



(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)



1-0024154

(51)⁷ C12R 1/225; C12R 1/46; A23C 9/127; (13) B
C12N 9/90

(21) 1-2013-01474

(22) 21/10/2011

(86) PCT/EP2011/068478 21/10/2011

(87) WO2012/052557 26/04/2012

(30) 10188511.9 22/10/2010 EP

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/07/2013 304A

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

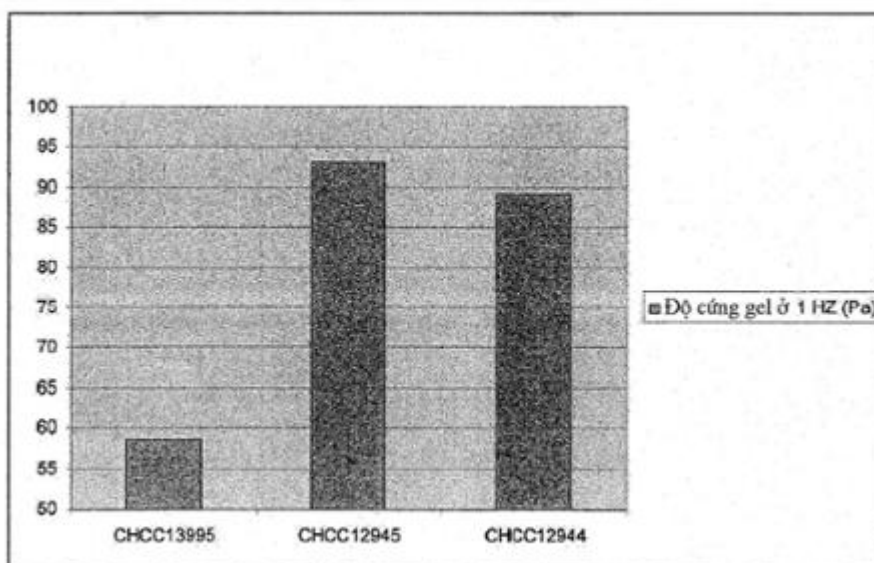
Boege Alle 10-12, DK-2970 Hoersholm, Denmark

(72) KIBENICH, Annette (DK); SOERENSEN, Kim, Ib (DK); JOHANSEN, Eric (CA).

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

(54) CHŨNG VI KHUẨN AXIT LACTIC TẠO CẤU TRÚC, PHƯƠNG PHÁP THU NHẬN, CHẾ PHẨM VÀ SẢN PHẨM SỮA CHỨA CHÚNG, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM SỮA

(57) Sáng chế đề cập đến thể đột biến kháng thuốc kháng sinh D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng của vi khuẩn axit lactic, thể đột biến này khi phát triển trong sữa tạo ra cấu trúc được cải thiện đồng thời duy trì được các đặc tính sinh trưởng khác của chủng bố mẹ. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa thể đột biến này, và các sản phẩm sữa lên men bằng vi khuẩn axit lactic kháng D-xycloserin và/hoặc kháng sinh tương đương về mặt chức năng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể đột biến của vi khuẩn axit lactic, như *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*, có tính kháng kháng sinh D-xycloserin và/hoặc các kháng sinh tương đương về mặt chức năng, và khi phát triển trong sữa tạo ra cấu trúc cải thiện đồng thời duy trì được các đặc tính sinh trưởng khác của chủng bố mẹ. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến giống cấy, như giống khởi động (men cái), chứa thể đột biến này, và các sản phẩm sữa lên men bằng giống cấy này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

Trong số các vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, có thể kể đến các giống *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* và *Bifidobacterium*. Vi khuẩn axit lactic thuộc các giống này được sử dụng một cách rộng rãi ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp với các vi khuẩn khác như *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* để sản xuất các sản phẩm thực phẩm, cụ thể là các sản phẩm lên men. Đặc biệt, chúng được sử dụng trong pha chế men để dùng trong sản xuất sữa lên men, ví dụ sữa chua. Một số vi khuẩn trong số chúng đóng vai trò chi phối sự phát triển cấu trúc của sản phẩm lên men. Đặc tính này có liên quan mật thiết với quá trình sản sinh polysacarit.

Xu hướng hiện nay trong sữa chua là hương vị dịu và cấu trúc đặc. Ngày nay, điều này đạt được bằng cách sử dụng giống cấy tạo ra hương vị dịu và bổ sung chất làm đặc hoặc protein để thu được độ đặc mong muốn. Các nhà sản xuất sữa chua mong muốn làm sao có thể sản xuất ra sữa chua có các đặc tính này mà không cần bổ sung chất làm đặc. Điều này sẽ giúp họ giảm chi phí và

mang lại một nhãn sản phẩm sạch hơn. Một cách vô cùng hấp dẫn để đạt được điều này là cần phải có giống khởi động tạo ra cấu trúc đặc.

Để đáp ứng yêu cầu của ngành công nghiệp, cần thu được chủng vi khuẩn axit lactic tạo cấu trúc mới, cụ thể là *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*, dùng để tạo cấu trúc cho các sản phẩm thực phẩm. Cụ thể là cần có chủng *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* tạo cấu trúc mới có thể được sử dụng cùng với chủng *Streptococcus thermophilus* tạo cấu trúc mới.

Thể đột biến kháng D-xycloserin của một số vi khuẩn khác nhau đã được mô tả nhưng chưa từng biết rằng các thể đột biến này có thể được sử dụng để cải thiện cấu trúc cho sản phẩm sữa. Thể đột biến của *Streptococcus thermophilus* cũng như của *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* chưa từng được mô tả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng nhóm thể đột biến kháng D-xycloserin của vi khuẩn axit lactic tạo ra ứng suất cắt và/hoặc độ cứng gel cao hơn so với chủng bố mẹ khi vi khuẩn này được sử dụng để lên men sữa.

Tác giả sáng chế đã tìm ra phương pháp thu nhận chủng vi khuẩn axit lactic tạo cấu trúc kháng thuốc kháng sinh D-xycloserin và/hoặc các kháng sinh tương đương về mặt chức năng và nhóm các chủng vi khuẩn axit lactic kháng D-xycloserin thuộc loài *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus* có các đặc tính tạo cấu trúc tốt.

Phù hợp với những phát hiện đáng ngạc nhiên nêu trên, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn axit lactic tạo cấu trúc, như chủng *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*, kháng D-xycloserin và/hoặc kháng thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng và phương pháp thu nhận chủng này. Tiếp theo, sáng chế đề cập đến giống cấy, như giống khởi động, chứa thể đột biến và các sản phẩm từ sữa, như sản phẩm sữa lên men được lên men bằng giống cấy này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 mô tả quá trình axit hóa (sự thay đổi độ pH theo thời gian) trong sữa ở 43°C khi dùng chủng bố mẹ *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* CHCC13995 và hai thể đột biến D-xycloserin của CHCC13995 là CHCC12944 và CHCC12945.

Hình 2 mô tả ứng suất cắt (tính theo (Pa) được đo ở tốc độ cắt 300 1/s) trong sữa nguyên kem với 2% sữa bột gầy ở 43°C khi dùng chủng bố mẹ *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* CHCC13995 và hai thể đột biến D-xycloserin của CHCC13995 là CHCC12944 và CHCC12945.

Hình 3 mô tả độ cứng gel (tính theo (Pa) được đo ở tốc độ cắt 300 1/s) trong sữa nguyên kem với 2% sữa bột gầy ở 43°C khi dùng chủng bố mẹ *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* CHCC13995 và hai thể đột biến D-xycloserin của CHCC13995 là CHCC12944 và CHCC12945.

Hình 4 mô tả ứng suất cắt (tính theo (Pa) được đo ở tốc độ cắt 300 1/s) trong sữa nguyên kem với 2% sữa bột gầy ở 43°C khi dùng chủng bố mẹ *Streptococcus thermophilus* CHCC13994 và 2 thể đột biến D-xycloserin của CHCC13994 là CHCC13235 và CHCC13236.

Hình 5 mô tả độ cứng gel (tính theo (Pa), được đo ở tốc độ cắt 300 1/s) trong sữa nguyên kem với 2% sữa bột gầy ở 43°C khi dùng chủng bố mẹ *Streptococcus thermophilus* CHCC13994 và 2 thể đột biến D-xycloserin của CHCC13994 là CHCC13235 và CHCC13236.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

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

Thuật ngữ "sữa" được hiểu là chất được tiết ra ở dạng sữa thu được bằng cách vắt sữa động vật có vú bất kỳ, như bò, cừu, dê, trâu hoặc lạc đà. Theo một

phương án được ưu tiên, sữa này là sữa bò. Thuật ngữ sữa cũng bao gồm dung dịch protein/chất béo được tạo ra từ nguyên liệu thực vật, ví dụ như sữa đậu nành.

Thuật ngữ "cơ chất sữa" có thể là nguyên liệu sữa thô và/hoặc đã chế biến có thể được đưa đi lên men theo phương pháp theo sáng chế. Do vậy, cơ chất sữa có thể sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch/huyền phù của sữa hoặc sản phẩm giống sữa bất kỳ chứa protein, như sữa nguyên kem hoặc sữa có hàm lượng chất béo thấp, sữa gầy, nước sữa còn lại sau khi tách bơ ra khỏi sữa, sữa bột hoàn nguyên, sữa đặc, sữa bột, nước sữa, váng sữa hòa tan, lactoza, nước cái từ quá trình kết tinh lactoza, dịch đặc protein nước sữa, hoặc kem. Hiển nhiên là, cơ chất sữa có thể có nguồn gốc từ động vật có vú bất kỳ, ví dụ như là sữa hầu như tinh khiết của động vật có vú, hoặc sữa bột hoàn nguyên.

Tốt hơn là, ít nhất một phần protein trong cơ chất sữa là protein tự nhiên có trong sữa, như casein hoặc protein nước sữa. Tuy nhiên, một phần protein có thể là protein không có trong tự nhiên trong sữa.

Trước khi lên men, cơ chất sữa có thể được đồng hoá và được thanh trùng theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực.

"Đồng hóa" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là trộn kỹ để thu được huyền phù hoặc nhũ tương có thể hòa tan. Nếu bước đồng hóa được thực hiện trước khi lên men, nó có thể được thực hiện sao cho chất béo trong sữa được phá vỡ thành các kích cỡ nhỏ hơn để nó không còn tách riêng ra khỏi sữa. Bước này có thể được thực hiện bằng cách cho sữa đi qua các vòi phun nhỏ ở áp suất cao.

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

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

Các quy trình lên men được sử dụng để sản xuất các sản phẩm sữa lên men là đã biết và chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách lựa chọn các điều kiện quy trình thích hợp như nhiệt độ, oxy, số lượng và đặc tính của vi sinh vật và thời gian quy trình. Hiển nhiên là, các điều kiện lên men được lựa

chọn sao cho hỗ trợ đạt được mục đích của sáng chế, tức là để thu được sản phẩm sữa ở dạng rắn hoặc dạng lỏng (sản phẩm sữa lên men).

Trong bản mô tả này, men cái dùng cho sữa chua là giống cấy vi khuẩn bao gồm ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus*. Theo đó, "sữa chua" dùng để chỉ sản phẩm sữa lên men thu được bằng cách cấy và lên men sữa với hỗn hợp gồm chủng *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và chủng *Streptococcus thermophilus*.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "ứng suất cắt" xác định độ nhớt. Độ nhớt (đơn vị là Pa s) được định nghĩa là ứng suất cắt (Pa) / tốc độ cắt (1/s).

Trị số ứng suất cắt được báo cáo ở dạng tiêu chuẩn trong sáng chế ở tốc độ cắt = 300 1/s. Các thử nghiệm cảm quan đã chỉ ra rằng (dữ liệu không được chỉ ra) tương quan tốt nhất giữa phép đo lưu biến và độ nhớt cảm quan /độ đặc khi nuốt được phát hiện khi sử dụng độ nhớt đo ở tốc độ cắt 300 1/s.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng" cần phải hiểu là thuốc kháng sinh có cùng phương thức tác dụng hoặc có cùng đích với D-xycloserin, như ví dụ như các chất ức chế D-alanyl-D-alanine ligaza khác, ví dụ như vancomycin (Tytgat và đồng tác giả (2009), Curr. Med. Chem. 16(20) : 2566-2580) và các chất ức chế D-alanine raxemaza khác, ví dụ như O-carbamoyl-D-serin, alaphosphin và haloalanin (Holtje (2004), The Desk Encyclopedia of Microbiology: 239-258).

Thuật ngữ "kháng D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng" trong bản mô tả có nghĩa là một chủng vi khuẩn đột biến cụ thể không bị tiêu diệt, hoặc bị tiêu diệt chậm hơn đáng kể so với chủng chưa gây đột biến tương ứng mà từ đó chủng đột biến này được tạo ra khi có mặt thuốc kháng sinh này trong môi trường nuôi cấy. Tùy thuộc vào nồng độ của chất kháng sinh trong môi trường nuôi cấy, tính kháng cũng có thể được thể hiện thông qua các đặc tính sinh trưởng biến đổi của chủng đột biến và chủng chưa gây đột biến. Ví dụ, nồng độ thuốc kháng sinh thấp trong môi trường nuôi cấy sẽ ngăn ngừa hoặc làm giảm đáng kể sự sinh trưởng của chủng chưa gây đột biến trong khi sự sinh trưởng của chủng đột biến không bị ảnh hưởng. Tốt hơn là, chủng chưa đột biến có thể được sử dụng làm chủng đối chứng miễn cảm trong đánh giá tính kháng bao gồm chủng CHCC13995 và CHCC13994.

Ví dụ 1 và 2 của sáng chế tương ứng minh họa sự phân lập chủng đột biến kháng D-xycloserin của *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*. Dựa trên cơ sở các phương pháp được đề cập trong Ví dụ 1 và 2, chuyên gia trong lĩnh vực sẽ dễ dàng có thể lựa chọn lượng D-xycloserin hoặc lượng thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng hữu hiệu đối với mỗi chủng bố mẹ chưa đột biến để tiêu diệt phần lớn các tế bào

thuộc chủng bố mẹ trong khi không tiêu diệt hoặc tiêu diệt chậm hơn đáng kể chủng đột biến kháng D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể đột biến" cần phải hiểu là chủng thu được từ, hoặc chủng có thể thu được từ chủng theo sáng chế (hoặc chủng bố mẹ) bằng cách ví dụ như kỹ thuật di truyền, xử lý bằng phóng xạ và/hoặc bằng hóa chất. Thể đột biến này cũng có thể là thể đột biến xảy ra ngẫu nhiên. Tốt hơn nếu thể đột biến này là thể đột biến tương đương về mặt chức năng, ví dụ như thể đột biến có các đặc tính (ví dụ như liên quan đến độ nhớt, độ cứng gel, hậu vị, hương vị, quá trình axit hóa sau đó, tốc độ axit hóa, và/hoặc độ khỏe của thể thực khuẩn) về cơ bản giống, hoặc được cải thiện, so với chủng bố mẹ. Thể đột biến như vậy là một phần của sáng chế. Đặc biệt là, thuật ngữ "thể đột biến" để chỉ chủng thu được bằng cách cho chủng theo sáng chế qua bước xử lý đột biến theo cách thông thường bao gồm xử lý bằng hóa chất gây đột biến như etan metan sulphonat (EMS) hoặc N-metyl-N'-nitro-N-nitroguanidin (NTG), ánh sáng UV hoặc để quá trình đột biến xảy ra một cách ngẫu nhiên. Thể đột biến có thể được cho qua một số bước xử lý đột biến (một bước xử lý cần phải hiểu là một bước gây đột biến, theo sau là bước sàng lọc/chọn lọc), nhưng tốt hơn là không lớn hơn 20, hoặc không lớn hơn 10, hoặc không lớn hơn 5, bước xử lý (hoặc bước sàng lọc/chọn lọc) được thực hiện. Ở thể đột biến được ưu tiên theo sáng chế, ít hơn 1%, hoặc ít hơn 0,1%, ít hơn 0,01%, ít hơn 0,001% hoặc thậm chí ít hơn 0,0001% nucleotit trong bộ gen vi khuẩn đã được thay bằng nucleotit khác, hoặc bị khuyết, so với chủng bố mẹ.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "biến dị" cần phải hiểu là chủng tương đương về mặt chức năng với chủng theo sáng chế, ví dụ như, có các đặc tính (ví dụ như liên quan đến độ nhớt, độ cứng gel, hậu vị, hương vị, quá trình axit hóa sau đó, tốc độ axit hóa, và/hoặc độ mạnh của thể thực khuẩn) về cơ bản giống hoặc cải tiến so với chủng theo sáng chế. Các biến dị này, có thể được xác định 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 từ tương tự trong nội dung của 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 số ít lẫn số nhiều, trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả hoặc mẫu thuẫn một cách rõ ràng với nội dung bản mô tả. Các thuật ngữ "bao gồm", "có", "gồm" và "chứa" được hiểu như là thuật ngữ không giới hạn (tức là, có nghĩa "bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,") trừ khi có chỉ dẫn khác. Việc nêu các trị số riêng rẽ nằm trong khoảng này, trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả, và mỗi trị số riêng rẽ được kết hợp vào bản mô tả như thể nó được nêu một cách riêng rẽ trong bản mô tả này. Tất cả các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo trình tự thích hợp bất kỳ trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả hoặc mẫu thuẫn một cách rõ ràng với nội dung bản mô tả. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ được

lấy làm ví dụ (ví dụ, "như") được nêu trong bản mô tả này, chỉ nhằm minh họa rõ hơn sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi có chỉ dẫn khác. Không có cách diễn đạt nào trong bản mô tả được hiểu là chỉ ra yếu tố không được bảo hộ bất kỳ cần thiết để thực hiện sáng chế.

Việc thực hiện và các khía cạnh của sáng chế

D-xycloserin (D-4-amino-isoxazolidon) là thuốc kháng sinh ức chế alanin raxemaza, D-alanyl-D-alanin ligaza, D-alanylalanin syntaza và D-alanin permeaza gây ra sự phân giải tế bào. D-alanin raxemaza là cần thiết để sản xuất D-alanin – một phần không thể thiếu của lớp peptidoglycan của thành tế bào. Thể đột biến của *Mycobacterium* kháng D-xycloserin sản sinh D-alanin quá mức nhờ việc gia tăng sự biểu hiện của gen D-alanin raxemaza (Caceres và đồng tác giả (1997), J. Bacteriol. 179: 5046-5055). Do vậy, các tác giả sáng chế dự tính rằng có thể phân lập thể đột biến ngẫu nhiên của chủng vi khuẩn axit lactic mà có khả năng sản sinh D-alanin cao hơn. Các thể đột biến như vậy được phân lập và được mô tả đặc trưng.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng các kháng sinh khác có cùng phương thức tác dụng hoặc cùng đích với D-xycloserin có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc cùng với D-xycloserin để phân lập thể đột biến thuộc loại được nêu trong bản mô tả. Vì vậy, sáng chế này cũng bao hàm việc sử dụng các kháng sinh tương đương về mặt chức năng như vậy, như các chất ức chế D-alanyl-D-alanin ligaza hoặc D-alanin raxemaza khác.

Thuật ngữ "chất kháng sinh tương đương về mặt chức năng với D-xycloserin" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm hợp chất bất kỳ cản trở quá trình tổng hợp D-alanin, quá trình vận chuyển D-alanin vào tế bào, quá trình điều chế D-alanyl-D-alanin từ D-alanin hoặc quá trình kết hợp D-alanyl-D-alanin vào đơn vị kết cấu của peptidoglycan polyme. Các kháng sinh như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng sinh ức chế các enzym D-alanin-raxemaza, D-alanyl-D-alanin ligaza, D-alanylalaninse syntaza và D-alanin permeaza. Các kháng sinh tương đương về mặt chức năng với D-xycloserin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vancomyxin, O-carbamoyl-D-serin, alaphosphin và haloalanin.

Đã phát hiện ra rằng một số thể đột biến kháng D-xycloserin của *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus* khi phát triển trong sữa tạo ra cấu trúc cải thiện so với chủng bố mẹ đồng thời duy trì được các đặc tính sinh trưởng khác của chủng bố mẹ.

Phù hợp với những phát hiện đáng ngạc nhiên nêu trên, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phương pháp thu nhận chủng vi khuẩn axit lactic tạo cấu trúc. Phương pháp này bao gồm các bước:

a) tạo ra vi khuẩn axit lactic chủng bố mẹ;

b) phân lập thể đột biến kháng D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng với D-xycloserin của chủng bố mẹ; và

c) chọn lọc thể đột biến nếu khi phát triển trong sữa nó tạo ra cấu trúc tốt hơn, như được xác định bởi ứng suất cắt lớn hơn và/hoặc độ cứng gel lớn hơn, so với chủng bố mẹ, bằng cách đo thu được chủng vi khuẩn axit lactic tạo cấu trúc.

Do vậy, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp thu nhận thể đột biến vi khuẩn axit lactic tạo ra ứng suất cắt và hoặc/độ cứng gel tăng khi phát triển trong sữa, phương pháp này bao gồm các bước:

a) tạo ra vi khuẩn axit lactic chủng bố mẹ;

b) phân lập thể đột biến kháng D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng D-xycloserin của chủng bố mẹ; và

c) chọn lọc thể đột biến nếu nó tạo ra cấu trúc tốt hơn, như được xác định bởi ứng suất cắt lớn hơn và/hoặc độ cứng gel lớn hơn, so với chủng bố mẹ khi phát triển trong sữa, bằng cách đo

thu nhận thể đột biến vi khuẩn axit lactic tạo ra ứng suất cắt và/hoặc độ cứng gel tăng khi phát triển trong sữa.

Việc tạo ra cấu trúc tốt hơn khi sử dụng thể đột biến đã chọn lọc so với chủng bố mẹ, như được xác định bởi ứng suất cắt lớn hơn và/hoặc độ cứng gel lớn hơn, xảy ra ở cả sữa nguyên kem và sữa có hàm lượng chất béo thấp.

Theo một phương án được ưu tiên, sữa là sữa bò. Tốt hơn là, sữa là sữa bò nguyên kem.

Theo một phương án được ưu tiên, chủng vi khuẩn axit lactic bố mẹ là vi khuẩn axit lactic được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*. Tuy nhiên, việc sử dụng các vi khuẩn axit lactic khác, như vi khuẩn *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, và *Bifidobacterium spp.*, cũng là một phần của sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, thể đột biến thu được từ bước ủ chủng vi khuẩn axit lactic bố mẹ trong/trên môi trường sinh trưởng chứa D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng D-xycloserin và phân lập thể đột biến của chủng bố mẹ mà không bị tiêu diệt bởi D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng D-xycloserin hoặc bị tiêu diệt chậm hơn đáng kể so với phần lớn các tế bào không đột biến được thử nghiệm. Tuy nhiên, sáng chế bao gồm những cách phân lập thể đột biến kháng D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng D-xycloserin khác mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết. Do đó, chủng bố mẹ

được sử dụng trong phương pháp theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế là chủng không kháng D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng D-xycloserin (hoặc kháng D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng D-xycloserin kém hơn) .

Theo một phương án, thể đột biến có thể là thể đột biến ngẫu nhiên kháng D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng D-xycloserin.

Theo một phương án khác, phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm bước gây đột biến (ví dụ như bằng cách điều trị bằng hóa chất hoặc điều trị bằng phóng xạ, hoặc bằng các kỹ thuật di truyền) chủng bố mẹ, ví dụ như trước hoặc trong bước b.

Do vậy, theo một phương án, thể đột biến có thể thu được bằng cách sinh đột biến chủng bố mẹ bằng các phương pháp ví dụ như điều trị bằng hóa chất hoặc điều trị bằng phóng xạ, hoặc thể đột biến thu được bằng các kỹ thuật di truyền.

Thuật ngữ "cấu trúc" hoặc "vị giác" có nghĩa là tương tác về mặt vật lý và hóa học của sản phẩm trong miệng.

Các phương pháp xác định cấu trúc của sữa bao gồm đo ứng suất cắt (độ nhớt) hoặc độ cứng gel của sữa đã lên men và các phương pháp này sẵn có và đã biết trong lĩnh vực và được nêu làm ví dụ dưới đây.

Thể đột biến được chọn lọc, ở bước c), nếu nó tạo ra cấu trúc tốt hơn, như được xác định bởi ứng suất cắt lớn hơn và/hoặc độ cứng gel lớn hơn, trong sữa đã lên men so với chủng bố mẹ khi được cấy với cùng một lượng như chủng bố mẹ, chẳng hạn như với lượng ít nhất là 10^4 tế bào trong một ml.

Theo một phương án được ưu tiên, thể đột biến tạo ra độ nhớt trong sữa được đo dưới dạng ứng suất cắt (Pa) ở tốc độ cắt 300 1/s cao hơn ít nhất khoảng 5%, cao hơn ít nhất khoảng 10%, cao hơn ít nhất khoảng 15%, cao hơn ít nhất khoảng 20%, cao hơn ít nhất khoảng 25%, cao hơn ít nhất khoảng 30%, cao hơn ít nhất khoảng 35%, cao hơn ít nhất khoảng 40%, cao hơn ít nhất khoảng 50%, so với độ nhớt được tạo ra bởi chủng bố mẹ.

Theo một phương án ưu tiên khác, thể đột biến tạo ra độ cứng gel trong sữa cao hơn ít nhất khoảng 5%, cao hơn ít nhất khoảng 10%, cao hơn ít nhất khoảng 15%, cao hơn ít nhất khoảng 20%, cao hơn ít nhất khoảng 25%, cao hơn ít nhất khoảng 30%, cao hơn ít nhất khoảng 35%, cao hơn ít nhất khoảng 40%, cao hơn ít nhất khoảng 50%, so với độ cứng gel được tạo ra bởi chủng bố mẹ.

Tốt hơn là, thể đột biến tạo ra độ nhớt trong sữa bò nguyên kem được bổ sung 2% sữa bột gây lớn hơn khoảng 105Pa được đo dưới dạng ứng suất cắt (Pa) ở tốc độ cắt 300 1/s sau 12 giờ sinh trưởng trong sữa ở 37°C khi được cấy

với lượng ít nhất là 10^4 tế bào trong một ml sữa trong trường hợp chủng *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và lớn hơn khoảng 75Pa được đo dưới dạng ứng suất cắt (Pa) ở tốc độ cắt 300 1/s sau 12 giờ sinh trưởng trong sữa ở 37°C khi được cấy với lượng ít nhất là 10^4 tế bào trong một ml sữa trong trường hợp chủng *Streptococcus thermophilus*.

Theo một phương án được ưu tiên, thể đột biến tạo ra độ cứng gel trong sữa bò nguyên kem được bổ sung 2% sữa bột gây lớn hơn khoảng 80Pa sau 12 giờ sinh trưởng trong sữa ở 37°C khi được cấy với lượng ít nhất là 10^4 tế bào trong một ml sữa trong trường hợp chủng *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và lớn hơn khoảng 140Pa sau 12 giờ sinh trưởng trong sữa ở 37°C khi được cấy với lượng ít nhất là 10^4 tế bào trong một ml sữa trong trường hợp chủng *Streptococcus thermophilus*.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn axit lactic có thể thu được theo phương pháp theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, chủng vi khuẩn axit lactic là chủng được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*.

Theo một phương án ưu tiên khác, chủng vi khuẩn axit lactic tạo ra độ nhớt trong sữa bò nguyên kem được bổ sung 2% sữa bột gây lớn hơn khoảng 105Pa được đo dưới dạng ứng suất cắt (Pa) ở tốc độ cắt 300 1/s sau 12 giờ sinh trưởng trong sữa ở 37°C khi được cấy với lượng 10^4 tế bào trong một ml sữa trong trường hợp chủng *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và lớn hơn khoảng 75Pa được đo dưới dạng ứng suất cắt (Pa) ở tốc độ cắt 300 1/s sau 12 giờ sinh trưởng trong sữa ở 37°C khi được cấy với lượng ít nhất 10^4 tế bào trong một ml sữa trong trường hợp chủng *Streptococcus thermophilus*.

Tốt hơn là, chủng vi khuẩn axit lactic tạo ra độ cứng gel trong sữa bò nguyên kem được bổ sung 2% sữa bột gây lớn hơn khoảng 80Pa sau 12 giờ sinh trưởng trong sữa ở 37°C khi được cấy với lượng ít nhất 10^4 tế bào trong một ml sữa trong trường hợp chủng *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và lớn hơn khoảng 140Pa sau 12 giờ sinh trưởng trong sữa ở 37°C khi được cấy với lượng ít nhất 10^4 tế bào trong một ml sữa trong trường hợp chủng *Streptococcus thermophilus*.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn axit lactic thuộc loài *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus*, được chọn từ nhóm bao gồm: chủng CHCC12944, đã được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số truy nhập DSM 24019, chủng CHCC12945, đã được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số truy nhập DSM 24020, và thể đột biến và các biến dị

của chúng. Thể đột biến và các biến dị này có các đặc tính ứng suất cắt và/hoặc độ cứng gel của chúng đã lưu giữ mà từ đó chúng được tạo ra.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn axit lactic thuộc loài *Streptococcus thermophilus*, được chọn từ nhóm bao gồm: chủng CHCC13235, đã được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số truy nhập DSM 24010, chủng CHCC13236, đã được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số truy nhập DSM 24011, và thể đột biến và các biến dị của chúng. Thể đột biến và các biến dị này có các đặc tính ứng suất cắt và/hoặc độ cứng gel của chúng từ đã lưu giữ mà từ đó chúng được tạo ra.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn axit lactic thuộc loài *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* kháng D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng có đặc tính độ cứng gel và/hoặc ứng suất cắt giống hoặc cải thiện so với chủng CHCC12944, đã được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số truy nhập DSM 24019 hoặc chủng CHCC12945, đã được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số truy nhập DSM 24020.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn axit lactic thuộc loài *Streptococcus thermophilus* kháng D-xycloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng có đặc tính độ cứng gel và/hoặc ứng suất cắt giống hoặc cải thiện so với chủng CHCC13235, đã được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số truy nhập DSM 24010 hoặc chủng CHCC13236, đã được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số truy nhập DSM 24011.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chủng vi khuẩn axit lactic theo các khía cạnh từ khía cạnh thứ hai đến khía cạnh thứ sáu của sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm:

i) chủng thuộc loài *Streptococcus thermophilus* theo khía cạnh thứ hai, thứ bốn hoặc khía cạnh thứ sáu của sáng chế; và

ii) chủng thuộc loài *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* theo khía cạnh thứ hai, ba hoặc khía cạnh thứ năm của sáng chế

ở dạng hỗn hợp hoặc ở dạng kit nhiều thành phần.

Theo một phương án, tốt hơn là chế phẩm này bao gồm ít nhất 10^9 CFU (đơn vị hình thành tế bào) của chủng thuộc loài *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus*; và ít nhất 10^{10} CFU của chủng thuộc loài *Streptococcus thermophilus*. Theo một phương án khác, chế phẩm này bao gồm ít nhất 10^{11}

CFU (đơn vị hình thành tế bào) của chủng thuộc loài *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus*; và ít nhất 10^{12} CFU của chủng thuộc loài *Streptococcus thermophilus*.

Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm này có thể có lợi nếu được dùng làm giống khởi động, và ở dạng đông lạnh, đông-khô hoặc dạng lỏng.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa, như sản phẩm sữa lên men, bao gồm bước lên men cơ chất sữa bằng chủng vi khuẩn axit lactic theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ khía cạnh thứ hai đến khía cạnh thứ sáu của sáng chế hoặc chế phẩm theo khía cạnh thứ bảy của sáng chế, bằng cách đó thu được sản phẩm sữa.

Nhờ đó, sản phẩm sữa được sản xuất theo phương pháp này tương ứng chứa chủng vi khuẩn axit lactic theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ khía cạnh thứ hai đến khía cạnh thứ sáu của sáng chế hoặc chủng vi khuẩn axit lactic của chế phẩm theo khía cạnh thứ bảy của sáng chế.

Theo phương pháp này, cơ chất sữa có thể được lên men bằng chủng theo sáng chế, như chủng thuộc loài *Streptococcus thermophilus* trước, trong, hoặc sau khi lên men bằng chủng theo sáng chế, như chủng thuộc loài *Lactobacillus*.

Hơn nữa, phương pháp này có thể bao gồm bước bổ sung enzym vào cơ chất sữa trước, trong và/hoặc sau khi lên men, như enzym được chọn từ nhóm bao gồm: enzym có thể liên kết chéo với các protein, transglutaminaza, aspartic proteaza, chymosin, và rennet.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất sản phẩm sữa, như sản phẩm sữa lên men (ví dụ như sữa chua hoặc kem sữa) hoặc phomat (ví dụ như phomat tươi của pasta filata), có thể thu được theo phương pháp theo khía cạnh thứ tám của sáng chế.

Sản phẩm sữa bao gồm vi khuẩn axit lactic.

Sản phẩm sữa có thể tùy ý chứa thành phần được chọn từ nhóm bao gồm: nước quả cô đặc, sirô, giống vi khuẩn probiotic, chất tạo màu, chất làm đặc, chất tạo hương, và chất bảo quản; và/hoặc tùy ý ở dạng sản phẩm kiểu khuấy, sản phẩm truyền thống, hoặc sản phẩm uống được.

Theo khía cạnh thứ mười, sáng chế đề xuất sản phẩm sữa chứa chủng vi khuẩn axit lactic theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ thứ hai đến thứ sáu của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ mười một, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chủng vi khuẩn axit lactic theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ thứ hai đến thứ sáu để sản xuất sản phẩm sữa lên men.

Sáng chế được minh họa rõ hơn bởi phần ví dụ không giới hạn sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sử dụng D-xycloserin để phân lập thể đột biến ở *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* có các đặc tính lưu biến được cải thiện.

Vật liệu và các phương pháp

Chủng

Lactobacillus delbrueckii loài phụ *bulgaricus* CHCC13995

Lactobacillus delbrueckii loài phụ *bulgaricus* CHCC12944 (thể đột biến kháng D-xycloserin của CHCC13995)

Lactobacillus delbrueckii loài phụ *bulgaricus* CHCC12945 (thể đột biến kháng D-xycloserin của CHCC13995)

Phân lập thể đột biến

Để phân lập thể đột biến của chủng *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* CHCC13995, tế bào bắt nguồn từ một khuẩn lạc duy nhất được cấy vào môi trường canh MRS chứa D-xycloserin với lượng nằm trong khoảng từ 50-100 µg/ml và được cho phát triển đến mức tối đa. Các tế bào được pha loãng và được đưa lên đĩa MRS và các khuẩn lạc được sàng lọc dựa trên khả năng phát triển trên đĩa vi định phân với sự có mặt của D-xycloserin với lượng nằm trong khoảng từ 50-100 µg/ml. Thông thường, 25% khuẩn lạc thu được được xác định là các khuẩn lạc phát triển nhanh với sự có mặt của D-xycloserin. Các khuẩn lạc này được chọn để nghiên cứu tiếp. Thể đột biến kháng D-xycloserin đã chọn lọc được tinh chế tiếp và được đánh giá khả năng phát triển trên sữa. Trong quá trình này, quan sát thấy rằng một số thể đột biến tạo ra cấu trúc tốt hơn đáng kể so với chủng bố mẹ trong các điều kiện như vậy.

Lưu biến học

Thực hiện phân tích lưu biến học trên lưu biến kế StressTech do ReoLogica Instruments AB, Sweden cung cấp, sau khi sinh trưởng trong môi trường sữa bò nguyên kem có bổ sung 2% sữa bột gầy.

Kết quả

Hai dẫn xuất thể đột biến của CHCC13995, có tên CHCC12944 và CHCC12945, tạo ra cấu trúc tốt hơn đáng kể với ứng suất cắt (độ nhớt) cũng như độ cứng gel gia tăng so với chủng bố mẹ. Điều này là hiển nhiên chỉ bằng cách khuấy pipet trong sữa lên men. Hơn nữa, quan sát thấy rằng lượng nước sữa của các thể đột biến khác nhau là khác nhau và lượng nước sữa này trở thành một trong số các thông số được dùng để chọn lọc thể đột biến để nghiên cứu tiếp (xem Bảng 1 dưới đây). Thể đột biến được chọn là những thể đột biến có mức đông tụ thấp: thể đột biến 1 và thể đột biến 11 trong ví dụ dưới đây (Bảng 1) tương ứng với thể đột biến CHCC12944 và CHCC12945, tương ứng.

Bảng 1: Thể đột biến 1 và thể đột biến 11 được chọn trong số 20 thể đột biến, do thể tích nước sữa tạo ra là thấp. Các ô trống là thể đột biến không gây đông tụ sữa. 2 thể đột biến được xác định là CHCC12945 và CHCC12944, tương ứng.

Thể đột biến	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ml	4	16	-	17	8	8	10,5	22	-	16	7	5	15	32	11	-	16	20	-	-

ml nước sữa sau khi sinh trưởng trong 24 giờ trong 100ml sữa B ở 43°C

Các thử nghiệm lưu biến thực hỗ trợ cho việc quan sát độ đặc tăng lên (Bảng 2 và Hình 2 và 3). Sự gia tăng độ cứng gel của thể đột biến CHCC12945 và CHCC12944 nằm trong khoảng từ 52% đến 59%. Ứng suất cắt cũng cao hơn nhưng không nhiều như là đối với độ cứng gel (Bảng 2 và các hình 2 và 3).

Bảng 2

Mẫu	Ứng suất cắt (Pa) ở tốc độ cắt 300 1/s	Độ cứng gel ở 1HZ (Pa)
CHCC13995	99	58,55
CHCC12945	108,5	93,20
CHCC12944	108	89.05

Một điều là lưu biến được cải thiện nhưng thể đột biến này sẽ kém hấp dẫn nếu các đặc tính quan trọng khác như sự axit hóa bị ảnh hưởng. Dữ kiện axit hóa khi sinh trưởng trong sữa bò nguyên kem có bổ sung 2% sữa bột gầy ở 43°C của thể đột biến được chọn lọc là tương tự như dữ kiện axit hóa của chủng bố mẹ tương ứng (Hình 1).

Kết luận

Thể đột biến *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* D-xycloserin nêu trong bản mô tả có thể được kết hợp vào giống cấy, chẳng hạn như giống khởi động, tạo ra cấu trúc tốt hơn mong muốn.

Ví dụ 2: Sử dụng D-xycloserin để phân lập thể đột biến của *Streptococcus thermophilus* có các đặc tính lưu biến học được cải thiện.

Vật liệu và các phương pháp

Chủng

Streptococcus thermophilus CHCC13994

Streptococcus thermophilus CHCC13236 (thể đột biến kháng D-xycloserin của CHCC13994)

Streptococcus thermophilus CHCC13235 (thể đột biến kháng D-xycloserin của CHCC13994)

Phân lập thể đột biến:

Để phân lập thể đột biến của *Streptococcus thermophilus* CHCC13994, tế bào bắt nguồn từ một khuẩn lạc duy nhất được cấy vào môi trường canh M17+2% lactoza chứa D-xycloserin với lượng nằm trong khoảng từ 50-70µg/ml và được cho phát triển đến mức tối đa. Các tế bào được pha loãng và được đưa lên đĩa M 17+2% lactoza và các khuẩn lạc được thu nhận và sàng lọc trên đĩa vi chuẩn độ dựa trên khả năng sinh trưởng với sự có mặt của D-xycloserin với lượng nằm trong khoảng từ 50-70µg/ml. Thông thường, 25% khuẩn lạc thu được được xác định là các khuẩn lạc phát triển nhanh với sự có mặt của D-xycloserin. Các khuẩn lạc này được chọn để nghiên cứu tiếp. Thể đột biến kháng D-xycloserin chọn lọc được tinh chế tiếp và được đánh giá khả năng phát triển trên sữa. Trong quá trình đánh giá, quan sát thấy một số thể đột biến tạo ra cấu trúc tốt hơn đáng kể so với chủng bố mẹ trong các điều kiện này. Lượng nước sữa cũng được đo như là chỉ số cho thấy độ cứng gel cao hoặc thấp.

Lưu biến học

Thực hiện phân tích lưu biến học trên lưu biến kế StressTech do ReoLogica Instruments AB, Sweden cung cấp, sau khi sinh trưởng trong sữa bò nguyên kem có bổ sung 2% sữa bột gầy.

Kết quả

Hai dẫn xuất thể đột biến của CHCC13994, có tên CHCC13235 và CHCC13236, tạo ra cấu trúc tốt hơn so với chủng bố mẹ. Điều này là hiển nhiên chỉ bằng cách khuấy pipet trong sữa lên men. Hơn nữa, quan sát thấy rằng lượng nước sữa của các thể đột biến khác nhau là khác nhau và lượng nước sữa này trở thành một trong số các thông số được dùng để chọn lọc thể đột biến để nghiên cứu tiếp (xem Bảng 3 dưới đây). Thể đột biến được chọn, số 9 và số 13 trong bảng 3, là hai thể đột biến có mức đông tụ thấp. Hai thể đột biến này tương ứng là CHCC13236 và CHCC13235.

Bảng 3: 2 thể đột biến số 9 và số 13 được lựa chọn trong số 20 thể đột biến.

Thể đột biến	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ml	12	20	10	5,5	7	10	7,5	12	7	22	6,5	-	6,5	7	7,5	6	10	10	5	6

ml nước sữa sau khi sinh trưởng trong 24 giờ trong 50ml sữa B ở 37°C.

Các thử nghiệm lưu biến thực hỗ trợ cho việc quan sát độ đặc tăng lên (Hình 4 và Hình 5). Thể đột biến CHCC13236 có ứng suất cắt tăng 15% và độ cứng gel tăng 19%, trong khi thể đột biến CHCC13235 chỉ thể hiện sự gia tăng về độ cứng gel (23%) (Bảng 4).

Bảng 4

Mẫu	Ứng suất cắt (Pa) ở tốc độ cắt 300 1/s	Độ cứng gel ở 1HZ (Pa)
CHCC13994	69,6	136,6
CHCC13236	79,7	162,5
CHCC13235	64,9	167,3

Liên quan đến khả năng axit hóa, dữ kiện này của thể đột biến đã chọn lọc là giống với dữ kiện của chủng bố mẹ (dữ liệu không được chỉ ra).

Kết luận

Thể đột biến *Streptococcus thermophilus* D-xycloserin nêu trong bản mô tả có thể được kết hợp vào giống cấy, chẳng hạn như giống khởi động, tạo ra cấu trúc tốt hơn mong muốn.

Ví dụ 3: Sử dụng thể đột biến *S. thermophilus* và *Lb. delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* D-xycloserin để chế biến sản phẩm sữa lên men.

Sữa chua được tạo ra bởi hỗn hợp gồm *S. thermophilus* và *Lb. delbrueckii* loài phụ *bulgaricus*, được trộn ở tỷ lệ 9:1 và được cấy vào sữa bò nguyên kem có bổ sung 2% sữa bột gầy. Một hỗn hợp gồm chủng bố mẹ CHCC13994 và CHCC13995; hỗn hợp thứ hai gồm thể đột biến kháng D-xycloserin của *S. thermophilus* là CHCC13236 và thể đột biến kháng D-xycloserin của *Lb. delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* là CHCC12945 và hỗn hợp thứ ba gồm thể đột biến kháng D-xycloserin của *S. thermophilus* là CHCC13235 và thể đột biến kháng D-xycloserin của *Lb. delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* là CHCC12945.

Khi so sánh quá trình axit hóa giữa ba hỗn hợp này, nhận thấy rằng hỗn hợp gồm hai thể đột biến có độ pH cuối cao hơn một chút so với hỗn hợp gồm các chủng bố mẹ (dữ liệu không được chỉ ra). Khuấy bằng thìa cho thấy sản phẩm được tạo ra bởi thể đột biến kháng D-xycloserin có tính chịu khuấy tăng đáng kể so với sản phẩm được tạo ra bởi chủng bố mẹ. Ngoài ra, sữa chua tạo ra được xem là có cấu trúc mịn hơn và vị tươi hơn khi được đánh giá bởi ba đối tượng.

Lưu giữ và giải pháp chuyên môn

Các chủng CHCC12944, CHCC12945 và CHCC13995 của *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* được lưu giữ tại DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) với số truy nhập tương ứng DSM 24019, DSM 24020, và DSM 24021 ngày 22 tháng 9 năm 2010.

Các chủng CHCC13235, CHCC13236, và CHCC13994 của *Streptococcus thermophilus* được lưu giữ tại DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) với số truy nhập tương ứng DSM 24010, DSM 24011, và DSM 24012 ngày 22 tháng 9 năm 2010.

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

Người nộp đơn yêu cầu mẫu vi sinh vật đã lưu giữ chỉ được cung cấp cho chuyên gia với sự đồng ý của Người nộp đơn.

Tài liệu tham khảo

Tytgat et al. (2009), Curr. Med. Chem. 16(20) : 2566-2580.

Caceres et al. (1997), J. Bacteriol. 179: 5046-5055.

Holtje (2004), The Desk Encyclopedia of Microbiology: 239-258.

Toàn bộ nội dung của tất cả các tài liệu trích dẫn trong tư liệu patent này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp thu nhận chủng vi khuẩn axit lactic tạo cấu trúc, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra vi khuẩn axit lactic chủng bố mẹ;
- b) phân lập thể đột biến kháng D-xyloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng của chủng bố mẹ này, trong đó thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng là chất ức chế D-alanine racemase; và
- c) chọn lọc thể đột biến nếu nó tạo ra cấu trúc tốt hơn, như được xác định bởi ứng suất cắt lớn hơn và/hoặc độ cứng gel lớn hơn, so với chủng bố mẹ khi phát triển trong sữa.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thể đột biến được lựa chọn ở bước c) nếu nó tạo ra ứng suất cắt lớn hơn ít nhất 5% so với ứng suất cắt được tạo ra bởi chủng bố mẹ.

3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó thể đột biến được lựa chọn ở bước c) nếu nó tạo ra độ cứng gel lớn hơn ít nhất 5% so với độ cứng gel được tạo ra bởi chủng bố mẹ.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước b) bao gồm việc ủ chủng vi khuẩn axit lactic bố mẹ trong/trên môi trường sinh trưởng chứa D-xyloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng và phân lập thể đột biến của chủng bố mẹ mà không bị tiêu diệt bởi D-xyloserin và/hoặc thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng, trong đó thuốc kháng sinh tương đương về mặt chức năng cản trở quá trình tổng hợp D-alanine, cản trở quá trình vận chuyển D-alanine vào tế bào.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó thể đột biến là thể đột biến ngẫu nhiên.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước gây đột biến chủng bố mẹ trước hoặc trong bước b).

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chủng vi khuẩn axit lactic bố mẹ là chủng được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*.

8. Chủng vi khuẩn axit lactic thuộc loài *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus*, được chọn từ nhóm bao gồm chủng CHCC12944 đã được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số truy nhập

DSM 24019, chủng CHCC12945 đã được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số truy nhập DSM 24020.

9. Chủng vi khuẩn axit lactic thuộc loài *Streptococcus thermophilus*, được chọn từ nhóm bao gồm chủng CHCC13235 đã được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số truy nhập DSM 24010, chủng CHCC13236 đã được lưu giữ tại Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số truy nhập DSM 24011.

10. Chế phẩm chứa chủng vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 9.

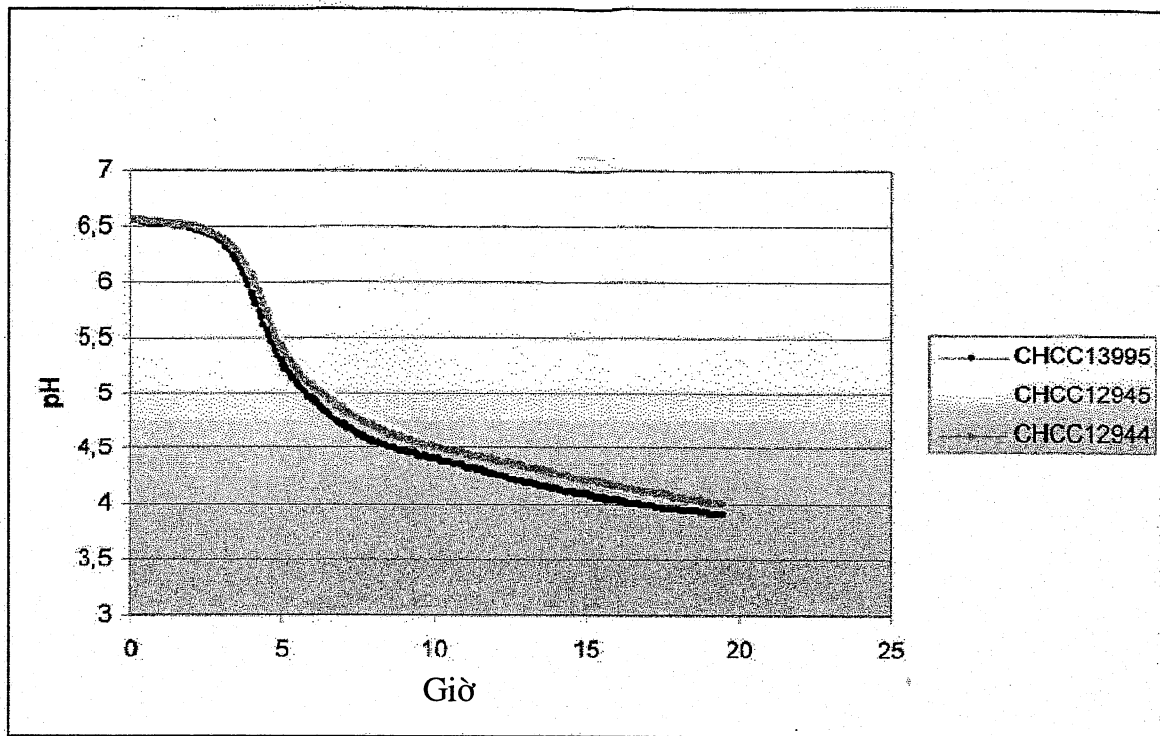
11. Chế phẩm theo điểm 10 chứa, ở dạng hỗn hợp hoặc ở dạng kit nhiều thành phần:

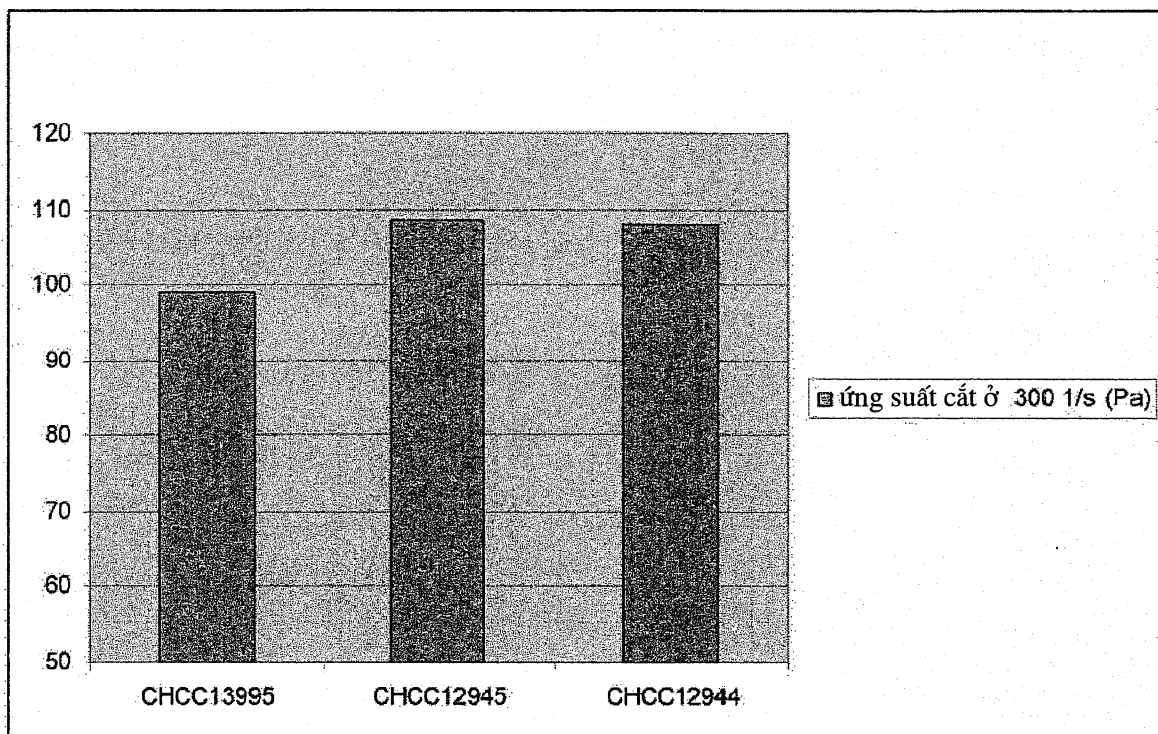
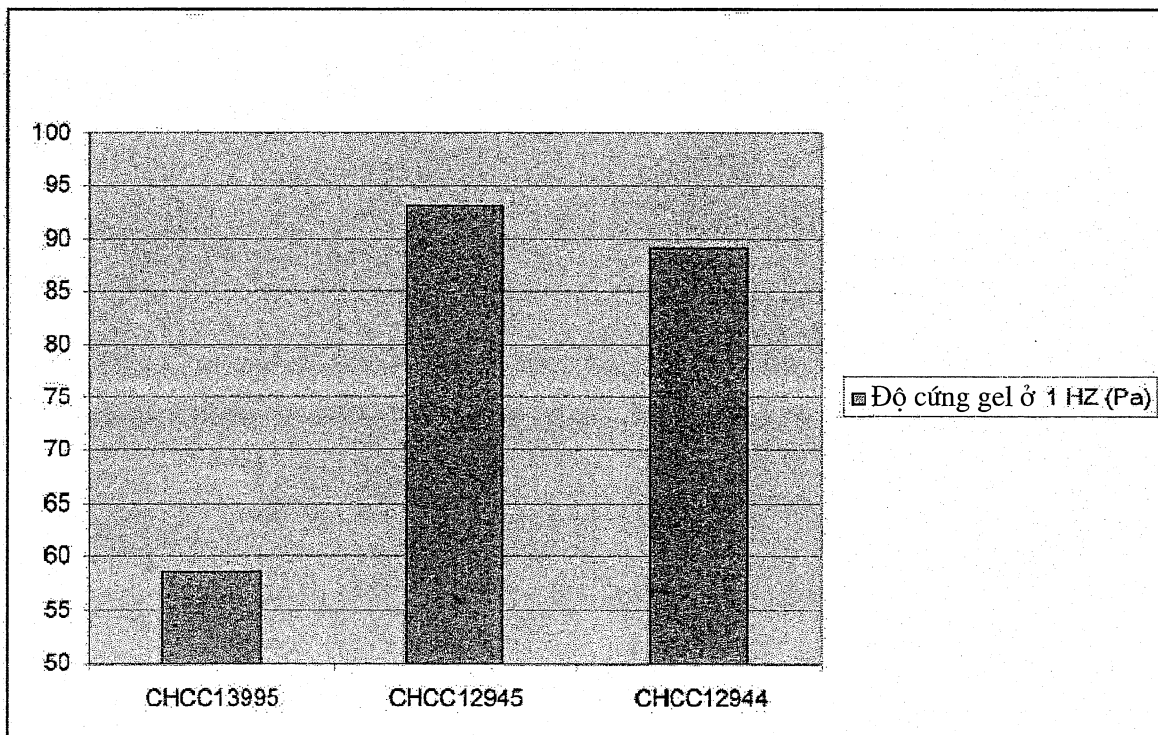
- i) chủng thuộc loài *Streptococcus thermophilus* theo điểm 9; và
- ii) chủng thuộc loài *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus* theo điểm 8.

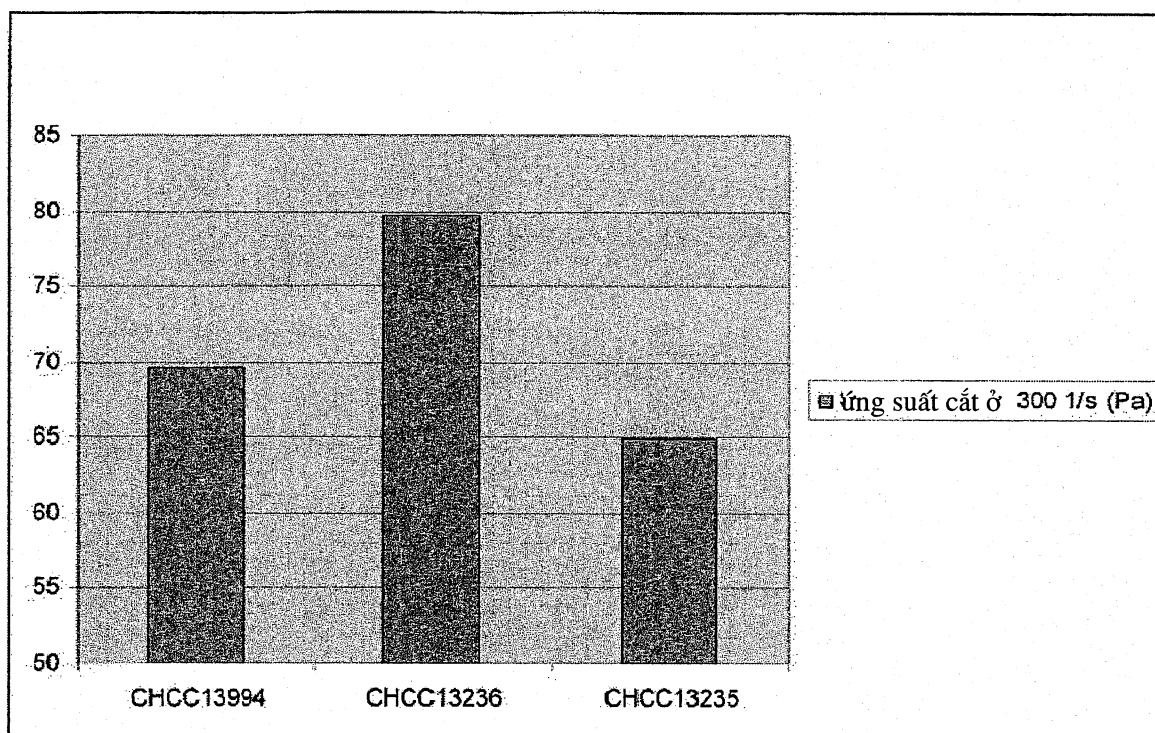
12. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 11, trong đó chế phẩm này có thể dùng làm giống khởi động, và ở dạng đông lạnh, đông-khô hoặc dạng lỏng.

13. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa, bao gồm bước lên men cơ chất sữa bằng chủng vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 9, hoặc chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 12.

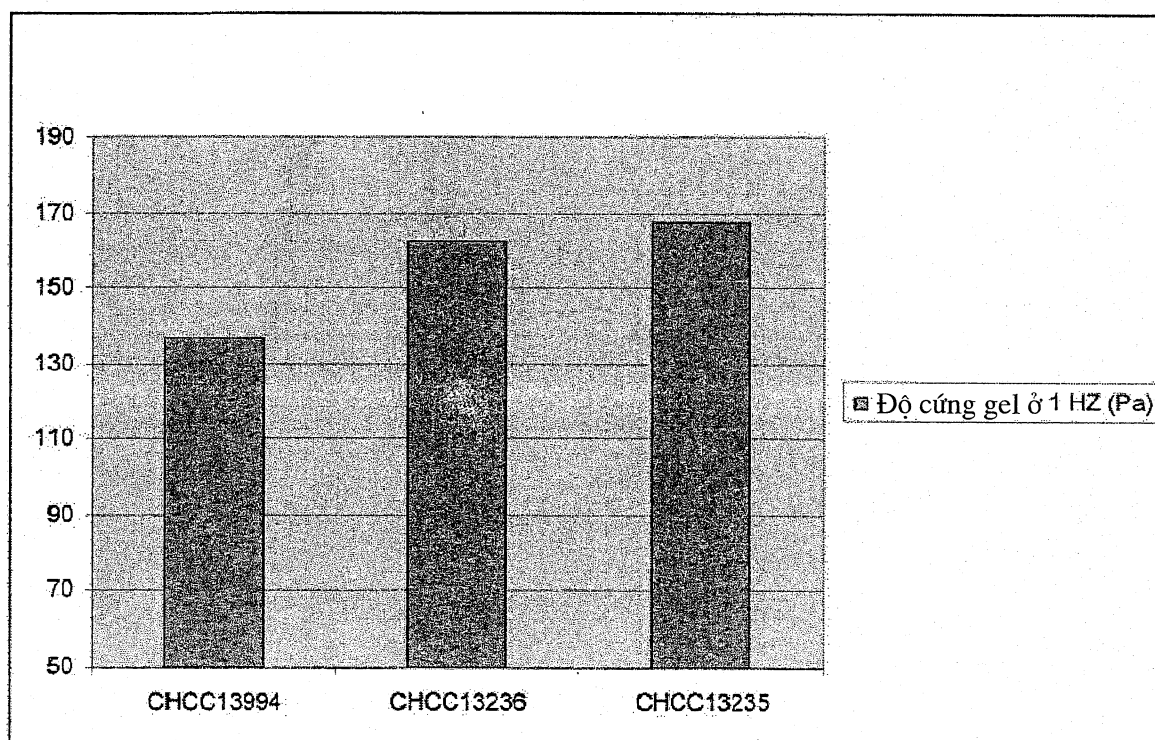
14. Sản phẩm sữa chứa chủng vi khuẩn axit lactic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 9.

**Hình 1**

**Hình 2****Hình 3**



Hình 4



Hình 5