lactoza và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB) thiếu hụt lactoza) được thiết kế để ngừng axit hóa ở pH khoảng 5,30 bằng các probiotic dẫn đến trong số lượng tế bào probiotic cao hơn, ví dụ 1,4-9,6E+08 CFU các tế bào sống được vi khuẩn của probiotic/g sản phẩm sữa lên men (CFU/g) của *Bifidobacterium*, BB-12®, 2,4-4,6E+08 CFU/g *L. acidophilus*, LA-5®, và 2,7-4,3E+08 CFU/g *L. rhamnosus*, LGG®. Số lượng tế bào của tất cả các probiotic cao hơn so với những gì thường thấy trong sữa lên men probiotic và số lượng ổn định hơn trong thời hạn sử dụng 60 ngày.

Khi được lên men bằng Acidifix® 1,0 trong sữa có mức sucroza hạn chế (0,41%, tức là, được thiết kế để ngừng axit hóa ở pH khoảng 5,30) (Kết hợp nuôi cấy A, B và C), số lượng tế bào của BB-12® cao hơn gần 1 log so với những gì thường đạt được khi kết hợp với nuôi cấy sữa chua (lac +), xem Bảng 3 dưới đây.

A	Acidifix® 1,0+ BB-12® +LGG®	D1	D15	D30	D45	D60
	<i>Bifidobacterium lactis</i> , BB-12®	6,00E+08	8,90E+08	9,60E+08	6,1E+08	5,70E+08
	<i>L. rhamnosus</i> , LGG®	4,30E+08	3,10E+08	2,80E+08	2,7E+08	2,80E+08
B	Acidifix® 1,0+BB-12®					
	<i>Bifidobacterium lactis</i> , BB-12®	5,20E+08	4,30E+08	3,80E+08	3,60E+08	4,40E+08
C	Acidifix® 1,0 + BB-12® + LA-5®					
	<i>Bifidobacterium lactis</i> , BB-12®	2,20E+08	2,10E+08	1,40E+08	2,20E+08	2,20E+08
	<i>L. acidophilus</i> , LA-5®	2,70E+08	2,40E+08	4,60E+08	2,80E+08	3,10E+08
D	Acidifix® 1,0+BB-12® pH 4,55					
	<i>Bifidobacterium lactis</i> , BB-12®	1,30E+08	9,90E+07	9,20E+07	1,10E+08	7,40E+07
E	Mild 1,0 +BB-12®					
	<i>Bifidobacterium lactis</i> , BB-12®	1,20E+08	9,20E+07	8,90E+07	7,10E+07	6,60E+07
F	BB-12®					
	<i>Bifidobacterium lactis</i> , BB-12®	1,20E+07				

Bảng 3: Số lượng tế bào (CFU/g sản phẩm sữa lên men) trong thời hạn sử dụng 60 ngày, được xác định bằng cách đếm chọn lọc trên đĩa aga.

Khi nền sữa được bổ sung 0,9% sucroza, được tính toán để cho phép axit hóa đến pH 4,55 (biến D), Acidifix® 1.0 + BB-12® được thực hiện theo cách tương tự như nuôi cấy sữa chua Lactose (+) YoFlex® Mild 1.0 + BB -12® (biến E). Số lượng tế bào

của BB-12® ở cả hai biến trong đó *Streptococcus thermophilus* (ST) thiếu hụt lactoza và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB) thiếu hụt lactoza được để axit hóa đến 4,55 có thể so sánh được và dao động trong khoảng $1,2-1,3E + 08$ CFU/g. Số lượng tế bào của BB-12® khi được cấy mà không có môi trường nuôi cấy sữa chua (biến F), không tăng lên, nó vào khoảng $1,2 E + 07$ CFU/g, về cơ bản tương ứng với số lượng tế bào trong chất cấy.

Cải thiện khả năng sống sót trong thời hạn sử dụng

Số lượng tế bào trong 60 ngày, là thời hạn sử dụng điển hình của các sản phẩm sữa tươi lên men ở Bắc Mỹ và một số khu vực khác trên thế giới, cũng đã được thử nghiệm. Trong thời hạn sử dụng, trong một loại sữa chua chứa probiotic điển hình, số lượng tế bào của Bifidobacterium, BB-12® thường giảm từ 0,5-1 log trong vòng 60 ngày, tùy thuộc vào cách nuôi cấy sữa chua, nền sữa, điều kiện nuôi trồng và bảo quản. Số lượng tế bào của LA-5® thường giảm từ 1-2 log trong thời hạn sử dụng 60 ngày. Khi được đồng nuôi cấy với Acidifix® 1.0 (tăng trưởng giới hạn ở độ pH khoảng 5,30), số lượng tế bào của probiotic BB-12®, LA-5® và LGG® cao hơn 0,5-1 log so với mức thường thấy và cũng cho thấy sự ổn định tuyệt vời trong thời hạn sử dụng (60 ngày).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tạo ra sản phẩm sữa lên men với lượng vi khuẩn probiotic gia tăng, quy trình này bao gồm các bước:

i. Thêm vào nền sữa:

a. men cái chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza; trong đó, chủng thiếu hụt lactoza *Streptococcus thermophilus* được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28952;

(ii) chủng thu được từ DSM 28952, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(b) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28953;

(ii) chủng thu được từ DSM 28953, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(c) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2017-08-22 với số hiệu DSM 32599;

(ii) chủng thu được từ DSM 32599, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal; và

(d) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2017-08-22 với số hiệu DSM 32600; và

(ii) chủng thu được từ DSM 32600, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal, và

trong đó, chủng *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28910; và

(ii) chủng thu được từ DSM 28910, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

b. một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong mục a., trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, và

c. chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG[®], được lưu giữ dưới tên ATCC 53103, được lưu giữ dưới tên ATCC 55544, *Lactobacillus acidophilus* strain, LA-5[®], được lưu giữ dưới tên DSM 13241 và *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12[®], được lưu giữ dưới tên DSM 15954;

ii. lên men nền sữa trong một khoảng thời gian cho đến khi đạt được độ pH đích để thu được sản phẩm sữa lên men, trong đó nền sữa được lên men chứa $1,3E+08$ CFU các tế bào sống được của probiotic vi khuẩn/g của sản phẩm sữa lên men (CFU/g) hoặc nhiều hơn

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được chọn từ nhóm bao gồm sucroza, galactoza và glucoza.

3. Quy trình theo điểm 1, trong đó trong bước b của bước i, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4.

4. Quy trình theo điểm 1, trong đó trong bước b của bước i, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là 5,3.

5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó, độ pH đích của bước ii. là khoảng 4,8 đến khoảng 4,0.

6. Quy trình theo điểm 5, trong đó, độ pH đích của bước ii. là tốt hơn là khoảng 4,6 đến khoảng 4,55.

7. Quy trình theo điểm 5, trong đó, độ pH đích của bước ii. là 4,55.

8. Sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng quy trình theo các điểm từ 1 đến 7.

9. Thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi, trong đó thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi là sản phẩm sữa lên men được sản xuất theo quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi chứa $1,3E+08$ CFU tế bào sống của vi khuẩn probiotic/g sản phẩm sữa lên men (CFU/g) hoặc nhiều hơn trong số ít nhất một trong các chủng probiotic có trong thực phẩm

hoặc thức ăn chăn nuôi, tại thời điểm ít nhất là 1 ngày sau khi quá trình lên men theo định nghĩa trong mục ii của điểm 1 đã hoàn tất, trong đó thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi đã được giữ ở 4°C sau khi quá trình lên men đã hoàn tất.

10. Thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo điểm 9, trong đó thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi chứa $2E+08$ CFU tế bào sống của vi khuẩn probiotic/g sản phẩm sữa lên men (CFU/g) hoặc nhiều hơn trong số ít nhất một trong các chủng probiotic có trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi, tại thời điểm ít nhất là 1 ngày sau khi quá trình lên men theo định nghĩa trong mục ii của điểm 1 đã hoàn tất, trong đó thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi đã được giữ ở 4°C sau khi quá trình lên men đã hoàn tất.

11. Thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo điểm 9, trong đó thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi chứa $5E+08$ CFU tế bào sống của vi khuẩn probiotic/g sản phẩm sữa lên men (CFU/g) hoặc nhiều hơn trong số ít nhất một trong các chủng probiotic có trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi, tại thời điểm ít nhất là 1 ngày sau khi quá trình lên men theo định nghĩa trong mục ii của điểm 1 đã hoàn tất, trong đó thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi đã được giữ ở 4°C sau khi quá trình lên men đã hoàn tất.

12. Thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi là đồ uống sữa lên men.

13. Thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó, thực phẩm hoặc sản phẩm thức ăn chăn nuôi là sữa chua.

14. Chế phẩm để tạo ra sản phẩm sữa lên men với lượng vi khuẩn probiotic gia tăng, chứa:

- a) men cái chứa vi khuẩn axit lactic bao gồm ít nhất một chủng

Streptococcus thermophilus thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza, và ít nhất một chủng *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza, mà có khả năng chuyển hóa hydrat cacbon không phải lactoza; trong đó chủng *Streptococcus thermophilus* thiếu hụt lactoza được chọn từ nhóm bao gồm

(a) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28952;

(ii) chủng thu được từ DSM 28952, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(b) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28953;

(ii) chủng thu được từ DSM 28953, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

(c) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2017-08-22 với số hiệu DSM 32599;

(ii) chủng thu được từ DSM 32599, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal; và

(d) (i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2017-08-22 với số hiệu DSM 32600; và

(ii) chủng thu được từ DSM 32600, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal, và

trong đó, chủng *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* thiếu hụt lactoza được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) chủng được lưu giữ tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, on 2014-06-12 với số hiệu DSM 28910; và

(ii) chủng thu được từ DSM 28910, trong đó, chủng thu được này còn được đặc trưng bởi nó có khả năng tạo ra tập đoàn trắng trên môi trường chứa lactoza và X-Gal;

b. một hoặc nhiều hydrat cacbon không phải lactoza có khả năng được chuyển hóa bởi vi khuẩn axit lactic như được xác định trong mục a., trong đó, hydrat cacbon không phải lactoza được thêm vào với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,5, và

c. chủng probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus rhamnosus*, LGG[®], được lưu giữ dưới tên ATCC 53103, được lưu giữ dưới tên ATCC 55544, *Lactobacillus acidophilus* strain, LA-5[®], được lưu giữ dưới tên DSM 13241 và *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12[®], được lưu giữ dưới tên DSM 15954;

trong đó nền sữa được lên men chứa 1,3E+08 CFU các tế bào sống được của probiotic vi khuẩn/g của sản phẩm sữa lên men (CFU/g) hoặc nhiều hơn.

15. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó trong bước b), hydrat cacbon không phải lactoza có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,4.

16. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó trong bước b), hydrat cacbon không phải lactoza có mặt trong chế phẩm với lượng được tính sao cho trở nên suy kiệt khi độ pH của sản phẩm sữa lên men là 5,3.

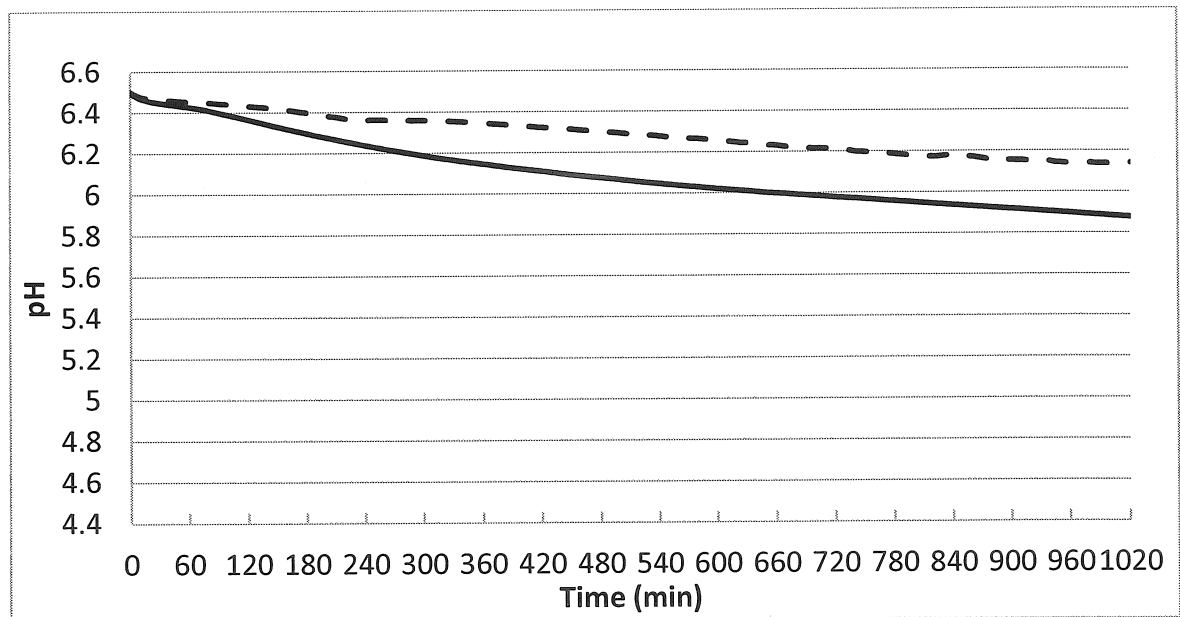


FIG. 1

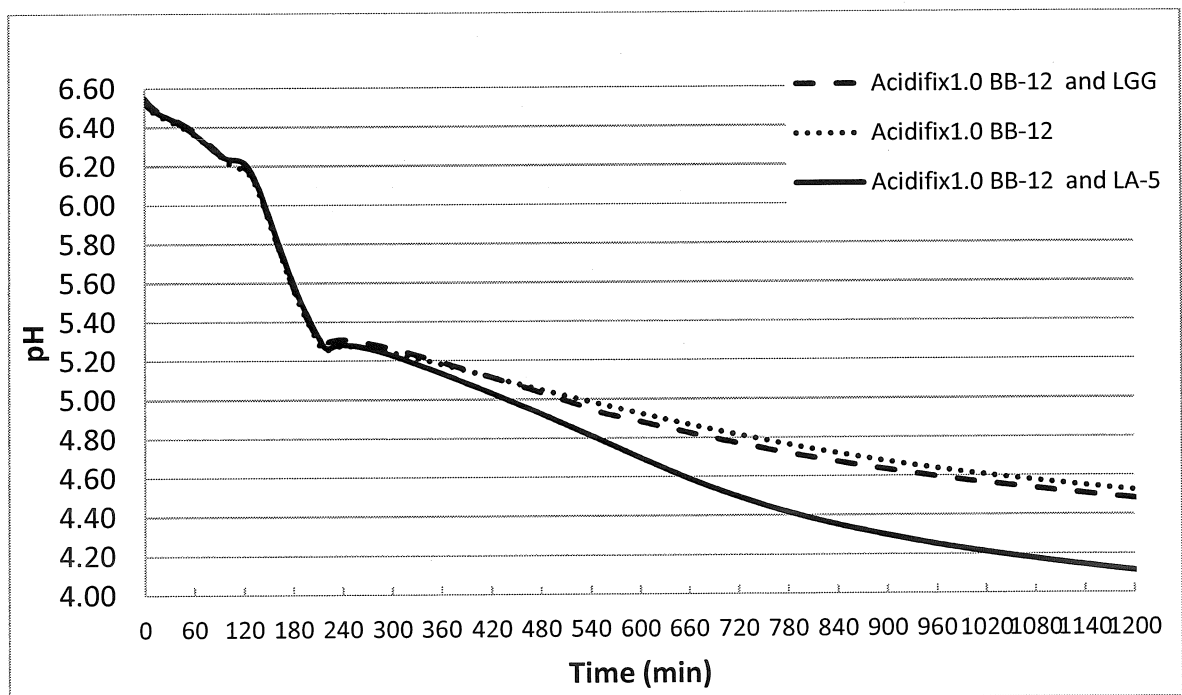
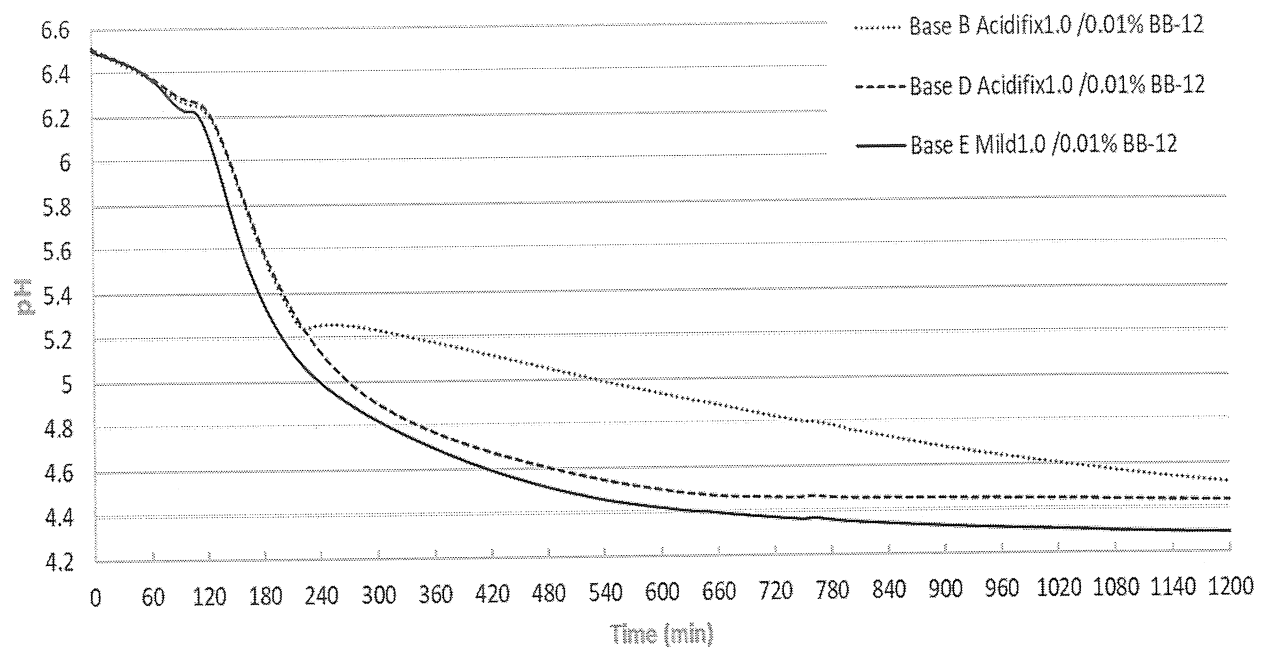


FIG. 2

**FIG. 3**