



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

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

(11) 
1-0022485

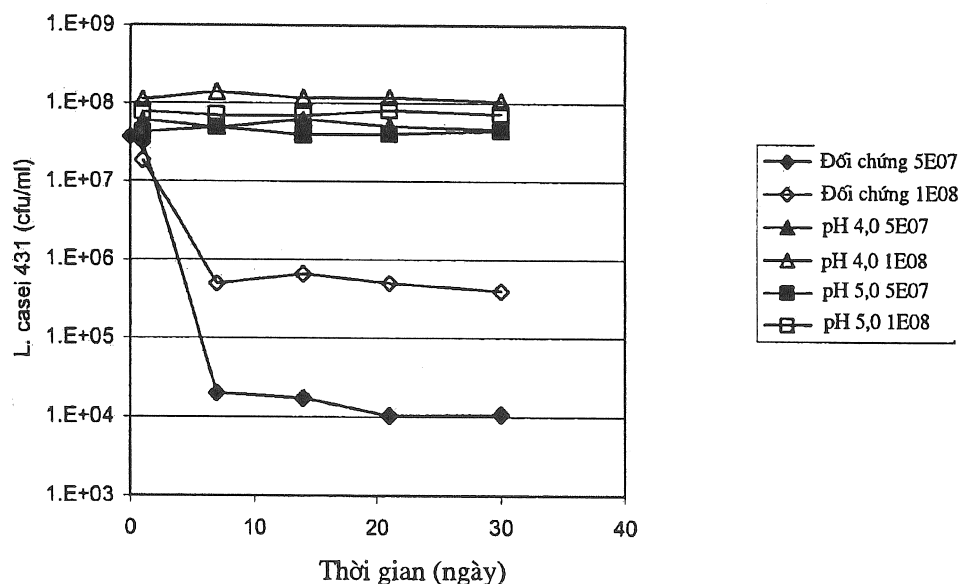
(51)⁷ A23L 33/135, 2/02, 2/52

(13) B

-
- | | | | | | |
|------|---|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2013-02245 | (22) | 23.01.2012 | | |
| (86) | PCT/EP2012/050930 | 23.01.2012 | (87) | WO2012/098254 | 26.07.2012 |
| (30) | 11151624.1 | 21.01.2011 | EP | | |
| | 11158249.0 | 15.03.2011 | EP | | |
| (45) | 25.12.2019 | 381 | (43) | 25.10.2013 | 307 |
| (73) | CHR. HANSEN A/S (DK)
Boege Alle 10-12, DK-2970 Hoersholm, Denmark | | | | |
| (72) | HORNBAEK, Tina (DK), GOTTLIEB, Caroline, Trebbien (DK), THORSEN, Tina, Malling (DK), SOMMER, Peter (DK) | | | | |
| (74) | Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES) | | | | |
-

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT NƯỚC QUẢ CHỨA LỢI KHUẨN VÀ NƯỚC QUẢ CHỨA LỢI KHUẨN THU ĐƯỢC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất nước quả chứa lợi khuẩn chứa số lượng lớn các lợi khuẩn sống đã được làm thích nghi với môi trường axit, như chủng *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, và nước quả chứa lợi khuẩn thu được bằng phương pháp này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp chế biến nước quả chứa nhiều lợi khuẩn sống. Sáng chế còn đề cập đến nước quả chứa lợi khuẩn thu được bằng phương pháp này và lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit dùng để chế biến nước quả chứa lợi khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Một số vi khuẩn được biết là có các đặc tính có lợi, nghĩa là chúng có tác động tích cực đối với sức khỏe vật chủ khi được đưa vào cơ thể với lượng thỏa đáng dưới dạng còn sống. Cụ thể, rất nhiều nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả lâm sàng của chủng vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* trong việc phòng ngừa nhiều bệnh và cải thiện một số chức năng sinh lý. Các lợi khuẩn này thường an toàn và đặc biệt là có khả năng thúc đẩy sự hoạt động hợp lý của vi khuẩn đường ruột. Để một vi khuẩn đáp ứng định nghĩa về lợi khuẩn, ngoài bằng chứng rõ ràng rằng nó có tác dụng tích cực đến sức khỏe của người tiêu dùng, nó cần phải có khả năng sống sót và tồn tại ở ruột và sống sót trong những điều kiện khắc nghiệt của quy trình sản xuất và bảo quản thực phẩm. Bằng chứng lâm sàng chỉ ra rằng liều dùng hằng ngày của lợi khuẩn cần phải ít nhất là 10^9 CFU mới đảm bảo hiệu quả có lợi.

Thị trường các sản phẩm lợi khuẩn liên tục phát triển. Lợi khuẩn đã được bổ sung đặc biệt vào các sản phẩm từ sữa trong đó vi khuẩn axit lactic được làm thích nghi tương đối tốt với môi trường. Ngày nay, nước cam ép cũng như các loại nước quả ép và đồ uống khác chứa quả nghiền và nước quả ép đã được xác định là các chất dẫn quan trọng cho quần thể lợi khuẩn và có các đặc tính có lợi của cả nước quả và lợi khuẩn. Ngoài ra, nước quả, không chứa các hợp phần sữa, là phương tiện tuyệt vời để sử dụng các lợi khuẩn không gây dị ứng như *L. casei* 431® (Chr. Hansen, Hoersholm, Denmark).

Tuy nhiên, môi trường axit yếu của nước quả ép gây ra sự giảm mạnh số lượng tế bào ban đầu khi một lượng lớn lợi khuẩn nói trên được thêm vào nước cam ép chẳng hạn. Để sử dụng thành công các lợi khuẩn trong nước quả, cần phải đảm bảo mật độ tế bào lợi khuẩn thích hợp trong suốt thời gian sử dụng. Do vậy, việc gia tăng khả năng sống sót của lợi khuẩn trong nước cam ép và các nước quả khác được cho là rất quan trọng.

Các phương pháp sản xuất nước quả chứa lượng hữu hiệu *Lactobacilli* sống là đã biết trong lĩnh vực, như trong patent Châu Âu số EP 0113055, đề cập đến phương pháp bao gồm bước cho nước quả ép tiếp xúc với tác nhân rắn để loại bỏ hợp phần kim vi khuẩn và sau đó làm cho *lactobacillus* tăng sinh trong nước quả ép ở độ pH = 4,0 hoặc thấp hơn.

Tuy nhiên, có thể nhận thấy rằng sự phát triển và/hoặc hoạt tính của vi khuẩn trong nước quả như vậy sẽ sinh ra khí và các mùi vị lạ khiến cho chúng không thích hợp để tiêu thụ.

Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2010/0086646 đề cập đến nước ép nguyên chất từ thực vật và/hoặc thực phẩm từ sữa chứa lợi khuẩn sống và monoaxit yếu đã được proton hóa dùng cho ăn kiêng có độ pH nằm giữa 3 và 4, monoaxit này ngăn không cho lợi khuẩn sản sinh ra vị tồi và/hoặc khí trong sản phẩm.

Công bố đơn quốc tế số WO 2010/132017 đề cập đến nước quả ép chứa lợi khuẩn chứa ít nhất một chủng lợi khuẩn và ít nhất một thành phần làm giảm sự tạo khí được chọn từ sơ ri, lựu, nam việt quất, aronia, quả lý chua, quả mai hoặc quả cây com cháy.

Việc bổ sung các monoaxit có thể ảnh hưởng đến các đặc tính cảm quan của thực phẩm và cũng ảnh hưởng tiêu cực đến tỷ lệ sống sót của lợi khuẩn. Việc bổ sung các chất làm giảm sự tạo axit đường như cũng ảnh hưởng bất lợi đến tỷ lệ sống sót của lợi khuẩn. Việc bổ sung các chất để loại bỏ các hợp chất kim vi khuẩn và/hoặc để làm giảm vị khó chịu và/hoặc khí trong sản phẩm thực phẩm có thể là rất tốn kém.

Do vậy, trong lĩnh vực này vẫn cần có các phương pháp thay thế để sản xuất nước quả chứa lợi khuẩn có nồng độ lợi khuẩn cao, trong đó nước quả chứa lợi khuẩn này có vị ngon mà không có mùi vị lạ, không tạo khí, và có thời hạn sử dụng lâu dài. Đặc biệt, cần có các phương pháp không có bước bổ sung các tác nhân rắn, monoaxit hoặc các hợp chất khác có thể ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan của nước quả.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất nước quả chứa lợi khuẩn đã được làm thích nghi trong môi trường axit trước khi cấy vào nước quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là thu được nước quả chứa lợi khuẩn chứa lợi khuẩn khỏe mạnh có khả năng sống sót trong môi trường axit của nước quả. Một mục đích khác của sáng chế là thu được nước quả chứa lợi khuẩn có vị ngon. Một mục đích khác nữa của sáng chế là thu được nước quả chứa lợi khuẩn có thời hạn sử dụng lâu dài.

Để thu được lợi khuẩn với trị số CFU/ml cao trong nước quả mà không cần bổ sung lượng dư lợi khuẩn, các tác giả sáng chế đã tiến hành cải thiện tính chịu axit của lợi khuẩn, bằng cách đó khiến cho lợi khuẩn này chịu được độ pH thấp.

Sáng chế dựa trên phát hiện ra rằng lợi khuẩn có thể được làm thích nghi với môi trường axit bằng cách nhân giống mà không cần phải làm ổn định độ pH trong một khoảng thời gian nhất định và không gây ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất thu được trong quá trình lên men.

Lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit là thành phần cực kỳ hữu hiệu để bổ sung vào nước quả có độ pH thấp (dưới 4,2). Nó kết hợp được tất cả các tính năng có lợi của lợi khuẩn với giá trị dinh dưỡng cao của nước quả.

Phương pháp theo sáng chế không bao gồm bước bổ sung vào nước quả các hợp chất hóa học có thể ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan của nước quả chứa lợi khuẩn.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất nước quả chứa lợi khuẩn, bao gồm các bước:

- (a) làm cho ít nhất một chủng lợi khuẩn thích nghi với môi trường axit trong suốt quá trình nhân giống;
- (b) cấy ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit ở bước (a) vào nước quả; và
- (c) tùy ý đóng gói nước quả chứa lợi khuẩn.

Theo một phương án của sáng chế, việc làm cho lợi khuẩn thích nghi với môi trường axit ở bước (a) được thực hiện bằng cách:

- (i) nhân giống ít nhất một chủng lợi khuẩn mà không cần làm ổn định độ pH ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 43°C, và tốt hơn là từ 25°C đến 40°C, trong môi trường thích hợp có độ pH ban đầu nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0, môi trường này có thành phần cho phép môi trường đạt đến độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0;
- (ii) thu nhận ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit;
- (iii) tùy ý cô đặc ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit;

và

- (iv) tùy ý làm lạnh đông hoặc làm đông khô ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit.

Theo một phương án được ưu tiên, môi trường ở bước (i) có thành phần cho phép môi trường này đạt đến độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0 sau ít nhất 8 giờ nhân giống.

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa, chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit được cô ở bước (iii), nghĩa là sau khi thu nhận vi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất nước quả chứa lợi khuẩn có thể thu được từ phương pháp theo khía cạnh thứ nhất. Sáng chế cũng đề xuất nước quả chứa lợi khuẩn bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL431 (*L. casei* 431®).

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp thu nhận giống cây chứa chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit, bao gồm các bước:

- (a) nhân giống chủng lợi khuẩn mà không ổn định độ pH ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 43°C, và tốt hơn là từ 25°C đến 40°C, trong môi trường thích hợp có độ pH ban đầu nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0, môi trường này có thành phần cho phép môi trường đạt đến độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0;
- (b) thu nhận chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit;
- (c) tùy ý cô đặc chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit; và
- (d) tùy ý làm lạnh đông hoặc làm đông khô chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit.

Theo một phương án được ưu tiên, môi trường ở bước (a) có thành phần cho phép môi trường này đạt đến độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0 sau ít nhất 8 giờ nhân giống.

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit được cô ở bước (c), nghĩa là sau khi thu nhận lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất giống cây chứa chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit có thể thu được theo phương pháp theo khía cạnh thứ ba của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất giống cây chứa chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit theo khía cạnh thứ tư của sáng chế dùng để sản xuất nước quả chứa lợi khuẩn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện quá trình axit hóa môi trường MRS (Difco) bởi *L. casei* 431®. Tế bào đã được làm thích nghi với môi trường axit được thu nhận ở độ pH 5,0, pH 4,5, và pH 4,0 bằng cách ly tâm.

Hình 2 thể hiện số lượng tế bào *L. casei* 431® trong quá trình sản xuất ở quy mô lớn.

Hình 3 thể hiện số lượng tế bào *L. casei* 431® khi được bổ sung vào nước ép dâu tây/chuối của tế bào chưa được làm thích nghi (hình thoi), tế bào đã được làm thích nghi với môi trường có độ pH 4,0 (hình tam giác) hoặc độ pH 5,0 (hình vuông) trong quá trình sản xuất và sau đó được bổ sung với nồng độ thấp (5×10^7 CFU/ml, biểu tượng đặc) hoặc cao (1×10^8 CFU/ml, biểu tượng rỗng).

Hình 4 thể hiện số lượng tế bào *L. casei* 431® khi được bổ sung vào nước quả nhiệt đới ép của tế bào chưa được làm thích nghi (hình thoi), tế bào đã được làm thích nghi với môi trường có độ pH 4,0 (hình tam giác) hoặc độ pH 5,0 (hình vuông) trong quá trình sản xuất và sau đó được bổ sung với nồng độ thấp (5×10^7 CFU/ml, biểu tượng đặc) hoặc nồng độ cao (1×10^8 CFU/ml, biểu tượng rỗng).

Hình 5 thể hiện số lượng tế bào *L. casei* 431® khi được bổ sung vào nước quả ép màu đỏ của tế bào chưa được làm thích nghi (hình thoi), theo cách khác tế bào đã được làm thích nghi với môi trường có độ pH 4,0 (hình tam giác) hoặc độ pH 5,0 (hình vuông) trong quá trình sản xuất và sau đó được bổ sung với nồng độ thấp (5×10^7 CFU/ml, biểu tượng đặc) hoặc cao (1×10^8 CFU/ml, biểu tượng rỗng).

Hình 6 thể hiện số lượng tế bào *L. casei* 431® khi được bổ sung vào nước cam ép 100% của tế bào chưa được làm thích nghi (mẫu đối chứng), đã được làm thích nghi với môi trường có độ pH 4,0, 4,5 hoặc 5,0 trong quá trình sản xuất và sau đó được bổ sung với nồng độ $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

Hình 7 thể hiện số lượng tế bào *L. casei* 431® chưa được làm thích nghi (mẫu đối chứng) và đã được làm thích nghi với môi trường có độ pH 4,0, 4,5 hoặc 5,0 trong quá trình sản xuất và sau đó được bảo quản ở dạng viên kết lạnh đông ở -50°C , và được thường xuyên kiểm tra khả năng sống sót trong dịch nuôi cấy đã được làm tan giá bằng cách rót đĩa.

Hình 8 thể hiện số lượng tế bào *L. casei* 431® chưa được làm thích nghi (mẫu đối chứng) hoặc đã được làm thích nghi với môi trường có độ pH 4,0 trong quá trình sản xuất, được bảo quản ở dạng viên kết lạnh đông ở -50°C trong 6 tháng và sau đó được bổ sung vào nước cam ép được bảo quản ở 8°C trong khoảng thời gian được chỉ ra trên trục x.

Hình 9 thể hiện số lượng tế bào *L. casei* 431® khi được bổ sung vào nước cam ép của tế bào chưa được làm thích nghi (hình vuông), tế bào đã được làm thích nghi với môi trường có độ pH 4,0 (hình tam giác) trong quá trình sản xuất và sau đó được bảo quản ở 8°C.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "nước quả ép" dùng để chỉ chất lỏng tự nhiên chứa trong quả thu được bằng cách ép cơ học hoặc giã quả tươi mà không cần đến nhiệt và các dung môi. "Nước quả ép" có thể bao gồm nước ép từ một loại quả hoặc hỗn hợp gồm nhiều hơn một loại quả.

Thuật ngữ "đồ uống chứa nước quả" trong sáng chế dùng để chỉ đồ uống có hàm lượng nước quả ép nằm trong khoảng từ 0 đến 29%.

Thuật ngữ "nước quả có chứa thịt quả" (nectar) trong bản mô tả này dùng để chỉ đồ uống có hàm lượng nước quả ép nằm trong khoảng từ 30 đến 99%.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "quả nghiền" (puree) dùng để chỉ quả được chế biến bằng cách nghiền, ép và/hoặc lọc thành chất lỏng đặc hoặc dịch đặc mịn đồng nhất mà không cần đến nhiệt và các dung môi. "Quả nghiền" được làm 100% từ quả chứ không phải chỉ được làm từ nước quả ép.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "nước quả" dùng để chỉ đồ uống chứa nước quả ép, dịch cô đặc từ quả và/hoặc quả nghiền. Thuật ngữ "nước quả" bao hàm "nước quả ép", "đồ uống chứa nước quả" và "nước quả có chứa thịt quả" như được xác định trong bản mô tả. "Nước quả" có thể là nước quả chứa thịt quả, hoặc nước quả mà thịt quả được loại ra bằng cách ly tâm chẳng hạn. Nước quả có thể còn chứa yến mạch, đậu tương, hạnh nhân, nước sữa và/hoặc sữa chưa lên men, ví dụ như ở dạng sữa bột chẳng hạn. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, nước quả theo sáng chế không chứa hợp phần từ sữa, như sữa.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "được làm thích nghi với môi trường axit" (vi khuẩn) dùng để chỉ vi khuẩn sống được tạo ra chịu được độ pH thấp bằng cách cho tiếp xúc từ từ để giảm dần trị số pH trong suốt quá trình nuôi cấy. Do đó, quy trình làm cho chủng lợi khuẩn thích nghi với môi trường axit thường bao gồm nuôi cấy các chủng này trong điều kiện độ pH giảm dần, ví dụ như cho đến khi đạt được độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0. Tốt hơn là, bản thân lợi khuẩn được làm thích nghi với môi trường axit tạo ra axit trong quá trình nhân giống, các axit này tích tụ trong môi trường. Tốt hơn nữa là, lợi khuẩn sinh axit thuộc nhóm vi khuẩn sản sinh axit lactic. Theo cách khác, trong đó lợi khuẩn được làm thích nghi với

môi trường axit không tự sản sinh axit, việc làm giảm độ pH cũng có thể đạt được bằng cách bổ sung một axit từ bên ngoài.

Tốt hơn là, quy trình làm thích nghi với môi trường axit được thực hiện bằng cách nhân giống lợi khuẩn trong môi trường mà không cần làm ổn định độ pH. Cụm từ "không cần làm ổn định độ pH" có nghĩa là không cần thực hiện các biện pháp để chống lại sự giảm dần độ pH. Ví dụ, theo một phương án, môi trường được cấy với lợi khuẩn thường không chứa các chất đệm có thể giữ cho độ pH ổn định bằng cách tạo ra hoặc bổ sung axit. Theo cách khác, trong đó môi trường ban đầu chứa các chất đệm ở nồng độ nhất định, việc nuôi cấy có thể tiếp tục cho đến khi hết khả năng đệm, và không có các chất đệm khác được bổ sung trong suốt quá trình nuôi cấy. Cụ thể là, không bổ sung các hợp chất bazơ trong quá trình nuôi cấy để trung hòa độ pH giảm.

Thuật ngữ "mùi vị lạ" có nghĩa là vị khác thường của sản phẩm thực phẩm. Mùi vị lạ gây khó chịu cho người tiêu thụ và vì vậy không cần đến. Cái gọi là mùi "tích cực" cũng có thể được phát hiện trong sản phẩm, ví dụ như mùi của các loại quả. Do các vị này không gây khó chịu cho người tiêu thụ, chúng không được bao hàm trong thuật ngữ "mùi vị lạ" theo sáng chế.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "đóng gói" nước quả chứa lợi khuẩn đề cập đến công đoạn đóng gói cuối cùng của nước quả chứa lợi khuẩn để thu được sản phẩm có thể được tiêu thụ bởi một người hoặc một nhóm người chẳng hạn. Vì vậy, bao bì thích hợp có thể là chai hoặc hộp bìa cứng hoặc các bao bì tương tự, và lượng thích hợp có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ 10ml đến 5000ml, nhưng tốt hơn là có mặt trong bao bì với lượng nằm trong khoảng từ 50ml đến 1000ml như từ 200ml đến 1000ml.

Thuật ngữ "lợi khuẩn" dùng để chỉ vi khuẩn sống được dùng với lượng thích hợp cho người tiêu thụ với mục đích đạt được tác dụng tăng cường sức khỏe cho người tiêu thụ. Lợi khuẩn có thể được dùng ở dạng liều riêng biệt, ví dụ như ở dạng viên nang, hỗn dịch, và các dạng tương tự. Theo cách khác, lợi khuẩn được dùng ở dạng thực phẩm hoặc thực phẩm bổ sung. Lợi khuẩn có khả năng sống sót trong các điều kiện của hệ tiêu hoá sau khi ăn vào và sống trong ruột của người tiêu thụ. Các loại vi khuẩn khác nhau đã được sử dụng trước đây làm lợi khuẩn, bao gồm vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus*, như *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* và *Lactobacillus johnsonii*, giống *Bifidobacterium*, như *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, và các vi

khuẩn tương tự. Chủng lợi khuẩn từ các giống khác cũng được mô tả như *Escherichia* và *Bacillus*.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể đột biến" cần phải hiểu là chủng thu được từ, hoặc chủng có thể có nguồn gốc từ chủng theo sáng chế (hoặc chủng gốc) bằng cách biện pháp ví dụ như kỹ thuật di truyền, xử lý phóng xạ và/hoặc hóa chất. Thể đột biến cũng có thể là thể đột biến xảy ra một cách tự phát. Tốt hơn là, thể đột biến là thể đột biến tương đương về mặt chức năng, ví dụ như thể đột biến về cơ bản có cùng các đặc tính hoặc có các đặc tính được cải thiện (ví dụ, các đặc tính liên quan đến hương vị, sự axit hóa sau đó, tốc độ axit hóa, và/hoặc khả năng thích nghi với môi trường axit) so với chủng gốc. Thể đột biến như vậy là một phần của sáng chế. Đặc biệt, thuật ngữ "thể đột biến" dùng để chỉ chủng thu được bằng cách xử lý đột biến chủng theo sáng chế theo các phương pháp đột biến bất kỳ thường được sử dụng bao gồm xử lý bằng các hóa chất gây đột biến như etan metan sulphonat (EMS) hoặc N-metyl-N'-nitro-N-nitroguanidin (NTG), tia cực tím (UV), hoặc dùng để chỉ thể đột biến xảy ra một cách tự phát. Thể đột biến có thể trải qua một số bước xử lý sinh đột biến (một bước xử lý duy nhất cần phải được hiểu là một bước sinh đột biến được theo sau bởi một bước sàng lọc/chọn lọc), nhưng tốt hơn là không nhiều hơn 20, hoặc không nhiều hơn 10, hoặc không nhiều hơn 5, bước xử lý (hoặc bước sàng lọc/chọn lọc) được thực hiện. Trong một thể đột biến được ưu tiên theo sáng chế, ít hơn 5%, hoặc ít hơn 1% hoặc thậm chí ít hơn 0,1% nucleotit trong bộ gen vi khuẩn được thay bằng một nucleotit khác, hoặc bị xóa bỏ, so với chủng gốc.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "biến thể" cần phải được hiểu là chủng tương đương về mặt chức năng với chủng theo sáng chế, ví dụ như có các đặc tính về cơ bản giống, hoặc được cải thiện, ví dụ như các đặc tính liên quan đến hương vị, sự axit hóa sau đó, tốc độ axit hóa, và/hoặc khả năng thích nghi với môi trường axit). Các biến thể như vậy, có thể được nhận biết bằng cách sử dụng các kỹ thuật sàng lọc thích hợp, là một phần của sáng chế.

Việc sử dụng thuật ngữ "một" và các thuật ngữ tương tự trong bản mô tả sáng chế (đặc biệt là trong nội dung của phần yêu cầu bảo hộ kèm theo) được hiểu là bao hàm cả dạng số ít và số nhiều, trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả hoặc mâu thuẫn rõ ràng với ngữ cảnh. Thuật ngữ "bao gồm", "có", "bao gồm cả" và "chứa" được hiểu là thuật ngữ giới hạn mở (tức là, có nghĩa "bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,") trừ khi có chỉ dẫn khác.

Việc nêu ra các khoảng trị số trong bản mô tả chỉ để dùng như một phương pháp viết tắt đề cập riêng rẽ cho từng trị số riêng biệt thuộc khoảng này, trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả, và mỗi trị số riêng biệt được kết hợp vào bản mô tả

như thế nó được nêu riêng rẽ trong đó. Tất cả các phương pháp nêu trong bản mô tả có thể được thực hiện theo thứ tự thích hợp trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả hoặc theo cách khác mẫu thuẫn rõ ràng với ngữ cảnh. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và toàn bộ phần ví dụ, hoặc ngôn ngữ dùng làm ví dụ (ví dụ, "như") được nêu trong bản mô tả, chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế rõ hơn và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi có tuyên bố khác. Không có từ ngữ nào trong bản mô tả cần phải hiểu là chỉ ra yếu tố bất kỳ không được bảo hộ là cần thiết để thực hiện sáng chế.

Các phương án thực hiện và các khía cạnh của sáng chế

Chủng lợi khuẩn, như các chủng thuộc giống *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*, có thể được sử dụng trong đồ uống. Tuy nhiên, chúng rất nhạy cảm với môi trường axit và số lượng tế bào sống sót giảm nhanh khi được cấy vào môi trường có độ pH 4,2 hoặc thấp hơn.

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng việc làm cho chủng lợi khuẩn thích nghi với môi trường axit làm gia tăng đáng kể khả năng sống sót của nó trong nước quả, mà thường có độ pH thấp nằm trong khoảng từ 3-4 do axit từ quả. Trong nước quả, khả năng sống sót của lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit về cơ bản không bị ảnh hưởng bởi độ pH thấp cho đến 10 tuần sau khi bảo quản lạnh và khả năng sống sót cao trong môi trường axit được duy trì trong suốt quá trình bảo quản lạnh đông vì khuẩn này.

Ngoài ra, không phát hiện thấy mùi vị lạ khi lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit được bổ sung vào nước quả, như đồ uống từ các loại quả có màu đỏ, quả nhiệt đới và dâu tây/chuối.

Do vậy, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất nước quả chứa lợi khuẩn bằng cách cấy ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit vào nước quả.

Ví dụ về nước quả thích hợp để sử dụng trong sáng chế là các nước quả có độ pH thấp, đặc biệt là các nước quả chứa nước quả có múi ép như nước cam ép, nước nho ép, nước chanh lá cam và nước quýt ép và hỗn hợp của chúng. Ví dụ khác về nước quả bao gồm nước quả chứa nước táo ép.

Nước quả thích hợp để sử dụng trong sáng chế có thể là nước quả ép, nước quả ép từ dịch quả cô đặc, nước quả và nước quả có chứa thịt quả tùy ý chứa quả nghiền và/hoặc nước.

Tổng hàm lượng của nước quả ép và/hoặc quả nghiền trong nước quả thường nằm trong khoảng từ 20% đến 99,99% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30% đến 95% khối lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 40% đến

90% khối lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50% đến 80% khối lượng, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 60% đến 70% khối lượng.

Theo một phương án, nước quả theo sáng chế về cơ bản không chứa hợp phần sữa nhưng có thể chứa nước rau ép, rau cô đặc và/hoặc rau nghiền.

Theo một phương án, độ pH của nước quả nằm trong khoảng từ 3,2 đến 4,2, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3,5 đến 3,9.

Theo một phương án được ưu tiên, toàn bộ hoặc một phần nước quả được làm từ quả được chọn từ nhóm bao gồm dâu tây, chuối, nho, cam, táo, xoài, đào, việt quất, dứa, chanh lá cam, màu quả mâm xôi và quả lý chua và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, nước quả bao gồm dâu tây nghiền, chuối nghiền, nước nho ép, nước cam ép, xoài nghiền, đào nghiền và việt quất nghiền.

Theo một phương án được ưu tiên khác của sáng chế, nước quả bao gồm nước dứa ép, nước cam ép, chuối nghiền, xoài nghiền và nước chanh lá cam ép.

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa của sáng chế, nước quả bao gồm quả mâm xôi nghiền, nước quả lý chua ép, việt quất nghiền, nước nho ép, dâu tây nghiền và chuối nghiền.

Ít nhất một lợi khuẩn được làm thích nghi với môi trường axit trong môi trường thích hợp bằng cách nhân giống mà không cần làm ổn định độ pH. Theo một phương án, ít nhất một lợi khuẩn được nhân giống mà không cần làm ổn định độ pH ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 43°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C trong môi trường có độ pH ban đầu nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0, môi trường này có thành phần cho phép môi trường đạt đến độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0, tốt hơn là sau ít nhất 8 giờ nhân giống, bằng cách đó tạo ra ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit; ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit được thu nhận; tốt hơn là, ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit được cô; và ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit tùy ý được làm lạnh đông hoặc làm đông khô.

Môi trường được sử dụng để làm cho lợi khuẩn thích nghi với axit tốt hơn là có thành phần cho phép môi trường đạt tới độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0 trong suốt quá trình nhân giống lợi khuẩn. Điều này có nghĩa là độ pH của môi trường giảm do lợi khuẩn sản sinh axit, hoặc, theo cách khác, bằng cách bổ sung axit liên tục hoặc theo bậc vào dịch nuôi cấy. Do đó, môi trường không chứa hợp phần thiết yếu bất kỳ mà sẽ phân hủy hoặc theo cách khác trở nên không có hiệu

quả hoặc thậm chí gây độc ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0. Các hợp phần thiết yếu của môi trường là các hợp chất cần thiết để lợi khuẩn tăng sinh, như chất dinh dưỡng, nguồn cacbon và nitơ, vitamin và các chất tương tự.

Môi trường được sử dụng để nhân giống trong một phương án được ưu tiên bao gồm ít nhất 0,4% dịch chiết nấm men và ít nhất 2% đường.

Môi trường thích hợp có thể được sử dụng để nhân giống lợi khuẩn, cụ thể là vi khuẩn sản sinh axit lactic, đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, nếu lợi khuẩn được sử dụng là vi khuẩn sản sinh axit lactic, môi trường nuôi cấy vi khuẩn sản sinh axit lactic bất kỳ hiện có trên thị trường có thể được sử dụng, như môi trường Lactobacilli MRS (de Man, Rogosa và Sharpe). Ví dụ về môi trường MRS có thể được sử dụng để nhân giống lợi khuẩn chứa 1,0% pepton, 0,8% nước chiết thịt, 0,4% dịch chiết nấm men, 2,0% glucoza, 0,5% natri axetat trihydrat, 0,1% polysorbat 80 (còn được gọi là Tween 80), 0,2% đikali hydro phosphat, 0,2% triamoni xitrat, 0,02% magie sulphat heptahydrat và 0,005% mangan sulphat tetrahydrat, độ pH 6,0-7,0 ở 25°C. Khi sử dụng môi trường này cho lợi khuẩn được làm thích nghi với axit, tốt hơn là không có mặt hợp phần đikali hydro phosphat sao cho môi trường này không thể có được độ pH ổn định mặc dù có sự sản sinh axit bởi vi khuẩn hoặc bổ sung axit từ bên ngoài. Theo một phương án được ưu tiên hơn, cả hợp phần đikali hydro phosphat và hợp phần natri axetat trihydrat đều không có mặt trong môi trường MRS nêu trên. Tuy nhiên, như đã nêu ở những đoạn khác trong bản mô tả, cũng có thể duy trì hợp phần đệm trong môi trường được dùng để làm cho lợi khuẩn thích nghi với điều kiện axit. Trong trường hợp này, sự giảm độ pH sẽ xảy ra sau khi hết khả năng đệm. Việc nuôi cấy lợi khuẩn sẽ không bao gồm bước bổ sung bazơ bất kỳ từ bên ngoài.

Thông thường, người có hiểu biết trong lĩnh vực sẽ biết rõ môi trường thích hợp để nhân giống lợi khuẩn. Môi trường nêu trên, cùng với hoặc không cùng với hợp phần đệm, là thích hợp để nhân giống trong giống khởi động (men cái), như men cái có thể tích khoảng 100ml, khoảng 500ml, khoảng 1000ml, khoảng 2000ml, khoảng 4000ml hoặc lớn hơn, cũng như đối với giống cấy vi khuẩn có quy mô lớn, như giống cấy có thể tích lớn hơn 50l, lớn hơn 100l, lớn hơn 200l, hoặc lớn hơn 400l. Việc nuôi cấy có quy mô lớn như vậy thường được thực hiện trong thiết bị lên men. Ví dụ về sử dụng môi trường thích hợp được nêu trong Ví dụ 1 dưới đây.

Độ pH ban đầu của môi trường là độ pH của môi trường trước khi bổ sung lợi khuẩn. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH ban đầu của môi trường nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6,2 đến 6,6.

Theo một phương án của sáng chế, môi trường đạt đến độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0, tốt hơn là sau ít nhất 6 giờ, ít nhất 8 giờ, ít nhất 10 giờ nhân

giống lợi khuẩn, và tốt hơn nữa là sau ít nhất 12 giờ nhân giống lợi khuẩn. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, môi trường đạt đến độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0 sau ít nhất 8 giờ.

Lợi khuẩn có thể gây ra sự giảm độ pH trong quá trình nhân giống do sự sản sinh axit lactic trong suốt quá trình lên men. Theo một phương án được ưu tiên, môi trường được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế cho phép giảm độ pH, do nó không hoặc hầu như không chứa chất đệm bất kỳ mà sẽ giữ cho độ pH ổn định bất chấp sự tạo thành axit lactic trong quá trình nhân giống.

Tốt hơn là, lợi khuẩn được nhân giống mà không cần làm ổn định độ pH ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 43°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C, và tốt nhất là ở khoảng 37°C.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, ít nhất một chủng lợi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus* hoặc *Bifidobacterium*.

Theo một phương án được ưu tiên hơn của sáng chế, ít nhất một chủng lợi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus paracasei*. Nếu *Lactobacillus paracasei* được sử dụng, tốt hơn là nhiệt độ nhân giống là 37°C hoặc 38°C.

Chủng *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL431 (*L. casei* 431®) được nộp lưu theo hiệp ước Budapest liên quan đến ghi nhận quốc tế về việc nộp lưu các vi sinh vật dùng để phục vụ việc xét nghiệm sáng chế cho Trung tâm sưu tập kiểu mô ở Mỹ, 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110, USA ngày 24 tháng 1 năm 1994 với số lưu giữ ATCC 55544. Lợi khuẩn đã biết rõ này hiện có trên thị trường do Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Alle, DK-2970 Hoersholm, Denmark cung cấp, dưới tên sản phẩm là Probio-Tec® F-DVS *L. casei*-431đ, số khoản mục 501749, và dưới tên sản phẩm là Probio-Tec® C-Powder-30, số khoản mục 687018.

Theo một phương án được ưu tiên hơn của sáng chế, ít nhất một chủng lợi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL431 (*L. casei* 431®) được nộp lưu cho Trung tâm sưu tập kiểu mô ở Mỹ với số lưu giữ ATCC55544, thể đột biến của nó và biến thể của nó.

Các phương pháp thu nhận và cô đặc lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, có thể thu nhận vi khuẩn bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy vi khuẩn để loại bỏ phần dịch nổi của môi trường nuôi cấy. Việc ly tâm sẽ đủ nhẹ để tránh không làm phá vỡ vi khuẩn. Các phương pháp thu nhận tế bào bằng cách ly tâm thường đã biết và bao gồm, ví dụ, ly tâm ở tốc độ 2000 đến 6000 x g ($2000.9,8\text{m/s}^2$ đến $6000.9,8\text{m/s}^2$) trong 2-20 phút. Vi khuẩn

cũng có thể được thu nhận bằng các kỹ thuật khác đã được mô tả trong trường hợp lên men vi khuẩn, như lọc, ví dụ như lọc kiểu luồng chéo (lọc vắt). Các phương pháp cô đặc cũng đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, có thể cô đặc vi khuẩn bằng cách ly tâm và sau đó tái tạo huyền phù trong một thể tích nhỏ hơn, các kỹ thuật đông khô hoặc lọc qua màng, như lọc qua cột hoặc màng lọc.

Thông thường, nước quả được cấy ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit với lượng (CFU ban đầu/ml) nằm trong khoảng từ 1×10^4 đến 1×10^{10} CFU/ml, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^5 đến 1×10^9 CFU/ml, và thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^8 CFU/ml.

Bất ngờ là, khả năng sống sót của lợi khuẩn đặc biệt cao sau khi làm thích nghi với các điều kiện axit như đã nêu trên và sẽ vẫn cao sau thời gian bảo quản vài tháng ở nhiệt độ 4-10°C. Theo một phương án, khả năng sống sót của ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit ít nhất là 50% CFU ban đầu/ml sau khi bảo quản trong ít nhất 30 ngày ở nhiệt độ 8°C trong nước quả, như sau ít nhất 42 ngày bảo quản ở nhiệt độ 8°C, như sau ít nhất 70 ngày bảo quản ở nhiệt độ 8°C.

Theo một phương án được ưu tiên, khả năng sống sót của ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit ít nhất là 60% CFU ban đầu/ml, tốt hơn là ít nhất 70% CFU ban đầu/ml, và tốt hơn là ít nhất là 80% CFU ban đầu/ml trong các điều kiện bảo quản nêu trên.

Việc xác định số lượng tế bào sống sót được thực hiện bằng cách xác định số lượng đơn vị tạo khuẩn lạc (colony forming units - CFU) trong dịch pha loãng theo bậc bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc trên đĩa thạch, theo phương pháp tiêu chuẩn đã biết trước đây. Môi trường và các điều kiện nuôi cấy thích hợp được nêu trong phần ví dụ dưới đây.

Sau khi thu nhận và/hoặc cô đặc, vi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit tùy ý được làm lạnh đông hoặc làm đông khô. Ví dụ, lợi khuẩn có thể làm lạnh đông ở khoảng -20°C, tốt hơn là ở khoảng -80°C, hoặc thấp hơn. Tốt hơn là, quy trình làm lạnh đông được thực hiện càng nhanh càng tốt, tốt hơn là làm lạnh đông cực nhanh, để tránh sự tổn hại tế bào. Ví dụ như, làm lạnh đông cực nhanh có thể được thực hiện để đổ một thùng chứa vi khuẩn vào nitơ lỏng. Do vậy, theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, lợi khuẩn đã được làm thích nghi với axit được làm lạnh đông cực nhanh ở khoảng -196°C. Các phương pháp làm đông khô cũng đã biết trong lĩnh vực này. Trong quá trình làm đông khô, nguyên liệu được làm lạnh đông và sau đó áp suất xung quanh được giảm để cho phép nước đã lạnh đông trong nguyên liệu bị thăng hoa trực tiếp khỏi pha rắn để thành pha khí. Sau khi làm

lạnh đông hoặc làm lạnh đông cực nhanh vi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit, vi khuẩn này có thể được bảo quản ở khoảng -20°C , ở khoảng -55°C , ở khoảng -80°C , hoặc trong nitơ lỏng ở -196°C . Tốt hơn là bảo quản vi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit ở khoảng -55°C .

Theo một phương án của sáng chế, nước quả chứa lợi khuẩn được đóng gói một cách thuận tiện trong đồ chứa kín chứa từ 10 đến 5000ml sản phẩm, như từ 50 đến 1000ml hoặc từ 200 đến 1000ml.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến nước quả chứa lợi khuẩn thu được theo phương pháp theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, trong đó nước quả chứa lợi khuẩn này bao gồm ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit.

Theo một phương án, ít nhất một chủng lợi khuẩn có mặt trong nước quả với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^4 đến 1×10^{10} CFU/ml, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^5 đến 1×10^9 CFU/ml, và thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^8 CFU/ml sau ít nhất 30 ngày bảo quản ở nhiệt độ 8°C , như sau ít nhất 42 ngày bảo quản ở nhiệt độ 8°C .

Việc xác định số lượng tế bào sống sót được thực hiện bằng cách định lượng số đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU) trong dịch pha loãng theo bậc nồng độ bằng cách đếm số khuẩn lạc trên đĩa thạch, theo phương pháp tiêu chuẩn đã biết. Môi trường thích hợp và các điều kiện ủ được nêu trong phần ví dụ dưới đây.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp thu nhận giống cấy chứa chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit bằng cách nhân giống không cần ổn định độ pH. Theo một phương án được ưu tiên, lợi khuẩn được tăng sinh không cần ổn định độ pH ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 43°C , tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C trong môi trường có độ pH ban đầu nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0, môi trường này có thành phần cho phép môi trường đạt đến độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0 sau ít nhất 8 giờ nhân giống, bằng cách đó tạo ra lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit; lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit này được thu nhận; lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit này được cô; và lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit này tùy ý được làm lạnh đông hoặc làm đông khô.

Theo một phương án được ưu tiên, môi trường bao gồm ít nhất 0,4% dịch chiết nấm men và ít nhất 2% đường.

Độ pH ban đầu của môi trường là độ pH của môi trường trước khi bổ sung lợi khuẩn. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH ban đầu của môi trường nằm trong khoảng từ 6,2 đến 6,6.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, môi trường đạt độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0 sau ít nhất 10 giờ nhân giống lợi khuẩn, tốt hơn là sau ít nhất 12 giờ nhân giống lợi khuẩn.

Theo một phương án được ưu tiên, lợi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus* hoặc *Bifidobacterium*.

Theo một phương án được ưu tiên hơn của sáng chế, ít nhất một chủng lợi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus paracasei*.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa của sáng chế, ít nhất một chủng lợi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL431 (*L. casei* 431®) được nộp lưu tại Trung tâm sưu tập kiểu mô của Mỹ với số lưu giữ ATCC55544, thể đột biến của nó và biến thể của nó.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất giống cây chứa chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit theo khía cạnh thứ ba của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất giống cây theo khía cạnh thứ tư dùng để sản xuất nước quả chứa lợi khuẩn.

Theo một phương án được ưu tiên, nước quả chứa lợi khuẩn có độ pH ít nhất là 4,2.

Sáng chế được minh họa rõ hơn bởi các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất *L. casei* 431® được làm thích nghi trong môi trường axit

Môi trường MRS do Difco (ref. 288110) cung cấp được cấy 1% (thể tích/thể tích) *L. casei* 431® từ chủng gốc được làm đông lạnh. Dịch nuôi cấy được để phát triển qua đêm ở 37°C cho đến khi độ pH nhỏ hơn 3,9 và được bảo quản ở 5°C cho đến khi sử dụng. Dịch nuôi cấy qua đêm này được sử dụng để cấy vào 4L (1%, thể tích/thể tích) môi trường MRS (Difco) và được ủ qua đêm ở 37°C cho đến khi độ pH nhỏ hơn 3,9 và được bảo quản ở 5°C cho đến khi sử dụng. Bước nuôi cấy sơ bộ này được thực hiện để thu được lượng thích đáng dịch nuôi cấy để dùng cho quá trình lên men. Thiết bị sinh học chứa 400L môi trường thích hợp ở 10°C được cấy với toàn bộ thể tích của dịch nuôi cấy sơ bộ. Quá trình lên men được khởi đầu bằng cách tăng nhiệt độ đến 35°C và quá trình lên men được theo sau bởi bước giám sát sự giảm độ pH – cho thấy sự chuyển hóa của hydrat cacbon thành axit lactic. Trong suốt quá trình giảm độ pH, tế bào dần dần thích nghi với độ pH thấp. Tế bào đã thích nghi với môi trường axit được thu nhận ở độ pH 5,0, 4,5, và 4,0 bằng cách ly

tâm. Thời gian lên men nằm trong khoảng từ 10-17 giờ tùy thuộc vào thời điểm thu nhận (Hình 1).

Sinh khối tế bào cô đặc ngay lập tức được làm lạnh đông trong nitơ lỏng (-196°C) và được bảo quản ở -55°C cho đến khi sử dụng.

Ví dụ 2. Tối ưu hóa điều kiện thu nhận đối với chủng *L. casei* 431® đã được làm thích nghi với môi trường axit

Để thu được tế bào sống sót với số lượng tối đa, điều kiện thu nhận tối ưu được xác định như sau. Thiết bị phản ứng sinh học được cấy với dịch nuôi cấy sơ bộ và bắt đầu lên men như đã mô tả trong ví dụ 1. Lấy mẫu dịch lên men 30 phút một lần, từ 11 giờ sau khi cấy (tương ứng với độ pH 4,5) cho đến khi độ pH giảm xuống dưới 4,0 và khả năng sống sót được đánh giá bằng cách xác định số lượng đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU) (Hình 2). CFU được xác định bằng cách rót dịch pha loãng mười lần với lượng thích hợp trên đĩa thạch MRS, sau đó ủ kỵ khí trong 3 ngày ở 37°C .

Số lượng tế bào tăng cho đến 12 giờ sau khi cấy (tương ứng với độ pH = 4,24) và giữ ở lượng không đổi trong toàn bộ quá trình lên men cho đến 15 giờ. Điều này chỉ ra rằng các tế bào khỏe mạnh và vẫn sống sót ngay cả khi độ pH giảm xuống dưới 4,0. Độ pH < 4,0 được xác định là điều kiện thu nhận tối ưu tạo ra số lượng tế bào sống sót và được làm thích nghi với môi trường axit trong khoảng thời gian xử lý khả thi.

Ví dụ 3. Tỷ lệ sống sót và chất lượng cảm quan của các loại nước quả khác nhau được bổ sung *L. casei* 431® đã được làm thích nghi

L. casei 431® được tạo ra theo quy trình được mô tả trong ví dụ 1 được sử dụng để cấy vào các loại nước quả khác nhau chứa các thành phần sau đây:

Nước dâu và chuối ép (pH 3,75)

31% dâu tây nghiền

26% chuối nghiền

Nước nho ép, nước cam ép, xoài nghiền, đào nghiền và việt quất nghiền thêm tới 100%

Nước quả nhiệt đới ép (pH 3,88)

32% nước dứa ép

32% nước cam ép

26% chuối nghiền

7% xoài nghiền

3% chanh lá cam ép

Nước ép của các loại quả có màu đỏ (pH 3,55)

16% các loại quả có màu đỏ khác nhau (quả mâm xôi nghiền, nước quả lý chua ép, việt quất nghiền)

Nước nho ép, dâu tây nghiền và chuối nghiền lên tới 100%

Giống cấy chứa lợi khuẩn F-DVS được pha loãng trong dung dịch nước muối chứa pepton để đảm bảo số lượng tế bào ban đầu là 5×10^7 hoặc 1×10^8 CFU/ml thu được bằng cách bổ sung 1% thể tích giống cấy vào các hộp các tông chứa các loại nước quả ép khác nhau. Nước quả ép được cấy *L. casei* 431® đã được làm thích nghi với độ pH 4,0 hoặc pH 5,0 và mẫu đối chứng là *L. casei* 431® chưa được làm thích nghi. Để dùng làm mẫu đối chứng để phân tích cảm quan, các hộp các tông được cấy với cùng thể tích dung dịch nước muối chứa pepton. Nước quả ép đã cấy vi khuẩn được bảo quản và được giữ trong bóng tối ở nhiệt độ 8°C. Số lượng tế bào *L. casei* 431® định kỳ được xác định bằng cách rót dịch pha loãng 10 lần lên đĩa thạch MRS thích hợp sau đó ủ kỵ khí trong 3 ngày ở 37°C. Tiến hành đánh giá cảm quan trong quá trình bảo quản bởi hội đồng gồm 3 người có hiểu biết đánh giá cảm quan đã được huấn luyện.

Số lượng tế bào *L. casei* 431® trong các loại nước ép quả khác nhau được minh họa trên Hình 3, 4 và 5. Vi khuẩn *L. casei* 431® đã được làm thích nghi với môi trường axit không bị ảnh hưởng bởi quá trình bảo quản trong ít nhất 30 ngày trong môi trường axit có độ pH 3,5-3,9 trong khi vi khuẩn *L. casei* 431® chưa được làm thích nghi có khả năng sống sót thấp hơn 1000 lần trong nước quả.

Đánh giá cảm quan trong 30 ngày bảo quản cho thấy không có sự thay đổi về các đặc tính cảm quan trong nước quả được bổ sung *L. casei* 431® so với nước quả cùng loại được bổ sung thể tích tương ứng dung dịch nước muối chứa pepton.

Ví dụ 4. Tỷ lệ sống sót của *L. casei* 431® trong nước cam ép khi được làm thích nghi với ba giá trị độ pH khác nhau

L. casei 431® được tạo ra theo quy trình được mô tả trong ví dụ 1 được sử dụng để cấy vào nước cam ép 100 % (pH 3,8). Giống cấy lợi khuẩn F-DVS được pha loãng trong dung dịch nước muối chứa pepton để đảm bảo rằng số lượng tế bào ban đầu là $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, thu được bằng cách bổ sung 1% thể tích giống cấy vào các hộp các tông chứa nước cam ép. Nước quả ép được cấy với *L. casei* 431® đã được làm thích nghi với độ pH 4,0, pH 4,5 hoặc pH 5,0, và được cấy với *L. casei* 431® chưa được làm thích nghi để làm mẫu đối chứng. Nước quả ép được bảo

quản trong bóng tối ở 8°C trong 42 ngày và được lấy mẫu định kỳ để xác định số lượng tế bào bằng cách rót dịch pha loãng gấp 10 lần thích hợp lên đĩa thạch MRS, sau đó ủ kỵ khí trong 3 ngày ở 37°C.

Như được minh họa trên Hình 6, số lượng tế bào *L. casei* 431® gần như không đổi khi tế bào được làm thích nghi với độ pH 4,0, 4,5 hoặc 5,0 trong quá trình sản xuất, trong khi quan sát thấy số lượng tế bào giảm đáng kể đối với *L. casei* 431® chưa được làm thích nghi.

Ví dụ 5. Độ ổn định của *L. casei* 431 đã được làm thích nghi trong quá trình bảo quản lạnh đông.

L. casei 431® được tạo ra theo ví dụ 1 được bảo quản ở dạng viên kết lạnh đông ở -50°C, và được kiểm tra định kỳ về khả năng sống sót. Số lượng tế bào trong giống cấy đã được làm tan giá được xác định bằng cách rót dịch pha loãng gấp 10 lần lên 5 đĩa thạch MRS thích hợp, sau đó ủ kỵ khí trong 3 ngày ở 37°C. Như được minh họa trên Hình 7, số lượng tế bào của cả *L. casei* 431® chưa được làm thích nghi cũng như *L. casei* 431® đã được làm thích nghi với độ pH 4,0, 4,5 hoặc 5,0 trong quá trình sản xuất cực kỳ ổn định trong ít nhất 6 tháng khi được bảo quản ở -50°C.

Các phương án được ưu tiên của sáng chế được nêu trong bản mô tả, bao gồm các phương án tốt nhất mà tác giả sáng chế đã biết để thực hiện sáng chế. Các biến thể của các phương án ưu tiên này có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ dựa trên phần mô tả nêu trên. Các tác giả sáng chế hy vọng người có hiểu biết trong lĩnh vực sử dụng những biến thể như vậy nếu thích hợp, và tác giả sáng chế dự tính sáng chế được thực hiện theo cách khác với các cách được nêu cụ thể trong bản mô tả. Do đó, sáng chế này bao gồm tất cả các dạng cải biến và các phương án tương đương của các đối tượng nêu trong yêu cầu bảo hộ kèm theo đây như luật sáng chế cho phép. Hơn nữa, sự kết hợp bất kỳ của các yếu tố đã nêu trên với tất cả các biến thể có thể của nó được bao hàm trong sáng chế trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả hoặc theo cách khác mẫu thuẫn rõ ràng với ngữ cảnh.

Ví dụ 6. Tỷ lệ sống sót của *L. casei* 431® trong nước quả ép sau khi bảo quản lạnh đông trong thời gian dài.

Sau 6 tháng bảo quản ở -50°C dưới dạng viên kết lạnh đông, khả năng sống sót được xác định trong 25 mẫu nước cam ép 100% đối với *L. casei* 431 đã được làm thích nghi với độ pH 4,0 trong quá trình sản xuất. Giống cấy lợi khuẩn F-DVS được pha loãng trong dung dịch nước muối chứa pepton để đảm bảo rằng số lượng tế bào ban đầu là 10^8 CFU/ml, thu được bằng cách bổ sung 1% thể tích giống

cấy vào các hộp các tông chứa nước cam ép. Để dùng làm mẫu đối chứng, các hộp các tông khác chứa 100% nước cam ép được bổ sung *L. casei* 431® chưa được làm thích nghi được bảo quản trong 6 tháng ở -50°C. Nước quả ép được bảo quản ở 8°C trong bóng tối và định kỳ được lấy mẫu để xác định số lượng tế bào *L. casei* 431® bằng cách rót dịch pha loãng gấp 10 lần lên đĩa thạch MRS thích hợp, sau đó ủ kỵ khí trong 3 ngày ở 37°C.

Như được minh họa trên Hình 8, số lượng tế bào *L. casei* 431® gần như không đổi khi được làm thích nghi với độ pH 4,0 trong quá trình sản xuất, được bảo quản trong 6 tháng ở -50°C và sau đó được bảo quản lạnh trong nước cam ép trong 6 tuần. Ngược lại, quan sát thấy sự giảm đáng kể số lượng tế bào đối với *L. casei* 431® chưa được làm thích nghi khi bảo quản trong 6 tháng ở -50°C và được bổ sung vào nước cam ép. Điều này chứng tỏ rằng khả năng sống sót cao trong nước cam của *L. casei* 431® đã được làm thích nghi với độ pH 4,0 trong quá trình sản xuất vẫn được duy trì ngay cả sau khi bảo quản lạnh đông giống cây trong thời gian dài ở -50°C.

Ví dụ 7. Độ ổn định của *L. casei* 431® đã được làm thích nghi với môi trường axit khi bảo quản trong thời gian dài trong nước cam ép 100%.

L. casei 431® được tạo ra theo quy trình được mô tả trong Ví dụ 1 được sử dụng để cấy vào nước cam ép 100% (pH 3,8). Giống cấy lợi khuẩn F-DVS được pha loãng trong dung dịch nước muối chứa pepton để đảm bảo rằng số lượng tế bào ban đầu khoảng 1×10^8 CFU/ml, thu được bằng cách bổ sung 1% thể tích giống cấy vào các hộp các tông chứa nước quả ép. Nước quả ép được cấy với *L. casei* 431® đã được làm thích nghi với độ pH 4,0 hoặc được cấy với *L. casei* 431® chưa được làm thích nghi để làm mẫu đối chứng. Nước cam ép được bảo quản trong bóng tối ở 8°C trong 70 ngày và được lấy mẫu định kỳ để xác định số lượng tế bào bằng cách rót dịch pha loãng gấp 10 lần lên đĩa thạch MRS thích hợp, sau đó ủ kỵ khí trong 3 ngày ở 37°C.

Như được minh họa trên Hình 9, số lượng tế bào *L. casei* 431® gần như không đổi khi được làm thích nghi với độ pH 4,0 trong quá trình sản xuất và sau đó được bảo quản lạnh trong nước cam ép trong khoảng thời gian lên tới 10 tuần. Ngược lại, quan sát thấy sự giảm đáng kể số lượng tế bào *L. casei* 431® chưa được làm thích nghi ở thời điểm 3 tuần bảo quản khi được bảo quản lạnh trong nước cam ép so với thời điểm lấy mẫu đầu tiên. Điều này chứng tỏ khả năng sống sót cao hơn của *L. casei* 431® đã được làm thích nghi với độ pH 4,0 trong nước cam ép sau khoảng thời gian bảo quản lạnh thậm chí lên tới 10 tuần.

Tài liệu viện dẫn

Patent Châu Âu số EP 0113055

Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2010/0086646

Công bố đơn quốc tế số WO 2010/132017

Tất cả nội dung của các tài liệu viện dẫn nêu trong sáng chế được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất nước quả chứa lợi khuẩn, phương pháp này bao gồm:

- (a) làm cho ít nhất một chủng lợi khuẩn thích nghi với môi trường axit trong quá trình nhân giống bao gồm:
 - (i) cấy ít nhất một chủng lợi khuẩn mà không cần làm ổn định độ pH ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 43°C, trong môi trường thích hợp có độ pH ban đầu nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0, với sự có mặt của mức pH đang giảm từ từ cho đến khi đạt được độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0, môi trường này có thành phần cho phép môi trường đạt đến độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 4,0;
 - (ii) thu nhận ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit;
 - (iii) cô đặc ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit; và
 - (iv) tùy ý làm lạnh đông hoặc đông khô ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit;
- (b) cấy ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit ở bước (a) vào nước quả; và
- (c) tùy ý đóng gói nước quả chứa lợi khuẩn.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc làm thích nghi với môi trường axit ở bước (a) bao gồm bước cấy ít nhất một chủng lợi khuẩn mà không cần làm ổn định độ pH ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường ở bước (i) bao gồm ít nhất 2% đường và 0,4% dịch chiết nấm men.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-3, trong đó ở bước (b) nước quả được cấy bằng ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit với lượng CFU ban đầu trên 1 ml nước quả nằm trong khoảng từ 1×10^4 đến 1×10^{10} CFU trên 1 ml nước quả.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó lượng CFU ban đầu trên 1 ml nước quả nằm trong khoảng từ 1×10^5 đến 1×10^9 CFU trên 1 ml nước quả.

6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó lượng CFU ban đầu trên 1 ml nước quả nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^8 CFU trên 1 ml nước quả.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-3 và 5-6, trong đó khả năng sống sót của ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit là ít nhất 50% CFU ban đầu trên 1 ml nước quả sau khi bảo quản trong ít nhất 30 ngày ở nhiệt độ 8°C trong nước quả.
8. Phương pháp theo điểm 4, trong đó khả năng sống sót của ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit là ít nhất 50% CFU ban đầu trên 1 ml nước quả sau khi bảo quản trong ít nhất 30 ngày ở nhiệt độ 8°C trong nước quả.
9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó khả năng sống sót của ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit là ít nhất 50% CFU ban đầu trên 1 ml nước quả sau ít nhất 42 ngày bảo quản ở nhiệt độ 8°C.
10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó khả năng sống sót của ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit là ít nhất 50% CFU ban đầu trên 1 ml nước quả sau ít nhất 42 ngày bảo quản ở nhiệt độ 8°C.
11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó khả năng sống sót của ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit là ít nhất 50% CFU ban đầu trên 1 ml nước quả sau ít nhất 70 ngày bảo quản ở nhiệt độ 8°C.
12. Phương pháp theo điểm 10, trong đó khả năng sống sót của ít nhất một chủng lợi khuẩn đã được làm thích nghi với môi trường axit là ít nhất 50% CFU ban đầu trên 1 ml nước quả sau ít nhất 70 ngày bảo quản ở nhiệt độ 8°C.
13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-3, 5-6 và 8-12, trong đó độ pH của nước quả chứa lợi khuẩn nằm trong khoảng từ 3,2 đến 4,2.
14. Phương pháp theo điểm 4, trong đó độ pH của nước quả chứa lợi khuẩn nằm trong khoảng từ 3,2 đến 4,2.
15. Phương pháp theo điểm 7, trong đó độ pH của nước quả chứa lợi khuẩn nằm trong khoảng từ 3,2 đến 4,2.
16. Phương pháp theo điểm 13, trong đó độ pH của nước quả chứa lợi khuẩn nằm trong khoảng từ 3,5 đến 3,9.
17. Phương pháp theo điểm 14 hoặc 15, trong đó độ pH của nước quả chứa lợi khuẩn nằm trong khoảng từ 3,5 đến 3,9.

18. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-3, trong đó ít nhất một chủng lợi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*.

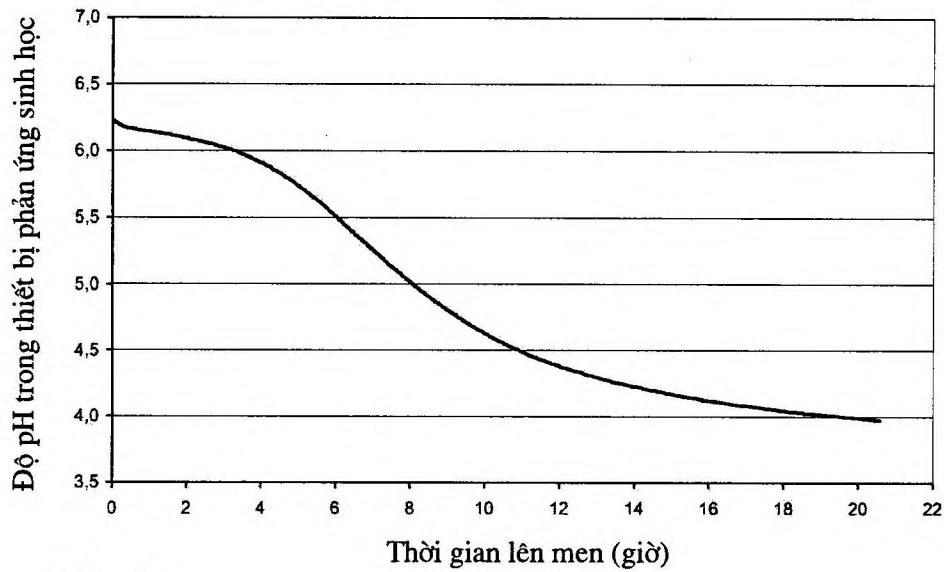
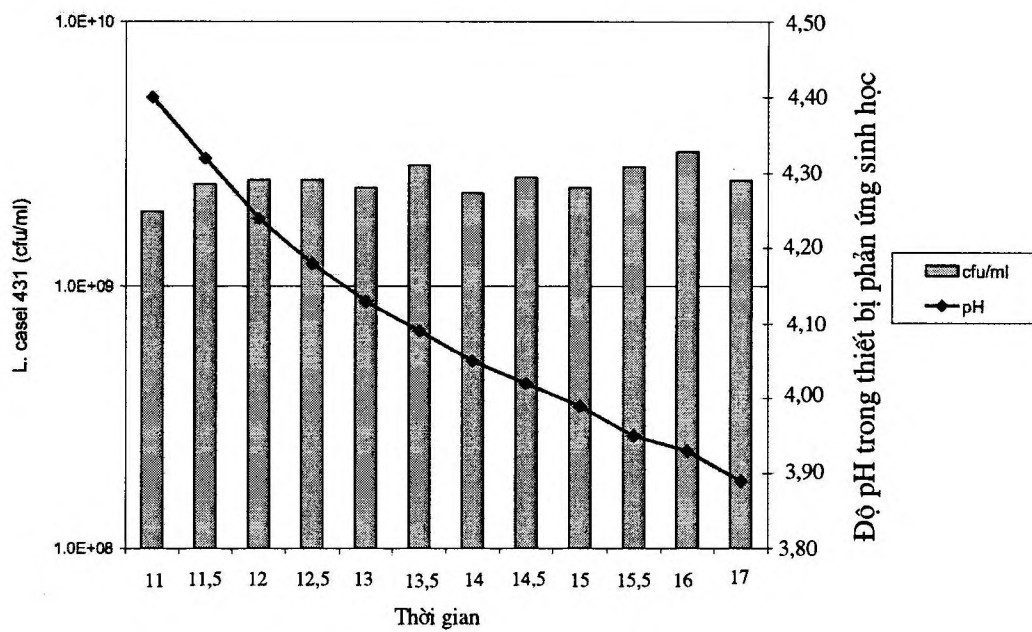
19. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-3, trong đó nước quả chứa lợi khuẩn bao gồm từ 20% đến 99,99% khối lượng nước ép quả và/hoặc quả nghiền.

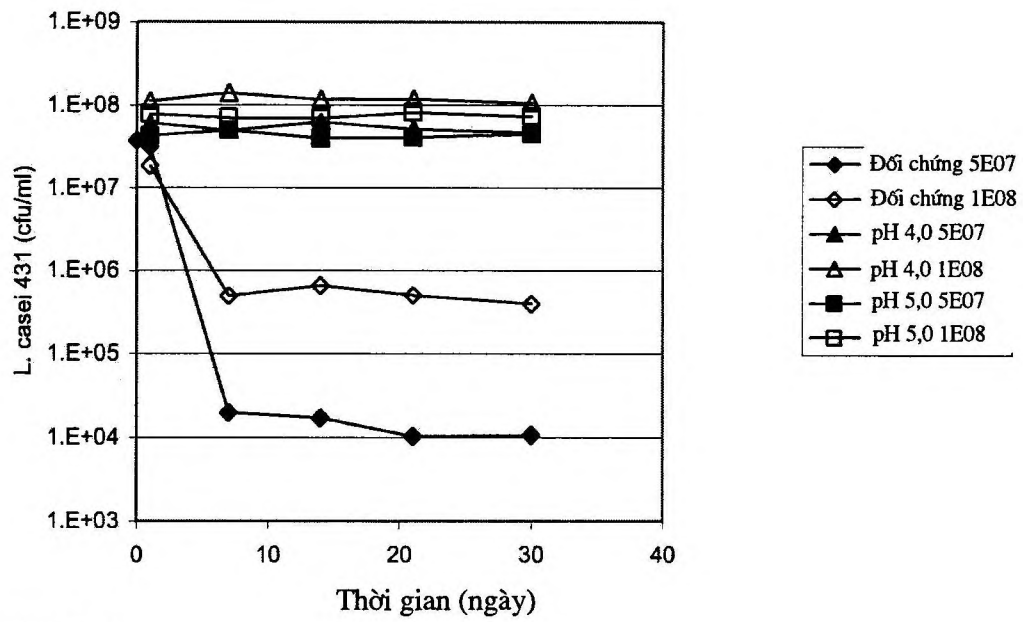
20. Nước quả chứa lợi khuẩn thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-19.

21. Nước quả chứa lợi khuẩn theo điểm 20, trong đó ít nhất một chủng lợi khuẩn có mặt trong nước quả với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^4 đến 1×10^{10} CFU/ml sau ít nhất 30 ngày bảo quản ở nhiệt độ 8°C .

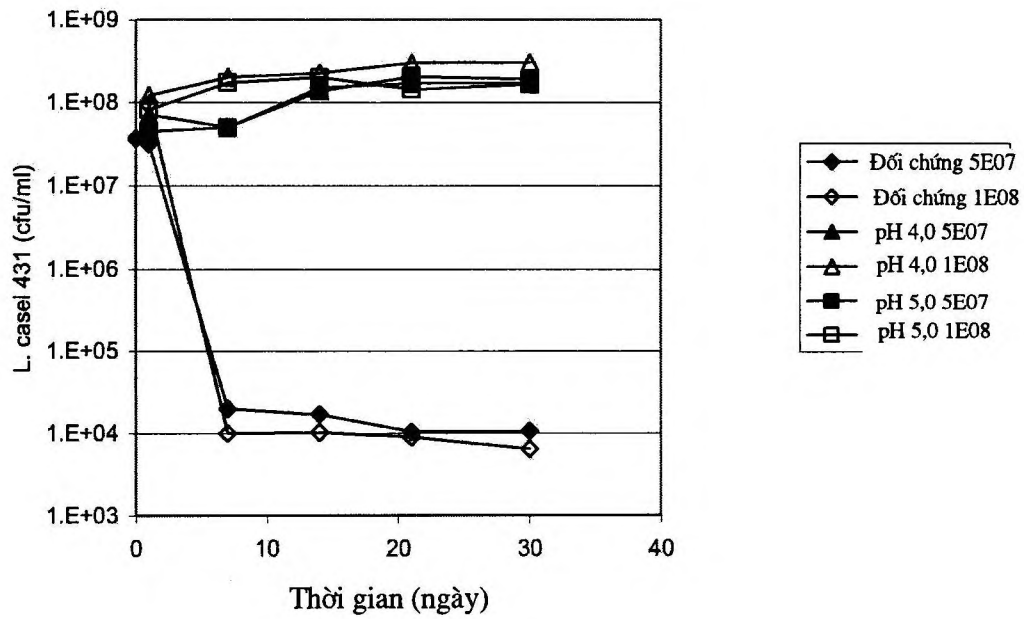
22. Nước quả chứa lợi khuẩn theo điểm 21, trong đó ít nhất một chủng lợi khuẩn có mặt trong nước quả với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^5 đến 1×10^9 CFU/ml sau ít nhất 30 ngày bảo quản ở nhiệt độ 8°C .

23. Nước quả chứa lợi khuẩn theo điểm 22, trong đó ít nhất một chủng lợi khuẩn có mặt trong nước quả với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^8 CFU/ml sau ít nhất 30 ngày bảo quản ở nhiệt độ 8°C .

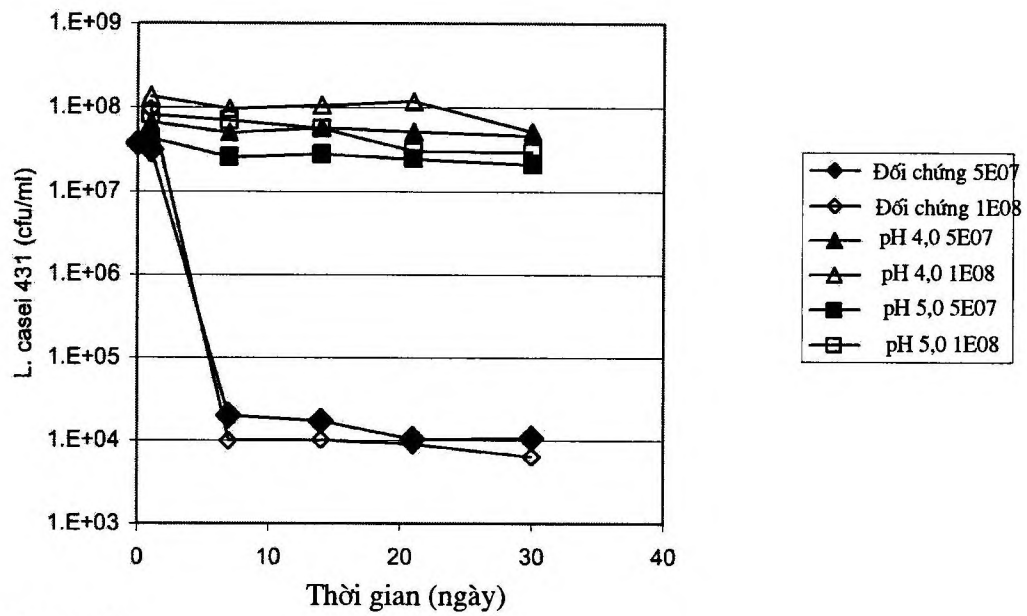
**Hình 1****Hình 2**



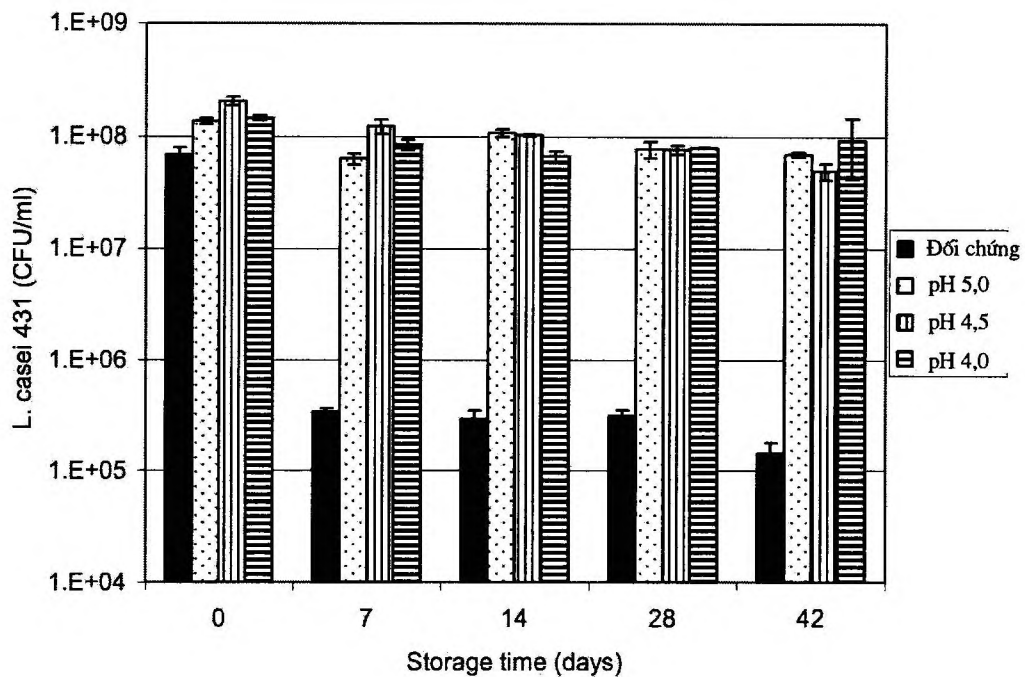
Hình 3



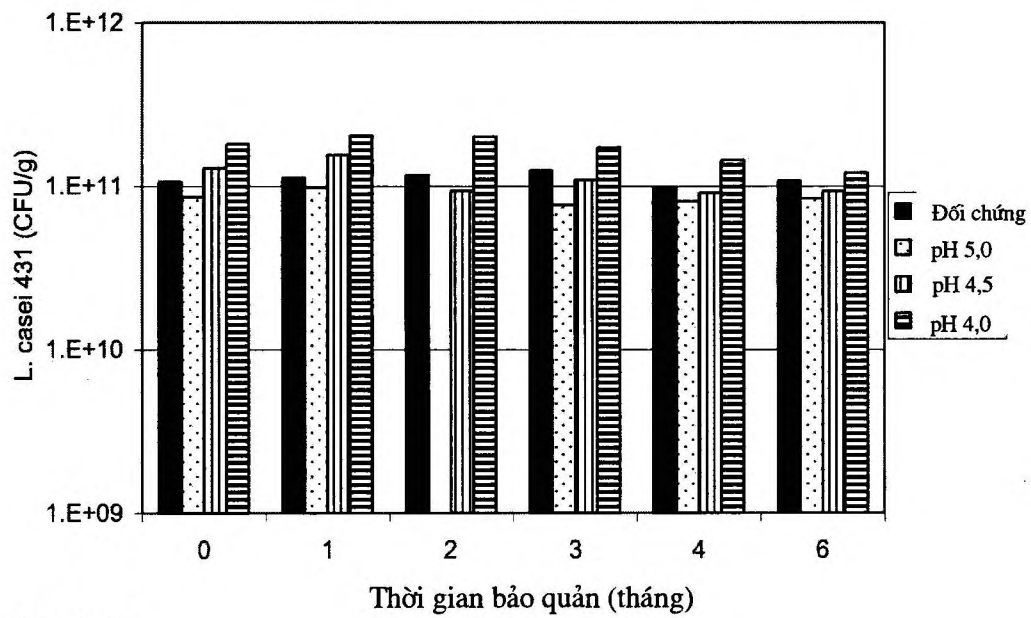
Hình 4



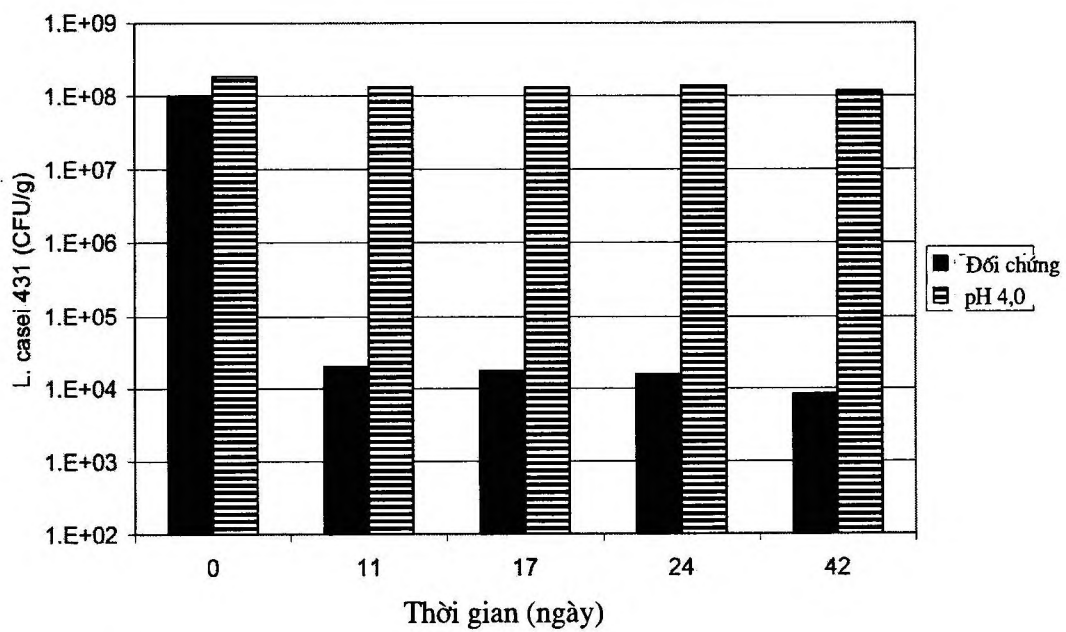
Hình 5



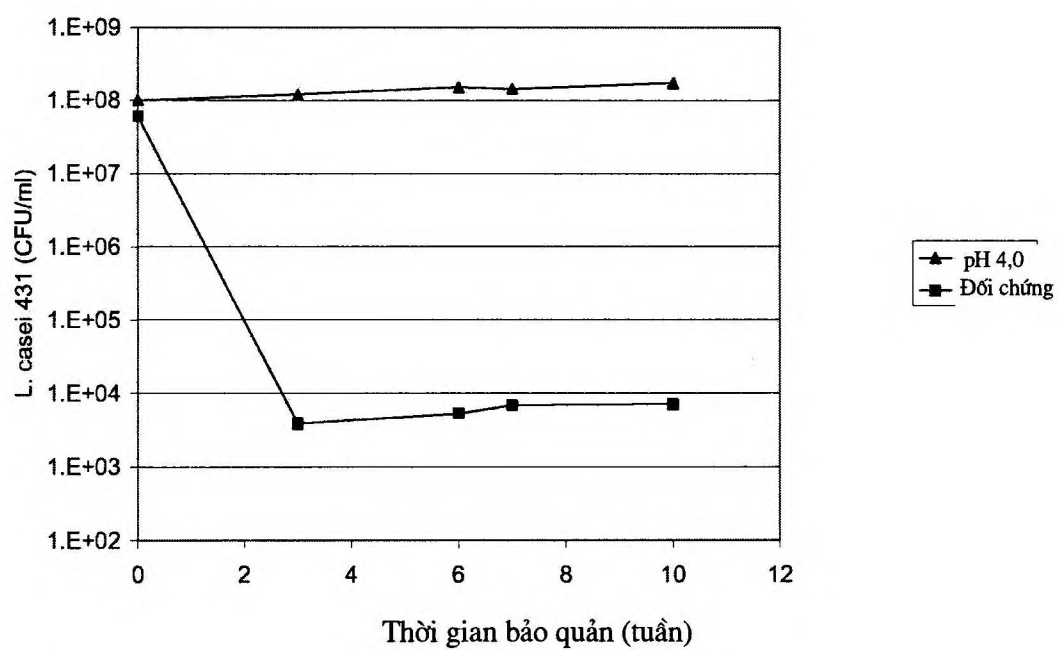
Hình 6



Hình 7



Hình 8

**Hình 9**