



(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)   
**1-0022506**

(51)<sup>7</sup> **C12N 1/20, A23C 9/127, 9/13**

(13) **B**

- 
- |      |                                                                                                                                         |            |            |                 |            |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|-----------------|------------|
| (21) | 1-2011-02762                                                                                                                            | (22)       | 19.03.2010 |                 |            |
| (86) | PCT/JP2010/054826                                                                                                                       | 19.03.2010 | (87)       | WO2010/113680A1 | 07.10.2010 |
| (30) | 2009-086305                                                                                                                             | 31.03.2009 | JP         |                 |            |
| (45) | 25.12.2019                                                                                                                              | 381        | (43)       | 25.06.2012      | 291        |
| (73) | KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (JP)<br>1-19, Higashi-Shinbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8660, Japan                                |            |            |                 |            |
| (72) | NAKANO, Masatoshi (JP), ARIFUKU, Mika (JP), MIZUKOSHI, Harumi (JP),<br>MIZUSAWA, Susumu (JP), KIMURA, Kazumasa (JP), ITO, Masahiko (JP) |            |            |                 |            |
| (74) | Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)                                                                       |            |            |                 |            |
- 

(54) **PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY VI KHUẨN AXIT LACTIC VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM SỮA LÊN MEN**

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic để tạo ra môi trường vi khuẩn axit lactic trong đó số lượng vi khuẩn axit lactic có thể được duy trì ổn định, và để tạo ra thực phẩm và đồ uống bao gồm môi trường vi khuẩn axit lactic có độ ổn định của sản phẩm tuyệt vời.

Để thực hiện mục đích trên, sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic bao gồm việc cấy truyền vi khuẩn axit lactic vào môi trường chứa thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do nhỏ hơn 0,25% trọng lượng, và phosphat, và thực phẩm và đồ uống bao gồm môi trường vi khuẩn axit lactic tạo ra từ phương pháp nuôi cấy trên.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic, và phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Đã biết rằng vi khuẩn axit lactic được dùng để sản xuất các sản phẩm từ sữa như pho mát, sữa lên men, đồ uống vi khuẩn axit lactic và tương tự, và các thực phẩm lên men khác như Kim chi Hàn Quốc, dưa chua và tương tự. Trong những năm gần đây, các chức năng sinh lý học khác của vi khuẩn axit lactic tác dụng điều hòa trong ruột và tương tự đã được làm sáng tỏ, và bản thân thể nấm của vi khuẩn axit lactic và môi trường vi khuẩn axit lactic khác được sử dụng làm nguyên liệu cho thực phẩm và dược phẩm vì sức khỏe, và chúng được sử dụng vào nhiều ứng dụng khác nhau.

Mặc dù việc nuôi cấy vi khuẩn axit lactic được thực hiện dưới các dạng khác nhau, dạng được thực hiện thường xuyên nhất là sản xuất chế phẩm vi khuẩn axit lactic, việc sản xuất thực phẩm từ sữa lên men dưới dạng khác nhau như sữa lên men, đồ uống vi khuẩn axit lactic, pho mát và tương tự bằng cách sử dụng thành phần sữa như sữa động vật làm môi trường. Mặc dù vậy, do hiện tượng dinh dưỡng thụ động của vi khuẩn axit lactic thường là nghiêm ngặt, có nhiều chủng loại vi khuẩn axit lactic không phát triển thích hợp khi chỉ sử dụng thành phần sữa làm môi trường. Hơn nữa, nếu một loại nhất định của vi khuẩn có đặc tính tăng trưởng tương đối tốt được sử dụng, việc nuôi cấy trong thời gian dài là cần thiết để tạo ra môi trường có đủ độ axit (lượng axit được tạo ra) trong việc sản xuất đồ uống vi khuẩn axit lactic và tương tự.

Tuy nhiên, việc nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong thời gian dài gây ra sự

giảm số lượng vi khuẩn sống, và do đó là một vấn đề trong việc sản xuất đồ uống vi khuẩn axit lactic và tương tự trong đó số lượng vi khuẩn sống được coi là quan trọng. Vì vậy, các chất kích thích tăng trưởng khác nhau có khả năng làm tăng sự phát triển của vi khuẩn với môi trường trong việc nuôi cấy vi khuẩn axit lactic thường được bổ sung, để giảm thời gian nuôi cấy. Chiết xuất rong biển, muối sắt, các vitamin, các sản phẩm phân hủy protein bao gồm amino axit và peptit, chiết xuất men bia và tương tự đã được biết đến khi dùng làm chất kích thích tăng trưởng hoặc chất được ghi nhận có hiệu quả tăng trưởng.

Hơn nữa, phương pháp sử dụng nước chiết của cặn rượu sakê và/hoặc nước chiết của cặn rượu sakê mà được xử lý với enzym phân giải protein (công bố sáng chế 1), phương pháp sử dụng chiết xuất của lá cây cà phê (công bố sáng chế 2), phương pháp sử dụng phức của chất béo với protein (công bố sáng chế 3) và tương tự đã được bộc lộ. Các tác giả sáng chế nhận thấy rằng chiết xuất của trà, tỏi xanh và gừng thu được bằng cách chiết xuất với axit là có hiệu quả khi dùng làm chất tăng sự phát triển của vi khuẩn axit lactic, và vấn đề này đã được báo cáo (công bố sáng chế 4).

Mặt khác, điều quan trọng là vi khuẩn axit lactic sống được chuyển vào trong ruột nhằm làm tăng các chức năng sinh lý học bởi vi khuẩn axit lactic. Vì vậy, để duy trì khả năng tồn tại cao của vi khuẩn axit lactic trong môi trường hoặc sản phẩm chứa chúng, phương pháp sử dụng chế phẩm bao gồm từ 20 đến 90% trọng lượng chất béo trong đó phospholipit có từ 40 đến 55% trọng lượng, so với toàn bộ thành phần rắn (công bố sáng chế 5), và phương pháp sử dụng thể nắm chết của vi khuẩn axit lactic (công bố sáng chế 6) được đề xuất.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Công bố sáng chế 1: Công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 5-15366

Công bố sáng chế 2: Công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 6-125771

Công bố sáng chế 3: Công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 2006-230259

Công bố sáng chế 4: Patent Nhật Bản số 3648115

Công bố sáng chế 5: Công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 2007-97447

Công bố sáng chế 6: Công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 2008-5811

Bài công bố trên tạp chí của Sung-Han Kim và cộng sự, J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 52: 76-79, 2009 bộc lộ các điều kiện để phát triển và bảo quản vi khuẩn axit lactic.

JP 8-116872 bộc lộ phương pháp cấy truyền vi khuẩn axit lactic bao gồm bước cấy truyền vi khuẩn axit lactic trong môi trường bao gồm sữa bột gầy và phosphat.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Mặc dù vậy, chất lượng của thành phần sữa, sản phẩm tự nhiên, không ổn định, bởi vì nó phụ thuộc vào mùa, khu vực sản xuất, phương pháp xử lý và tương tự. Vì vậy, thậm chí khi các nguyên liệu đã biết được ghi nhận là có hiệu quả làm tăng đặc tính phát triển và tồn tại của vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong môi trường bao gồm thành phần sữa làm nguyên liệu trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn axit lactic, ví dụ, số lượng vi khuẩn axit lactic trong môi trường thu được không được duy trì ổn định, và khi môi trường này khi được sử dụng để sản xuất thực phẩm và đồ uống hoặc tương tự, số lượng vi khuẩn sống giảm rất nhanh sau khi bảo quản thực phẩm và đồ uống hoặc tương tự.

Theo đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic để tạo ra môi trường vi khuẩn axit lactic trong đó số lượng vi khuẩn axit lactic có thể được duy trì ổn định.

Hơn nữa, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm môi trường vi khuẩn axit lactic có độ ổn định sản phẩm tuyệt vời.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu một cách hăng hái để giải quyết vấn đề trên, và kết quả là, tìm ra được kỹ thuật mà chất lượng của thành phần sữa được sử dụng trong môi trường ảnh hưởng đến độ ổn định của số lượng vi khuẩn axit lactic trong sản phẩm lên men chứa vi khuẩn axit lactic, và cụ thể là, xác định được rằng môi trường vi khuẩn axit lactic trong đó số lượng vi khuẩn axit lactic có thể được duy trì ổn định không thể tạo ra bằng cách sử dụng môi trường chứa thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do nhỏ hơn 0,25% trọng lượng. Hơn nữa, các tác giả sáng chế nhận thấy rằng khi thành phần sữa được sử dụng làm môi trường, độ ổn định của số lượng vi khuẩn axit lactic trong các sản phẩm lên men chứa vi khuẩn axit lactic thu được tăng lên bằng cách bổ sung phosphat vào môi trường, để hoàn tất sáng chế.

Hơn nữa, các tác giả sáng chế nhận thấy rằng thực phẩm và đồ uống như sản phẩm sữa lên men và tương tự có độ ổn định sản phẩm tuyệt vời có thể được tạo ra bằng cách sử dụng môi trường này.

Cụ thể là, sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic bao gồm bước cấy truyền vi khuẩn axit lactic vào môi trường chứa thành phần sữa có nồng độ axit phosphoric tự do nhỏ hơn 0,25% trọng lượng và phosphat, trong đó thành phần sữa là sữa bột gầy, trong đó nồng độ của thành phần sữa trong môi trường nằm trong khoảng từ 5 đến 30% trọng lượng, trong đó phosphat được bổ sung với lượng để cùng với thành phần sữa tạo ra nồng độ axit phosphoric tự do trong môi trường nằm trong khoảng từ 0,25% trọng lượng đến 0,50% trọng lượng, trong đó lượng bổ sung phosphat được xác định bởi công thức 2:

[Công thức 2]

$$\frac{\left( \begin{array}{c} \text{nồng độ axit} \\ \text{phosphoric tự do} \\ \text{trong vật liệu nền} \end{array} - \begin{array}{c} \text{nồng độ axit} \\ \text{phosphoric tự} \\ \text{do trong thành} \\ \text{phần sữa} \end{array} \right) \times \left( \begin{array}{c} \text{nồng độ} \\ \text{môi trường} \end{array} \right) \times \left( \begin{array}{c} \text{phân tử lượng} \\ \text{của} \\ \text{phosphat*} \end{array} \right)}{100 \times \left( \begin{array}{c} \text{phân tử lượng của phospho} \end{array} \right)}$$

\* Nếu hai hoặc nhiều loại phosphat được sử dụng, phân tử lượng trung bình của chúng được sử dụng.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic bao gồm bước cấy truyền vi khuẩn axit lactic vào môi trường chứa thành phần sữa có nồng độ axit phosphoric tự do nhỏ hơn 0,25% trọng lượng, và hàm lượng protein trên thành phần sữa không béo ở dạng rắn (solid nonfat – SNF) nhỏ hơn 35% trọng lượng, và phosphat tan trong nước, trong đó thành phần sữa là sữa bột gầy, trong đó nồng độ của thành phần sữa trong môi trường nằm trong khoảng từ 5 đến 30% trọng lượng, trong đó phosphat được bổ sung với lượng để cùng với thành phần sữa tạo ra nồng độ axit phosphoric tự do trong môi trường nằm trong khoảng từ 0,25% đến 0,50% trọng lượng, trong đó lượng bổ sung phosphat được xác định bởi công thức 2. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm môi trường tạo ra bằng cách cấy truyền vi khuẩn axit lactic vào môi trường chứa thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do nhỏ hơn 0,25% trọng lượng hoặc thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do nhỏ hơn 0,25% trọng lượng, và hàm lượng protein trên thành phần sữa không béo rắn (SNF) nhỏ hơn 35% trọng lượng, và phosphat tan trong nước, và việc nuôi cấy chúng.

## Hiệu quả của sáng chế

Theo phương pháp của sáng chế, nếu thành phần sữa mà có chất lượng thay đổi, phụ thuộc vào mùa, khu vực sản xuất, các bước xử lý hoặc tương tự do chúng là sản phẩm tự nhiên được sử dụng, môi trường vi khuẩn axit lactic trong đó số lượng vi khuẩn axit lactic có thể được duy trì ổn định có thể được tạo ra, và môi trường vi khuẩn axit lactic có thể được ứng dụng rộng rãi vào thực phẩm và dược phẩm khác nhau vì sức khỏe.

Ngoài ra, theo phương pháp của sáng chế, bởi vì môi trường ổn định bao gồm lượng lớn vi khuẩn axit lactic thể hiện hoạt tính cao có thể được tạo ra bằng cách kết hợp các chất đã biết có tác dụng làm tăng đặc tính phát triển và tồn tại của vi khuẩn axit lactic, nó đặc biệt thích hợp để dùng trong sản xuất thực phẩm sữa lên men như đồ uống vi khuẩn axit lactic và tương tự trong đó số lượng vi khuẩn sống được coi là coi quan trọng.

Hơn nữa, theo phương pháp của sáng chế, sản phẩm từ sữa mà là sản phẩm tự nhiên có thể được sử dụng làm nguyên liệu trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn axit lactic, không phụ thuộc vào mùa, khu vực sản xuất, các bước xử lý hoặc tương tự.

## Mô tả chi tiết sáng chế

Thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do nhỏ hơn 0,25% trọng lượng được sử dụng làm thành phần sữa trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong sáng chế. Hàm lượng axit phosphoric tự do của thành phần sữa được xác định bằng các phương pháp đã biết như phương pháp sử dụng axit molybdic (phương pháp xanh molipđen) hoặc tương tự để xác định xem liệu thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do nằm trong khoảng trên hay không. Ở đây, thuật ngữ thành phần sữa nghĩa là nguyên liệu bao gồm protein sữa. Trong phương pháp theo sáng chế, sữa bột gầy được dùng làm thành phần sữa.

Phương pháp để xác định hàm lượng axit phosphoric tự do của thành phần sữa sẽ được giải thích dưới đây, sử dụng sữa bột gầy làm ví dụ về thành phần sữa. Lưu ý rằng giá trị xác định từ phương pháp dưới đây được lấy làm hàm lượng axit phosphoric tự do của thành phần sữa trong bản mô tả sáng chế.

Phương pháp xác định nồng độ axit phosphoric tự do

(1) Hóa chất

(a) Dung dịch axit ascobic (72g/L)

7,2g Axit L(+)-ascobic (loại đặc biệt, do Wako Pure Chemical Industries, Ltd. sản xuất) được hòa tan trong nước để điều chế dung dịch có tổng thể tích là 100ml, và dung dịch được lưu giữ trong bóng tối ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 10°C.

(b) Dung dịch amoni molipdat

6,0g hexaamoni heptamolipdat tetrahydrat (loại đặc biệt, do Wako Pure Chemical Industries, Ltd. sản xuất) và 0,24g bis[(+)-tartrato]diantimonat (III) kali trihydrat (loại đặc biệt, do Wako Pure Chemical Industries, Ltd. sản xuất) được hòa tan trong nước để điều chế dung dịch có tổng thể tích là khoảng 300ml, và 120ml của axit sulfuric(2+1) được thêm vào dung dịch để điều chế dung dịch có tổng thể tích là 500ml.

(c) Hỗn hợp dung dịch amoni molipdat-axit ascorbic (dung dịch tạo màu)

Dung dịch amoni molipdat và dung dịch axit ascobic (72g/L) được trộn với nhau với tỷ lệ thể tích của chúng là 5:1 (điều chế khi sử dụng).

(d) Dung dịch ion axit phosphoric đậm đặc tiêu chuẩn (50 $\mu$ g PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P/mL)

Kali dihydro phosphat (dùng cho dung dịch pH tiêu chuẩn) được đun nóng ở nhiệt độ 105 $\pm$ 2°C trong khoảng thời gian 2 giờ, và được làm lạnh trong bình làm khô. 0,2197g của nó được dùng để điều chế dung dịch có tổng thể tích

là 1000ml. Dung dịch được lưu giữ trong bóng tối ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 10°C.

(e) Dung dịch ion axit phosphoric tiêu chuẩn ( $1\mu\text{g PO}_4^{3-}\text{-P/mL}$ )

1ml của dung dịch ion axit phosphoric đậm đặc tiêu chuẩn ( $50\mu\text{g PO}_4^{3-}\text{-P/mL}$ ) được sử dụng để đổ đầy vào trong bình đo thể tích 50ml.

## (2) Đường cong tiêu chuẩn

(i) Nước được đổ vào trong các ống thử nghiệm sao cho thể tích của chúng là 5,0ml, 4,75ml, 4,5ml, 4,0ml, 3,0ml hoặc 0,0ml.

(ii) Dung dịch ion axit phosphoric tiêu chuẩn ( $1\mu\text{g PO}_4^{3-}\text{-P/mL}$ ) được thêm vào mỗi ống thử nghiệm của (i) theo từng thể tích 0,0ml, 0,25ml, 0,5ml, 1,0ml, 2,0ml hoặc 5,0ml để điều chế dung dịch có tổng thể tích là 5,0ml.

(iii) 400 $\mu\text{l}$  của dung dịch tạo màu được thêm vào, và hỗn hợp dung dịch được để yên trong khoảng 15 phút.

(iv) Khả năng thu bức xạ ở UV 880nm được xác định bằng quang phổ kế trong 30 phút.

## (3) Các bước xác định

(i) Sau khi mẫu (2,0g sữa bột gầy) được xác định, và được hòa tan trong nước (hoặc nước nóng), dung dịch được đổ đầy vào trong bình đo có thể tích 100ml. Dung dịch được để yên trong 1 giờ hoặc lâu hơn.

(ii) Khoảng 6ml của (i) được xác định vào trong VIVA SPIN 6 (5.000MWCO), và được xử lý siêu lọc bằng máy ly tâm (7.500 G, 30 phút, 25°C).

(iii) Nước lọc của (ii) được xác định một cách chính xác và được đổ vào bình đo có thể tích 100ml bằng pipet 1ml được đổ đầy bằng nước.

(iv) Dung dịch của (iii) được xác định, và được đổ vào ống thử nghiệm bằng pipet 5ml.

(v) 400µl của dung dịch tạo màu được thêm vào, và dung dịch được để yên trong khoảng 15 phút.

(vi) Khả năng thu bức xạ ở UV880nm được xác định bằng quang phổ kế trong 30 phút.

(vii) Lượng axit phosphoric tự do (µg/Vial) được xác định, đối chứng với đường cong tiêu chuẩn thu được trong (2). Tỷ lệ của axit phosphoric tự do chứa trong sữa bột gầy được xác định bằng công thức dưới đây, sử dụng lượng axit phosphoric tự do thu được.

% của axit phosphoric tự do trong sữa bột gầy = lượng axit phosphoric tự do (µg/Vial) x 10.000ml/5ml x 100 g/2g x 1 g/1.000.000µg

\* Phương pháp phân tích được thực hiện, đối chứng với phương pháp phân tích của ion phosphoric (xanh molipden (sự khử axit ascorbic) phép quang trắc hấp thụ) trong phương pháp thử nghiệm hợp phần thực phẩm và JIS K0102 (phương pháp thử nghiệm thải nhà máy, 1998).

Trong sáng chế, thành phần sữa trong đó hàm lượng axit phosphoric tự do được xác định bằng các phương pháp nêu trên là nhỏ hơn 0,25% trọng lượng, và hàm lượng protein trên thành phần sữa không béo rắn (SNF) là nhỏ hơn 35% trọng lượng được coi là ví dụ về thành phần sữa được ưu tiên sử dụng trong môi trường để nuôi cấy vi khuẩn axit lactic.

Hàm lượng protein trên thành phần sữa không béo rắn (SNF) có thể được tính toán bằng Công thức 1 dưới đây.

[Công thức 1]

$$\frac{\text{hàm lượng protein trong sữa bột gầy}}{\left( \begin{array}{c} \text{lượng sữa} \\ \text{bột gầy (100)} \end{array} \right) - (\text{lượng nước}) - (\text{lượng chất béo})} \times 100$$

Lượng protein, lượng chất béo và lượng nước có thể được tính, dựa trên phương pháp xác định được mô tả trong bảng tiêu chuẩn về chế phẩm thực

phẩm ở Nhật Bản (xuất bản lần thứ 5). Cụ thể hơn, lượng protein, lượng chất béo và lượng nước được xác định và tính theo phương pháp Kjeldahl, phương pháp Rhese Gotlieb, và tổn hao trọng lượng trong phương pháp làm sấy khô ở áp suất khí quyển hoặc áp suất giảm trong phương pháp trực tiếp hoặc phương pháp bổ sung bù làm khô, một cách lần lượt.

Mặt khác, trong sáng chế, phosphat sử dụng trong môi trường để nuôi cấy vi khuẩn axit lactic với thành phần sữa nêu trên bao gồm các phosphat hòa tan trong nước. Cụ thể hơn, natri dihydro phosphat, dinatri hydro phosphat, amoni dihydro phosphat, diamoni hydro phosphat, kali dihydro phosphat, dikali hydro phosphat, trinatri phosphat, trikali phosphat và tương tự là các ví dụ được ưu tiên. Tốt hơn là hai hoặc nhiều phosphat này được kết hợp để bổ sung vào môi trường có độ pH nằm trong khoảng trung tính (độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8).

Trong sáng chế, lượng bổ sung của phosphat được lấy để tạo ra nồng độ xấp xỉ với hàm lượng axit phosphoric tự do được tính bằng cách trừ đi nồng độ của axit phosphoric tự do chứa trong thành phần sữa từ hàm lượng axit phosphoric tự do hợp lý của môi trường được điều chế bằng cách sử dụng thành phần sữa trong đó hàm lượng axit phosphoric tự do nằm trong khoảng từ 0,25% đến 0,50% trọng lượng so với vật liệu nền.

Hơn nữa, nồng độ của thành phần sữa trong môi trường nằm trong khoảng từ 5 đến 30% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 20% trọng lượng.

Cụ thể là, lượng của phosphat được sử dụng trong sáng chế được xác định bằng việc tính toán sử dụng công thức 2 dưới đây. Lượng của phosphat được sử dụng có thể được chọn như là nồng độ phosphat, cho rằng tất cả các phân tử của axit phosphoric trong phosphat là các phân tử của axit phosphoric tự do.

[Công thức 2]

$$\frac{\left( \begin{array}{c} \text{nồng độ axit} \\ \text{phosphoric tự do} \\ \text{trong vật liệu nền} \end{array} - \begin{array}{c} \text{nồng độ axit} \\ \text{phosphoric tự} \\ \text{do trong thành} \\ \text{phần sữa} \end{array} \right) \times \left( \begin{array}{c} \text{nồng độ} \\ \text{môi trường} \end{array} \right) \times \left( \begin{array}{c} \text{phân tử lượng} \\ \text{của} \\ \text{phosphat*} \end{array} \right)}{100 \times \left( \begin{array}{c} \text{phân tử lượng của phospho} \end{array} \right)}$$

\* Nếu hai hoặc nhiều loại phosphat được sử dụng, phân tử lượng trung bình của chúng được sử dụng.

Ví dụ, lượng phosphat sử dụng hỗn hợp của dikali hydro phosphat (50%) và kali dihydro phosphat (50%) có phân tử lượng trung bình là 155 trong trường hợp mà thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do là 0,20% trọng lượng hoặc 0,24% trọng lượng được sử dụng điều chế môi trường có hàm lượng thành phần sữa là 20% trọng lượng có thể được xác định bằng tính toán dưới đây.

(1) Khi thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do là 0,20% trọng lượng được sử dụng:

- Giới hạn dưới

$$(0,25-0,20) \times 20/100 \times 155/31=0,05\%$$

- Giới hạn trên

$$(0,50-0,20) \times 20/100 \times 155/31=0,30\%$$

Cụ thể là, khi môi trường 20% trọng lượng được điều chế bằng cách sử dụng thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do là 0,20% trọng lượng, các phosphat có thể được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,30% trọng lượng. Cụ thể là, nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,30g của các phosphat nêu trên có thể được bổ sung vào 100g môi trường bao gồm 20% trọng

lượng thành phần sữa.

(2) Khi thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do là 0,24% trọng lượng được sử dụng:

- Giới hạn dưới

$$(0,25-0,24) \times 20/100 \times 155/31=0,01\%$$

- Giới hạn trên

$$(0,50-0,24) \times 20/100 \times 155/31=0,26\%$$

Cụ thể là, khi môi trường 20% trọng lượng được điều chế bằng cách sử dụng thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do là 0,24% trọng lượng, các phosphat có thể được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,26% trọng lượng. Cụ thể là, nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,26g của các phosphat nêu trên có thể được bổ sung vào 100g môi trường bao gồm 20% trọng lượng thành phần sữa.

Trong việc điều chế môi trường dùng để nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong sáng chế, nếu hàm lượng axit phosphoric tự do của môi trường thấp hơn hàm lượng axit phosphoric tự do hợp lý của môi trường mà được điều chế bằng cách sử dụng thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do là 0,25% trọng lượng so với vật liệu nền, số lượng vi khuẩn axit lactic trong môi trường chứa axit lactic thu được không thể được duy trì ổn định. Số lượng vi khuẩn axit lactic trong thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm môi trường này có thể giảm, do việc bảo quản thực phẩm và đồ uống này.

Mặt khác, nếu hàm lượng axit phosphoric tự do cao hơn hàm lượng axit phosphoric tự do hợp lý của môi trường mà được điều chế bằng cách sử dụng thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do là 0,50% trọng lượng so với vật liệu nền, độ ổn định của số lượng vi khuẩn axit lactic trong sản phẩm lên men chứa vi khuẩn axit lactic thu được tăng, tuy nhiên chất lượng của thực phẩm và đồ uống này bao gồm chúng có thể giảm, do sự kết khối hoặc kết tủa

trong quá trình bảo quản thực phẩm và đồ uống.

Hơn nữa, trong sáng chế, các hợp phần mà được sử dụng cho môi trường thông thường cho vi khuẩn axit lactic, và ngoại trừ thành phần sữa có hàm lượng axit phosphoric tự do nhỏ hơn 0,25% trọng lượng, và phosphat hòa tan trong nước có thể được bổ sung vào môi trường được dùng cho nuôi cấy vi khuẩn axit lactic. Ví dụ về các hợp phần này bao gồm các vitamin như vitamin A, các vitamin B, vitamin C, vitamin E và tương tự, các peptit khác nhau, axit amin, và muối của canxi, magie và tương tự. Lượng sử dụng của chúng không bị giới hạn cụ thể.

Vi khuẩn axit lactic được nuôi cấy sử dụng môi trường được điều chế trong phần trên của sáng chế. Vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là chúng thường được sử dụng trong sản xuất thực phẩm. Các ví dụ về chúng bao gồm giống vi khuẩn *Lactobacillus* như *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus yoghurti*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, *Lactobacillus johnsonii* và tương tự, giống vi khuẩn *Streptococcus* như *Streptococcus thermophilus* và tương tự, giống vi khuẩn *Lactococcus* như *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis* và tương tự, và giống vi khuẩn *Enterococcus* như *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* và tương tự.

Các điều kiện nuôi cấy của vi khuẩn axit lactic này là các điều kiện thích hợp để nuôi cấy thông thường của vi khuẩn axit lactic, và không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, điều kiện về nhiệt độ là nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C và khoảng thời gian từ 1 đến 7 ngày được ưu tiên. Hơn nữa, do điều kiện nuôi cấy ở thời điểm này, phương pháp thích hợp cho việc nuôi cấy vi khuẩn axit lactic được sử dụng có thể được lựa chọn tùy ý từ nuôi cấy để yên (still standing), nuôi cấy có

khuấy (agitation), nuôi cấy trên máy lắc (shaking), nuôi cấy sục khí (aeration) và tương tự.

Bản thân môi trường tạo ra bằng phương pháp nuôi cấy của sáng chế hoặc sau khi áp dụng quy trình tiệt trùng để sử dụng làm thực phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm, dược phẩm và tương tự. Môi trường có thể được sử dụng độc lập, hoặc trộn với các hợp phần tùy ý. Hơn nữa, thể nấm có thể thu thập từ môi trường và rửa bằng phương tiện như ly tâm hoặc tương tự. Hơn nữa, phương pháp nuôi cấy của sáng chế có thể áp dụng vào sản xuất enzym thể nấm tạo ra bởi vi khuẩn axit lactic.

Khi môi trường tạo ra bằng phương pháp nuôi cấy của sáng chế được sử dụng làm thực phẩm hoặc đồ uống, môi trường có thể được kết hợp vào trong sữa lên men như loại nguyên chất, loại được tạo mùi, loại trái cây, loại ngọt, loại mềm, loại uống, loại rắn (cứng), loại đông đá hoặc tương tự, đồ uống, rượu kêfia, pho mát chứa vi khuẩn axit lactic hoặc tương tự.

Hơn nữa, khi nó được sử dụng làm thực phẩm hoặc đồ uống, chất tạo ngọt như xi-rô và tương tự, và các nguyên liệu thực phẩm khác, ví dụ, các hợp phần tùy ý như các loại đường, chất làm đặc, chất nhũ hóa, các vitamin và tương tự có thể được bổ sung vào làm thành phần mà được trộn với môi trường. Các ví dụ cụ thể về các nguyên liệu thực phẩm này bao gồm đường như sucroza, glucoza, fructoza, palatinoza, trehaloza, lactoza, xyloza, maltoza và tương tự, các rượu đường như sorbitol, xylitol, erytritol, lactitol, palatinit, xi-rô tinh bột lúa nếp cắt mạch, xi-rô tinh bột lúa nếp maltoza cắt mạch và tương tự, chất tạo ngọt có độ tạo ngọt cao như aspartam, thaumatin, sucralose, acesulfame K, cây cỏ ngọt và tương tự, chất làm đặc khác (chất làm ổn định) như thạch, gelatin, carrageenan, gôm guar, gôm xanthan, gôm pectin, gôm locust bean, gôm gellan, cacboxymetylxenluloza, đậu tương polysacarit, axit alginic propylen glycol và tương tự, chất nhũ hóa như sucroza axit béo este, glyxerin axit béo este, polyglyxerol axit béo este, sorbitan axit béo este, lecitin và tương tự, chất béo từ

sữa như kem, bơ, kem chua và tương tự, chất có tính axit như axit xitric, axit lactic, axit axetic, axit malic, axit tartaric, axit gluconic và tương tự, các vitamin như vitamin A, các vitamin B, vitamin C, vitamin E và tương tự, các khoáng chất như canxi, magie, kẽm, sắt, mangan và tương tự, chất điều vị loại vị sữa chua, vị quả mọng, vị cam, vị quả mọng qua, vị húng quế Nhật, vị cam quýt, vị táo, vị bạc hà, vị nho, vị mơ, vị lê, kem trứng sữa, đào, dưa hấu, chuối, trái cây nhiệt đới, thảo mộc, trà, cà phê và tương tự.

Việc sản xuất thực phẩm hoặc đồ uống sử dụng phương pháp nuôi cấy của sáng chế có thể thực hiện bằng các kỹ thuật thông thường, và và không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, phosphat được thêm vào sữa bột gầy mà có hàm lượng axit phosphoric tự do đã được xác định là nhỏ hơn 0,25% trọng lượng theo cách đáp ứng các điều kiện định trước trong điều chế môi trường, như được xác định trong yêu cầu bảo hộ, môi trường này được áp dụng quy trình tiệt trùng, vi khuẩn axit lactic được cấy truyền vào môi trường, và được nuôi cấy, và môi trường được đem đi xử lý đồng nhất để tạo ra sữa lên men. Tiếp theo, dung dịch xi-rô được điều chế riêng biệt được thêm vào sữa lên men, và được trộn. Hơn nữa, chất điều vị được thêm vào đó để tạo ra sản phẩm cuối cùng.

Tiếp theo, chi tiết sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn nữa dưới đây, dựa vào Các ví dụ và ví dụ thử nghiệm. Mặc dù vậy, sáng chế sẽ không bị giới hạn bởi các ví dụ và tương tự. Lưu ý là các giá trị phần trăm (%) đưa ra dưới đây là dựa trên trọng lượng, trừ khi có các thông báo khác.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### **Ví dụ thử nghiệm 1**

#### **Phân tích thành phần của thành phần sữa**

Hàm lượng axit phosphoric tự do và lượng protein của sữa bột gầy từ Úc sản xuất bởi Murray Goulburn Corporation (sau đây được gọi là “Mẫu”) được xác định.

## (1) Xác định hàm lượng axit phosphoric tự do

Hàm lượng axit phosphoric tự do của mẫu được xác định theo phương pháp được đã nêu trong bản mô tả sáng chế.

Kết quả là, hàm lượng axit phosphoric tự do là 0,23%.

## (2) Xác định lượng protein

Lượng protein của mẫu được tính bằng công thức 1 trong bản mô tả sáng chế sử dụng các giá trị phân tích dưới đây.

Lượng protein của sữa bột gầy: 32,8%

Lượng nước: 3,8%, Lượng chất béo: 0,6%

Kết quả là, hàm lượng protein trên thành phần sữa không béo rắn là 34,3%/SNF.

## Ví dụ 1

## Điều chế môi trường vi khuẩn axit lactic

Sữa bột gầy, các phosphat, và glucoza được hòa tan trong nước, và Mẫu của Ví dụ thử nghiệm 1 được sử dụng điều chế môi trường có thành phần được mô tả trong bảng 1. Lưu ý rằng lượng của phosphat sử dụng được chọn, cho rằng tất cả các phân tử axit phosphoric trong các phosphat là các phân tử của axit phosphoric tự do (sau đây, được chọn theo cách tương tự). Môi trường được tiệt trùng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 90 phút. Tiếp theo, *Lactobacillus casei* được đưa vào sao cho lượng của nó là 0,5% môi trường, và được nuôi cấy cho tới khi độ pH của môi trường lên khoảng 3,6, và độ pH và số lượng vi khuẩn axit lactic của môi trường vi khuẩn axit lactic thu được khi kết thúc nuôi cấy được xác định. Hơn nữa, 400ml xi-rô đường lỏng của glucoza và sucroza, và 1,5L nước tiệt trùng được bổ sung vào 600ml môi trường, và hỗn hợp được làm đồng nhất để tạo ra đồ uống vi khuẩn axit lactic (các sản phẩm và sản phẩm đối chứng). Độ pH và số lượng vi khuẩn axit lactic được xác định ngay lập tức sau

khi sản xuất đồ uống, và sau 14 ngày bảo quản ở nhiệt độ 10°C. Các kết quả được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

|                        |                                             | Sản phẩm          | Sản phẩm đối chứng |
|------------------------|---------------------------------------------|-------------------|--------------------|
| Thành phần môi trường  | Sữa bột gầy (Mẫu)                           | 16%               | 16%                |
|                        | Các phosphat*                               | 0,016%            | -                  |
|                        | Glucosa                                     | 3%                | 3%                 |
| Độ pH sau khi nuôi cấy |                                             | 3,57              | 3,57               |
| Số lượng vi khuẩn sống | Sau khi nuôi cấy                            | $1,0 \times 10^9$ | $4,1 \times 10^8$  |
|                        | Ngay lập tức sau khi việc sản xuất sản phẩm | $2,2 \times 10^8$ | $9,0 \times 10^7$  |
|                        | Sau 14 ngày bảo quản ở nhiệt độ 10°C        | $1,1 \times 10^8$ | $3,2 \times 10^7$  |

\* Hỗn hợp của dikali hydro phosphat (50%) và kali dihydro phosphat (50%)

Như thể hiện trong bảng 1, rõ ràng rằng số lượng vi khuẩn axit lactic trong đồ uống vi khuẩn axit lactic sản xuất bằng cách sử dụng môi trường tạo ra bằng việc nuôi cấy vi khuẩn axit lactic trong môi trường bao gồm chỉ thành phần sữa (Mẫu) có nồng độ axit phosphoric tự do nhỏ hơn 0,25% làm nguyên liệu giảm đáng kể sau khi bảo quản. Liên quan đến việc này, được cho là do số lượng vi khuẩn axit lactic trong môi trường tăng do bổ sung các phosphat vào môi trường bao gồm thành phần sữa này làm nguyên liệu. Hơn nữa, hiệu quả ổn định số lượng vi khuẩn axit lactic được ghi nhận trong đồ uống vi khuẩn axit lactic sản xuất bằng cách sử dụng môi trường này.

## Ví dụ 2

## Sản xuất đồ uống vi khuẩn axit lactic

Sữa bột gầy, các phosphat, và glucoza được hòa tan trong nước, và Mẫu của Ví dụ thử nghiệm 1 được sử dụng để điều chế môi trường có thành phần được mô tả trong bảng 2. Môi trường này được tiệt trùng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 90 phút, *Lactobacillus casei* được đưa vào sao cho lượng của nó là 0,5% mỗi môi trường, và được nuôi cấy cho tới khi độ pH của môi trường lên khoảng 3,6 để tạo ra môi trường vi khuẩn axit lactic (A đến C), và độ pH và số lượng vi khuẩn axit lactic của môi trường (A đến C) khi kết thúc nuôi cấy được xác định. Các kết quả được thể hiện trong bảng 2. Tiếp theo, 400ml xi-rô đường lỏng của glucoza và sucroza, và 1,5L nước tiệt trùng được bổ sung vào 600ml môi trường. Sau khi làm đồng nhất hỗn hợp, hỗn hợp được đổ vào trong bình chứa thể tích 65ml để sản xuất đồ uống vi khuẩn axit lactic (các sản phẩm từ 1 đến 3). Độ pH và số lượng vi khuẩn axit lactic được xác định ngay lập tức sau khi sản xuất đồ uống, và sau thời gian 14 ngày bảo quản ở nhiệt độ 10°C. Về đồ uống vi khuẩn axit lactic sau khi bảo quản, lượng của chất kết tủa được ghi nhận bằng cách nhìn, và lượng của chất kết tủa và nước sữa tách ra (lượng của nước tách ra) được xác định. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Hơn nữa, lượng của chất kết tủa được đánh giá bằng cách nhìn, dựa trên các tiêu chuẩn dưới đây.

## Tiêu chuẩn đánh giá

## 1. Chất kết tủa

++ : Lượng rất lớn của chất kết tủa

+ : Chất kết tủa được ghi nhận

± : Lượng rất nhỏ của chất kết tủa (không có vẩn đục trong sản phẩm cuối cùng)

- : không có

Bảng 2

|                                                                   |                   | A                 | B                 | C                 |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Thành phần môi trường                                             | Sữa bột gầy (Mẫu) | 16%               | 16%               | 16%               |
|                                                                   | Các phosphat*     | 0,016%            | 0,116%            | 0,216%            |
|                                                                   | Glucosa           | 3%                | 3%                | 3%                |
| Hàm lượng axit phosphoric tự do trong môi trường (giá trị hợp lý) |                   | 0,25%             | 0,375%            | 0,50%             |
| Độ pH sau khi nuôi cấy                                            |                   | 3,58              | 3,59              | 3,60              |
| Số lượng vi khuẩn sống khi kết thúc nuôi cấy                      |                   | $1,0 \times 10^9$ | $1,3 \times 10^9$ | $1,2 \times 10^9$ |

\*hỗn hợp của dikali hydro phosphat (50%) và kali dihydro phosphat (50%)

Bảng 3

|                                             |                               | Sản phẩm 1        | Sản phẩm 2        | Sản phẩm 3        |
|---------------------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Môi trường vi khuẩn axit lactic             |                               | A                 | B                 | C                 |
| Ngay lập tức sau khi việc sản xuất sản phẩm | pH                            | 3,78              | 3,78              | 3,79              |
|                                             | Số lượng vi khuẩn sống        | $2,0 \times 10^8$ | $2,4 \times 10^8$ | $2,5 \times 10^8$ |
| Sau 14 ngày bảo quản ở 10°C                 | pH                            | 3,56              | 3,57              | 3,58              |
|                                             | Số lượng vi khuẩn sống        | $1,2 \times 10^8$ | $1,3 \times 10^8$ | $1,2 \times 10^8$ |
|                                             | Chất kết tủa (bằng cách nhìn) | ±                 | ±                 | ±                 |
|                                             | Lượng chất kết tủa*           | 0,94%             | 0,95%             | 1,03%             |
|                                             | Nước sữa tách ra              | 6mm               | 6mm               | 6mm               |

Lưu ý: Tỷ lệ của lượng chất kết tủa so với lượng chất lỏng được đổ vào được tính bằng công thức dưới đây:

$$D-C/A-C$$

D: Trọng lượng của bình chứa và chất kết tủa

(Trọng lượng của bình chứa với chất kết tủa được xác định sau khi phần chứa bên trong bình chứa được loại bỏ một cách nhẹ nhàng, và bình chứa được úp ngược trong thời gian 1 phút.)

C: Trọng lượng của bình chứa

A: Trọng lượng của bình chứa và chất lỏng được đổ vào

Như thể hiện trong bảng 3, số lượng vi khuẩn axit lactic trong đồ uống axit lactic thu được bao gồm vi khuẩn axit lactic có thể được duy trì ổn định bằng cách bổ sung các phosphat trong trường hợp mà thành phần sữa có nồng độ axit phosphoric tự do nhỏ hơn 0,25% được sử dụng làm nguyên liệu.

Hơn nữa, đồ uống axit lactic thu được có hương vị tuyệt vời. Không có chất kết tủa và sự phân tách được ghi nhận trong đồ uống sau khi bảo quản, và đồ uống có độ ổn định của sản phẩm tuyệt vời.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic bao gồm bước cấy truyền vi khuẩn axit lactic vào môi trường chứa thành phần sữa có nồng độ axit phosphoric tự do nhỏ hơn 0,25% trọng lượng và phosphat, trong đó thành phần sữa là sữa bột gầy, trong đó nồng độ của thành phần sữa trong môi trường nằm trong khoảng từ 5 đến 30% trọng lượng, trong đó phosphat được bổ sung với lượng để cùng với thành phần sữa tạo ra nồng độ axit phosphoric tự do trong môi trường nằm trong khoảng từ 0,25% đến 0,50% trọng lượng, trong đó nồng độ axit phosphoric tự do trong vật liệu nền nằm trong khoảng từ 0,25% đến 0,50% trọng lượng và trong đó lượng bổ sung phosphat được xác định bởi công thức 2:

[Công thức 2]

$$\frac{\left( \begin{array}{c} \text{nồng độ axit} \\ \text{phosphoric tự do} \\ \text{trong vật liệu nền} \end{array} - \begin{array}{c} \text{nồng độ axit} \\ \text{phosphoric tự} \\ \text{do trong thành} \\ \text{phần sữa} \end{array} \right) \times \left( \begin{array}{c} \text{nồng độ} \\ \text{môi trường} \end{array} \right) \times \left( \begin{array}{c} \text{phân tử lượng} \\ \text{của} \\ \text{phosphat*} \end{array} \right)}{100 \times \left( \begin{array}{c} \text{phân tử lượng của phospho} \end{array} \right)}$$

\* nếu hai hoặc nhiều loại phosphat được sử dụng, phân tử lượng trung bình của chúng được sử dụng.

2. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic theo điểm 1, trong đó hàm lượng protein theo thành phần sữa không béo ở dạng rắn (solid nonfat milk – SNF) của thành phần sữa nhỏ hơn 35% trọng lượng.

3. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phosphat tan được trong nước.

4. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vi khuẩn axit lactic là *Lactobacillus casei*.

5. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm phương pháp nuôi cấy vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
6. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men theo điểm 5, trong đó sản phẩm sữa lên men là đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic.