



(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) 
1-0020955

(51)⁷ **C12N 9/12, C12R 1/46**

(13) **B**

(21)	1-2012-00530	(22)	01.09.2010
(86)	PCT/EP2010/062808 01.09.2010	(87)	WO2011/026863 10.03.2011
(30)	PA 2009 00984 01.09.2009 DK		
	PA 2010 00070 28.01.2010 DK		
(45)	27.05.2019 374	(43)	25.07.2013 304
(73)	CHR. HANSEN A/S (DK)		
	Boege Alle 10-12, DK-2970 Hoersholm, Denmark		
(72)	JANZEN Thomas (DE), CHRISTIANSEN Ditte Ellegaard (DK)		
(74)	Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)		

(54) **VI KHUẨN AXIT LACTIC VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VI KHUẨN AXIT LACTIC NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến vi khuẩn axit lactic, phương pháp sản xuất vi khuẩn axit lactic, chủng vi khuẩn, chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa và sản phẩm sữa thu được bằng phương pháp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tế bào vi khuẩn có đặc tính tạo cấu trúc, giống khởi động chứa các tế bào này, và các sản phẩm sữa được lên men bằng giống khởi động này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngành công nghiệp thực phẩm sử dụng rất nhiều loại vi khuẩn, đặc biệt là vi khuẩn lactic, để không những cải thiện hương vị và cấu trúc của thực phẩm mà còn kéo dài thời hạn sử dụng của các thực phẩm này. Trong ngành công nghiệp chế biến sữa, vi khuẩn lactic được sử dụng một cách rộng rãi để không những làm axit hóa sữa (nhờ quá trình lên men) mà còn tạo cấu trúc cho sản phẩm mà chúng được đưa vào.

Trong số các vi khuẩn lactic được sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm, có thể kể đến chi *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* và *Bifidobacterium*. Vi khuẩn lactic thuộc loài *Streptococcus thermophilus* được sử dụng riêng biệt hoặc kết hợp với các vi khuẩn khác một cách rộng rãi trong sản xuất thực phẩm, cụ thể là các sản phẩm lên men. Đặc biệt, chúng được sử dụng trong pha chế men dùng để sản xuất sữa lên men, ví dụ, sữa chua. Một số vi khuẩn trong số đó đóng vai trò chính trong sự phát triển cấu trúc của sản phẩm lên men. Đặc điểm này có liên quan mật thiết với quá trình sản xuất các polysacarit. Có thể phân biệt giữa các chủng tạo cấu trúc và các chủng không tạo cấu trúc trong số các chủng *Streptococcus thermophilus*.

Để đáp ứng yêu cầu trong công nghiệp, cần tạo ra các chủng vi khuẩn lactic tạo cấu trúc mới, cụ thể là *Streptococcus thermophilus*.

WO2007095958A1 đề cập đến các chủng *Streptococcus thermophilus* có đặc tính tạo cấu trúc. Trong Fig.1 có thể thấy rằng chủng tạo cấu trúc tốt nhất CHCC8833 (DSM17876) có ứng suất cắt bằng khoảng 59 Pa.

J Dairy Sci. 92: 477-482 (2009) đề cập đến nghiên cứu cho thấy rằng có thể làm tăng sản lượng EPS (Expanded Polystyrene - Polystyren kéo dài) nhờ các chủng *Streptococcus thermophilus* quánh thông qua kỹ thuật di truyền bằng cách làm tăng hoạt tính GalK. Đã kết luận được rằng khi chủng này được sử dụng kết hợp với *Lactobacillus bulgaricus* để sản xuất sữa chua, việc sản xuất quá mức EPS của chủng tái tổ hợp là không đáng kể.

Do đó, nhằm giải quyết vấn đề nêu trên, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn lactic có đặc tính tạo cấu trúc các thực phẩm tốt, đặc biệt là các sản phẩm mà chủng vi khuẩn lactic tạo cấu trúc (như *Streptococcus thermophilus*) được sử dụng cùng với chủng của loài *Lactobacillus*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng vi khuẩn axit lactic có các đột biến ở gen GalK (galactokinaza) tạo ra độ nhớt trong sữa lên men cao hơn so với chủng kiểu dại (bố mẹ), đặc biệt là khi được sử dụng để lên men sữa cùng với vi khuẩn *Lactobacillus*.

Từ phát hiện bất ngờ này, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn axit lactic tạo siêu cấu trúc như chủng *S. thermophilus*, có các đột biến ở gen GalK và phương pháp sản xuất các chủng này, và các sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng cách sử dụng các chủng này.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện ứng suất cắt của CHCC11379 đo được bằng lưu biến kế StressTech. Kết quả cho thấy cấu trúc (ứng suất cắt) cải tiến trong sữa được kết tụ bằng CHCC11379 sau khi sinh trưởng qua đêm ở nhiệt độ 43°C. Cấu trúc được định lượng bằng cách đánh giá ứng suất cắt đo được bằng Pascal (Pa) sử dụng lưu biến kế StressTech như được mô tả trong “Phân tích cấu trúc trong sữa lên men”.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất vi khuẩn axit lactic (ví dụ, vi khuẩn tạo ra độ nhớt trong sữa lên men cao hơn so với chủng bố mẹ, hoặc vi khuẩn tạo ra độ nhớt trong sữa lên men lớn hơn khoảng 70 Pa (ví dụ, lớn hơn 71 hoặc lớn hơn 73 Pa, khi đo được bằng ứng

suất cắt sau 12 giờ sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C), trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra chủng vi khuẩn axit lactic (chủng bố mẹ); và
- b) đưa đột biến vào gen GalK của chủng.

Do đó, các phương án của khía cạnh thứ nhất là:

- Phương pháp sản xuất vi khuẩn axit lactic tạo ra độ nhớt trong sữa lên men cao hơn so với chủng bố mẹ (ví dụ, khi đo được bằng ứng suất cắt sau 12 giờ sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C chẳng hạn), trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra chủng vi khuẩn axit lactic (chủng bố mẹ); và
- b) đưa đột biến vào gen GalK của chủng.

- Phương pháp sản xuất vi khuẩn axit lactic tạo ra độ nhớt trong sữa lên men lớn hơn khoảng 70 Pa (ví dụ, khi đo được bằng ứng suất cắt sau 12 giờ sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C chẳng hạn), trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra chủng vi khuẩn axit lactic (chủng bố mẹ); và
- b) đưa đột biến vào gen GalK của chủng.

Theo các phương án được ưu tiên, độ nhớt đo được bằng ứng suất cắt sau 12 giờ sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C, và/hoặc đo được trong thử nghiệm được mô tả dưới đây. Do đó, phương án được ưu tiên của khía cạnh thứ nhất theo sáng chế là phương pháp sản xuất vi khuẩn axit lactic tạo ra độ nhớt trong sữa lên men lớn hơn khoảng 70 Pa, khi đo được bằng ứng suất cắt sau 12 giờ sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra chủng vi khuẩn axit lactic (chủng bố mẹ); và
- b) đưa đột biến vào gen GalK của chủng.

Phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm một hoặc nhiều bước nữa được chọn từ nhóm bao gồm:

- c1) sàng lọc chủng đột biến tạo cấu trúc như chủng tạo nhiều cấu trúc hơn so với chủng bố mẹ, hoặc làm tăng độ nhớt của cơ chất sữa; và
- c2) sàng lọc chủng đột biến có phenotyp Gal⁺ như chủng có hoạt tính làm suy biến/lên men galactose cải thiện so với chủng bố mẹ.

Đột biến có thể được đưa vào trình tự khởi đầu của gen như vùng -10 (hộp Pribnow) của gen.

Theo một phương án được ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, đột biến làm thay thế một hoặc cả hai nucleotit C và G trong vùng -10 kiểu đại (TACGAT) bằng nucleotit độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nucleotit A và T.

Đột biến có thể làm thay thế nucleotit C trong vùng -10 kiểu đại (TACGAT) bằng nucleotit độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nucleotit A và T.

Theo một phương án, đột biến làm thay thế nucleotit C vùng -10 kiểu đại (TACGAT) bằng nucleotit T, và/hoặc đột biến làm cho vùng -10 có trình tự nucleotit TATGAT, TATTAT hoặc TACTAT.

Đột biến có thể được đưa vào bằng cách sử dụng các kỹ thuật di truyền, và/hoặc bằng kỹ thuật gây đột biến, ví dụ, bằng phóng xạ hoặc xử lý bằng hóa học, tùy ý tiếp theo là phân tích gen GalK để kiểm tra đột biến trong gen GalK.

Vi khuẩn (chủng bố mẹ) có thể được chọn từ các chi thuộc nhóm bao gồm *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* và *Bifidobacterium*. Vi khuẩn đang quan tâm thuộc loài *Streptococcus thermophilus*.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất vi khuẩn axit lactic thu được bằng phương pháp theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vi khuẩn axit lactic tạo ra độ nhớt trong sữa lên men lớn hơn khoảng 70 Pa (ví dụ, lớn hơn 71 Pa hoặc 73 Pa), khi đo được bằng ứng suất cắt sau 12 giờ sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C; vi khuẩn axit lactic mang đột biến trong vùng -10 của gen GalK (so với vùng -10 kiểu đại (TACGAT)), trong đó đột biến làm cho vùng -10 có trình tự nucleotit TATGAT, TATTAT hoặc TACTAT; và vi khuẩn axit lactic mang đột biến trong vùng -10 của gen GalK, đột biến làm thay thế nucleotit C trong vùng -10 kiểu đại (TACGAT) bằng nucleotit độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nucleotit A và T. Theo một phương án quan tâm, đột biến làm thay thế nucleotit C trong vùng -10 kiểu đại (TACGAT) bằng T.

Theo một phương án quan tâm, vi khuẩn axit lactic theo sáng chế chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:5 hoặc trình tự khởi đầu của chúng, bao gồm vùng -35 và vùng -10. Tốt hơn là, vi khuẩn axit lactic thuộc loài *Streptococcus thermophilus*.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn thuộc loài *Streptococcus thermophilus*, được chọn từ nhóm bao gồm: CHCC11379 (DSM 22884), CHCC11342, CHCC11976, và các thể đột biến và các biến dị của thể đột biến bất kỳ trong số các thể đột biến này. Ngoài ra, sáng chế đề xuất tất cả các chủng mới được đề cập trong bản mô tả này, cũng như các thể đột biến và các biến dị của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo sáng chế như vi khuẩn thuộc chủng CHCC11379. Tốt hơn là, chế phẩm này chứa ít nhất 10×10^6 CFU (cell forming unit - đơn vị tạo tế bào) của vi khuẩn này.

Chế phẩm có thể chứa, ở dạng hỗn hợp hoặc ở dạng nhiều thành phần,
 - chủng thuộc loài *Lactobacillus* như chủng *L. bulgaricus* hoặc *L. fermentum*;
 và
 - chủng của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế như chủng thuộc loài *Streptococcus thermophilus*.

Tốt hơn, nếu chủng thuộc loài *Lactobacillus* là chủng thuộc polysacarit (như polysacarit khác loại, polysacarit cùng loại) và/hoặc các loài *Lactobacillus* sản xuất enzym fructosyl transferase.

Chế phẩm có thể chứa ít nhất 10×10^6 CFU của chủng thuộc loài *Lactobacillus*; và ít nhất 10×10^6 CFU của chủng thuộc loài *Streptococcus thermophilus*.

Tốt hơn là, chế phẩm có thể sử dụng ở dạng giống khởi động (starter culture), và ở dạng đông lạnh, dạng đông khô hoặc dạng lỏng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men/sản phẩm sữa, bao gồm bước lên men cơ chất sữa (như sữa bò) bằng vi khuẩn axit lactic, chủng, hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm bước lên men cơ chất sữa bằng chủng thuộc loài *Lactobacillus* như chủng *L. bulgaricus* hoặc *L. fermentum*, ví dụ, chủng được chọn từ nhóm bao gồm LB18, CHCC10019 (DSM19252), DSM22584, hoặc CHCC3984 (DSM19251), và các thể đột biến và các biến dị của chủng bất kỳ trong số các chủng này.

Cơ chất sữa có thể được lên men bằng chủng hoặc vi khuẩn bất kỳ trong số các chủng hoặc vi khuẩn nêu trên như chủng thuộc loài *Streptococcus thermophilus* trước khi, trong khi, hoặc sau khi lên men bằng chủng thuộc loài *Lactobacillus*.

Phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm bước bổ sung enzym vào cơ chất sữa trước khi, trong khi và/hoặc sau khi lên men, như enzym được chọn từ nhóm bao gồm: enzym có thể tạo liên kết ngang các protein, transglutaminaza, aspartic proteaza, chymosin và men dịch vị.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sản phẩm sữa, như sản phẩm sữa lên men (ví dụ sữa chua hoặc nước sữa) hoặc pho mát (ví dụ, pho mát tươi hoặc pasta filata), thu được bằng phương pháp theo sáng chế. Sản phẩm sữa lên men có thể là, ví dụ, sản phẩm dạng khuấy, hoặc sản phẩm dạng tập hợp.

Sản phẩm sữa có thể tùy ý bao gồm một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm: nước ép trái cây, si-rô, môi trường nuôi cấy vi khuẩn probiotic, chất tạo màu, chất làm đặc, chất điều hương, và chất bảo quản; và/hoặc tùy ý ở dạng sản phẩm dạng khuấy, sản phẩm dạng tập hợp, hoặc sản phẩm uống được.

Sáng chế cũng đề xuất sản phẩm sữa, được tạo ra bằng cách lên men cơ chất sữa (như sữa bò) bằng vi khuẩn axit lactic theo sáng chế (ví dụ, chủng thuộc loài *Streptococcus thermophilus* như DSM 22884) và vi khuẩn axit lactic thuộc loài được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus bulgaricus* và *Lactobacillus fermentum* (như CHCC10019 (DSM19252), CHCC3984 (DSM19251) và CHCC2008 (DSM22584)).

Sản phẩm sữa được quan tâm theo sáng chế có độ nhớt lớn hơn 100 Pa (ví dụ, lớn hơn 102 hoặc lớn hơn 104 Pa), khi đo được bằng ứng suất cắt, ví dụ, sau 12 giờ sinh trưởng ở 37°C. Theo phương án được ưu tiên, độ nhớt lớn hơn 100 Pa thu được bằng cách chỉ cho sinh trưởng các tế bào vi khuẩn, nhưng có

thể thu được giá trị độ nhớt cao hơn bằng cách bổ sung các hợp chất hóa học như gelatin, carrageenan, v.v.

Định nghĩa

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vi khuẩn axit lactic" dùng để chỉ vi khuẩn gram dương, vi yếm khí hoặc kỵ khí, lên men đường kết hợp sản xuất axit gồm axit lactic được tạo ra chủ yếu ở dạng axit, axit axetic và axit propionic. Đã phát hiện ra rằng vi khuẩn axit lactic hữu ích nhất trong công nghiệp thuộc Bộ "Lactobacillales" gồm *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. và *Propionibacterium* spp. Ngoài ra, vi khuẩn sản xuất axit lactic thuộc nhóm vi khuẩn kỵ khí nghiêm ngặt, *Bifidobacterium*, tức là *Bifidobacterium* spp., thường chứa trong nhóm vi khuẩn axit lactic. Chúng thường xuyên được sử dụng ở dạng môi trường nuôi cấy thực phẩm riêng biệt hoặc kết hợp với vi khuẩn axit lactic khác. Vi khuẩn axit lactic, bao gồm vi khuẩn của các loài *Lactobacillus* sp. và *Streptococcus thermophilus*, thường được cung cấp cho ngành công nghiệp sữa ở dạng môi trường nuôi cấy đông lạnh hoặc đông khô để nhân giống men cái lớn hoặc ở dạng môi trường nuôi cấy được gọi là "Direct Vat Set" (DVS), được dự định để cấy truyền trực tiếp vào bình lên men hoặc thùng lên men để sản xuất sản phẩm sữa như sản phẩm sữa lên men. Các môi trường nuôi cấy này được gọi chung là "men cái" hoặc "giống khởi động".

Thuật ngữ "sữa" được hiểu là việc tiết sữa thu được bằng cách vắt sữa động vật có vú bất kỳ như bò, cừu, dê, trâu hoặc lạc đà. Theo một phương án được ưu tiên, sữa là sữa bò. Thuật ngữ sữa cũng bao gồm protein/dung dịch chất béo được làm từ nguyên liệu thực vật, ví dụ, sữa đậu tương.

Thuật ngữ "cơ chất sữa" có thể là nguyên liệu sữa thô hoặc đã chế biến bất kỳ có thể đưa vào quá trình lên men theo phương pháp theo sáng chế. Do đó, các cơ chất sữa có thể sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch/huyền phù của sữa hoặc các sản phẩm giống sữa bất kỳ bao gồm protein, như sữa hoàn nguyên hoặc sữa có chất béo thấp, sữa không béo, nước sữa, sữa bột hoàn nguyên, sữa đặc, sữa khô, nước sữa, váng sữa hòa tan, lactoza, nước

cái từ quá trình kết tinh lactoza, chất cô đặc nước sữa protein hoặc kem. Rõ ràng là, cơ chất sữa có thể có nguồn gốc từ động vật có vú bất kỳ, ví dụ, sữa động vật có vú về cơ bản nguyên chất, hoặc sữa bột hoàn nguyên.

Trước khi lên men, cơ chất sữa có thể được làm đồng nhất và được tiệt trùng bằng phương pháp Pasteur theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

“Làm đồng nhất” như được sử dụng trong bản mô tả này nghĩa là trộn mạnh để thu được huyền phù hoặc nhũ tương có thể hòa tan. Nếu quá trình làm đồng nhất được thực hiện trước khi lên men, nó có thể được thực hiện sao cho phá vỡ chất béo sữa thành các kích cỡ nhỏ hơn để nó không thể tách ra khỏi sữa. Việc làm đồng nhất có thể được thực hiện bằng cách ép sữa ở áp suất cao qua các vòi phun nhỏ.

“Tiệt trùng bằng phương pháp Pasteur” như được sử dụng trong bản mô tả này nghĩa là xử lý cơ chất sữa để làm giảm hoặc loại bỏ sự có mặt của các sinh vật sống như vi sinh vật. Tốt hơn là, tiệt trùng bằng phương pháp Pasteur đạt được bằng cách duy trì nhiệt độ cụ thể trong khoảng thời gian cụ thể. Nhiệt độ cụ thể thường đạt được bằng cách đun nóng. Nhiệt độ và khoảng thời gian có thể được chọn lọc để tiêu diệt hoặc làm bất hoạt một số vi khuẩn như vi khuẩn có hại. Bước làm nguội nhanh có thể được thực hiện sau đó.

“Quá trình lên men” trong các phương pháp theo sáng chế nghĩa là quá trình chuyển hóa hydrat cacbon thành rượu hoặc axit nhờ tác động của vi sinh vật. Tốt hơn là, quá trình lên men trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm quá trình chuyển hóa lactoza thành axit lactic.

Các quy trình lên men được sử dụng để sản xuất các sản phẩm sữa lên men là đã biết và người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách để chọn lọc các điều kiện quy trình thích hợp như nhiệt độ, oxy, số lượng và đặc điểm của vi sinh vật và thời gian quy trình. Rõ ràng là, các điều kiện lên men được chọn lọc sao cho hỗ trợ đạt được mục đích của sáng chế, tức là để thu được sản phẩm sữa ở dạng rắn hoặc dạng lỏng (sản phẩm sữa lên men).

Thuật ngữ “sản phẩm dạng khuấy” dùng để chỉ cụ thể sản phẩm sữa lên men vẫn duy trì xử lý cơ học sau khi lên men, dẫn đến phá vỡ cấu trúc và hóa

lông thể đông tụ tạo thành trong giai đoạn lên men. Xử lý cơ học là xử lý thông thường nhưng không phải chỉ thu được bằng cách khuấy, bơm, lọc hoặc làm đông nhất gel, hoặc bằng cách trộn nó với các thành phần khác. Các sản phẩm dạng khuấy thường có lượng sữa rắn không béo nằm trong khoảng từ 9 đến 15%.

Thuật ngữ “sản phẩm dạng tập hợp” bao gồm sản phẩm trên cơ sở sữa đã được cấy truyền bằng men cái, ví dụ, men cái, và được đóng gói tiếp sau bước cấy truyền và tiếp theo được lên men trong gói.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thể đột biến” cần phải hiểu là chủng có nguồn gốc, hoặc chủng có thể có nguồn gốc từ chủng theo sáng chế (hoặc chủng bố mẹ) thu được bằng các phương tiện, ví dụ, kỹ thuật di truyền, xử lý bằng phóng xạ và/hoặc bằng hóa học. Tốt hơn, nếu thể đột biến là thể đột biến tương đương về mặt chức năng, ví dụ, thể đột biến có các đặc tính (ví dụ, liên quan đến cấu trúc, ứng suất cắt, độ nhớt, độ cứng gel, lớp phủ khuôn, hương vị, sau axit hóa, tốc độ axit hóa, và/hoặc độ khỏe của thể thực khuẩn) là giống hoặc cải tiến so với chủng bố mẹ. Thể đột biến như vậy là một phần của sáng chế. Đặc biệt là, thuật ngữ “thể đột biến” dùng để chỉ chủng thu được bằng cách đưa chủng theo sáng chế vào xử lý đột biến được sử dụng thông thường bao gồm xử lý bằng hóa chất gây đột biến như etan metan sulphonat (EMS) hoặc N-metyl-N'-nitro-N-nitroguanidin (NTG), ánh sáng UV hoặc để thể đột biến xảy ra một cách tự phát. Thể đột biến có thể được đưa vào một số xử lý đột biến (một xử lý cần phải hiểu là một bước gây đột biến tiếp theo là bước sàng lọc/chọn lọc), nhưng ưu tiên là không lớn hơn 20, hoặc không lớn hơn 10, hoặc không lớn hơn 5, xử lý (hoặc bước sàng lọc/chọn lọc) được thực hiện. Trong thể đột biến được ưu tiên, ít hơn 5%, hoặc ít hơn 1% hoặc thậm chí ít hơn 0,1% nucleotit trong bộ gen vi khuẩn đã được dịch chuyển với nucleotit khác, hoặc được khuyết, so với chủng bố mẹ. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến dị” cần phải hiểu là chủng tương đương về mặt chức năng với chủng theo sáng chế, ví dụ, có các đặc tính, ví dụ, liên quan đến cấu trúc, ứng suất cắt, độ nhớt, độ cứng gel, lớp phủ khuôn, hương vị, sau axit hóa, tốc độ axit hóa, và/hoặc độ khỏe của thể thực khuẩn) về cơ bản là giống hoặc được cải thiện.

Các biến dị này, có thể là giống nhau bằng cách sử dụng các kỹ thuật sàng lọc thích hợp, là một phần của sáng chế.

Trong bản mô tả này, "cấu trúc" đo được bằng ứng suất cắt sau 12 giờ sinh trưởng ở 37°C. Một thử nghiệm được sử dụng để phân tích cấu trúc:

Vào ngày sau khi cấy truyền, sữa lên men được đưa đến nhiệt độ 13°C và khuấy nhẹ bằng que được lắp với đĩa khoan cho đến khi mẫu đồng nhất. Các đặc tính lưu biến của mẫu được đánh giá trên lưu biến kế (StressTech, Reologica Instruments, Thụy Điển) được trang bị hệ đo đồng trục C25. Thử nghiệm đo độ nhớt được thực hiện với tốc độ trượt thay đổi trong khoảng từ 0,27 đến 300 1/s trong 21 bước. Tốc độ trượt được tăng và tiếp theo được giảm và các đường cong đi lên và đi xuống của ứng suất cắt và độ nhớt biểu kiến được ghi lại. Thời gian trì hoãn và tích hợp lần lượt là 5 giây và 10 giây.

Việc sử dụng thuật ngữ "một" và các từ tương tự trong bản mô tả của sáng chế (đặc biệt là trong nội dung của phần yêu cầu bảo hộ dưới đây) được cấu trúc để nhằm bao hàm cả số ít lẫn số nhiều, trừ khi có quy định khác trong bản mô tả hoặc trái ngược một cách rõ ràng với nội dung bản mô tả. Các thuật ngữ "bao gồm", "có", "gồm" và "chứa" được cấu trúc ở dạng nghĩa mở (tức là, nghĩa "bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,") trừ khi có quy định khác. Việc nêu các khoảng giá trị trong bản mô tả này chỉ nhằm đáp ứng việc thể hiện nhanh khi đề cập đến mỗi giá trị riêng biệt nằm trong khoảng này, trừ khi có quy định khác trong bản mô tả, và mỗi giá trị riêng biệt được kết hợp vào bản mô tả như thể nó được nêu một cách riêng biệt trong bản mô tả này. Tất cả các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo trình tự thích hợp bất kỳ, trừ khi có quy định khác trong bản mô tả, hoặc trái ngược một cách rõ ràng với nội dung bản mô tả. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ được lấy làm ví dụ (ví dụ, "như") được nêu trong bản mô tả này, chỉ nhằm dự định giải thích rõ hơn sáng chế và không giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi có quy định khác. Ngôn ngữ sử dụng trong bản mô tả cần phải hiểu là dấu hiệu chỉ ra yếu tố bảo hộ như là yếu tố cần thiết để ứng dụng thực tế sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 Chuẩn bị thể đột biến dương tính galactosa của chủng *Streptococcus*

Phân lập chủng lên men galactosa

Các thể đột biến được phân lập ở dạng thể đột biến lên men galactosa của chủng *S. thermophilus* CHCC6008 (=ST6008, DSM18111). Các tế bào CHCC6008 không được gây đột biến bằng hóa chất gây đột biến cũng như bằng ánh sáng UV trước bước phân lập thể đột biến. Vì vậy, các chủng đã tách là tương tự như các thể đột biến dương tính galactosa tự phát của CHCC6008.

Trước khi phân lập thể đột biến, CHCC6008 được tạo vết trên các đĩa thạch M17 với 2% galactosa (các đĩa M17-gal). CHCC6008 đã không sinh trưởng trên nguồn hydrat cacbon duy nhất là galactosa.

Tiếp theo, môi trường sinh trưởng qua đêm chứa CHCC6008 được đặt trên đĩa M17-gal và một số khuẩn lạc có thể được phân lập sau hai ngày sinh trưởng ở 37°C. Một vài thể đột biến được lọc trên đĩa M17-gal và thử nghiệm lại trong canh thịt M17 chứa nguồn hydrat cacbon duy nhất là 2% galactosa.

Trong khi CHCC6008 không làm giảm độ pH trong canh thịt M17-gal một cách đáng kể, CHCC11379, một trong các thể đột biến đã được tinh chế, đạt đến độ pH bằng 5,3 sau 10 giờ ở 37°C, và vì vậy được xem là thể đột biến lên men galactosa từ CHCC6008.

Các chủng CHCC11342 và CHCC11976 cũng được phân lập theo cách như vậy.

Phân lập các thể đột biến bằng kỹ thuật di truyền

Các thể đột biến dương tính galactosa cũng có thể được tạo ra bằng đột biến gen hướng vị trí. Các oligonucleotit mang nucleotit đột biến trong hộp tăng cường galK -10 được sử dụng để khuếch đại mảnh ADN đặc hiệu bằng PCR. Mảnh PCR mang đột biến mong muốn được tách dòng vô tính vào vật truyền plasmit và biến nạp vào chủng đích *S. thermophilus*, và đột biến được hợp nhất vào nhiễm sắc thể và trao đổi vùng tăng cường galK kiểu đại bằng tái tổ hợp. Tiến hành phân lập các chủng như nêu trên.

Phân tích cấu trúc trong sữa lên men

Vào ngày sau khi cấy truyền, sữa lên men được đưa đến nhiệt độ 13°C và khuấy nhẹ bằng que được lắp với đĩa khoan cho đến khi mẫu đồng nhất. Các đặc tính lưu biến của mẫu được đánh giá trên lưu biến kế (StressTech, Reologica Instruments, Thụy Điển) được trang bị hệ đo đồng trục C25.

Thử nghiệm đo độ nhớt được thực hiện với tốc độ trượt thay đổi trong khoảng từ 0,27 đến 300 1/s trong 21 bước. Tốc độ trượt được tăng và tiếp theo được giảm và các đường cong đi lên và đi xuống của ứng suất cắt và độ nhớt biểu kiến được ghi lại.

Thời gian trì hoãn và tích hợp lần lượt là 5 giây và 10 giây. Để phân tích tiếp, chọn ứng suất cắt ở 300 s⁻¹. Kết quả lưu biến kế cho thấy rằng CHCC11379 có ứng suất cắt tăng 10% so với CHCC6008 (ứng suất cắt 74,0 Pa (Pascals) đối với CHCC11379 so với 67,5 Pa đối với chủng bố mẹ CHCC6008, xem Fig. 1).

Phân tích cấu trúc trong sữa

Trong thí nghiệm khác CHCC11379 được sử dụng như là một phần của môi trường nuôi cấy sữa chua trong đó các chủng từ *S. thermophilus* được nuôi cấy đồng thời trong sữa không kem ở 43°C cùng với chủng từ các loài *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Khi sự khác nhau trong quá trình sản xuất sữa chua chỉ là việc sử dụng CHCC11379 thay vì CHCC6008 kiểu đại, ứng suất cắt cũng tăng 10% (105,0 Pa cho môi trường nuôi cấy sữa chua chứa CHCC11379 so với 94,7 Pa cho môi trường nuôi cấy sữa chua chứa CHCC6008).

Sắp xếp trình tự vùng tăng cường *galK* từ CHCC11379

Để phát hiện dạng đột biến đối với thể đột biến dương tính gal CHCC11379, phần khởi đầu của gen *GalK* (ghi mã cho galactokinaza từ *S. thermophilus*) được sắp xếp trình tự.

Đối với CHCC11379, đột biến trong vùng tăng cường *galK* là giống nhau (xem dưới đây). Đột biến tương ứng rất có thể sẽ dẫn đến việc hoạt tính gen tăng cường mạnh hơn so với chủng bố mẹ 6008, giải thích genotyp dương tính gal quan sát được. Điều này dựa trên thực tế là trình tự liên ứng đối với

hộp tăng cường -10 là “TATAAT”, và đột biến ở nucleotit 3 của hộp -10 (vùng) đối với CHCC6008 (“TACGAT”) dẫn đến việc hộp -10 có tính tương tự về trình tự liên ứng cao hơn trong CHCC11379 (“TATGAT”).

```
CHCC11379  AAAATATTGATTTTCCATGTGAAAGGGGTTATGATTTTCAGTATAAACAAAAAGAATAAGTGAGATACATC SEQ
ID NO:5
CHCC6008   AAAATATTGATTTTCCATGTGAAAGGGGTTACGATTTTCAGTATAAACAAAAAGAATAAGTGAGATACATC SEQ
ID NO:6
AY704368   AAAATATTGATTTTCCATGTGAAAGGGGTTACGATTTTCAGTATAAACAAAAAGAATAAGTGAGATACATC SEQ
ID NO:7
Consensus  AAAATATTGATTTTCCATGTGAAAGGGGTTACGATTTTCAGTATAAACAAAAAGAATAAGTGAGATACATC SEQ
ID NO:8
```

-35

-10

RBS

Vùng tăng cường của gen *Galk* từ CHCC11379. Đột biến điểm trong gen tăng cường CHCC11379 *galk* được chỉ ra có mã màu xám. Trình tự *galk* đã công bố từ *S. thermophilus* ST111 (Số truy nhập Genbank AY704368) được chỉ ra để so sánh. -35: -35-vùng tăng cường; -10: -10-vùng tăng cường; RBS: vị trí gắn kết ribosom.

Các phương án được ưu tiên theo sáng chế được mô tả trong bản mô tả này là các phương thức tốt nhất đã biết đối với tác giả sáng chế để thực hiện sáng chế. Biến thể của các phương án được ưu tiên này có thể là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này khi đọc phần mô tả trên đây. Các tác giả sáng chế cho rằng người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này vận dụng những biến thể này khi thích hợp, và các tác giả sáng chế dự định ứng dụng thực tế sáng chế ngoài những điều được mô tả một cách rõ ràng trong bản mô tả này. Do đó, sáng chế bao hàm tất cả các cải biến và dạng tương đương của đối tượng được nêu trong yêu cầu bảo hộ kèm theo đây theo quy định của pháp luật. Ngoài ra, sự kết hợp bất kỳ của các yếu tố được mô tả trên đây trong tất cả các biến thể có thể xảy ra của chúng cũng nằm trong phạm vi của sáng chế, trừ khi có quy định khác trong bản mô tả hoặc mâu thuẫn một cách rõ ràng với phần nội dung.

Lưu giữ sinh học và giải pháp về mặt chuyên môn

Chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC11379 đã được lưu giữ tại DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,

Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) với số truy nhập là DSM22884, ngày 26/08/2009.

Mẫu của chủng *Streptococcus thermophilus* (ST) ST6008 (còn được gọi là CHCC6008) đã được lưu giữ tại DSMZ với số truy nhập là DSM 18111 được lưu giữ ngày 29/3/2006. CHCC11342 (DSM 22932) và CHCC11976 (DSM 22934) được lưu giữ ngày 8/9/2009 tại DSMZ.

Các chủng khác nữa được lưu giữ tại DSMZ:

CHCC10019 (DSM19252), CHCC3984 (DSM19251): ngày lưu giữ 3/4/2007, CHCC2008 (DSM22584): ngày lưu giữ 19/5/2009,

Việc lưu giữ được thực hiện theo các điều khoản trong Hiệp ước Budapest về Nhận dạng lưu giữ vi sinh vật quốc tế cho mục đích xử lý sáng chế (the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure).

Người nộp đơn yêu cầu lưu giữ các mẫu vi sinh vật chỉ được tạo ra bởi người có hiểu biết đã được Người nộp đơn chấp thuận.

Tài liệu viện dẫn

Appl. Environ. Microbiol. 71, 7, p. 3659-67 (2005)

International Journal of Food Microbiology 113 (2007) 195-200

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Feb. 2002, p. 784-790

J Dairy Sci 92: 477-482 (2009)

WO2008/040734A1, WO2007/025097A2, US7241610B2, WO2007/144770A2,

WO2004/085607A, WO2008/148561A

Tất cả các tài liệu trích dẫn trong đơn patent này được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất vi khuẩn axit lactic tạo ra cấu trúc cải thiện cho các sản phẩm sữa lên men, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:
 - a) tạo ra chủng vi khuẩn axit lactic làm chủng bố mẹ;
 - b) đưa đột biến vào trình tự khởi đầu của gen GalK của chủng này, trong đó đột biến này được đưa vào bằng cách gây đột biến đặc hiệu vị trí, trong đó đột biến này dẫn đến việc vùng -10 của gen GalK có trình tự nucleotit TATTAT nêu trong SEQ ID NO:2, hoặc TATTAT nêu trong SEQ ID NO:3, hoặc TACTAT nêu trong SEQ ID NO:4, và
 - c) sàng lọc chủng đột biến tạo ra nhiều cấu trúc hơn so với chủng bố mẹ.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn thuộc loài *Streptococcus thermophilus*.
3. Vi khuẩn axit lactic mang đột biến ở vùng -10 của gen GalK, trong đó đột biến này dẫn đến việc vùng -10 có trình tự nucleotit TATTAT nêu trong SEQ ID NO:3 hoặc TACTAT nêu trong SEQ ID NO:4.
4. Vi khuẩn axit lactic theo điểm 3, trong đó vi khuẩn này thuộc loài *Streptococcus thermophilus*.
5. Vi khuẩn axit lactic thuộc chủng được chọn từ nhóm bao gồm: CHCC11379 được lưu giữ tại Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật của Đức (the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) với số hiệu lưu giữ DSM 22884, CHCC11342 được lưu giữ tại Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật của Đức với số hiệu lưu giữ DSM 22932, và CHCC11976 được lưu giữ tại Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật của Đức với số hiệu lưu giữ DSM 22934.
6. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 ← đến 5.
7. Chế phẩm chứa, dưới dạng hỗn hợp hoặc dưới dạng kit nhiều thành phần,
 - chủng vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 5; và
 - chủng thuộc loài *Lactobacillus*.
8. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó chủng này thuộc loài *Lactobacillus* sản xuất enzym polysacarit và/hoặc fructosyl transferaza.

9. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó polysacarit được chọn từ nhóm bao gồm heteropolysacarit và homopolysacarit.
10. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 9, trong đó chế phẩm này chứa ít nhất 10^{10} đơn vị tạo thành tế bào của chủng thuộc loài *Lactobacillus*; và ít nhất 10^{10} đơn vị tạo thành tế bào của chủng thuộc loài *Streptococcus thermophilus*.
11. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men/sản phẩm sữa, trong đó phương pháp này bao gồm bước lên men cơ chất sữa bằng vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 5 hoặc chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó cơ chất sữa được lên men bằng vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 5 trước khi, trong khi, hoặc sau khi lên men bằng chủng thuộc loài *Lactobacillus*.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó loài *Lactobacillus* là chủng thuộc loài *L. bulgaricus* hoặc *L. fermentum*, tốt hơn là chủng được chọn từ nhóm bao gồm LB18, CHCC10019 (DSM19252), CHCC2008 (DSM22584), and CHCC3984 (DSM19251).
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó chủng này được chọn từ nhóm bao gồm LB18, CHCC10019 được lưu giữ tại Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật của Đức với số hiệu lưu giữ DSM19252, CHCC2008 được lưu giữ tại Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật của Đức với số hiệu lưu giữ DSM22584 và CHCC3984 được lưu giữ tại Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật của Đức với số hiệu lưu giữ DSM19251.
15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 14, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung enzym vào cơ chất sữa trước khi, trong khi và/hoặc sau khi lên men.
16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó enzym được chọn từ nhóm bao gồm: enzym có thể tạo liên kết ngang các protein, transglutaminaza, aspartic proteaza, chymosin và men dịch vị.
17. Sản phẩm sữa thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 16.

18. Sản phẩm sữa theo điểm 17, trong đó sản phẩm sữa là sản phẩm sữa lên men hoặc phomat.
19. Sản phẩm sữa theo điểm 18, trong đó sản phẩm sữa lên men được chọn từ nhóm bao gồm sữa chua hoặc nước sữa.
20. Sản phẩm sữa theo điểm 18, trong đó phomat được chọn từ nhóm bao gồm phomat tươi và pasta filata.
21. Sản phẩm sữa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 20, trong đó sản phẩm này còn chứa một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm: nước ép trái cây cô đặc, si-rô, môi trường nuôi cấy vi khuẩn probiotic, chất tạo màu, chất làm đặc, chất điều hương và chất bảo quản; và/hoặc ở dạng sản phẩm dạng khuấy, sản phẩm dạng tập hợp hoặc sản phẩm uống được.
22. Sản phẩm sữa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 20, trong đó sản phẩm này có độ nhớt lớn hơn 100 Pa, đo được bằng ứng suất cắt.
23. Sản phẩm sữa theo điểm 21, trong đó sản phẩm này có độ nhớt lớn hơn 100 Pa, đo được bằng ứng suất cắt.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Chr. Hansen A/S

<120> VI KHUẨN AXIT LACTIC VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VI KHUẨN
AXIT LACTIC NÀY

<130> P3652PC00

<150> DK 2009 00984

<151> 2009-09-01

<160> 8

<170> Phiên bản PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> ADN

<213> Streptococcus thermophilus

<400> 1

tacgat

6

<210> 2

<211> 6

<212> ADN

<213> Streptococcus thermophilus

<400> 2

tatgat

6

<210> 3

<211> 6

<212> ADN

<213> Streptococcus thermophilus

<400> 3

tattat

6

<210> 4

<211> 6

<212> ADN

<213> Streptococcus thermophilus

<400> 4

tactat

6

<210> 5

<211> 70

<212> ADN

<213> Streptococcus thermophilus

<400> 5

aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt atgatttcag tataaacaaa aagaataagt

60

gagatacatc

70

<210> 6

<211> 70

<212> ADN

<213> Streptococcus thermophilus

<400> 6

aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt acgatttcag tataaacaaa aagaataagt

60

gagatacatc 70

<210> 7
<211> 70
<212> ADN
<213> Streptococcus thermophilus

<400> 7
aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt acgatttcag tataaacaaa agaataagt 60

gagatacatc 70

<210> 8
<211> 70
<212> ADN
<213> Streptococcus thermophilus

<400> 8
aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt acgatttcag tataaacaaa agaataagt 60

gagatacatc 70

1/1

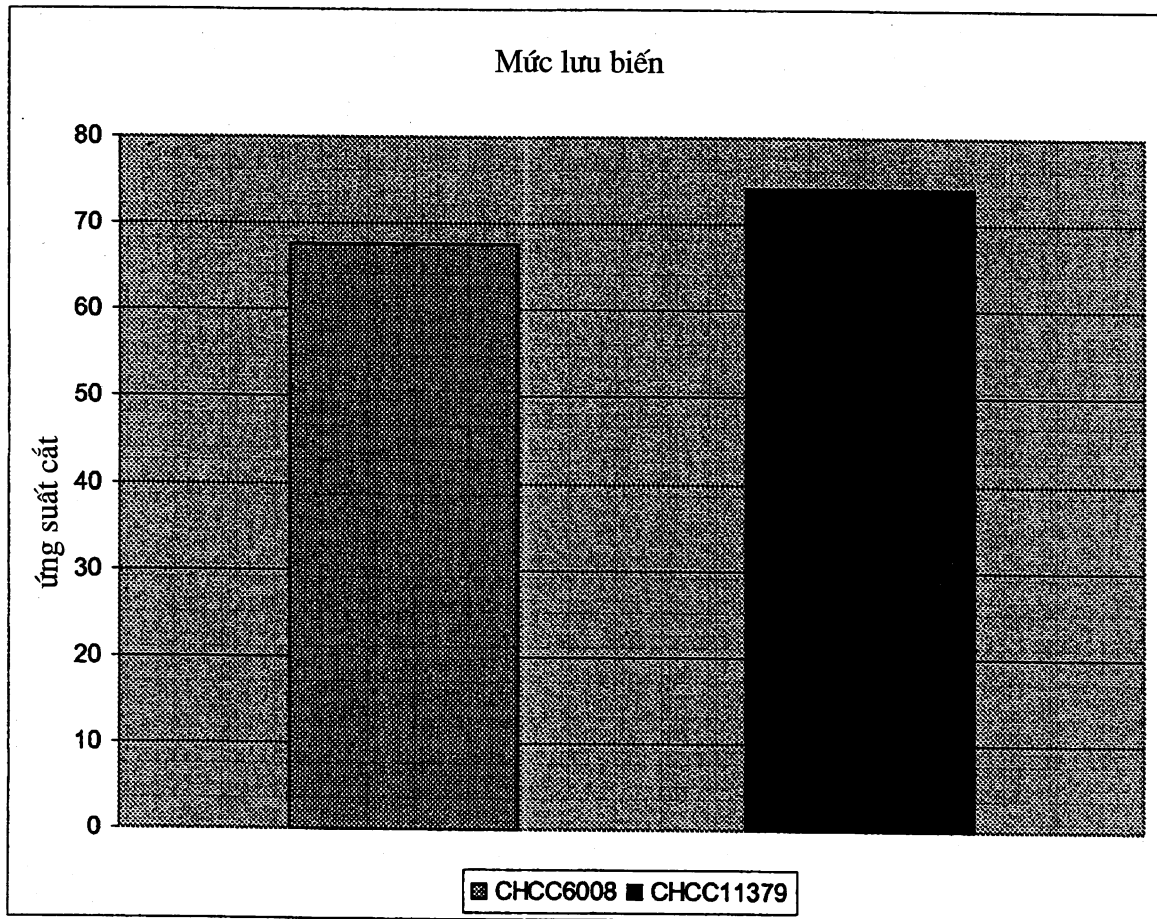


Fig. 1