



(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)



1-0024604

(51)⁷ C12N 1/20; A23L 1/30

(13) B

(21) 1-2011-01942

(22) 03/03/2010

(86) PCT/JP2010/53421 03/03/2010

(87) WO2010/101175 10/09/2010

(30) 2009-051118 04/03/2009 JP

(45) 27/07/2020 388

(43) 26/12/2011 285A

(73) MEIJI CO., LTD. (JP)

2-10, Shinsuna 1-chome, Koto-ku, Tokyo 1368908, Japan

(72) TERAHARA Masaki (JP); KAMIJO Masayuki (JP).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) BỘT TẾ BÀO VI KHUẨN ĐƯỢC ĐÔNG KHÔ VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
BỘT TẾ BÀO VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô trong đó huyền phù của tế bào vi khuẩn được tạo huyền phù trong dung dịch sacarit gồm vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacterium, được làm đông khô để thu được bột tế bào vi khuẩn đông khô, và trong đó sacarit là đường trihaloza và sucroza, và nồng độ mỗi đường trihaloza và sucroza trong huyền phù trước khi làm đông lạnh có khối lượng không ít hơn 4.5%. Bột tế bào vi khuẩn đông khô thích hợp cho quá trình bảo quản lâu dài và có thể thu được nhờ quá trình đông khô hiệu quả.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến bột tế bào vi khuẩn đông khô và phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô này. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến bột tế bào vi khuẩn đông khô có thể bảo quản lâu dài ngay cả ở điều kiện nhiệt độ cao và phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Những chủng vi khuẩn có chức năng probiotic (lợi khuẩn) là đối tượng ngày càng được quan tâm trong suốt những năm qua, và thuốc phòng bệnh, dựa trên sự cải thiện và bình thường hóa hệ tiêu hóa bằng cách sử dụng những vi sinh vật này, và cũng dựa trên hoạt động điều hòa miễn dịch đi kèm, đã được phát triển. Trong số những vi sinh vật đó, vi khuẩn axit lactic và bifidobacteria, còn được gọi là các vi sinh vật probiotic, được sử dụng trong nhiều loại thực phẩm từ xa xưa. Các chức năng của chúng ngày nay phát triển mạnh mẽ hơn trước kia, và việc phát triển chúng dưới dạng sản phẩm kết hợp với những chức năng mới cũng đang được thực hiện.

Nhiều nhóm thực phẩm chế biến sẵn có chứa những vi sinh vật này đã được phát triển vì những mục đích như trên, đó là để cải thiện và bình thường hóa hệ tiêu hóa, tuy nhiên nhiều nỗ lực cũng được thực hiện để sử dụng thuận lợi và hiệu quả hơn. Sữa chua là ví dụ điển hình về một trong những nhóm thực phẩm này, nhưng các vi sinh vật này cũng đang được sử dụng dưới dạng bột để sử dụng thuận tiện hơn. Bột tế bào vi khuẩn này cũng có thể được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu mới mà làm cho quá trình sản xuất thực phẩm chế biến sẵn đơn giản và dễ dàng, và do đó bột tế bào vi khuẩn này rất hữu dụng.

Tuy nhiên, khi các vi sinh vật này được chuyển thành dạng bột thì tác dụng có lợi của chúng không thể nhận biết được trừ khi có ít nhất một lượng đủ vi sinh vật thực tế còn sống tại thời điểm sử dụng hoặc sản xuất thực phẩm có sử dụng các vi sinh vật này. Do đó, mong muốn có những phương pháp bảo quản vi sinh vật hiệu quả và phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn dễ dàng bằng cách sử dụng các vi sinh vật này. Ví dụ, mong muốn có phương pháp cải thiện khả năng sống sót của vi sinh vật khi chúng được

đông khô.

Cho đến nay, rất nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm theo đuổi những mục đích này.

Ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số H5-186337 (JP H5-186337 A) hướng tới việc cải thiện tính tan trong ruột đồng thời ngăn chất lỏng hòa tan trong dạ dày bằng cách sử dụng kỹ thuật bảo quản lớp phủ và sự kết hạt của vi khuẩn hữu dụng như vi khuẩn axit lactic và bifidobacteria, v.v. mà có thể bị tiêu diệt do axit hoặc nhiệt độ cao. Cụ thể, hạt được tạo ra từ các chất có hoạt tính sinh lý bằng cách sử dụng lớp phủ 3 tầng trong đó sacarit được sử dụng cho một tầng

Để cải thiện khả năng sống sót của vi khuẩn thuộc chi *Bifidobacterium*, đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số H11-137172 (JP H11-137172 A) đề xuất phương pháp theo đó yếu tố tăng cường khả năng sống sót mà chứa sacarit được chọn từ glyxerol/glyxerin, xylitol, adonitol, arabitol, and mannitol được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Mục đích của phương pháp này là để duy trì khả năng sống sót và tổng số tế bào (tức là, lượng tế bào còn sống) trong quá trình bảo quản trong điều kiện hảo khí và/hoặc điều kiện độ pH thấp. Cụ thể, mục đích chính của kỹ thuật này là để cải thiện tỷ lệ sống sót trong hệ môi trường nuôi cấy.

Tương tự, Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2001-64189 (JP 2001-64189 A) đề xuất chế phẩm vi khuẩn axit lactic hòa tan trong ruột, có độ ổn định lâu dài tốt, kháng axit tốt, và khả năng hòa tan trong ruột tốt, thu được bằng cách trộn polyglyxerol/este của axit béo trong bột tế bào vi khuẩn axit lactic. Mục đích chính của kỹ thuật này là để bảo quản và duy trì khỏe mạnh trong điều kiện cụ thể.

Mặt khác, kỹ thuật khác cũng được phát triển đề cập đến việc cải thiện khả năng sống sót của vi khuẩn trong bảo quản cryo (tức là: bảo quản đông lạnh) và bảo quản đông khô.

Ví dụ, với mục đích giới thiệu phương pháp sản xuất cho thấy tỷ lệ tế bào sống sót cao và tỷ lệ tế bào chết hoặc hư hại bào chết ít khi đông lạnh hoặc đông khô, phương pháp đông khô được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số H7-313140 (JP H7-313140 A) trong đó hydrolyzat chứa một phần polisacarit có nguồn gốc từ bột konjac được thêm vào dịch phân tán tế bào lỏng của vi khuẩn axit lactic. Hydrolyzat chứa một phần polisacarit có khối lượng phân tử riêng mà thu được do sự phân hủy

bằng enzym, và quá sản xuất nó yêu cầu quy trình phức tạp. Ngoài ra, mục đích chính của kỹ thuật này là để cải thiện tỷ lệ sống sót trong quá trình đông lạnh và làm tan, và đề xuất hoặc tham chiếu tới tỷ lệ sống sót sau bảo quản của bột tế bào vi khuẩn đông khô được sản xuất theo sáng chế này là hoàn toàn không được đề cập đến.

Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2001-327280 (JP 2001-327280 A) đề xuất dung dịch bảo quản để đạt được tỷ lệ sống sót và hoạt tính của tế bào vi khuẩn cao, ngay cả sau khi tế bào vi khuẩn đông lạnh được làm tan. Dung dịch bảo quản cryo của tế bào vi khuẩn này chứa các thành phần có hiệu quả như trihaloza và/hoặc polyetylen glycol. Kết quả là, dung dịch bảo quản này có khả năng đặc trưng là hạn chế tế bào chết trong quá trình đông lạnh và có thể sử dụng ngay sau khi làm tan. Kỹ thuật này đề cập đến hệ thống chứa nước và cụ thể là giải quyết các vấn đề trong quá trình làm tan sau khi đông lạnh.

Tương tự, trong đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2005-52100 (JP 2005-52100 A), *Lactobacillus fermentum*, được tạo thành dạng bột được sấy phun bằng cách phủ lớp bọc bảo vệ chứa đường và tinh bột. Kỹ thuật này là kỹ thuật cơ bản hướng tới việc cải thiện khả năng sống sót của tế bào vi khuẩn trong suốt quá trình sấy phun.

Hơn nữa, độ ổn định bảo quản ở trạng thái khô được cải thiện theo tình trạng kỹ thuật của Công bố đơn quốc tế số 2006/106806 (WO 2006/106806 A) bằng cách kết hợp vi sinh vật được sấy khô như vi khuẩn axit lactic được sấy khô với muối axit amin của L-arginin. Mục đích chính của kỹ thuật này là để cải thiện độ ổn định bảo quản của vi sinh vật trong quá trình tạo chế phẩm vi sinh vật. Kết quả, mà thu được trong quá trình bảo quản 2 tuần ở 40°C của chế phẩm vi khuẩn bifidobacteria sản xuất theo kỹ thuật này, đó là tỷ lệ sống sót ở mức thấp là khoảng 25%. Kết quả này cho thấy kỹ thuật này không phải là kỹ thuật có thể tạo ra khả năng chống chịu trong quá trình bảo quản dài hạn kéo dài đến vài tháng.

Tương tự, "Samuel B. Leslie et al., Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying, *Applied and Environmental Microbiology*, tháng 10, 1995, trang 3592-3597 (USA)" báo cáo kết quả nghiên cứu trong đó có thể chắc chắn rằng, dựa trên việc phân tích cơ chế làm đông khô, mà làm chết vi sinh vật khi đông khô phần lớn là do những thay đổi trong tình trạng vật lý của lipid tạo nên màng tế bào, và do những thay đổi về cấu trúc trong protein, và trong đó,

trên cơ sở nghiên cứu này, việc đông khô được thực hiện trên, ví dụ, *E. coli*, trong sự có mặt của trihaloza hoặc sucroza. Tuy nhiên, các gợi ý hoặc tham chiếu đến việc sử dụng hỗn hợp của trihaloza and sucroza là hoàn toàn không được đề cập đến trong báo cáo này. Hơn nữa, hoàn toàn không có nghiên cứu nào được thực hiện hướng tới việc bảo quản lâu dài vật liệu được đông khô cụ thể hoặc việc bảo quản ở điều kiện nhiệt độ cao theo quy định.

Ngoài ra, "Gaber Zayed et al., Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage, *Process Biochemistry*, 2004, Tập 39, trang 1081-1086" báo cáo các nghiên cứu đã thực hiện, với những mục đích tương tự ở trên, về việc làm đông khô và bảo quản *Lactobacillus salivarius*. Nghiên cứu này được tiến hành sử dụng 4% trihaloza, 4% sucroza, 18% sữa bột không kem, 4% trihaloza + 18% sữa bột không kem, 4% sucroza + 18% sữa bột không kem, 4% trihaloza+ 4% sucroza, and 4% trihaloza+ 4% sucroza + 18% sữa bột không kem, dưới dạng các chất bảo vệ đông khô, và nghiên cứu tỷ lệ sống sót khi bột tế bào vi khuẩn đông khô được bảo quản ở -85°C . Chú ý rằng trong huyền phù tế bào tại thời điểm đông khô, nồng độ sacarit là xấp xỉ 3,2% và nồng độ sữa bột không kem là 14,4%. Theo các kết quả được bộc lộ trong tài liệu này, 4% sucroza được cho là không thể cải thiện đáng kể khả năng bảo quản bột tế bào vi khuẩn đông khô ở -85°C , trong khi 4% sucroza + 18% sữa bột không kem được cho là có thể cải thiện khả năng bảo quản bột tế bào vi khuẩn đông khô ở -85°C . Hơn nữa, 4% trihaloza được cho là có thể cải thiện khả năng bảo quản bột tế bào vi khuẩn đông khô ở -85°C . Ngoài ra, các kết quả cũng được báo cáo đối với việc bảo quản bột tế bào vi khuẩn trong 7 ngày ở nhiệt độ phòng (giá trị nhiệt độ không được nêu ra) của bột tế bào vi khuẩn thu được bằng cách làm đông khô tế bào vi khuẩn bằng hỗn hợp dung dịch gồm 4% trihaloza + 4% sucroza + 18% sữa bột không kem. Các kết quả được báo cáo cho thấy khả năng bảo quản cao được duy trì khi việc bảo quản được thực hiện trong không khí có độ ẩm riêng (tức là độ ẩm: 2,8 đến 5,6%, hoạt tính ẩm: 0,028 đến 0,056). Tuy nhiên, khả năng bảo quản cao không thể được duy trì trong khí quyển có độ ẩm là 0% hoặc 8,8% (tỷ lệ sống sót này lần lượt là, xấp xỉ 40% và 10%). Do đó, các điều kiện để khả năng bảo quản ở nhiệt độ phòng bị giới hạn ở phạm vi độ ẩm rất hẹp ở độ ẩm rất thấp, và các điều kiện này là không thực tế. Do đó, kỹ thuật theo tài liệu này cho thấy kết quả của các thí nghiệm bảo quản ở điều kiện môi trường cách xa môi trường sống thông thường. Hơn

nữa, trong tài liệu này, những gợi ý hoặc tham chiếu tới việc bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ cao là hoàn toàn không được đề cập đến, và ứng dụng của kỹ thuật này cho thực phẩm nói chung vẫn còn rất mơ hồ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Như được mô tả ở trên, cho đến nay, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành về việc bảo quản hoặc duy trì vi sinh vật hữu dụng và ở các dạng hữu hiệu. Cụ thể, đối với bột tế bào vi khuẩn đông khô hay tế bào được sấy khô, nhiều phương pháp tiếp cận khác nhau về sự thuận tiện của dạng sản phẩm cũng được thực hiện. Tuy nhiên, vẫn còn có nhiều khả năng nghiên cứu về việc duy trì chức năng của vi khuẩn và tỷ lệ sống sót sau khi bảo quản lâu dài. Ví dụ, có những phương thức tiếp cận mà có tác dụng chỉ với một vi sinh vật trong khi đó có những phương thức tiếp cận mà có tác dụng tới nhiều vi sinh vật trong điều kiện bảo quản rất giới hạn như nhiệt độ rất thấp và độ ẩm thấp. Do đó, phương pháp mang lại hiệu quả công nghiệp vẫn chưa được phát triển. Cụ thể, để sử dụng bột tế bào vi khuẩn như bột tế bào vi khuẩn mà có thể được sử dụng trong thực phẩm, có khả năng bảo quản lâu dài ở nhiệt độ không khí trong phòng (nghĩa là: nhiệt độ môi trường xung quanh). Bột tế bào vi khuẩn này cần thiết phải có khả năng sống sót cao ở điều kiện nhiệt độ cao (từ 30 đến 40°C) trong phạm vi giả định đối với nhiệt độ trong môi trường sống bình thường và trong các điều kiện mà không bị giới hạn ở các điều kiện bảo quản đặc biệt. Bột tế bào vi khuẩn mà không có tỷ lệ sống sót cao như vậy thì không đảm bảo chất lượng và không thể được sử dụng trên thực tế làm nguyên liệu ban đầu của thực phẩm.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô thích hợp để bảo quản lâu dài và thu được bằng phương pháp đông khô hiệu quả và đơn giản và phương pháp sản xuất bột từ tế bào vi khuẩn đông khô này. Cụ thể, sáng chế đề xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô có thể được bảo quản ở tỷ lệ sống sót cao của vi sinh vật hữu dụng như vi khuẩn axit lactic, bifidobacteria và loại tương tự, kể cả trong trường hợp bảo quản lâu dài sau khi đông khô và kể cả trong trường hợp bảo quản lâu dài ở vùng nhiệt độ môi trường sống (đặc biệt là trong suốt mùa hè) mà dường như có ảnh hưởng không mong muốn đến khả năng bảo quản do nhiệt độ tương đối cao so với nhiệt độ thấp. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô được mô tả trên đây. Thêm vào đó, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa bột tế

bào vi khuẩn đông khô thu được này.

Các tác giả sáng chế đã thực hiện nhiều nghiên cứu sâu về các vấn đề kỹ thuật được mô tả trên đây, và phát hiện ra rằng khả năng sống sót, đặc biệt là khả năng sống sót khi bảo quản ở nhiệt độ cao, của bột tế bào của vi sinh vật hữu dụng như vi khuẩn axit lactic, bifidobacteria và loại tương tự gia tăng ở mức độ lớn nhờ đông khô huyền phù của tế bào vi khuẩn của vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacteria được tạo huyền phù trong dung dịch sacarit. Do đó, sáng chế được hoàn thành.

Sáng chế đề xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô thích hợp để bảo quản lâu dài và được sản xuất bằng quy trình đông khô đơn giản và hiệu quả.

Một khía cạnh của sáng chế là phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô trong đó huyền phù của tế bào vi khuẩn của vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacterium được tạo huyền phù trong dung dịch sacarit được làm đông khô để thu được bột tế bào vi khuẩn đông khô, và trong đó sacarit là trihaloza và sucroza, và nồng độ của mỗi trihaloza và sucroza trong huyền phù trước khi làm đông khô là không nhỏ hơn 4,5% khối lượng (sau đây được viết tắt là “wt %”).

Theo sáng chế, nồng độ của mỗi trihaloza và sucroza trong huyền phù trước khi làm đông lạnh có khối lượng tốt hơn là từ 4,5 đến 1,5 wt%, tốt hơn nữa là từ 8 đến 12 wt%.

Theo sáng chế, tỷ lệ khối lượng của sucroza/trehaloze tốt hơn là từ 1/5 đến 5/1.

Theo sáng chế, các ví dụ ưu tiên về vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacterium bao gồm vi sinh vật thuộc chi *Bifidobacterium*.

Các ví dụ ưu tiên về chi *Bifidobacterium* bao gồm chủng *Bifidobacterium bifidum* và chủng *Bifidobacterium longum*.

Các ví dụ ưu tiên về chủng *Bifidobacterium bifidum* bao gồm *Bifidobacterium bifidum* OLB6378.

Các ví dụ ưu tiên về chủng *Bifidobacterium longum* bao gồm *Bifidobacterium longum* OLB6001.

Tương tự, khía cạnh khác của sáng chế là bột tế bào vi khuẩn đông khô được sản xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã nêu để sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là chế phẩm thực phẩm chứa bột tế bào vi khuẩn đông khô nêu trên với một lượng thích hợp.

Phương pháp theo sáng chế để sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô có thể bảo quản lâu dài bộc lộ những hiệu quả, cụ thể khi việc bảo quản lâu dài được đảm bảo ở các loại thực phẩm dạng bột hoặc dạng rắn. Nghĩa là, bột tế bào vi khuẩn được sản xuất theo phương pháp theo sáng chế có những hiệu quả có lợi của vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacteria mà hữu dụng ngay cả sau khi bảo quản, bởi vì tỷ lệ sống sót khi bảo quản ở nhiệt độ cao được cải thiện đáng kể.

Tương tự, phương pháp sản xuất theo sáng chế là đơn giản và dễ dàng. Do đó, không yêu cầu cần có thiết bị chuyên dụng và quy trình phức tạp và không phát sinh chi phí đi kèm.

Tương tự, bột tế bào vi khuẩn được sản xuất bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng trực tiếp, và do đó cũng có thể được sử dụng ở dạng bột một cách dễ dàng kể cả sau khi đã bảo quản hoặc có thể được sử dụng hiệu quả ở dạng nguyên liệu ban đầu để sản xuất thực phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là biểu đồ thể hiện kết quả của thí nghiệm bảo quản ở nhiệt độ 20°C, 30°C hoặc 40°C của bột tế bào *Bifidobacterium bifidum* được sản xuất bằng cách sử dụng huyền phù đặc chứa trihaloza với nồng độ 6,6 wt % và sucroza với nồng độ 6,6 wt% trước khi làm đông khô, đây là huyền phù đặc thu được bằng cách sử dụng dung dịch sacarit có nồng độ trehazola là 20 wt % và nồng độ sucroza là 20 wt % trước khi được trộn với vi sinh vật.

Fig. 2 là biểu đồ thể hiện kết quả của thí nghiệm bảo quản ở nhiệt độ 20°C, 30°C hoặc 40°C của bột tế bào *Bifidobacterium bifidum* được sản xuất bằng cách sử dụng huyền phù đặc chứa trihaloza với nồng độ 10 wt % và sucroza với nồng độ 10 wt% trước khi làm đông khô, đây là huyền phù đặc thu được bằng cách sử dụng dung dịch sacarit có nồng độ trehazola là 30 wt % và nồng độ sucroza là 30 wt % trước khi được trộn với vi sinh vật.

Fig. 3 là biểu đồ thể hiện kết quả của thí nghiệm bảo quản ở nhiệt độ 40°C của bột tế bào *Bifidobacterium bifidum* đông khô (là số 2 được khoanh tròn) được sản xuất

bằng cách sử dụng huyền phù đặc chứa trihaloza với nồng độ 6,7 wt % và sucroza với nồng độ 6,7 wt% trước khi làm đông khô, đây là huyền phù đặc thu được bằng cách sử dụng dung dịch sacarit có nồng độ trehalose là 20 wt % và nồng độ sucroza là 20 wt % trước khi được trộn với vi sinh vật và bột tế bào vi khuẩn đông khô làm đối chứng (là số 1 được khoan tròn).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án đơn lẻ được mô tả dưới đây.

Vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacteria được sử dụng trong sáng chế có thể được lấy ví dụ là các vi sinh vật thuộc chi *Bifidobacterium* và ví dụ cụ thể là các chủng *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, v.v.. Các ví dụ khác là các vi sinh vật thuộc chi *Lactobacillus* và chi *Streptococcus*. Những ví dụ cụ thể của những ví dụ khác là chủng *Lactobacillus gasseri*, chủng *Lactobacillus bulgaricus*, và chủng *Streptococcus thermophilus*. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn đối ở những loài này. Hơn nữa, một chủng đơn trong số những chủng vi khuẩn này có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều chủng trong số những chủng vi khuẩn này có thể được sử dụng dưới dạng kết hợp.

Các chủng được đặc biệt ưu tiên trong số những chủng nêu trên là chủng *Bifidobacterium bifidum*, và chủng *Bifidobacterium longum*, v.v..

Các ví dụ về các chủng được nộp lưu bao gồm các chủng *Bifidobacterium bifidum* OLB6378, *Bifidobacterium longum* OLB6001, v.v..

(A) Nộp lưu chủng *Bifidobacterium bifidum* OLB6378

Việc nộp lưu chủng *Bifidobacterium bifidum* OLB6378 sử dụng trong sáng chế được thực hiện như sau.

(1) Tên Cơ quan lưu giữ có thẩm quyền: Cơ quan lưu giữ vi sinh vật patent thuộc Viện Công nghệ và Thảm định Quốc gia được thành lập với tư cách là một pháp nhân độc lập.

(2) Địa chỉ liên lạc: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, mã bưu điện 292-0818, điện thoại: 0438-20-5580

(3) Số nộp lưu: NITE BP-31

(4) Mô tả nhận diện: *Bifidobacterium bifidum* OLB6378

(5) Ngày nộp lưu ban đầu: 26 tháng 10 năm 2004

(6) Ngày chuyển tới cơ quan lưu giữ theo Hiệp ước Budapest: 18 tháng 1 năm 2006

(B) Nộp lưu chủng *Bifidobacterium longum* OLB6001

Việc nộp lưu chủng *Bifidobacterium longum* OLB6001 sử dụng trong sáng chế được thực hiện như sau.

(1) Tên Cơ quan lưu giữ có thẩm quyền: Cơ quan lưu giữ sinh vật patent quốc tế thuộc Viện Khoa học và Công nghệ công nghiệp tiên tiến Quốc gia được thành lập với tư cách là một pháp nhân độc lập.

(2) Địa chỉ liên lạc: Chuodai-6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, mã bưu điện 305-8566, điện thoại: 029-861-6029

(3) Số nộp lưu: FERM P-13610

(4) Mô tả nhận biết: *Bifidobacterium longum* No. 7

(5) Ngày nộp lưu ban đầu: 20 tháng 4 năm 1993

(6) Ngày chuyển tới cơ quan lưu giữ theo Hiệp ước Budapest

Ngày nhận: 2 tháng 3 năm 2010

Số nhận: FERM ABP-11242

Chủng *Bifidobacterium bifidum* OLB6378 và *Bifidobacterium longum* OLB6001 sử dụng trong sáng chế có những đặc tính vi khuẩn học như sau.

Chủng *Bifidobacterium bifidum* OLB6378 là khuẩn que (bacillus) kỵ khí bắt buộc gam dương thu được từ phân trẻ em. Hình thái học tế bào dạng hình chữ Y được nhìn thấy khi vi khuẩn này được cấy vào canh thang Lactobacilli MRS Broth (BD) và được nuôi cấy kỵ khí trong 18 tiếng ở 37°C sử dụng AnaeroPack KENKI (sản xuất bởi công ty Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.). Sản phẩm PCR đã được quan sát bằng PCR sử dụng đoạn mồi đặc hiệu cho *Bifidobacterium bifidum* (Tomotari MITSUOKA and Takahiro MATSUMOTO, Molecular Biological Detection and Identification of Intestinal Flora, *Proceedings of the 8th Symposium on Intestinal Flora*)

và cụ thể là BiBIF-1: CCA CAT GAT CGC ATG TGA TT và BiBIF-2: CCG AAG GCT TGC TCC CAA A, là các môi đặc hiệu loài cho 16S rADN.

Chủng *Bifidobacterium longum* OLB6001 là vi sinh vật kỵ khí bắt buộc gam dương thu được từ phân người trưởng thành mà là vi sinh vật hình que hoặc vi sinh vật đa hình phân nhánh và không có tính di động và khả năng hình thành bào tử. Khuẩn lạc có bóng mờ hình bán cầu được hình thành khi vi khuẩn này được cấy vào đĩa thạch BL (EIKEN) và được nuôi cấy trong 48 tiếng ở 37°C sử dụng phương pháp bông thép. Vi sinh vật này có khả năng lên men arabinosa, xyloza, ribosa, glucoza, fructoza, galactoza, sucroza, maltoza, melibioza, raffinosa and melicitoza.

Sacarit được sử dụng làm chất bảo vệ theo sáng chế là hỗn hợp của trihaloza và sucroza. Nồng độ của mỗi trihaloza và sucroza trong huyền phù đặc trước khi làm đông khô là không nhỏ hơn 4,5 wt %, và tốt hơn là không ít hơn 8 wt % để thu được bột tế bào vi khuẩn đông khô phù hợp để bảo quản lâu dài ở nhiệt độ cao. Giới hạn trên của nó tốt hơn là 15 wt % và tốt hơn nữa là 12 wt %. Tỷ lệ khối lượng của sucroza/trihaloza không bị giới hạn cụ thể, nhưng tốt hơn là từ 1/5 đến 5/1, tốt hơn nữa là từ 1/3 đến 3/1, tốt nhất là 1/1 để thu được bột tế bào vi khuẩn đông khô phù hợp để bảo quản lâu dài ở nhiệt độ cao.

Tốt hơn là những sacarit này được trộn với các tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy dưới dạng dung dịch nước chứa sacarit để tái tạo huyền phù các tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy. Bột tế bào vi khuẩn đông khô theo sáng chế có thể thu được bằng cách làm đông khô huyền phù thu được theo cách này.

Dung dịch nước chứa sacarit có thể bao gồm protein sữa, axit amin, axit ascorbic hoặc thành phần tương tự ngoài nước và sacarit.

Phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể bao gồm, ví dụ, trình tự sau đây.

- 1) Vi sinh vật mong muốn được nuôi cấy theo phương pháp thông thường.
- 2) Chất lỏng nuôi cấy bao gồm các tế bào vi khuẩn đã nuôi cấy được sử dụng như bước
- 3) sau đây, hoặc được cô hoặc chia thành các thành phần dạng lỏng và dạng rắn, ví dụ, bằng cách tách ly tâm để thu được chất lỏng nuôi cấy được cô (nghĩa là chất lỏng tế bào) hoặc các tế bào vi khuẩn tách dưới dạng thành phần dạng rắn, và sau đó được sử

dụng như bước 3) sau đây.

3) Bằng cách trộn chất lỏng tế bào vi khuẩn thu được hoặc các tế bào vi khuẩn thu được với dung dịch chứa sacarit (tức là chất bảo vệ) có nồng độ sacarit này theo quy định, thu được huyền phù. Sau đó, huyền phù này được làm đông khô để thu được bột tế bào vi khuẩn đông khô theo sáng chế.

Bước đông khô có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng máy làm đông khô. Ví dụ, đầu tiên, thực hiện bước đông lạnh nhanh ở nhiệt độ thấp (ví dụ, từ -30 đến -90°C). Tiếp theo, làm khô ở nhiệt độ không khí phòng (ví dụ, từ 0 đến 20°C) và dưới áp suất giảm (mức độ chân không tốt hơn là không quá 1.000Pa, tốt hơn nữa là không quá 100Pa). Tiếp theo, nhiệt độ của máy làm đông khô được tăng lên, ví dụ, tới mức nhiệt độ từ 30 đến 70°C đồng thời vẫn duy trì áp suất giảm. Tiếp theo, quá trình làm khô được giữ trong khoảng thời gian nhất định.

Bột tế bào vi khuẩn đông khô theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trực tiếp, bởi vì trihaloza và sucroza được sử dụng trong sáng chế cũng có thể được sử dụng làm chất phụ gia thực phẩm. Bột tế bào vi khuẩn đông khô theo sáng chế cũng có thể được sử dụng bằng cách thêm vào nhiều chế phẩm thực phẩm khác nhau. Ngoài ra, bột tế bào vi khuẩn đông khô theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu như môi trường nuôi cấy ban đầu đối với sản phẩm sữa lên men, v.v., bởi vì bột tế bào vi khuẩn đông khô theo sáng chế bộc lộ tỷ lệ sống sót nhất định của tế bào sau khi bảo quản lâu dài.

Chế phẩm thực phẩm có thể lấy ví dụ là các loại đồ uống và thực phẩm khác nhau (ví dụ, nước ngọt, sản phẩm sữa lên men, sữa chua, bột sữa được biến đổi, v.v.). Chế phẩm thực phẩm này có thể được sử dụng trực tiếp, hoặc có thể được sử dụng theo các phương pháp thông thường trong những chế phẩm thực phẩm thông thường, ví dụ, bằng cách trộn với thực phẩm khác hoặc với thành phần thực phẩm khác. Dạng của chế phẩm thực phẩm có thể thường được sử dụng ở dạng đồ uống hoặc thực phẩm, như thực phẩm dạng rắn (ví dụ, bột, hạt, v.v.), bột nhào, chất lỏng, hoặc huyền phù.

Các thành phần khác trong chế phẩm thực phẩm cũng không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nước, protein, sacarit, lipid, vitamin, chất khoáng, axit hữu cơ, bazơ hữu cơ, nước ép hoa quả, mùi vị, v.v. có thể được sử dụng làm thành phần trong chế phẩm thực phẩm. Những thành phần này có thể được sử

dụng dưới dạng một thành phần riêng lẻ, hoặc hai hoặc nhiều thành phần này có thể được sử dụng trong hỗn hợp. Có thể sử dụng các sản phẩm và/hoặc thực phẩm tổng hợp mà chứa lượng lớn các sản phẩm tổng hợp dưới dạng các thành phần khác trong chế phẩm thực phẩm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả dưới đây bằng cách sử dụng các Ví dụ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các Ví dụ này. Trong bản mô tả sáng chế, “%” biểu thị “phần trăm khối lượng (wt %)” trừ trường hợp chỉ ra cụ thể khác.

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn dựa trên các Ví dụ được đề cập dưới đây.

Ví dụ thí nghiệm 1

Sử dụng các quy trình đưa ra dưới đây, bột tế bào vi khuẩn đông khô được sản xuất dựa trên phương pháp sản xuất theo sáng chế.

- 1) Nuôi cấy trong môi trường trung tính chủng *Bifidobacterium bifidum* OLB6378 được thực hiện trong môi trường casein được tiêu hóa (nghĩa là môi trường mà casein được tiêu hóa bằng enzyme được sử dụng làm protein)
- 2) 320 mL canh thang nuôi cấy được tách ly tâm trong 20 phút ở 10.000 G và 4°C; 307,2 mL dịch nổi được bỏ đi; và thu được phần hạt nhỏ tế bào vi khuẩn (12,8 mL).
- 3) 2 mL chất bảo vệ mà bao gồm sacarit có nồng độ đã xác định được thêm vào phần hạt nhỏ tế bào vi khuẩn (4 mL), và huyền phù tế bào vi khuẩn (viết tắt là “huyền phù tế bào” ở Bảng 1) được tạo ra và được đông khô bằng cách làm lạnh ở -80°C.
- 4) Ngay sau khi hoàn thành bước đông khô, 0,5g bột tế bào vi khuẩn đông khô được phủ bằng nước bằng cách thêm dung dịch nước muối sinh lý, và số lượng tế bào sống (tức là, đếm số tế bào sống) trong chất lỏng được xác định trên môi trường nuôi cấy thạch BL mỏng.
- 5) Hơn nữa, 0,5 g bột tế bào vi khuẩn đông khô được đặt trong lami-zip (nhãn hiệu: tên của sản phẩm túi làm bằng chất dẻo), và được bảo quản trong 53 ngày ở 20°C hoặc 30°C. Sau đó, số lượng tế bào sống (đó là, đếm số tế bào sống) trong bột tế bào vi khuẩn đông khô được xác định tương tự sử dụng môi trường nuôi cấy thạch BL mỏng.

Các dung dịch chất bảo vệ được sử dụng trong ví dụ thử nghiệm này được trình

bày trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Số mẫu	Nồng độ trihaloza trong dung dịch chất bảo vệ (%)	Nồng độ sucroza trong dung dịch chất bảo vệ (%)	Nồng độ trihaloza trong huyền phù tế bào (%)	Nồng độ sucroza trong huyền phù tế bào (%)
Mẫu 1	20	20	6,6	6,6
Mẫu 2	30	30	10	10
Mẫu so sánh 1	10	0	3,3	0
Mẫu so sánh 2	26	0	8,7	0
Mẫu so sánh 3	10	10	3,3	3,3

Kết quả đưa ra trong Bảng 2 đối với các thử nghiệm bảo quản *Bifidobacterium bifidum* được mô tả ở trên sử dụng các Mẫu 1 và 2 và các Mẫu so sánh 1, 2, và 3. Do tỷ lệ sống sót thấp ở các Mẫu so sánh 1, 2, chỉ các kết quả đối với việc bảo quản trong 7 ngày ở 20°C được đưa ra cho các Mẫu so sánh 1 và 2 trong Bảng 2.

Bảng 2

Số ví dụ	Số mẫu	Nhiệt độ bảo quản	Số lượng tế bào sống sót ngay sau khi làm khô (cfu/g)	Số lượng tế bào sống sót sau khi bảo quản (cfu/g)	Tỷ lệ sống sót (%)
Ví dụ 1	Mẫu 1	20°C	$9,4 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^{11}$	113,2
Ví dụ 2	Mẫu 1	30°C	$9,4 \times 10^{10}$	$9,6 \times 10^{10}$	102,4
Ví dụ 3	Mẫu 2	20°C	$1,1 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{11}$	109,5
Ví dụ 4	Mẫu 2	30°C	$1,1 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{11}$	111,7
Ví dụ so sánh 1	Mẫu so sánh 1	20°C	$1,2 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^{10} *1$	30,4

Ví dụ so sánh 2	Mẫu so sánh 2	20°C	$1,1 \times 10^{11}$	$5,3 \times 10^{10} *1$	48,2
Ví dụ so sánh 3	Mẫu so sánh 3	20°C	$1,0 \times 10^{11}$	$7,2 \times 10^{10}$	70,0
Ví dụ so sánh 4	Mẫu so sánh 3	30°C	$1,0 \times 10^{11}$	$5,2 \times 10^{10}$	49,9

*1: Số ngày bảo quản: 7 ngày

Như được thể hiện từ Bảng 2, sự giảm số lượng tế bào sống sót (đó là, số tế bào sống) không được nhìn thấy ở mỗi ví dụ từ 1 đến 4 được thực hiện bằng phương pháp theo sáng chế, thậm chí khi bột tế bào vi khuẩn đông khô này được bảo quản ở điều kiện nhiệt độ đã định trong 53 ngày. Cụ thể, tỷ lệ sống sót được nêu ra có thể gia tăng đáng kể khi ở nhiệt độ cao gần với nhiệt độ của môi trường sống, như trong các Ví dụ 2 và 4. Điều này cho thấy phương pháp sản xuất theo sáng chế là kỹ thuật có chất lượng tốt để áp dụng cho thực phẩm dạng bột hoặc dạng rắn với sự đảm bảo chất lượng khá lâu dài.

Mặt khác, các Ví dụ so sánh 1 và 2, là những thí nghiệm chỉ sử dụng trihaloza được lấy mẫu theo ấn phẩm "Gaber Zayed et al." được mô tả ở trên, thể hiện rằng không thể đạt được mục đích một cách có hiệu quả chỉ bằng trihaloza. Cụ thể, trong khi ấn phẩm "Gaber Zayed et al." mô tả hiệu quả đối với việc bảo quản ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm cực thấp, thì kết quả thu được từ các Ví dụ so sánh 1 và 2 chỉ ra rằng các hiệu quả mong muốn không thể thu được ở nhiệt độ môi trường sống như trong những thí nghiệm này.

Ngoài ra, các nghiên cứu cũng được tiến hành trong các Ví dụ so sánh 3 và 4 trong đó trihaloza và sucroza được sử dụng với cùng nồng độ như trong ấn phẩm "Gaber Zayed et al.". Các kết quả của Các ví dụ so sánh 3 và 4 chỉ ra rằng lượng tế bào sống giảm đi khoảng một nửa ở điều kiện nhiệt độ giả định đối với môi trường sống.

Do đó, có thể thấy rằng bột tế bào vi khuẩn đông khô sản xuất theo phương pháp của các Ví dụ so sánh này khó được áp dụng cho thực phẩm dạng bột hay thực phẩm dạng rắn với sự đảm bảo chất lượng lâu dài, và các phương pháp của các Ví dụ so sánh này không phải là kỹ thuật có chất lượng tốt để áp dụng cho những thực phẩm đó.

Ví dụ thí nghiệm 2

Bột tế bào vi khuẩn đông khô được sản xuất bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế là đối tượng của các thí nghiệm về hiệu quả trong việc bảo quản lâu dài (lên đến 6 tháng) ở điều kiện nhiệt độ cao (20°C, 30°C hoặc 40°C).

Bột tế bào được sử dụng được sản xuất bằng cùng phương pháp như đối với các Mẫu 1 và 2, ngoại trừ lượng đầu vào ban đầu được tăng lên tới 30 lần so với ở các Mẫu 1 và 2. Do đó, thảo luận sau đây vẫn chọn Mẫu 1 và Mẫu 2.

Kết quả thu được từ thí nghiệm này được nêu ở Fig. 1 và 2.

Như được thể hiện từ các hình vẽ, Mẫu 1 (xem Fig. 1; dung dịch chất bảo vệ chứa trihaloza và sucroza với nồng độ mỗi loại là 6,6 wt %, thu được bằng cách trộn dung dịch chứa đường trihaloza với nồng độ 20 wt % với dung dịch chứa sucroza với nồng độ 20 wt %) và Mẫu 2 (xem Fig. 2; dung dịch chất bảo vệ chứa trihaloza và sucroza với nồng độ mỗi loại là 10 wt %, thu được bằng cách trộn dung dịch chứa trihaloza với nồng độ 30 wt % với dung dịch chứa sucroza với nồng độ 30 wt %) đều có thể duy trì lượng đủ tế bào sống sót sau thời gian 6 tháng ở nhiệt độ bảo quản là 20°C hoặc 30°C, và khả năng sống sót cao cũng được thể hiện qua các Mẫu 1 và 2.

Đối với việc bảo quản ở 40°C, điều kiện nhiệt độ môi trường sống rất cao, Mẫu 1 cho thấy tỷ lệ sống sót cao đạt 93,9% sau thời gian 1 tháng bảo quản. Do đó, nồng độ được sử dụng trong Mẫu 1 được cho là nồng độ được ưu tiên hơn của chất bảo vệ trong điều kiện này (tức là bảo quản ở 40°C).

Ví dụ thí nghiệm 3

Các thí nghiệm được tiến hành theo cùng cách như ở Ví dụ 1 ngoại trừ Các mẫu ở Bảng 3 được sử dụng và nhiệt độ và thời gian bảo quản là ở 40°C và trong 3 tháng. Các kết quả được nêu ở Bảng 4. Từ Bảng 4, ta thấy khả năng sống sót trong các Ví dụ 5 đến 7 cơ bản là không khác nhau bởi vì tỷ lệ sống sót là từ 11 % đến 17 % khi tỷ lệ khối lượng của sucroza/ trihaloza đạt từ 1/3 đến 3/1, và các Ví dụ 5 đến 7 thể hiện hiệu quả gần như bằng nhau.

Bảng 3

Số mẫu	Nồng độ trihaloza trong dung dịch chất bảo vệ (%)	Nồng độ sucroza trong dung dịch chất bảo vệ (%)	Nồng độ trihaloza trong huyền phù tế bào (%)	Nồng độ sucroza trong huyền phù tế bào (%)
Mẫu 3	20	20	6,6	6,6
Mẫu 4	10	30	3,3	10
Mẫu 5	30	10	10	3,3

Bảng 4

Số ví dụ	Số mẫu	Nhiệt độ bảo quản	Số lượng tế bào sống sót sau ngay khi làm khô (cfu/g)	Số lượng tế bào sống sót sau khi bảo quản (cfu/g)	Tỷ lệ sống sót (%)
Ví dụ 5	Mẫu 3	40°C	$5,2 \times 10^{11}$	$7,7 \times 10^{10}$	15
Ví dụ 6	Mẫu 4	40°C	$7,1 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{11}$	17
Ví dụ 7	Mẫu 5	40°C	$5,8 \times 10^{11}$	$6,1 \times 10^{10}$	11

Ví dụ thí nghiệm 4

Sử dụng các quy trình như dưới đây, bột tế bào vi khuẩn đông khô được sản xuất dựa trên phương pháp sản xuất theo sáng chế.

- 1) Nuôi cấy trong môi trường trung tính chủng *Bifidobacterium longum* OLB6001 trong môi trường casein được tiêu hóa (nghĩa là môi trường mà casein được tiêu hóa bằng enzyme được sử dụng làm protein)
- 2) 5400 mL canh thang nuôi cấy được tách ly tâm trong 20 phút ở 10.000 G và 4°C; 520 mL dịch nổi được tách bỏ; và thu được phần hạt nhỏ tế bào vi khuẩn (200mL)

3) 100 mL chất bảo vệ bao gồm sacarit có nồng độ đã định được thêm vào phần hạt nhỏ tế bào vi khuẩn (200mL), và huyền phù tế bào vi khuẩn được tạo ra và được đông khô bằng cách làm lạnh ở -80°C .

4) Ngay sau khi hoàn thành bước đông khô, 1 g bột tế bào vi khuẩn đông khô được phủ bằng nước bằng cách thêm dung dịch nước muối, số lượng tế bào sống sót (tức là, lượng tế bào sống) trong chất lỏng này được xác định trong môi trường nuôi cấy thạch BL mỏng.

5) Thêm vào đó, 2 g bột tế bào vi khuẩn đông khô được đặt vào lami-zip (nhãn hiệu: tên của sản phẩm túi làm bằng chất dẻo), và được bảo quản trong 8 ngày, 30 ngày, 82 ngày hoặc 124 ngày ở 40°C . Sau đó, số lượng tế bào sống sót (tức là, lượng tế bào sống) trong bột tế bào vi khuẩn đông khô được xác định tương tự bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy thạch BL mỏng.

Các dung dịch chất bảo vệ được sử dụng trong ví dụ thí nghiệm này được trình bày dưới đây.

(1) Ví dụ 8

Dung dịch sacarit (sau đây được gọi là “Mẫu 6”) bao gồm trihaloza và sucroza, mỗi loại có nồng độ 20 wt % được sử dụng. Nồng độ mỗi loại trihaloza và sucroza trong huyền phù trước khi làm đông khô thu được bằng cách trộn dung dịch sacarit này với phần hạt nhỏ tế bào là 6,7 wt %.

(2) Ví dụ so sánh 5

Dung dịch (sau đây được gọi là Mẫu so sánh 4) bao gồm 6 wt % sữa bột không kem, 1,7 wt % lactoza, 0,4 wt % axit amin (lizin, v.v.), 4 wt % các thành phần khác (dextrin, v.v.) được sử dụng.

Các kết quả được nêu ở Bảng 5 và Fig. 3. Bảng 5 cho thấy bột tế bào vi khuẩn đông khô của Ví dụ 8 (được thể hiện là số 2 khoanh tròn ở Fig. 3) có tỷ lệ sống sót cao đạt 40,0% khi bảo quản trong khoảng 4 tháng ở 40°C , trong khi đó bột tế bào vi khuẩn đông khô của Ví dụ so sánh 5 (được thể hiện là số 1 khoanh tròn ở Fig. 3) có tỷ lệ sống sót đạt 0,002% khi bảo quản trong khoảng 4 tháng ở 40°C .

Bảng 5

Số ví dụ	Số mẫu	Nhiệt độ bảo quản	Số lượng tế bào sống sót sau khi bảo quản (cfu/g)				
			0 ngày	8 ngày	30 ngày	82 ngày	124 ngày
Ví dụ 8	Mẫu 6	40°C	$3,1 \times 10^{11}$	$3,6 \times 10^{11}$	$1,9 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{11}$
So sánh	So sánh	40°C	$6,5 \times 10^{11}$	$2,3 \times 10^{11}$	$1,9 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^8$
Ví dụ 5	Mẫu 4						

Phương pháp theo sáng chế để sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô bảo quản được lâu dài làm cho có khả năng thu được hiệu quả vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacteria thậm chí sau khi bảo quản, đặc biệt đối với thực phẩm dạng rắn và thực phẩm dạng bột và đặc biệt trong những trường hợp việc bảo quản lâu dài phải được đảm bảo. Ngoài ra, không yêu cầu thiết bị đặc biệt và quy trình phức tạp nhờ đó giảm những chi phí phụ đi kèm và do đó làm cho phương pháp này có lợi về mặt kinh tế. Hơn nữa, khi bột tế bào vi khuẩn có thể được sử dụng thì nó cũng có thể được sử dụng thông thường ở dạng bột sau khi bảo quản, hoặc có thể được sử dụng hiệu quả dưới dạng nguyên liệu ban đầu để sản xuất thực phẩm. Do đó, bột từ tế bào vi khuẩn theo sáng chế là rất hữu dụng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô, trong đó huyền phù của các tế bào vi khuẩn được tạo huyền phù trong dung dịch sacarit, dung dịch này gồm có vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacterium, được làm đông khô để thu được bột tế bào vi khuẩn đông khô, và trong đó sacarit là đường trihaloza và sucroza, và nồng độ của đường trihaloza và sucroza trong huyền phù trước khi làm đông khô nằm trong khoảng từ 6,6% đến 15% theo khối lượng.
2. Phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô theo điểm 1, trong đó nồng độ của mỗi đường trihaloza và sucroza trong huyền phù trước khi làm đông khô nằm trong khoảng từ 8% đến 12% theo khối lượng
3. Phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô theo các điểm 1 hoặc 2, trong đó vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacterium là vi sinh vật thuộc loại *Bifidobacterium*.
4. Phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô theo điểm 3, trong đó vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacterium là chủng *Bifidobacterium bifidum*.
5. Phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô theo điểm 4, trong đó vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacterium là chủng *Bifidobacterium bifidum* OLB6378 (số nộp lưu: NITE BP-31).
6. Phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô theo điểm 3, trong đó vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacterium là chủng *Bifidobacterium longum*.
7. Phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô theo điểm 6, trong đó vi khuẩn axit lactic và/hoặc bifidobacterium là chủng *Bifidobacterium longum* số 7 (số nộp lưu: FERM BP-11242).
8. Bột tế bào vi khuẩn đông khô được sản xuất theo phương pháp sản xuất bột tế bào vi khuẩn đông khô theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.
9. Chế phẩm thực phẩm bao gồm bột tế bào vi khuẩn đông khô theo điểm 8 ở lượng hữu hiệu.
10. Phương pháp bảo quản bột tế bào vi khuẩn đông khô, phương pháp này bao gồm bước thu bột tế bào vi khuẩn đông khô bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, và sau đó bảo quản bột tế bào vi khuẩn đông khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C.

FIG. 1

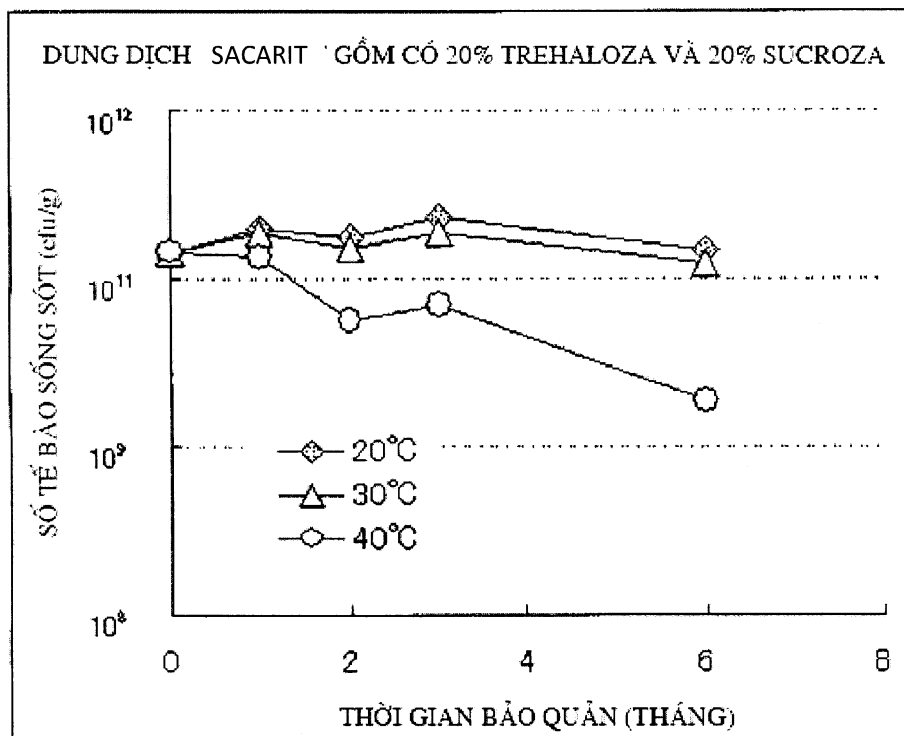


FIG. 2

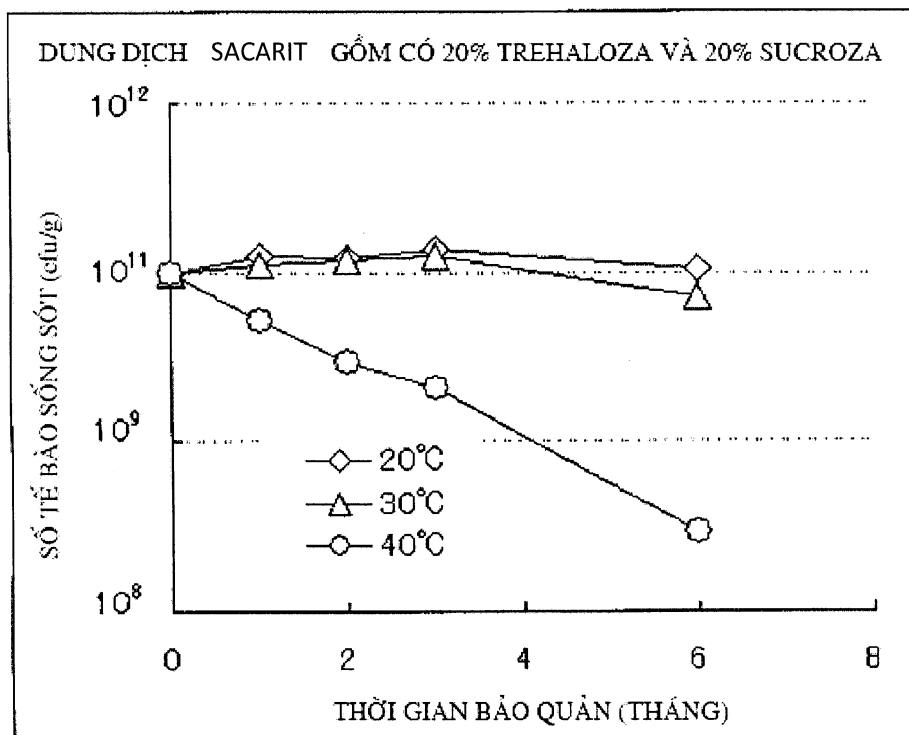


FIG. 3

