



(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)



1-0024622

(51)⁷ A23C 9/12; A23C 9/127; A23C 11/10; (13) B
A23C 19/032

(21) 1-2013-01928

(22) 23/11/2011

(86) PCT/EP2011/070835 23/11/2011

(87) WO2012/069546 31/05/2012

(30) 10192207.8 23/11/2010 EP

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/10/2013 307A

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

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

(72) JACOBSEN, Jonas (DK); WIND, Sandra Lykke (DK); QVIST, Karsten Bruun (DK).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM SỮA CHUA VÀ SẢN PHẨM SỮA
CHUA THU ĐƯỢC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa (ví dụ sữa chua) bao gồm việc cho một lượng hữu hiệu glycosidaza liên kết với N và/hoặc glycosidaza liên kết với O vào sữa và sản phẩm sữa thu được.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa (ví dụ sữa chua) bao gồm bước đưa vào sữa một lượng hữu hiệu glycosidaza liên kết với N và/hoặc glycosidaza liên kết với O.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các sản phẩm sữa chẳng hạn như sản phẩm sữa lên men (ví dụ sữa chua) là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này – các đặc tính chẳng hạn như độ nhớt và độ rắn chắc của gel là các đặc tính quan trọng của sản phẩm sữa liên quan.

Nói chung - khi sử dụng cùng một thành phần sữa, nếu có thể tạo ra độ nhớt và/hoặc độ rắn chắc của gel cao hơn, thì cũng có thể tạo ra cùng độ nhớt/độ rắn chắc của gel bằng lượng chất rắn của sữa (hoặc các chất khác) ít hơn, do đó tiết kiệm được nguyên liệu (hoặc thu được hiệu suất cao hơn).

Đối với các sản phẩm sữa lên men có hàm lượng chất béo thấp, như sữa chua có hàm lượng chất béo thấp, có thể khó thu được kết cấu tối ưu của sản phẩm – nói một cách chính xác hơn thì vấn đề là khó thu được độ nhớt kết cấu đủ cao ở các sản phẩm có hàm lượng chất béo thấp như vậy.

Việc bổ sung protein, thường là bột sữa gầy hoặc protein trên cơ sở nước sữa whey, có thể được xem như là một quy trình chuẩn để cải thiện kết cấu ở sữa chua có hàm lượng chất béo thấp. Tuy nhiên, giải pháp như vậy có thể dẫn đến chi phí cao và

không hoàn toàn phù hợp với mục đích có được sản phẩm có hàm lượng chất béo thấp/lượng calo thấp vì protein đưa vào dẫn đến làm tăng tổng số năng lượng.

Để cải thiện kết cấu – US2005/0095316A1 (đoạn [0005]) mô tả việc đưa thêm vào chất được gọi là tác nhân tạo cấu trúc (chất làm đặc, chất gel hoá) chẳng hạn như tinh bột, pectin hoặc gelatin. Tuy nhiên, như đã biết - ví dụ việc có thêm pectin hoặc gelatin trong sản phẩm sữa chua là không được ưu tiên.

Trong vòng vài năm gần đây, một kỹ thuật được gọi là phương pháp nuôi cấy tạo cấu trúc, dựa trên việc sản xuất polysacarit (EPS: polysacarit ngoại bào) ngoại bào, đã cải thiện rõ rệt độ nhớt của sản phẩm sữa có hàm lượng chất béo thấp như vậy – chẳng hạn WO2007/095958A1 (Chr. Hansen A/S) đã cho biết rằng chủng *Streptococcus thermophilus* tổng hợp nên EPS có thể làm cho sản phẩm sữa lên men có kết cấu “đặc quánh thành dây” hoặc kết cấu nhớt mong muốn.

Do đó, có thể cho rằng vấn đề độ nhớt kết cấu của sữa chua có hàm lượng chất béo thấp đến nay được giải quyết khá tốt bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy tạo EPC chẳng hạn.

Tuy nhiên, như được mô tả trong bài báo của A.N. Hassan và các đồng tác giả (J. Dairy Sci: 86:1632-1638; 2003) đặc tính được gọi là độ rắn chắc của gel có thể giảm đi một cách đáng kể khi dùng phương pháp nuôi cấy tạo EPS như vậy so với khi dùng phương pháp nuôi cấy không tạo EPS.

Do đó – hiện nay có thể nói rằng với sản phẩm sữa chua có hàm lượng chất béo thấp thì vấn đề độ nhớt được biết đến trước đây về cơ bản đã được giải quyết bằng phương pháp nuôi cấy tạo EPS – tuy nhiên, việc dùng phương pháp nuôi cấy EPS này có thể “đặt ra” một vấn đề mới liên quan đến sự giảm độ rắn chắc của gel.

Trong bài báo của A.N. Hassan và các đồng tác giả trong phần tóm tắt có đề cập đến mô đun nhớt đàn hồi thấp hơn – như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ

thuật này hiểu thì đặc tính modulus nhót đàn hồi này có liên quan đến độ rắn chắc của gel theo cách sao cho nếu như một sản phẩm có modulus nhót đàn hồi thấp hơn thì nó sẽ có độ rắn chắc của gel thấp hơn.

Fig 1 của bài báo này thể hiện rằng ứng suất trượt của sữa chua EPS là cao hơn nhiều, do vậy người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này giải thích hiện tượng này một cách trực tiếp là độ nhót cao hơn.

Như đã nêu trên - với các sản phẩm sữa nói chung chẳng hạn như sản phẩm sữa lên men (ví dụ sữa chua) – đặc tính được gọi là độ rắn chắc của gel là một đặc tính rất quan trọng.

Chẳng hạn, độ rắn chắc của gel thấp có thể gây cảm giác không muốn ăn sản phẩm sữa này.

Ngoài ra, nếu ví dụ sữa chua có độ rắn chắc của gel thấp thì sản phẩm sẽ loãng và rất dễ chảy – ví dụ trên thìa hoặc ví dụ trên bát.

Ngoài ra, nếu sữa chua có độ rắn chắc của gel thấp thì sẽ có xu thế xảy ra hiện tượng tách do co (xem phần dưới đây) do sự tách của nước sữa whey.

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, enzym gây đông cục sữa, chẳng hạn như proteaza chymosin (còn được gọi là rennin) được dùng để tạo ra pho mát, trong quá trình đó chymosin gây đông tụ và tạo thành cục sữa đông.

Như đã biết, quá trình sản xuất pho mát bao gồm ba bước, hoặc giai đoạn, tất cả các giai đoạn này là kết quả của việc bổ sung enzym gây đông cục sữa: 1) đông cục (hoặc gel mềm), đông đặc, hoặc làm rắn chắc đông cục này, và cuối cùng là đẩy nước sữa whey ra, quá trình sau này còn được gọi là tách do co.

Rõ ràng là – khi sản xuất ví dụ sữa chua, người ta thường không muốn để xảy ra hiệu ứng tách do co này – tức là quá trình tách sữa thành sữa đông rắn và nước sữa whey lỏng.

Do đó, việc sử dụng enzym gây đông cục sữa như chymosin thường không được ưu tiên khi người ta muốn sản xuất sữa chua.

US2005/0095317A1 (Danone) mô tả việc sử dụng proteaza với hoạt tính kappa-cazain phân trong quá trình sản xuất sản phẩm sữa lên men chẳng hạn như sữa chua.

Proteaza này ví dụ có thể là chymosin – xem ví dụ [0028] của đơn yêu cầu cấp patent Mỹ này.

Các proteaza (ví dụ chymosin) thủy phân cazain ở trong sữa – do đó thoát qua người ta cho rằng các proteaza (ví dụ chymosin) có thể gây ra cho quá trình sản xuất sữa chua hiệu ứng tách do co không mong muốn.

Tuy nhiên, phần [0008] có giải thích rằng, một cách bất ngờ và ngoài mong đợi, việc sử dụng các proteaza chẳng hạn như chymosin “cải thiện kết cấu, và đặc biệt là làm tăng độ nhớt của sữa chua và sữa được lên men, mà không gây ra sự tách do co là một hiện tượng không được phép xảy ra ở các sản phẩm sữa được lên men này”.

US2005/0095316A1 (Danone) về cơ bản đề cập đến cùng vấn đề kỹ thuật như trong US2005/0095317A1 (Danone) được bàn luận trên đây – tuy nhiên, trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ này proteaza được dùng được xác định là proteaza vi khuẩn (chymosin là từ bò – tức là nó không phải là proteaza vi khuẩn).

US7560127B2 (DSM) mô tả việc sử dụng enzym khử glycosyl đặc biệt trong sản xuất pho mát. Enzym khử glycosyl này được xác định là enzym có thể khử glycosyl kappa cazain (-cazain) có mặt trong sữa. Như được bàn luận sau đây – cazain là protein với glycosyl hoá kiểu liên kết với O. Do đó, các enzym khử glycosyl hoá được đề cập đến

trong patent Mỹ này là các enzym có thể khử glycosyl các protein glycosyl hoá liên kết với O chẳng hạn như kappa-cazain (kappa-cazain là glycoprotein kiểu liên kết với O).

Patent Mỹ này ở cột 1, các dòng 51-58, đã bộc lộ như sau:

“Đã bất ngờ phát hiện ra rằng việc khử glycosyl -cazain sẽ dẫn đến sự đóng cục vì nó là đường gắn với -cazain mang điện tích âm sẽ làm ổn định mixen cazain. Sự đóng cục của sữa theo cách này dẫn đến quy trình trong đó phần lớn hơn của -cazain được giữ lại trong pho mát và có thể thu được hiệu suất cao hơn khi tận dụng hoạt tính protein phân của chymosin.”

Nói tóm lại, có thể nói rằng patent US7560127B2 này chủ yếu mô tả rằng với quá trình sản xuất pho mát, người ta có thể đạt được sự đóng cục cần thiết bằng cách sử dụng enzym khử glycosyl có liên quan đến liên kết O được đề cập thay vì chymosin. Vì patent Mỹ số 7560127B2 này đề cập đến phương pháp sản xuất pho mát và điểm 1 yêu cầu bảo hộ của patent này nêu rằng có thể sản xuất pho mát mà không cần dùng proteaza (chẳng hạn như chymosin) người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ ngầm hiểu rằng việc sử dụng enzym khử glycosyl có liên quan đến liên kết O phải dẫn đến lượng tách do co đáng kể.

Cũng cần phải thấy rằng US7560127B2 đề cập đến phương pháp sản xuất pho mát, là quá trình cần phải có một lượng tách do co đáng kể. Kết quả là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ không ngờ rằng phương pháp này có thể được áp dụng cho sản phẩm sữa lên men như là sữa chua, mà trong đó sự tách do co thường là điều rất không mong muốn.

Ngoài ra, US7560127B2 không đề cập rõ ràng đến đặc tính độ rắn chắc của gel có lợi như được nêu trong bản mô tả này – tức là có thể nói là tài liệu này chỉ đề cập rõ ràng đến hiệu ứng đóng cục/tách do co do việc sử dụng enzym khử glycosyl liên kết với O được mô tả thay vì chymosin.

Bài báo của E. Cases và các đồng tác giả (Journal of Food Science; Vol. 68, Nr. 8, 2003, các trang 2406-2410) mô tả quá trình khử glycosyl của sữa đã axit hóa bằng phương pháp hóa học bằng enzym khử glycosyl liên kết với O (neuraminidaza; EC 3.2.1.18).

Sữa nêu trong tài liệu này được axit hóa bằng phương pháp hóa học bằng hóa chất GDL (xem trang 2407, phần “Acid milk coagulation”) – do đó, trong bài báo của E. Cases và các đồng tác giả không mô tả sản phẩm "sữa được lên men" được cấy bằng các vi sinh vật thích hợp (ví dụ sữa chua).

Bài báo của E. Cases và các đồng tác giả mô tả rằng việc sử dụng enzym khử glycosyl liên kết với O neuraminidaza (EC 3.2.1.18) cho độ rắn chắc của gel cuối cùng cao hơn cho sữa được xử lý bằng enzym và sữa được axit hóa bằng phương pháp hóa học.

Ở đây cần lưu ý là bài báo của E. Cases và các đồng tác giả không đề cập bất kỳ điều gì liên quan đến nội dung mô tả này về hiệu ứng tách do co có thể có do việc dùng enzym khử glycosyl liên kết với O neuraminidaza (EC 3.2.1.18).

Trong bài báo của E. Cases và các đồng tác giả không có bằng chứng liên quan về độ tinh khiết của chế phẩm enzym khử glycosyl liên kết với O neuraminidaza được sử dụng (EC 3.2.1.18).

Do đó có thể cho rằng chế phẩm enzym được sử dụng có thể đã có hoạt tính enzym proteaza liên quan và rằng hoạt tính enzym proteaza này có thể đã gây ra hiệu ứng rắn chắc của gel được mô tả – như đã nêu trên, US2005/0095317A1 (Danone) mô tả rằng việc sử dụng proteaza có thể cải thiện độ rắn chắc của gel.

Tính xác đáng của nghi ngờ này còn được khẳng định bằng thực tế là *Clostridium perfringens*, vi sinh vật mà từ đó thu được neuraminidaza trong bài báo của E. Cases và các đồng tác giả (xem phần Materials and Một phương pháp) được biết là chứa nhiều hơn

140 enzym protein phân– xem ví dụ dữ liệu peptidaza chính thức của Merops (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/speccards?sp=sp000283;type=peptidaza>).

Khi không có thông tin về độ tinh khiết của chế phẩm enzym được cung cấp, dường như rất đáng tin cậy cho rằng chế phẩm này đã không được tinh chế để loại trừ tất cả các enzym có hoạt tính protein phân liên quan, mà chính những enzym này có thể có tác động đến độ rắn chắc của gel được mô tả trong bài báo của E. Cases và các đồng tác giả.

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này – enzym khử glycosyl liên kết với O neuraminidaza (EC 3.2.1.18) có thể còn có hoạt tính glycosidaza liên kết với N nào đó. Tuy nhiên, bài báo E. Cases và các đồng tác giả được bàn luận trên đây chỉ đề cập đến hoạt tính glycosidaza liên kết với O của neuraminidaza (EC 3.2.1.18), còn trong bài báo của E. Cases và các đồng tác giả chỉ bàn luận đến hoạt tính enzym thích hợp của neuraminidaza.

EP1489135A1 có thể được xem như là đề cập đến việc sử dụng oleuropein được khử glycosyl (thu nhận từ dịch chiết lá ôliu) để tăng độ rắn chắc của gel của nước sữa whey được axit hóa và sữa chua. Beta-glycosidaza (beta-1,6-glucosidaza) và lactaza trong tài liệu này “đơn giản” là được dùng để khử glycosyl oleuropein – tức là các enzym nêu trong tài liệu này không phải là thành phần hoạt tính để gia tăng độ rắn chắc của gel ở trong sữa/sữa chua. Oleuropein không phải là protein/peptit có hoạt tính enzym. Beta-glycosidaza không phải là glycosidaza liên kết với N hoặc O. Phương pháp theo sáng chế tốt hơn là không bao gồm việc bổ sung dịch chiết lá ôliu được hoạt hóa (hoặc các dịch chiết khác) như được bộc lộ trong EP1489135A1 vào cơ chất sữa động vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Có thể xem vấn đề mà sáng chế nhằm giải quyết là việc đưa ra một phương pháp mới để cải thiện/tăng độ rắn chắc của gel của sản phẩm sữa thích hợp – ví dụ sản phẩm

sữa lên men như là sữa chua – đặc biệt là sản phẩm sữa lên men có hàm lượng chất béo thấp như sữa chua có hàm lượng chất béo thấp.

Ngoài ra – tốt hơn là phương pháp mới này phải không có tác động không có lợi đến độ nhớt của sản phẩm.

Giải pháp được các tác giả sáng chế tìm ra là sử dụng enzym khử glycosyl (tức là glycosidaza) giúp sản xuất ra sản phẩm sữa (ví dụ sữa chua) có sự tăng/cải thiện đáng kể độ rắn chắc của gel. Ngoài ra, các tác giả của sáng chế đã nhận ra việc sử dụng các glycosidaza thích hợp nêu trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo cách thức sao cho không có hiệu ứng tách do co đáng kể. Như đã nêu trên, việc không có hiệu ứng tách do co đáng kể là một ưu điểm lớn ví dụ trong quá trình sản xuất sản phẩm sữa lên men chẳng hạn như sữa chua. Cụ thể là, liên quan đến việc sử dụng glycosidaza liên kết với O, các tác giả sáng chế bất ngờ phát hiện ra rằng có thể sử dụng glycosidaza này mà không có hiệu ứng tách do co đáng kể. Các tác giả của sáng chế cũng đã nhận thấy rằng việc sử dụng enzym khử glycosyl không có ảnh hưởng không tốt đến độ nhớt của sản phẩm.

Ví dụ thực hiện 4 nêu trong bản mô tả này đã cho thấy rằng việc sử dụng glycosidaza PNGaza-F cho sữa chua có hàm lượng chất béo thấp với độ rắn chắc của gel được tăng lên/cải thiện đáng kể mà không có ảnh hưởng không tốt đến độ nhớt của sữa chua có hàm lượng chất béo thấp.

Như được mô tả trong ví dụ thực hiện 1 nêu trong bản mô tả này – chế phẩm enzym glycosidaza được dùng trong các ví dụ thực hiện trong bản mô tả này được phân tích và được nhận thấy là không có tạp chất – tức là không có các tạp chất chẳng hạn như hoạt tính enzym proteaza.

Ở đây cần lưu ý là PNGaza-F là glycosidaza hoạt động trên “glycan liên kết với N” – tức là khử glycosyl glycoprotein liên kết với N.

Như đã nêu trên – cazain là glycoprotein chứa glycan liên kết với O và do đó PNGaza-F như vậy không khử glycosyl cazain – do đó, lý do mà do đó PNGaza-F cho kết quả là độ rắn chắc tốt của gel như nêu trong bản mô tả này không thể là do cơ chế liên quan đến khử glycosyl cazain như ví dụ được bàn luận trong US7560127B2 (xem phần nêu trên).

Nói tóm lại và không chỉ giới hạn ở lý thuyết nào – thực tế mà các tác giả của sáng chế đã chứng tỏ rằng glycosidaza liên kết với N như PNGaza-F hoạt động theo sáng chế (tức là cải thiện độ rắn chắc của gel) chứng tỏ rằng cơ chế cơ bản cho việc đạt được nêu trong bản mô tả này độ rắn chắc của gel được cải thiện một cách phù hợp là hoàn toàn khác với cơ chế trên cơ sở “khử glycosyl của cazain” được nêu trong US7560127B2 liên quan đến việc sử dụng glycosidaza liên kết với O như là chất thay thế cho chymosin trong quá trình điều chế pho mát (xem phần nêu trên).

Theo cách khác có thể nói rằng phát hiện rằng glycosidaza liên kết với N như PNGaza-F có tác dụng theo sáng chế (tức là cải thiện độ rắn chắc của gel) có thể được xem là rất bất ngờ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật khi tham khảo các tài liệu đã biết chẳng hạn như US7560127B2.

Không chỉ giới hạn ở lý thuyết nào – một giải thích có thể có cho việc sử dụng glycosidaza như vậy mà có thể mang lại độ rắn chắc của gel được cải thiện phù hợp nêu trong bản mô tả đó là glycosidaza loại bỏ glycan ra khỏi protein cazain nước sữa whey không liên quan.

Chẳng hạn, glycosidaza liên kết với N như PNGaza-F có thể loại N-glycan ra khỏi một phần glycoprotein nước sữa whey chẳng hạn như α -lactalbumin mà được biết là được glycosyl hóa ở N. Protein nước sữa whey ở một mức độ nào đó còn có thể gắn kết với mạng lưới protein, làm xuất hiện đặc tính rắn chắc của gel.

Việc loại glycan kỵ nước và các thay đổi điện tích gây ra do phản ứng khử amin có thể tạo thuận lợi cho sự tạo thành mạng lưới protein cứng hơn và do đó có thể đạt được sự cải thiện về độ rắn chắc của gel.

Không chỉ giới hạn ở lý thuyết nào - tin rằng một số glycoprotein nước sữa whey liên quan nêu trong bản mô tả này còn chứa glycan liên kết với O.

Do đó, các tác giả của sáng chế thử nghiệm xem liệu nếu glycosidaza liên kết với O cũng có thể cho độ rắn chắc của gel được cải thiện phù hợp theo sáng chế.

Ở ví dụ thực hiện 5 nêu trong bản mô tả này đã chứng tỏ được rằng việc sử dụng glycosidaza liên kết với O như GalNAC cũng có thể mang lại độ rắn chắc của gel được cải thiện phù hợp theo sáng chế.

Xét trên quan niệm lý thuyết – người ta tin rằng ưu điểm phù hợp ở đây của việc dùng glycosidaza liên kết với N như PNGaza-F sẽ là giới hạn (hoặc không có) hiệu ứng tách do co không mong muốn ví dụ liên quan đến quá trình sản xuất sản phẩm sữa chua.

Một lý do cho quan niệm lý thuyết này đó là glycosidaza liên kết với N như PNGaza-F không tác động lên cazain và như được bàn luận trong ví dụ US7560127B2, đối với quá trình sản xuất pho mát, ta có thể có được sự đóng cục yêu cầu (sự tách do co) bằng cách sử dụng các enzym khử glycosyl có liên quan đến liên kết O (để khử glycosyl cazain) thay vì chymosin.

Trong ví dụ thực hiện 4 nêu trong bản mô tả này đã chứng tỏ được rằng glycosidaza liên kết với N PNGaza-F không gây ra hiệu ứng tách do co không mong muốn nêu ở đây trong quá trình sản xuất sữa chua.

Các tác giả của sáng chế thử nghiệm hiệu ứng tách do co không mong muốn ở đây liên quan đến ví dụ sản xuất sữa chua cho glycosidaza liên kết với O như GalNAC.

Như được thể hiện ở ví dụ thực hiện 6 ở đây – có thể nói điều bất ngờ với các tác giả của sáng chế – là không có hiệu ứng tách do cơ không mong muốn ở đây liên quan đến sản xuất sữa chua khi glycosidaza liên kết với O GalNAC được dùng cho quá trình sản xuất sữa chua.

Ví dụ thực hiện 7 ở đây đã chứng tỏ được rằng việc sử dụng glycosidaza (ở đây là PNGaza-F) tạo ra độ rắn chắc của gel được cải thiện một cách phù hợp ở cả sữa lên men dùng vi khuẩn axit lactic (LAB) và sữa được axit hóa bằng phương pháp hoá học.

Không bị giới hạn ở lý thuyết nào, điều này gợi ý là tác động của glycosidaza đến độ rắn chắc của gel là tác động vật lý (tức là khử glycosyl của protein nước sữa whey như đã nêu trên) - chứ không phải là tác động sinh lý (tức là tác động, trong đó glycosidaza về cơ bản chỉ ảnh hưởng đến một yếu tố nào đấy liên quan đến chức năng của LAB chẳng hạn).

Trong các ví dụ thực hiện được bàn luận trên đây, sử dụng là sữa được xử lý bằng nhiệt – tức là enzym glycosidaza được cho vào sữa sau quá trình xử lý bằng nhiệt thích hợp.

Không chỉ giới hạn ở lý thuyết nào - glycosidaza như ví dụ PNGaza-F cũng phải có tác dụng (tức là cho sự cải thiện độ rắn chắc của gel thích hợp ở đây) khi được cho vào sữa thô (tức là sữa không được xử lý bằng nhiệt) sau đó mới xử lý bằng nhiệt phù hợp ở đây.

Do đó, khía cạnh thứ nhất của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa bao gồm bước sau:

(i): cho glycosidaza liên kết với N và/hoặc glycosidaza liên kết với O vào cơ chất sữa; và

(ii) tùy ý axit hoá (ví dụ lên men) cơ chất sữa này, và/hoặc tùy ý thực hiện các bước thích hợp để thu được sản phẩm sữa, trong đó (các) bước thích hợp này được thực hiện trong điều kiện, trong đó một lượng hữu hiệu glycosidaza có tác dụng - do sự có mặt của nó - làm tăng độ rắn chắc của gel cho sản phẩm sữa đã qua xử lý.

Cơ chất sữa này có thể được chọn từ nhóm bao gồm sữa từ động vật (chẳng hạn như bò, cừu, động vật cái, dê, trâu hoặc lạc đà) và sữa có nguồn gốc thực vật (chẳng hạn như sữa đậu nành, sữa sồi, sữa gạo, sữa hạnh nhân).

Một phương án của khía cạnh thứ nhất đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm sữa đã qua xử lý từ sữa động vật bao gồm các bước sau:

(i): cho một lượng hữu hiệu vào glycosidaza liên kết với N và/hoặc glycosidaza liên kết với O vào cơ chất sữa động vật; và

(ii): thực hiện các bước thích hợp để thu được sản phẩm sữa đã qua xử lý từ sữa động vật, trong đó (các) bước thích hợp được thực hiện trong điều kiện, trong đó một lượng hữu hiệu glycosidaza có tác dụng - do sự có mặt của nó - làm tăng độ rắn chắc của gel cho sản phẩm sữa đã qua xử lý;

với điều kiện là nếu glycosidaza chỉ là glycosidaza liên kết với O (chẳng hạn như α -galactosidaza, N-acetyl-galactosaminidaza [GalNAC] và neuraminidaza) có khả năng thực hiện quá trình khử glycosyl -cazain có mặt trong sữa thì sản phẩm sữa đã qua xử lý từ sữa động vật là sản phẩm sữa lên men được cấy bằng các vi sinh vật thích hợp (sản phẩm sữa lên men không phải là sản phẩm pho mát có loại ra một lượng đáng kể huyết thanh sữa).

Thuật ngữ “một lượng hữu hiệu glycosidaza cho - do sự có mặt của nó - sự tăng độ rắn chắc của gel cho sản phẩm sữa đã qua xử lý” ở bước (ii) của khía cạnh thứ nhất còn có thể là thuật ngữ “một lượng hữu hiệu glycosidaza tạo ra - do sự có mặt của nó - sự cải thiện độ rắn chắc của gel cho sản phẩm sữa đã qua xử lý”.

Thuật ngữ “thực hiện các bước thích hợp để thu được sản phẩm sữa” của bước (ii) sẽ phải được hiểu là các bước thích hợp phù hợp để tạo ra sản phẩm sữa quan tâm (ví dụ sữa chua).

Rõ ràng là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu biết một cách rõ ràng là các bước thích hợp như vậy – mà chẳng hạn liên quan đến sản xuất sữa chua bao gồm việc cấy bằng nuôi cấy vi khuẩn axit lactic (LAB) thích hợp.

Việc đo độ rắn chắc của gel của sản phẩm sữa quan tâm (ví dụ sữa chua) là công việc thông thường đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ví dụ thực hiện 2 nêu trong bản mô tả này đưa ra phương pháp chuẩn thích hợp để đo độ rắn chắc của gel của sản phẩm sữa quan tâm – tốt hơn là độ rắn chắc của gel phù hợp được đo ở đây theo phương pháp của ví dụ 2 này.

Bài báo A.N. Hassan và các đồng tác giả (J. Dairy Sci: 86:1632-1638; 2003) được bàn luận trên đây cũng mô tả phương pháp chuẩn thích hợp để đo độ rắn chắc của gel.

Xem ví dụ phân phân chất liệu và phương pháp của bài báo này, theo đó môđun đàn hồi và môđun nhót đàn hồi được xác định – như có thể được nhận biết trong ví dụ 2 nêu trong bản mô tả này, các thông số môđun đàn hồi và môđun nhót đàn hồi được sử dụng để xác định độ rắn chắc của gel và từ đó người ta có thể tùy ý thu nhận môđun được gọi là môđun phức hợp, như được mô tả trong ví dụ 2 nêu trong bản mô tả này.

Vì với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng đo độ rắn chắc của gel của sản phẩm sữa quan tâm – nên tất nhiên cũng là dễ dàng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này xác định yêu cầu của bước (ii) trong phương pháp thuộc khía cạnh thứ nhất liên quan đến nếu:

“một lượng hữu hiệu glycosidaza tạo ra - do sự có mặt của nó - sự cải thiện độ rắn chắc của gel cho sản phẩm sữa này”.

Để xác định yêu cầu này – người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đơn giản thực hiện “(các) bước thích hợp để thu được sản phẩm sữa” của bước (ii) khi có và không có mặt một lượng hữu hiệu glycosidaza – và khi đó xác định hiệu ứng rắn chắc của gel phù hợp nêu trong bản mô tả này của sự có mặt của một lượng bổ sung glycosidaza.

Nếu độ rắn chắc của gel được cải thiện/tăng lên thì đã có bổ sung một lượng hữu hiệu glycosidaza vào cơ chất sữa này theo bước (i) của khía cạnh thứ nhất và (các) bước thích hợp của bước (ii) cũng đã được thực hiện trong điều kiện, trong đó một lượng hữu hiệu glycosidaza tạo ra - do sự có mặt của nó - sự cải thiện độ rắn chắc của gel cho sản phẩm sữa đã qua xử lý.

Như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này – các phương pháp khác nhau để đo độ rắn chắc của gel có thể cho các kết quả khác nhau về giá trị tuyệt đối. Tuy nhiên, liên quan đến việc đo lường sự cải thiện độ rắn chắc của gel như được bàn luận trong bản mô tả này về cơ bản là đo sự cải thiện tương đối của độ rắn chắc của gel – tức là sự cải thiện khi có và không có mặt một lượng hữu hiệu glycosidaza.

Theo như hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này – phương pháp đo độ rắn chắc của gel như ví dụ được mô tả trong ví dụ thực hiện 2 nêu trong bản mô tả này và bài báo A.N. Hassan và các đồng tác giả sẽ (trong phạm vi không chắc chắn sai số tương đối nhỏ) cho cùng một kết quả tương đối – tức là một cách độc lập với phương pháp đo lường cụ thể được dùng khi ta muốn đạt được cùng một kết quả liên quan đến sự cải thiện tương đối của độ rắn chắc của gel.

Điều kiện của phương pháp của khía cạnh thứ nhất có thể được xem như là loại trừ liên quan đến US7560127B2 được bàn luận trên đây và bài báo của E. Cases và các

đồng tác giả được bàn luận trên đây (Journal of Food Science; Vol. 68, Nr. 8, 2003, các trang 2406-2410).

Như đã nêu trên - trong bài báo của E. Cases và các đồng tác giả không mô tả sản phẩm "sữa được lên men" được cấy bằng vi sinh vật thích hợp (ví dụ sữa chua).

Như đã nêu trên - US7560127B2 không đề cập bất kỳ điều gì rõ ràng về đặc tính độ rắn chắc của gel phù hợp nêu trong bản mô tả này – tức là ta có thể nói rằng bài báo này chỉ đề cập đến hiệu ứng đóng cục/tách do co quy cho việc sử dụng enzym khử glycosyl liên kết với O được mô tả thay vì chymosin.

Tuy nhiên, có thể nói rằng trong US7560127B2 bằng cách đưa thêm enzym khử glycosyl liên kết với O được mô tả vào cơ chất sữa trong quá trình sản xuất sản phẩm sữa pho mát – về mặt lý thuyết ám chỉ rằng đã bổ sung một lượng hữu hiệu glycosidaza có thể đưa ra độ rắn chắc của gel được cải thiện một cách phù hợp trong đó.

Điều kiện này đề cập đến tình thế, trong đó glycosidaza là glycosidaza liên kết với O duy nhất – US7560127B2 không mô tả bất kỳ điều gì liên quan đến sử dụng glycosidaza liên kết với N ở đây – do đó, nếu một lượng hữu hiệu của glycosidaza (tức là bao hàm một hoặc nhiều glycosidaza) được cho vào trong bước (i) của khía cạnh thứ nhất sẽ là ví dụ hỗn hợp của glycosidaza liên kết với N và glycosidaza liên kết với O thì đó sẽ không phải là trường hợp, trong đó glycosidaza này là glycosidaza liên kết với O duy nhất.

Trong nội dung mô tả này – người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể nhận diện một cách thông thường nếu một sản phẩm sữa là sản phẩm pho mát như được mô tả trong US7560127B2 hoặc sản phẩm sữa thích hợp khác được nêu trong bản mô tả này chẳng hạn như sản phẩm sữa lên men như ví dụ sữa chua.

Các định nghĩa

Thuật ngữ “glycan” dùng để chỉ polysacarit hoặc oligosacarit. Các glycan có thể là polyme đồng nhất hoặc dị polyme của các gốc monosacarit, và có thể có mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Glycan cũng có thể được dùng để chỉ phần cacbohyđrat của liên hợp glyco, chẳng hạn như glycoprotein, glycolipid, hoặc proteoglycan.

Thuật ngữ “glycoprotein” là các protein có chứa mạch oligosacarit (glycan) được gắn đồng hoá trị với mạch bên của polypeptit. Cacbohyđrat này được gắn với protein ở vị trí cải biến đồng dịch mã hoặc hậu dịch mã.

Thuật ngữ “glycosidaza” (còn được gọi là glycosit hydrolaza) dùng để chỉ enzym xúc tác sự thủy phân của mỗi liên kết/kết nối glycosit - liên kết glycosit là dạng liên kết đồng hoá trị kết nối phân tử cacbohyđrat (đường) với một nhóm khác, mà có thể là hoặc có thể không phải là cacbohyđrat khác. Glycosidaza mà khử glycosyl một phần hoặc hoàn toàn glycan liên kết với N có thể được gọi là trong bản mô tả này là glycosidaza liên kết với N. Tương tự, glycosidaza khử glycosyl một phần hoặc hoàn toàn glycan liên kết với O trong bản mô tả này có thể được gọi là glycosidaza liên kết với O.

Thuật ngữ glycosidaza liên kết với N là một thuật ngữ được xác định rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết liệu glycosidaza quan tâm đặc biệt là glycosidaza liên kết với N hoặc là không.

Tương tự, thuật ngữ glycosidaza liên kết với O là một thuật ngữ được xác định rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rằng liệu một glycosidaza quan tâm đặc biệt là glycosidaza liên kết với O hoặc là không.

Glycosidaza trong bản mô tả này còn có thể được gọi là enzym khử glycosyl.

Thuật ngữ “quá trình glycosyl hoá” là quá trình enzym gắn glycan với proteins, lipit, hoặc các phân tử hữu cơ khác.

Thuật ngữ “glycan liên kết với N” dùng để chỉ glycan gắn với nitơ của các mạch bên asparagin hoặc arginin bình thường.

Thuật ngữ “glycan liên kết với O” dùng để chỉ glycan gắn với nguyên tử oxy của hydroxy của các mạch bên của serin, threonin, tyrosin, hydroxylysin bình thường, hoặc hydroxyprolin, hoặc với oxygens trên lipid chẳng hạn như ceramit.

Thuật ngữ "vi khuẩn axit lactic" dùng để chỉ vi khuẩn gam dương, ưa ít oxy hoặc yếm khí, lên men các đường và sản sinh ra các axit bao gồm axit lactic như là thành phần axit được tạo ra chính, axit axetic và axit. Vi khuẩn axit lactic hữu ích nhất trong công nghiệp được tìm thấy trong bộ “*Lactobacillales*” bao gồm *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. và *Propionibacterium* spp. Ngoài ra, vi khuẩn tạo axit lactic thuộc vào nhóm vi khuẩn yếm khí nghiêm ngặt, bifidobacteria, tức là *Bifidobacterium* spp., thường được bao gồm trong nhóm vi khuẩn axit lactic. Các vi khuẩn này thường được dùng làm nuôi cấy trong thực phẩm đơn lẻ hoặc phối hợp với vi khuẩn axit lactic khác.

Thuật ngữ “cơ chất sữa” có thể là chất liệu sữa thô và/hoặc được xử lý bất kỳ mà có thể cho xử lý bằng enzym (và có thể là lên men) theo phương pháp của sáng chế. Do đó, các cơ chất sữa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch/huyền phù của sữa hoặc sản phẩm giống như sữa bất kỳ chứa protein, chẳng hạn như sữa nguyên kem hoặc sữa có hàm lượng chất béo thấp, sữa gầy, nước sữa buttermilk (nước sữa còn lại sau khi tách bơ), bột sữa hoàn nguyên, sữa đặc, sữa sấy khô, nước sữa whey, nước sữa whey permeate, lactoza, nước cái từ quá trình kết tinh lactoza, dịch đặc protein từ nước sữa whey, hoặc cream. Tất nhiên, cơ chất sữa này có thể có nguồn gốc từ nguồn động vật (có vú) hoặc không phải có nguồn gốc động vật bất kỳ, ví dụ là sữa về cơ bản là tinh khiết, hoặc bột sữa hoàn nguyên. Tốt hơn là, ít nhất một phần protein trong cơ chất sữa này là proteins có trong tự nhiên của sữa, chẳng hạn như cazain hoặc protein nước sữa whey. Tuy nhiên, một phần của protein này có thể là protein không xuất hiện trong tự nhiên ở

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

Thuật ngữ “sữa” được hiểu là sự tiết sữa thu được bằng cách lấy sữa từ động vật có vú bất kỳ, chẳng hạn như bò, cừu, động vật cái, dê, trâu hoặc lạc đà. Theo một phương án được ưu tiên, sữa này là sữa bò. Thuật ngữ sữa cũng bao gồm “sữa” có nguồn gốc không phải có từ động vật hoặc có nguồn gốc thực vật (ví dụ từ rau hoặc nguồn ngũ cốc), chẳng hạn như sữa đậu nành, sữa sồi, sữa gạo, sữa hạnh nhân. Các nguồn khác là bông, lúa mì, malt, ngô, khoai tây, đậu, đậu lupin, và lúa miến. Tùy ý sữa này được axit hóa, ví dụ bằng cách bổ sung axit (chẳng hạn như axit xitric, axetic hoặc axit lactic), hoặc được phối trộn, ví dụ với nước. Sữa này có thể là sữa thô hoặc được xử lý, ví dụ bằng cách lọc, tiệt trùng, thanh trùng, làm đồng nhất hoá etc, hoặc có thể là sữa sấy khô được hoàn nguyên. Một ví dụ quan trọng của “sữa bò” theo sáng chế là sữa bò được thanh trùng. Cần hiểu rằng sữa này có thể là được axit hóa, xử lý bằng glycosidaza, được phối trộn hoặc được xử lý trước khi, trong và/hoặc sau khi cấy bằng vi khuẩn.

Trong nội dung mô tả này, thuật ngữ sản phẩm sữa đã qua xử lý là sản phẩm được tạo ra bằng cách xử lý cơ chất sữa bằng glucosidaza liên kết với N hoặc O, tùy ý sản phẩm này còn được lên men hoặc được axit hóa. Thuật ngữ này bao gồm sản phẩm sữa lên men (mà có thể là sản phẩm dạng uống, dạng khuấy trộn hoặc đóng rắn) và pho mát.

“Làm đồng nhất hoá” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ việc khuấy trộn mạnh để thu được huyền phù hoặc nhũ tương hoà tan. Nếu quá trình làm đồng nhất hoá được thực hiện trước lên men, thì quá trình này có thể được thực hiện để phá vỡ chất béo trong sữa thành kích cỡ nhỏ hơn sao cho nó không còn bị tách biệt ra khỏi sữa. Điều này có thể được thực hiện đối với sữa này ở áp suất cao qua các lỗ nhỏ.

“Lên men” trong phương pháp theo sáng chế dùng để chỉ việc chuyển hoá các cacbohydrat thành rượu hoặc axit nhờ tác động của vi sinh vật. Tốt hơn nếu quá trình lên men trong phương pháp theo sáng chế bao gồm việc chuyển hoá lactoza thành axit lactic.

Vi khuẩn axit lactic, bao gồm cả vi khuẩn thuộc loài *Lactobacillus* sp. và *Streptococcus thermophilus*, thường được cung cấp cho ngành công nghiệp sữa hoặc dưới dạng nuôi cấy được làm đông lạnh hoặc được làm đông khô để nhân giống khối ban đầu hoặc như được gọi là nuôi cấy “đưa trực tiếp vào hũ Direct Vat Set” (DVS), được dự định để cấy trực tiếp vào thùng hoặc hũ lên men để sản xuất sản phẩm sữa đã qua xử lý, chẳng hạn như sản phẩm sữa lên men. Nói chung các nuôi cấy như vậy được gọi là “nuôi cấy giống ban đầu” hoặc “nuôi cấy men khởi động”.

Tuỳ ý, cơ chất sữa được lên men này có thể được đưa đi xử lý bằng nhiệt để làm bất hoạt vi sinh vật.

Quá trình lên men sẽ được sử dụng trong sản xuất sản phẩm sữa lên men là đã được biết rõ và chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách thức làm sao để lựa chọn được các điều kiện quy trình thích hợp, chẳng hạn như nhiệt độ, oxy, lượng và đặc tính của vi sinh vật và thời gian xử lý. Tất nhiên là, điều kiện lên men được lựa chọn để trợ giúp cho việc hoàn thành sáng chế, tức là để thu được sản phẩm sữa lên men.

Trong nội dung mô tả này, việc nuôi cấy men khởi động sữa chua tốt hơn là nuôi cấy vi khuẩn bao gồm ít nhất một chủng *Lactobacillus*, ví dụ chủng *Lactobacillus bulgaricus*, và ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus*. Theo như điều nói sau đây, sữa chua là sản phẩm sữa lên men thu được bằng cách cấy và lên men sữa bằng chủng *Lactobacillus* strain và chủng *Streptococcus thermophilus*.

Thuật ngữ “xúc được bằng thìa” cần phải được hiểu là sẽ được ăn bằng thìa. Thuật ngữ “sản phẩm sữa xúc được bằng thìa” bao gồm sản phẩm được khuấy. Thuật ngữ “sản phẩm dạng được khuấy” cụ thể dùng để chỉ sản phẩm sữa lên men mà khi bị xử lý cơ học sau khi lên men, dẫn đến sự phá hủy và lỏng hoá khối đông tụ được tạo ra trong

giai đoạn lên men. Xử lý cơ học này thường thu được nhưng không chỉ giới hạn thu được bằng cách khuấy, bơm, lọc hoặc làm đồng nhất hoá gel, hoặc bằng cách phối trộn nó với các thành phần khác.

Thuật ngữ “sản phẩm dạng lên men sau khi đóng gói” bao gồm sản phẩm trên cơ sở sữa đã được cấy bằng nuôi cấy men khởi động, và được đóng gói sau bước cấy này và sau đó được lên men trong đồ đóng gói.

Thuật ngữ “sản phẩm uống” bao gồm các đồ uống chẳng hạn như “sữa chua uống” và các đồ uống tương tự. Thuật ngữ “sữa chua uống” thường bao gồm sản phẩm sữa được lên men bằng cách lên men kết hợp *Lactobacillus species* và *Streptococcus thermophilus*. Sữa chua uống thường có hàm lượng chất rắn không béo trong sữa bằng 8% hoặc nhiều hơn. Ngoài ra, lượng nuôi cấy sống cho đồ uống sữa chua uống thường ít nhất là $10E6$ đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU) cho mỗi ml.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sản phẩm sữa đã qua xử lý từ sữa động vật

Nói chung - độ pH sản phẩm sữa được ưu tiên ở sáng chế này, bao gồm cả sản phẩm sữa đã qua xử lý từ sữa động vật (tức là sản phẩm trên cơ sở sữa động vật), là độ pH từ pH = 3 đến pH = 6,5 – tốt hơn nữa là từ pH = 3,5 đến pH = 5,75.

Như đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này – ta có thể đạt được độ pH thích hợp của sản phẩm sữa bằng cách ví dụ lên men bằng cách nuôi cấy vi khuẩn axit lactic thích hợp.

Tuy nhiên, như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này ta có thể chỉ cần đơn giản là đưa một axit thích hợp (chẳng hạn như axit lactic) để có được độ pH theo yêu cầu.

Theo cách khác có thể thêm lacton (ví dụ lacton GDL) để có được độ pH theo yêu cầu hoặc sử dụng các phương pháp đã biết thích hợp khác (ví dụ bằng phương pháp enzym hoặc tạo áp lực bằng cacbon đioxit) để có được độ pH theo yêu cầu.

Như đã nêu trên – việc sử dụng glycosidaza để cải thiện độ rắn chắc của gel như được mô tả trong bản mô tả này có thể là đặc biệt hữu ích liên quan đến sữa được gọi là các sản phẩm sữa có hàm lượng chất béo thấp.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên cơ chất sữa này được sử dụng trong bước (i) của phương pháp của khía cạnh thứ nhất là cơ chất sữa với hàm lượng chất béo thấp – tức là với hàm lượng chất béo nhỏ hơn 3,5%, tốt hơn nữa là với hàm lượng chất béo nhỏ hơn 1,5% và còn được ưu tiên hơn với hàm lượng chất béo nhỏ hơn 0,75%.

Như đã nêu trên – ưu điểm của việc sử dụng glycosidaza để cải thiện độ rắn chắc của gel như được mô tả có thể là ta không cần phải tăng hàm lượng protein ví dụ sản phẩm sữa có hàm lượng chất béo thấp để có được độ rắn chắc của gel đủ thích hợp và do đó còn giảm thiểu hơn nữa tổng lượng calo/năng lượng của sản phẩm sữa có hàm lượng chất béo thấp cuối cùng (ví dụ sữa chua có hàm lượng chất béo thấp).

Do đó, theo một phương án được ưu tiên, sản phẩm sữa thành phẩm (ví dụ sữa chua) có tổng lượng calo/năng lượng nhỏ hơn 150 kilo calo cho 100 g sản phẩm sữa, tốt hơn nữa là sản phẩm sữa thành phẩm (ví dụ sữa chua) có tổng lượng calo/năng lượng nhỏ hơn 100 kilo calo cho 100 g sản phẩm sữa này.

Như đã biết – công việc thông thường của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là xác định hàm lượng calo của sản phẩm sữa quan tâm.

Một ví dụ thích hợp của sản phẩm sữa là sản phẩm sữa lên men hoặc pho mát.

Theo một phương án được ưu tiên, sản phẩm sữa này là sản phẩm sữa lên men.

Theo một phương án được ưu tiên – sản phẩm sữa lên men này ít nhất là một sản phẩm sữa lên men được chọn từ nhóm bao gồm: sữa chua, sữa chua dùng chung thay thế, nước sữa butter milk, sữa acidophilus, sữa chua kefir, sữa chua kumys và sữa chua quark. Tốt nhất là, sản phẩm sữa lên men là sữa chua.

Trong nội dung mô tả này - các thuật ngữ "sữa chua" và "sữa được lên men" có nghĩa thông thường. Trong US2005/0095316A1 và US2005/0095317A1 (cả hai đơn này của Danone) các thuật ngữ này được xác định phù hợp với nghị định/điều luật chính thức tương đương ở Pháp - sau đây về cơ bản được gọi là cùng các định nghĩa tiêu chuẩn đã biết của các thuật ngữ này.

Như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này - để thu được sản phẩm "sữa chua hoặc sữa được lên men" đặc biệt phải nhắc đến là không có sự loại đáng kể huyết thanh sữa và rằng phải có quá trình xử lý bằng nhiệt ít nhất tương đương với quá trình thanh trùng.

Xử lý bằng nhiệt phù hợp thích hợp dùng cho quá trình sản xuất sản phẩm sữa lên men chẳng hạn như sữa chua là ví dụ quá trình xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ từ 85 đến 98° C trong thời gian 15 giây đến 30 phút.

Vì việc áp dụng quá trình xử lý bằng nhiệt ít nhất là tương đương với thanh trùng tiêu chuẩn, protein huyết thanh sữa của cơ chất sữa này được làm biến tính ở mức độ cao hoặc thấp (vào khoảng từ 25 đến 99% trong số đó).

Như đã biết rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật – vì đối với sữa chua hoặc sản phẩm sữa lên men “phải không có sự loại đáng kể huyết thanh sữa” - sữa chua hoặc sản phẩm sữa lên men không phải là sản phẩm pho mát như được mô tả trong US7560127B2 (xem phần nêu trên).

Thuật ngữ "sữa được lên men" đề cập đến sản phẩm sữa đã qua xử lý được điều chế bằng sữa được tách chất béo hoặc không được tách chất béo hoặc sữa bột hoặc sữa

đặc được tách chất béo hoặc không được tách chất béo, với thành phần sữa được làm giàu hoặc không được làm giàu, mà đã được xử lý bằng xử lý bằng nhiệt ít nhất tương đương với thanh trùng, được cấy bằng vi sinh vật thuộc loài là đặc trưng cho mỗi sản phẩm.

Lượng axit lactic tự do mà sữa chứa tốt hơn là không nhỏ hơn 0,6 gam cho mỗi 100 gam ở thời điểm bán cho người tiêu thụ.

Sữa được lên men tốt hơn là được giữ, cho đến thời điểm bán cho người tiêu thụ, ở nhiệt độ có thể ngăn chúng bị phá hủy.

Thuật ngữ "sữa chua" dùng để chỉ sữa được lên men được thu nhận bằng phương pháp hợp lý và truyền thống, tốt hơn là bằng cách dùng chỉ vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt đặc hiệu, chẳng hạn ví dụ *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*, mà tốt hơn là phải được ủ đồng thời và tốt hơn là còn sống trong sản phẩm hoàn thiện, ở mức tốt hơn là ít nhất 10 tỷ vi khuẩn cho mỗi gam được biểu hiện là phần chứa sữa.

Sản phẩm sữa lên men thường được thu nhận bằng cách:

(A): cấy từ 10^5 đến 10^{13} cfu/ml (tốt hơn là từ 10^6 đến 10^{11} cfu/ml) của môi trường nuôi cấy vi khuẩn axit lactic (LAB) vào cơ chất sữa động vật; và

(B): lên men cơ chất sữa này trong thời gian từ 2 đến 120 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 55°C.

Như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này – các loài vi khuẩn axit lactic thích hợp bao gồm *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* (chẳng hạn như *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus cazai* hoặc *Lactobacillus helveticus*), *Streptococcus* (chẳng hạn như *Streptococcus thermophilus*), *Lactococcus* (chẳng hạn như *Lactococcus lactis*), *Leuconostoc* (chẳng hạn như *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*).

Khi cơ chất sữa này được cấy bằng men được tạo ra từ chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*, thì sản phẩm thường được hiểu là sữa chua.

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này – thuật ngữ “sữa chua dùng chủng thay thế” dùng để chỉ sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng cách sử dụng chủng nuôi cấy *Streptococcus thermophilus* và các loài *Lactobacillus* bất kỳ.

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này – thuật ngữ “sữa acidophilus” dùng để chỉ sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng cách sử dụng nuôi cấy *Lactobacillus acidophilus*.

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này – thuật ngữ “sữa chua kefir” dùng để chỉ sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng cách sử dụng nuôi cấy men khởi động được điều chế từ hạt kefir, *Lactobacillus kefir*, các loài thuộc giống *Leuconostoc*, *Lactococcus* và *Acetobacter* được cho phát triển trong điều kiện đặc biệt tốt. Hạt kefir cấu thành cả nấm men lên men lactoza (*Kluyveromyces marxianus*) và nấm men lên men không phải lactoza (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* và *Saccharomyces exiguus*).

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này – thuật ngữ “sữa chua kumys” dùng để chỉ sản phẩm sữa lên men được tạo ra bằng cách sử dụng nuôi cấy *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* và *Kluyveromyces marxianus*.

Theo một phương án được ưu tiên – sản phẩm sữa này là sữa chua, trong đó sữa chua được sản xuất bằng cách cấy bằng chủng vi khuẩn axit lactic tạo sữa chua mà có *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus* có khả năng tổng hợp polysaccharit ngoại bào (EPS) - phương án được ưu tiên này có thể là đặc biệt thích hợp nếu như sữa chua này là sữa chua có hàm lượng chất béo thấp, tức là trong đó cơ chất sữa được sử dụng trong bước (i) của phương pháp của khía cạnh thứ nhất là cơ chất sữa với hàm lượng chất béo thấp – tức là với hàm lượng chất béo nhỏ hơn 3,5%, tốt

hơn nữa là với hàm lượng chất béo nhỏ hơn 1,5% và còn được ưu tiên hơn với hàm lượng chất béo nhỏ hơn 0,75%.

Như đã nêu trên – các tài liệu đã biết mô tả một số chủng như *Streptococcus thermophilus* mà tạo ra EPS – xem ví dụ WO2007/095958A1 (Chr. Hansen A/S).

Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể nhận diện một cách thông thường một số chủng tạo EPS như vậy và còn có thể nhận diện một cách thông thường nếu một chủng quan tâm cụ thể là có khả năng tổng hợp EPS hoặc hay không.

Một ví dụ về trường hợp về kinh doanh lý thuyết phù hợp có thể gặp ở đây có thể là một công ty sản xuất dịch đặc/bột sữa bằng cách sử dụng glycosidaza như được mô tả nêu trong bản mô tả này và sau đó bán dịch đặc/bột sữa cho ví dụ nhà sản xuất sữa chua mà sẽ sử dụng sữa này trong sản xuất sữa chua của họ để có được sữa chua với độ rắn chắc của gel được cải thiện/làm tăng - tức là họ có thể có được độ rắn chắc của gel được cải thiện mà không phải bổ sung thêm glycosidaza trong quá trình sản xuất sữa chua như vậy.

Theo như hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này – trường hợp về kinh doanh lý thuyết như vậy có thể là ví dụ về một phương pháp nằm trong phạm vi của phương pháp của khía cạnh thứ nhất như được bàn luận nêu trong bản mô tả này. Dịch đặc/bột sữa có thể được xem như là một ví dụ của sản phẩm sữa đã qua xử lý từ sữa động vật theo phương pháp của khía cạnh thứ nhất. Ngoài ra, theo như hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này trong nội dung mô tả này - sữa chua thành phẩm sẽ có độ rắn chắc của gel được cải thiện/tăng lên do việc bổ sung trước đó glycosidaza vào sữa này - tức là nhà sản xuất sữa chua cũng thực hiện các hành động trong phạm vi của phương pháp của khía cạnh thứ nhất như được bàn luận trong bản mô tả này.

Glycosidaza

Như đã nêu trên - thuật ngữ “glycosidaza” (còn được gọi là hydrolaza glycosit) dùng để chỉ enzym xúc tác sự thủy phân mỗi liên kết/liên kết glycosit - liên kết glycosit là dạng liên kết đồng hoá trị kết nối phân tử cacbohyđrat (đường) với nhóm khác, mà có thể là hoặc không phải là một cacbohyđrat khác.

Như được mô tả trên đây - glycosidaza nêu trong bản mô tả này còn có thể được gọi là enzym khử glycosyl.

Glycosidaza này có thể là glycosidaza có trong tự nhiên hoặc nó có thể là dạng biến đổi/được làm đột biến của glycosidaza có trong tự nhiên – như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, người ta có thể tạo ra dạng biến đổi được làm đột biến của enzym quan tâm (ở đây là glycosidaza) ví dụ để cải thiện độ ổn định của enzym đồng thời vẫn duy trì hoạt tính enzym chính (ở đây là hoạt tính glycosidaza) của enzym này.

Để ví dụ đạt được sự tách do co không mong muốn ở mức nhỏ nhất (đặc biệt là nếu sản phẩm sữa này là sản phẩm sữa lên men chẳng hạn như sữa chua) – có thể được ưu tiên là glycosidaza này là glycosidaza liên kết với N.

Như đã nêu trên, thuật ngữ glycosidaza liên kết với N là một thuật ngữ được xác định rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết liệu glycosidaza quan tâm cụ thể là glycosidaza liên kết với N hoặc hay không.

Ngoài ra các tài liệu đã biết mô tả một số glycosidaza liên kết với N thích hợp khác nhau nêu trong bản mô tả này.

Ví dụ về glycosidaza liên kết với N thích hợp nêu trong bản mô tả này có thể là ít nhất một glycosidaza được chọn từ nhóm bao gồm: Peptit-N(4)-(N-axetyl-beta-glucosaminyl)asparagin amidaza (số EC: 3.5.1.52; các tên khác: N-Glycosidaza-F hoặc PNGaza-F) và Endo- β -N-axetylglucosaminidaza H (số EC: 3.2.1.96; tên khác ENDO-H).

Glycosidaza liên kết với N được mô tả ngay trên đây trong nội dung mô tả này có thể được mô tả như là glycosidaza có hoạt tính glycosidaza liên kết với N và không có hoạt tính glycosidaza liên kết với O đáng kể ở đây.

Do đó, trong bản mô tả này có thể được ưu tiên là glycosidaza liên kết với N là glycosidaza liên kết với N mà không có hoạt tính glycosidaza liên kết với O phù hợp ở đây (chẳng hạn như không có hoạt tính glycosidaza liên kết với O).

N-Glycosidaza-F, còn được biết đến như là PNGaza-F, được sử dụng trong quy trình này, là asparagin amidaza (EC 3.5.1.52) có thể được thu nhận từ *Flavobacterium mesingosepticum*. Enzym này xúc tác sự phân cắt đầy đủ và nguyên vẹn oligosacarit liên kết với N từ glycoprotein. Enzym này có thể là được dẫn xuất hoá như là sản phẩm thương mại từ New England Biolabs Inc. với tên PNGaza-F hoặc được sản xuất tái tổ hợp trong chủng như *Escherichia coli* như các tác giả sáng chế đã thực hiện bằng cách dùng plasmid và một phương pháp được mô tả trong ví dụ thực hiện 1 nêu trong bản mô tả này.

Endo- β -N-axetylglucosaminidaza H (EC 3.2.1.96), còn được biết đến như là ENDO-H, có thể được thu nhận từ *Streptomyces plicatus*. ENDO-H xúc tác sự thủy phân của liên kết glycosit giữa hai N-axetylglucosamin của glycosyl hoá liên kết với N. Enzym này có thể là được dẫn xuất hoá như là sản phẩm thương mại từ New England Biolabs Inc. với tên ENDO-H.

Ví dụ về glycosidaza liên kết với O thích hợp ở đây có thể là ít nhất một glycosidaza được chọn từ nhóm bao gồm: α -N-axetyl-galactosaminidaza (số EC: 3.2.1.49; tên khác: GalNAC); α -galactosidaza (số EC: 3.2.1.22); và neuraminidaza (số EC: 3.2.1.18).

GalNAC là exoglycosidaza có tính đặc hiệu cao xúc tác sự thủy phân của các gốc D-N-axetyl-galactosamin liên kết a từ đó. Nó có thể được dẫn xuất hoá như là sản phẩm thương mại từ New England Biolabs Inc.

Như đã nêu trên, thuật ngữ glycosidaza liên kết với O là một thuật ngữ được xác định rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết được liệu glycosidaza quan tâm cụ thể là glycosidaza liên kết với O hoặc hay không.

Ngoài ra, đã biết mô tả một số glycosidaza liên kết với O thích hợp khác nhau ở đây.

Một lượng hữu hiệu/hoạt tính của glycosidaza được xác định trong bản mô tả này theo các phương pháp đã biết.

Theo các phương pháp đã biết - đối với glycosidaza liên kết với N (chẳng hạn như PNGaza-F và Endo-H) một đơn vị hoạt tính được xác định như là lượng enzym cần thiết để loại >95% cacbohydrat ra khỏi 10 g RNaza-B được làm biến tính trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C với tổng thể tích phản ứng là 10 l.

Đối với GalNAC (một glycosidaza liên kết với O) một đơn vị hoạt tính được xác định như là lượng enzym cần thiết để phân cắt > 95% α -D-N-acetyl-galactosamin đầu cuối ra khỏi 1 nmol (GalNAc1-3)(Fuc1-2)Gal1-4Glc-7-amino-4-methyl-coumarin (AMC), trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tổng thể tích phản ứng 10 l.

Một số enzym glycosidaza thích hợp nêu trong bản mô tả này là thu được trên thị trường từ công ty New England Biolabs – tham khảo danh mục sản phẩm của New England Biolabs (như ví dụ có trên mạng của công ty) cho chi tiết hơn nữa liên quan đến định nghĩa chuẩn cụ thể của đơn vị hoạt tính glycosidaza thích hợp được nêu trong bản mô tả này.

Bước (i) của phương pháp theo khía cạnh thứ nhất

Bước (i) của phương pháp nêu trong bản mô tả này trong khía cạnh thứ nhất là như sau: “(i): cho một lượng hữu hiệu glycosidaza liên kết với N và/hoặc glycosidaza liên kết với O vào cơ chất sữa động vật”.

Theo như hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này trong nội dung mô tả này – glycosidaza liên kết với N và/hoặc glycosidaza liên kết với O thường được cho vào cơ chất sữa động vật như là thành phần glycosidaza về cơ bản là nguyên chất – ví dụ thành phần glycosidaza, trong đó hoạt tính glycosidaza thể hiện ít nhất 5% của tổng hoạt tính enzym của thành phần glycosidaza như vậy.

Glycosidaza có thể là chế phẩm glycosidaza, trong đó hoạt tính glycosidaza chiếm ít nhất 25% tổng hoạt tính enzym của chế phẩm glycosidaza hoặc chế phẩm glycosidaza, trong đó hoạt tính glycosidaza chiếm ít nhất 50% tổng hoạt tính enzym của chế phẩm glycosidaza.

Nhiều khi được ưu tiên là chế phẩm glycosidaza về cơ bản là nguyên chất là chế phẩm glycosidaza, trong đó hoạt tính glycosidaza chiếm ít nhất 90% của tổng hoạt tính enzym của chế phẩm glycosidaza.

Một lượng hữu hiệu glycosidaza có thể là một dạng cụ thể của glycosidaza (ví dụ PNGaza-F) hoặc là hỗn hợp của các enzym glycosidaza thích hợp nêu trong bản mô tả này (ví dụ hai glycosidaza liên kết với N khác nhau hoặc một glycosidaza liên kết với N và một glycosidaza liên kết với O).

Khi nêu trong bản mô tả này là điều có thể là được ưu tiên là glycosidaza được cho vào trong bước (i) của phương pháp của khía cạnh thứ nhất là glycosidaza liên kết với N tất nhiên phải có nghĩa là phải có bổ sung một lượng hữu hiệu glycosidaza liên kết với N vào bước (i) và glycosidaza liên kết với N này tạo ra - do sự có mặt của nó - sự cải thiện độ rắn chắc của gel cho sản phẩm sữa đã qua xử lý.

Tuy nhiên, khi nêu rằng glycosidaza liên kết với N là được ưu tiên, tất nhiên nó không có nghĩa là không được bổ sung glycosidaza liên kết với O vào bước (i).

Cũng áp dụng như vậy khi nêu trong bản mô tả này rằng glycosidaza liên kết với O là được ưu tiên – tức là ở đây phải bổ sung glycosidaza liên kết với O vào bước (i) – nhưng cũng có thể bổ sung glycosidaza liên kết với N.

Ngược lại và như đã biết rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này – khi nêu trong bản mô tả này nêu trong bản mô tả này glycosidaza chỉ là glycosidaza liên kết với O thì khi đó không được bổ sung glycosidaza liên kết với N vào bước (i) của khía cạnh thứ nhất. Cũng áp dụng như vậy khi nêu trong bản mô tả này là glycosidaza chỉ là glycosidaza liên kết với N thì không được bổ sung glycosidaza liên kết với O vào bước (i) của khía cạnh thứ nhất.

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này – sản phẩm sữa đã qua xử lý thường được đem xử lý bằng nhiệt. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này - quá trình xử lý bằng nhiệt thường sử dụng nhiệt độ thấp hơn điểm sôi vì ở nhiệt độ rất cao, mixen cazain chuyển hoá một chiều thành khối kết tụ (hoặc "đông sữa").

Trong nội dung mô tả này – thuật ngữ “được thanh trùng” liên quan đến sản phẩm sữa đã qua xử lý từ sữa động vật được thanh trùng dùng để chỉ bước thanh trùng chuẩn (tức là bao gồm việc xử lý bằng nhiệt sữa một cách thích hợp). Trong nội dung mô tả này – rõ ràng là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rằng liệu sản phẩm sữa cụ thể quan tâm có phải là sản phẩm sữa đã qua xử lý từ sữa động vật được thanh trùng hay không.

Theo như hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này - bước thanh trùng chuẩn có thể là quá trình xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ khoảng 71-72°C trong thời gian khoảng 15-20 giây

Như đã nêu trên - để thu được sản phẩm "sữa chua hoặc sữa được lên men" đặc biệt phải nhắc đến là không có sự loại đáng kể huyết thanh sữa và phải có quá trình xử lý bằng nhiệt ít nhất tương đương với quá trình thanh trùng.

Việc xử lý bằng nhiệt phù hợp thích hợp trong quá trình sản xuất sản phẩm sữa lên men chẳng hạn như sữa chua là, ví dụ, quá trình xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 85 đến 98°C trong thời gian từ 15 giây đến 30 phút.

Tuỳ thuộc vào dạng xử lý bằng nhiệt được sử dụng – việc xử lý bằng nhiệt có thể ví dụ là quá trình xử lý bằng nhiệt sữa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 65 đến 150°C trong thời gian từ một số phần của giây đến 30 phút.

Như đã nêu trên - khi sản phẩm sữa này là sản phẩm sữa lên men chẳng hạn như sữa chua, phải có quá trình xử lý bằng nhiệt ít nhất tương đương với thanh trùng.

Glycosidaza có thể được cho vào bước (i) trước hoặc sau bước xử lý bằng nhiệt – tức là quá trình xử lý bằng nhiệt của sữa được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 65°C đến 150°C trong thời gian từ một số phần của giây đến 30 phút.

Trong một số trường hợp có thể là được ưu tiên là glycosidaza được bổ sung vào sữa đã được xử lý bằng nhiệt.

Như đã nêu trên - khi sản phẩm sữa là sản phẩm sữa lên men, cơ chất sữa này được cấy và lên men bằng nuôi cấy vi khuẩn axit lactic (LAB) phù hợp.

Khi sản phẩm sữa này là sản phẩm sữa lên men – thì glycosidaza có thể là được bổ sung vào trước, cùng với hoặc sau khi cấy cơ chất sữa này bằng nuôi cấy vi khuẩn axit lactic (LAB).

Liên quan đến sản phẩm sữa nói chung - có thể được ưu tiên là glycosidaza được bổ sung vào trước khi độ pH của cơ chất sữa này thấp xuống dưới pH 6.

Liên quan đến sản phẩm sữa lên men - điều được ưu tiên là glycosidaza được bổ sung vào trước khi quá trình lên men bằng vi khuẩn axit lactic thích hợp kết thúc – tức là tốt hơn là trước khi độ pH của cơ chất sữa này thấp xuống dưới pH 6.

Ở đây tin rằng việc bổ sung glycosidaza với lượng từ 10 đơn vị hoạt tính cho 1 ml sữa đến 1000 đơn vị hoạt tính cho 1 ml sữa là đủ để có được lượng hữu hiệu thích hợp ở đây của glycosidaza – tức là đủ để có được độ rắn chắc của gel được cải thiện một cách phù hợp ở đây.

Nếu phù hợp cho mục đích cụ thể – người ta có thể bổ sung thêm glycosidaza ví dụ lên đến 20000 đơn vị hoạt tính glycosidaza cho 1 ml sữa.

Như đã nêu trên - một lượng hữu hiệu/hoạt tính của glycosidaza is được xác định trong bản mô tả này theo the art.

Bước (ii) của phương pháp theo khía cạnh thứ nhất

Bước (ii) của phương pháp nêu trong bản mô tả này mô tả một phương pháp của khía cạnh thứ nhất, đó là : “(ii): thực hiện các bước thích hợp để thu được sản phẩm sữa đã qua xử lý từ sữa động vật, trong đó (các) bước thích hợp này được thực hiện trong điều kiện, trong đó một lượng hữu hiệu glycosidaza tạo ra - do sự có mặt của nó - cải thiện độ rắn chắc của gel cho sản phẩm sữa đã qua xử lý”

Như đã nêu trên - thực hiện các bước thích hợp để thu được sản phẩm sữa đã qua xử lý từ sữa động vật quan tâm là công việc thường xuyên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này – ví dụ nếu sản phẩm sữa này ví dụ là sữa chua, thì người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tất nhiên biết (các) bước thích hợp này để có được sữa chua quan tâm.

Liên quan đến các điều kiện này, trong đó một lượng hữu hiệu glycosidaza cho sự cải thiện độ rắn chắc của gel của sản phẩm sữa đã qua xử lý – rõ ràng là các điều kiện

này sẽ là các điều kiện, trong đó enzym glycosidaza như vậy là có hoạt tính trong khoảng thời gian thích hợp.

Như được thể hiện trong phần ví dụ thực hiện được nêu trong bản mô tả này - các tác giả của sáng chế đã nhận diện được rằng một số các enzym glycosidaza khác nhau có hoạt tính thích hợp trong điều kiện phù hợp bình thường (ví dụ nhiệt độ, pH v.v.) để tạo ra sản phẩm sữa thích hợp nêu trong bản mô tả này chẳng hạn như sữa chua.

Nói tóm lại và theo như hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này – điều kiện tối ưu để có được hoạt tính glycosidaza thích hợp được ưu tiên nêu trong bản mô tả này sẽ phụ thuộc vào (các) glycosidaza cụ thể được sử dụng (ví dụ PNGaza-F) và sản phẩm sữa cụ thể sẽ được sản xuất (ví dụ sữa chua).

Trong nội dung mô tả này - ví dụ về điều kiện phản ứng thích hợp cho glycosidaza tạo ra độ rắn chắc của gel được cải thiện một cách phù hợp nêu trong bản mô tả này có thể là:

- Nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 50°C (chẳng hạn như từ 20°C đến 40°C);
- Độ pH từ pH = 3 đến pH = 9 (chẳng hạn như từ pH = 4 đến pH = 7,5, từ 3 đến 7 hoặc từ 3 đến 6,5);
- khoảng thời gian nằm trong khoảng từ 10 phút đến 120 giờ (chẳng hạn như từ 1 giờ đến 120 giờ, hoặc từ 0,5 đến 5 giờ)

Theo một phương án được ưu tiên, sự có mặt của glycosidaza trong bước (ii) tạo ra cải thiện độ rắn chắc của gel cho sản phẩm sữa đã qua xử lý tăng 1,25 lần; tốt hơn nữa là cải thiện độ rắn chắc của gel cho sản phẩm sữa đã qua xử lý tăng 1,50 lần và còn được ưu tiên hơn là sự có mặt của glycosidaza trong bước (ii) cho sự cải thiện độ rắn chắc của gel cho sản phẩm sữa đã qua xử lý tăng 1,7 lần.

Như đã nêu trên - các tác giả của sáng chế đã nhận thấy rằng việc sử dụng glycosidaza không có ảnh hưởng có hại đến độ nhớt của sản phẩm sữa thành phẩm.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên – bước (ii) được thực hiện trong điều kiện, trong đó một lượng hữu hiệu glycosidaza tạo ra - do sự có mặt của nó – không ảnh hưởng không tốt nào đến độ nhớt của sản phẩm sữa đã qua xử lý.

Việc đo độ nhớt của sản phẩm sữa quan tâm (ví dụ sữa chua) là công việc thường xuyên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong ví dụ thực hiện 2 nêu trong bản mô tả này đưa ra phương pháp chuẩn thích hợp để đo độ nhớt của sản phẩm sữa quan tâm – tốt hơn là độ nhớt phù hợp nêu trong bản mô tả này được đo theo phương pháp của ví dụ này 2.

Bài báo của A.N. Hassan và các đồng tác giả (J. Dairy Sci: 86:1632-1638; 2003) được bàn luận trên đây còn mô tả phương pháp chuẩn thích hợp để đo độ nhớt.

Xem ví dụ phần chất liệu và phương pháp và Fig. 1 của bài báo này, trong đó ứng suất trượt được xác định – như có thể được nhận biết trong ví dụ 2 trong bản mô tả này, thông số ứng suất trượt được sử dụng làm thước đo độ nhớt.

Vì người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng đo độ nhớt của sản phẩm sữa quan tâm – tất nhiên cũng là dễ dàng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này xác định phương án được ưu tiên cho bước (ii) trong phương pháp của khía cạnh thứ nhất liên quan đến nếu:

“bước (ii) được thực hiện trong điều kiện, trong đó một lượng hữu hiệu glycosidaza không tạo ra - do sự có mặt của nó – ảnh hưởng không tốt đến độ nhớt của sản phẩm sữa đã qua xử lý”.

Để xác định được yêu cầu này – người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đơn giản thực hiện “(các) bước thích hợp để thu được sản phẩm sữa” của

bước (ii) khi có và không có mặt một lượng hữu hiệu glycosidaza – và khi đó xác định hiệu ứng độ nhớt phù hợp nêu trong bản mô tả này trong sự có mặt của một lượng bổ sung glycosidaza.

Như có thể được nhận biết trong các ví dụ thực hiện nêu trong bản mô tả này – ta thực tế có thể thu được sự cải thiện độ nhớt bằng cách sử dụng glycosidaza như được mô tả nêu trong bản mô tả này.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên, sự có mặt của glycosidaza trong bước (ii) cho sự tăng độ nhớt 1,10 lần cho sản phẩm sữa đã qua xử lý; tốt hơn nữa là sự tăng độ nhớt 1,20 lần cho sản phẩm sữa đã qua xử lý.

Theo như hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này – phương pháp để đo độ nhớt như ví dụ được mô tả trong ví dụ thực hiện 2 nêu trong bản mô tả này và bài báo A.N. Hassan và các đồng tác giả sẽ (trong độ bất định của phép đo tương đối nhỏ) cho cùng một kết quả tương đối – tức là một cách độc lập với phương pháp được sử dụng, ta sẽ thu được cùng một kết quả liên quan đến sự cải thiện tương đối của độ nhớt.

Như đã nêu trên - trong phần ví dụ thực hiện trong bản mô tả này, đã chứng tỏ rằng được rằng cả glycosidaza liên kết với N và liên kết với O không cho hiệu ứng tách do co không mong muốn ở đây trong sản xuất sữa chua.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên bước (ii) được thực hiện trong điều kiện, trong đó một lượng hữu hiệu glycosidaza tạo ra - do sự có mặt của nó – không sự gia tăng nào về hiệu ứng tách do co đến sản phẩm sữa đã qua xử lý.

Điều này – tức là không có sự gia tăng về hiệu ứng tách do co – là đặc biệt thích hợp khi sản phẩm sữa đã qua xử lý là sản phẩm sữa lên men chẳng hạn như sữa chua.

Việc đo hiệu ứng tách do co của sản phẩm sữa quan tâm (ví dụ sữa chua) là công việc thường xuyên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong ví dụ thực hiện 3 nêu trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất phương pháp chuẩn thích hợp để đo lường sự tách do co của sản phẩm sữa quan tâm – tốt hơn là sự tách do co phù hợp nêu trong bản mô tả này được đo theo phương pháp của ví dụ 3 này.

Về cơ bản, phương pháp tiêu chuẩn để đo hiệu ứng tách do co của ví dụ 3 là dựa trên sự bảo quản liên quan thích hợp của sản phẩm sữa quan tâm và đo lường lượng nước sữa whey ở mặt trên sản phẩm sữa quan tâm.

Vì người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng đo sự tách do co sản phẩm sữa quan tâm – tất nhiên cũng là dễ dàng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này xác định phương án được ưu tiên của bước (ii) của phương pháp của khía cạnh thứ nhất liên quan đến nếu:

“bước (ii) được thực hiện trong điều kiện, trong đó một lượng hữu hiệu glycosidaza không làm - do sự có mặt của nó – tăng về hiệu ứng tách do co cho sản phẩm sữa đã qua xử lý”.

Để xác định yêu cầu này – người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đơn giản thực hiện “(các) bước thích hợp để thu được sản phẩm sữa” của bước (ii) khi có và không có mặt một lượng hữu hiệu glycosidaza – và sau đó xác định hiệu ứng tách do co phù hợp nêu trong bản mô tả này trong sự có mặt của một lượng bổ sung glycosidaza.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm sữa, phương pháp này bao gồm bước:

- a) cung cấp cơ chất sữa;
- b) xử lý cơ chất sữa này bằng enzyme có hoạt tính glycosidaza liên kết với N; và

c) tùy ý lên men cơ chất sữa này bằng vi sinh vật, chẳng hạn như vi khuẩn lactic.

Theo một phương án đáng quan tâm, bước b) được thực hiện trước khi hoặc trong quá trình thực hiện bước c).

Như đã nêu trên, cơ chất sữa này có thể có nguồn gốc từ nguồn động vật hoặc không phải có nguồn gốc động vật bất kỳ.

Sản phẩm sữa này tốt hơn là được tạo ra về cơ bản không có, hoặc hoàn toàn không có sự bổ sung bất kỳ của chất làm đặc và/hoặc chất làm ổn định, chẳng hạn như pectin, gelatin, tinh bột, tinh bột biến tính, carrageenan, alginat, và gôm guar.

Theo một phương án đáng quan tâm, vi sinh vật này là vi khuẩn axit lactic và/hoặc vi sinh vật mà tạo ra polysacarit, chẳng hạn như exopolysacarit (EPS).

Vi sinh vật này có thể là vi khuẩn axit lactic, và tốt hơn là thuộc vào loài được chọn từ nhóm bao gồm: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactobacillus cazai* subsp. *Cazai*, *Lactobacillus paracazai* subsp. *Paracazai*, *Bifidobacterium bifidum*, và *Bifidobacterium longum*.

Các phương án đáng quan tâm của phương pháp bất kỳ theo sáng chế là:

- Phương pháp trong đó cơ chất sữa này được xử lý thanh trùng trước khi axit hoá và việc xử lý bằng enzym được thực hiện trước khi thanh trùng;
- Phương pháp trong đó cơ chất sữa này được xử lý bằng nhiệt trước khi xử lý bằng enzym có hoạt tính glycosidaza liên kết với N;

- Phương pháp trong đó sản phẩm sữa này được chọn từ nhóm bao gồm: sản phẩm sữa lên men dạng đặc, sản phẩm sữa lên men uống, và sản phẩm sữa lên men dùng thìa xúc;

- Phương pháp trong đó sản phẩm sữa này có hàm lượng chất rắn không béo trong sữa nhỏ hơn 8%;

- Phương pháp trong đó sản phẩm sữa này có hàm lượng chất béo nhỏ hơn 2%;

- Phương pháp trong đó sản phẩm sữa này có hàm lượng chất béo nhỏ hơn 0,5%;

- Phương pháp trong đó sản phẩm sữa này được đóng gói (phương pháp bao gồm việc đóng gói); và/hoặc

- Phương pháp trong đó glycosidaza được chọn từ nhóm bao gồm: α -N-axetyl-galactosaminidaza; GalNAC); α -galactosidaza; neuraminidaza; Peptit-N(4)-(N-axetyl-beta-glucosaminy)asparagin amidaza; N-Glycosidaza-F; PNGaza-F; Endo- β -N-axetylglucosaminidaza H; ENDO-H và enzym bất kỳ được phân loại trong EC 3.2.1.49, EC 3.2.1.18, EC 3.2.1.22, EC 3.5.1.52, hoặc EC 3.2.1.96.

Trong nội dung mô tả này, thuật ngữ “đóng gói” (một lượng thích hợp) sản phẩm trong bao gói thích hợp đề cập đến việc đóng gói cuối cùng sản phẩm để thu được sản phẩm ở dạng có thể phân phát sao cho sản phẩm có thể được tiêu thụ bởi ví dụ một người hoặc một nhóm người. Do vậy, bao gói thích hợp có thể là chai, đồ chứa, bao gói hoặc các bao gói tương tự, và lượng thích hợp có thể là ví dụ từ 10ml đến 5000ml, nhưng hiện nay được ưu tiên là lượng trong bao gói là nằm trong khoảng từ 50ml đến 1000ml. Sản phẩm được bao gói như vậy là một phần của sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề cập đến sản phẩm sữa thu được bằng phương pháp theo sáng chế.

Còn theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất sản phẩm sữa mà thu được bằng phương pháp bao gồm việc đưa glycosidaza liên kết với N và/hoặc glycosidaza liên kết với O vào cơ chất sữa. Glycosidaza này phải được cho vào với “một lượng hữu hiệu” để cho độ cứng của gel như mong muốn.

Sản phẩm sữa theo sáng chế có thể đã được lên men bằng cách cấy bằng nuôi cấy vi khuẩn axit lactic, trước và/hoặc trong và/hoặc sau khi xử lý bằng glycosidaza.

Sản phẩm sữa này có thể được đóng gói, ví dụ trong đồ chứa được đóng kín có thể tích nằm trong khoảng từ 10ml đến 5000 ml, chẳng hạn như trong đồ chứa có thể tích nằm trong khoảng từ 25ml đến 1500 ml hoặc thể tích nằm trong khoảng từ 50ml đến 1000ml.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng glucosidaza liên kết với N trong phương pháp điều chế sản phẩm sữa, chẳng hạn như sản phẩm sữa lên men (chẳng hạn như sữa chua) hoặc pho mát (chẳng hạn như pho mát tươi, pho mát sữa của Pháp fromage frais, sữa chua quark, etc).

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến việc sử dụng glucosidaza liên kết với N trong phương pháp dùng để cải thiện kết cấu (chẳng hạn như độ rắn chắc hoặc độ cứng của gel) của sản phẩm sữa, chẳng hạn như sản phẩm sữa lên men (chẳng hạn như sữa chua) hoặc pho mát (chẳng hạn như pho mát tươi, pho mát sữa của Pháp fromage frais, sữa chua quark, etc).

Theo một phương án hiện được ưu tiên, sáng chế đề cập đến việc sử dụng enzym có hoạt tính glycosidaza liên kết với N và/hoặc liên kết với O dùng để cải thiện cảm giác ăn trong miệng của sản phẩm sữa, chẳng hạn như sữa chua.

Sự sử dụng này có thể bao gồm rằng sản phẩm sữa đã được tạo ra bằng cách sử dụng vi khuẩn axit lactic mà tạo ra polysaccharit, chẳng hạn như exopolysaccharit (EPS).

Việc sử dụng các thuật ngữ "a" và "an" và "the" và các từ tham chiếu tương tự trong nội dung bản mô tả tiếng Anh của sáng chế (đặc biệt là trong nội dung của phần yêu cầu bảo hộ sau đây) được xem như là bao hàm cả nghĩa số ít và số nhiều, trừ khi được quy định khác đi trong bản mô tả này hoặc về mặt ngữ nghĩa rõ ràng là có nghĩa ngược lại. Các thuật ngữ "chứa", "có", "gồm có" và "có chứa" được xem như là các thuật ngữ có nghĩa mở (tức là, nghĩa "bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở") trừ khi được lưu ý khác đi. Việc nêu các khoảng giá trị trong bản mô tả này chỉ dự định là để viết cho ngắn gọn đề cập đơn lẻ đến mỗi giá trị riêng biệt nằm trong khoảng đó, trừ khi được quy định khác đi trong bản mô tả này, và mỗi giá trị riêng biệt được kết hợp vào bản mô tả này như là chúng được nêu ra riêng biệt trong bản mô tả này. Tất cả các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo trật tự thích hợp bất kỳ trừ khi được quy định khác đi như nêu trong bản mô tả này hoặc theo nội dung theo cách khác rõ ràng có nghĩa ngược lại. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ (ví dụ, "chẳng hạn như") được nêu trong bản mô tả này, chỉ được dự định là thể hiện rõ hơn sáng chế và không áp đặt một giới hạn nào lên phạm vi của sáng chế trừ khi được yêu cầu bảo hộ khác đi. Không có ngôn ngữ nào trong phần mô tả phải được xem như là biểu thị thành phần không được yêu cầu bảo hộ bất kỳ là thành phần tất yếu để thực hiện sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Glycosidaza

Ví dụ về glycosidaza được sử dụng trong phương pháp như được mô tả trong bản mô tả này là asparagin amidaza, axetylglucosaminidaza hoặc galactosaminidaza.

N-Glycosidaza-F, còn được biết đến như là PNGaza-F, được sử dụng trong quy trình này, là asparagin amidaza (EC 3.5.1.52) mà có thể được thu nhận từ *Flavobacterium mesingosepticum*. Enzym này làm xúc tác cho quá trình phân cắt hoàn toàn và nguyên vẹn oligosacarit liên kết với N từ glycoprotein. Enzym này có thể được thu nhận như là

sản phẩm thương mại từ New England Biolabs Inc. với tên PNGaza-F hoặc được sản xuất tái tổ hợp trong chủng như *Escherichia coli* như các tác giả sáng chế đã thực hiện bằng cách sử dụng plasmid và phương pháp được mô tả trong Loo và các đồng tác giả (Protein Expression and Purification 24, 90-98, 2002).

Endo- β -N-acetylglucosaminidaza H (EC 3.2.1.96), còn được biết đến như là ENDO-H, có thể được thu nhận từ ví dụ *Streptomyces plicatus*. ENDO-H xúc tác sự thủy phân của liên kết glycosit nằm giữa hai N-acetylglucosamin của glycosyl hoá liên kết với N. It có thể là được thu nhận như là sản phẩm thương mại từ New England Biolabs Inc. với tên ENDO-H.

α -N-acetyl-galactosaminidaza (EC 3.2.1.49) là exoglycosidaza có tính đặc hiệu cao xúc tác sự thủy phân của các gốc D-N-acetyl-galactosamin liên kết a từ threonin hoặc serin. Nó có thể được thu nhận như là sản phẩm thương mại từ New England Biolabs Inc. với tên α -N-acetyl-galactosaminidaza.

Đối với PNGaza-F được tạo ra ở xưởng sản xuất, các tác giả đã khẳng định mức độ tinh khiết cao (>95%) bằng cách sử dụng phép điện di trên natri dodecyl sulfat-gel polyacrylamit (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel: SDS-PAGE) sau đó là nhuộm bằng coomassie brilliant blue (coomassie brilliant blue: CBB). Để khẳng định hơn nữa độ tinh khiết, enzym gom lại được tách riêng bằng SDS-PAGE và được nhuộm màu bằng cách sử dụng bạc. Các dải xuất hiện được phân tích tiếp bằng phân tích phổ khối khẳng định sự có mặt của PNGaza-F và chỉ có PNGaza-F.

Hoạt tính protein phân đặc hiệu a tiềm năng của PNGaza-F được tinh chế tại xưởng được đánh giá trong thử nghiệm protein phân bằng cách sử dụng kappa-cazain của bò (Sigma-Aldrich) làm cơ chất. Trong thử nghiệm này, các tác giả sáng chế đã thử nghiệm hoạt tính protein phân ở các giá trị pH khác nhau giống với sự giảm độ pH tự nhiên xảy ra trong quá trình lên men sữa chua. Để thử hệ thống này các tác giả sáng chế đã sử dụng nồng độ enzym cao hơn 20 lần trong quy trình theo sáng chế và ủ bốn giờ ở

mỗi giá trị độ pH. Trong các điều kiện này, các tác giả sáng chế không phát hiện thấy bằng chứng bất kỳ của hoạt tính protein phân đặc hiệu a.

Kết luận:

Dựa trên các kết quả được bàn luận trên đây – rõ ràng là PNGaza-F được gọi là được tạo ra tại xương là không có các tạp chất.

Các glycosidaza hiện có trên thị trường như đã nêu trên cũng không có tạp chất như được mô tả bởi nhà cung cấp.

Ví dụ 2: Phương pháp đo độ rắn chắc và độ nhớt của gel

Đo độ rắn chắc của gel bằng cách sử dụng thiết bị đo tốc lực Anton Paar với bộ thay mẫu tự động (Physica DSR Rheometer + ASC). Quả lắc đo được cho vào cốc đo chứa 20 ml mẫu, đã được khuấy bằng tay và được gia nhiệt đến nhiệt độ 13°C. Sau khi quả lắc đã được đưa vào trong mẫu, để thời gian chờ. Tiếp theo, độ rắn chắc của gel được đo bằng sự dao động. Ở đây sự biến dạng được giữ không đổi ở 0,3% và tần suất được tăng từ 0,5 Hz đến 30 Hz. Từ phép đo này, có thể tính được mô đun đàn hồi (G') và mô đun nhớt (G''), và từ những giá trị này thu nhận mô đun phức hợp (G^*):

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$$

sau đó G^* ở 1 Hz được sử dụng làm thước đo độ rắn chắc của gel và được dùng để so sánh các mẫu khác nhau.

Bằng cách sử dụng cùng thiết bị (thiết bị đo tốc lực Anton Paar) đo độ nhớt bằng cách tăng độ dốc trượt từ 0,2707 1/giây đến 300 1/giây với các điểm đo (ứng suất trượt) cách nhau 10 giây. Sau đó, độ dốc trượt được giảm từ 275 1/giây xuống 0,2707 1/giây với các điểm đo cách nhau 10 giây. Sau đó, ứng suất trượt ở 300 1/giây được sử dụng thước đo độ nhớt của sản phẩm.

Kết luận:

Dựa trên phương pháp tiêu chuẩn ở trên đo độ rắn chắc và độ nhớt của gel – một công việc thông thường đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là xác định xem liệu có sự cải thiện độ rắn chắc và/hoặc độ nhớt của gel của sản phẩm sữa đã qua xử lý quan tâm khi bổ sung glycosidaza theo phương pháp sản xuất sản phẩm sữa đã qua xử lý từ sữa động vật như được mô tả trong bản mô tả này.

Ví dụ 3: Phương pháp đo sự tách do co

Đã sử dụng hai phương pháp khác nhau để đo lượng sự tách do co theo sáng chế:

Phương pháp 1: Cho 50 ml sữa chua (được tạo ra giống như ví dụ 4) vào ống Eppendorf và đưa vào bảo quản lạnh (5°C) trong thời gian 14 ngày, sau thời gian đó đo lượng nước sữa whey ở mặt trên sữa chua bằng thước (theo mm).

Như đã biết rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này – người ta còn có thể đo hiệu ứng tách do co của sản phẩm sữa khác sữa chua bằng cách bảo quản sản phẩm sữa quan tâm và đo lượng nước sữa whey ở mặt trên sản phẩm sữa quan tâm.

Phương pháp 2: Sữa gầy được làm đậm đặc thêm bằng 2% bột sữa gầy (SMP, nhà sản xuất) và được đưa vào tủ lạnh để qua đêm. Mẻ này được xử lý bằng nhiệt trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 90°C. Cho 75 ml dung dịch sữa vào bình thể tích dung tích 100 ml cùng với nuôi cấy sữa chua 0,02% YoFlex Advance 2.0 (có thể là được thu nhận từ Chr. Hansen A/S, Denmark) và enzym (PNGaza hoặc GalNAC). Tổng khối lượng của sữa, nuôi cấy và enzym được ghi lại. Dung dịch này được gia nhiệt đến nhiệt độ 43°C và được lên men đến pH 4,55 sau thời gian đó bình này được đem bảo quản lạnh trong thời gian 7 ngày. Sau thời gian 7 ngày lượng nước sữa whey ở mặt trên sữa chua được rót ra và được cân. Sau đó, có thể tính toán lượng tách do co theo phần trăm.

Như đã biết rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này – người ta còn có thể đo hiệu ứng tách do co của sản phẩm sữa khác không phải là sữa chua bằng cách ví dụ lên men nuôi cấy quan tâm khác không phải là sữa chua, bảo quản và đo lượng nước sữa whey ở mặt trên sản phẩm sữa quan tâm.

Kết luận:

Dựa trên phương pháp tiêu chuẩn ở trên để đo hiệu ứng tách do co – là công việc thường xuyên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để xác định nếu có hiệu ứng tách do co đáng kể với sản phẩm sữa đã qua xử lý quan tâm bằng cách bổ sung glycosidaza theo phương pháp này để sản xuất sản phẩm sữa đã qua xử lý từ sữa động vật như được mô tả nêu trong bản mô tả này.

Ví dụ 4: Ảnh hưởng của PNGazaF đến độ rắn chắc của gel (quy mô 2 lít)

2 lít sữa gầy (0,1% chất béo, Arla Express, Slagelse) được làm đậm đặc thêm bằng 1,6% bột sữa gầy (SMP, nhà sản xuất) và được đưa vào tủ lạnh để qua đêm. Dung dịch này được xử lý bằng nhiệt trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 90°C, làm nguội xuống nhiệt độ 43°C, được cấy bằng 0,02% YoFlex Advance 2.0 (được thu nhận từ Chr. Hansen A/S, Denmark) và hoặc 10 ml PNGaza-F hoặc trong mẫu tham chiếu 10 ml dung dịch đệm 20 mM Na-phosphat pH 7,5 chứa 50 mM NaCl và được lên men đến độ pH 4,55. Khi độ pH đạt đến 4,55, khuấy sữa chua này và được chuyển qua bộ phận sau xử lý (PTU), mà đưa sữa chua đến áp suất ngược trở lại 2 bars ở nhiệt độ 25°C. Sản phẩm cuối được đưa đến phân tích ở thiết bị đo tốc lực vào ngày 5.

Bảng 1			
Kết quả thử nghiệm của thử nghiệm điều chế quy mô 2 l			
của sữa chua có hàm lượng chất béo thấp khi vắng mặt và có mặt PNGaza-F tạo ra tại xương			
	Modun phức hợp	Ứng suất trượt ở	Sự tách do co
	(Pa)	(300 1/s)	(mm)
Advance 2.0	29,2 ± 0,86	63,7 ± 0,61	8
Advance 2.0 + PNGaza-F (250 U/ml milk)	51,0 ± 0,57	70,7 ± 0,2	4
Đối với N-glycosidaza một đơn vị hoạt tính được xác định là lượng enzym cần thiết để loại >95% cacbohydrat từ 10 g RNaza-B đã được làm biến tính trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tổng thể tích phản ứng 10 l			

Số liệu trong Bảng 1 cho thấy là PNGaza-F làm gia tăng độ rắn chắc của gel của sữa chua có hàm lượng chất béo thấp. Trong các điều kiện này với 75% so với mẫu đối chứng. Độ nhớt được thu nhận khi có mặt PNGaza-F là ở mức tương đương hoặc hơi cao hơn mẫu tham chiếu. Dựa vào các số liệu khác không được thể hiện ở đây các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng có sự gia tăng về độ rắn chắc của gel đáp ứng lại xử lý bằng PNGaza-F là theo cách thức phụ thuộc liều lượng. Các tác giả cũng đánh giá sự tách do co bằng cách sử dụng một phương pháp 1 từ Ví dụ 3 và đã nhận thấy rằng sự tách do co được giảm đi đáp ứng lại xử lý bằng PNGaza-F.

Kết luận:

Các kết quả trên đây đã chứng tỏ rằng PNGaza-F làm gia tăng độ rắn chắc của gel của sữa chua có hàm lượng chất béo thấp. ở trong các điều kiện này của thử nghiệm này tăng 75% (tức là 1,75 lần) so với mẫu đối chiếu.

Ngoài ra, đã nhận thấy rằng sự tách do co được giảm đi đáp ứng lại xử lý bằng PNGaza-F.

Độ nhớt được thu nhận trong sự có mặt của PNGaza-F là ở mức tương đương hoặc hơi cao hơn mẫu tham chiếu.

Ví dụ 5: Thử nghiệm các glycosidaza khác nhau trong sữa chua có hàm lượng chất béo thấp

Cho trực tiếp sữa chua vào cốc của thiết bị đo tốc lực 20 ml. Ở đây thu nhận sữa chua được làm trong cốc. Sữa gầy (0,1% fat, Arla Express, Slagelse) được làm đậm đặc thêm bằng 2% bột sữa gầy (SMP) và được đưa vào tủ lạnh để qua đêm. Dung dịch này được xử lý bằng nhiệt trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 90°C, làm nguội xuống nhiệt độ 43°C, được cấy bằng 0,02% YoFlex Advance 2.0 và các deglycosidaza khác nhau và được lên men (Bảng 1)

Sau đó, Các mẫu này được đưa vào tủ lạnh và đo độ lưu biến vào ngày thứ 3 theo ví dụ 2.

Bảng 2

Kết quả thử nghiệm của thử nghiệm điều chế quy mô phòng thí nghiệm cho cốc 20 ml của sữa chua có hàm lượng chất béo thấp với sự có mặt và vắng mặt của các α -glycosidaza được thu nhận trên thị trường. Tất cả các enzym thử nghiệm trong bảng này là được thu nhận từ New England Biolabs Inc.

	Nồng độ (U/ml milk)	Độ rắn chắc của gel (Pa)
Advance 2.0 + PNGaza-F	250	$608 \pm 32,5$
Advance 2.0 + Endo-H	250	$564 \pm -$
Advance 2.0 + α -N-axetyl-galactosaminidaza	50	$482 \pm 19,8$
Advance 2.0	0	$391 \pm 7,5$

Đối với các N-glycosidaza PNGaza-F và Endo-H một đơn vị được xác định như là trong bảng 1. Đối với α -N-axetyl-galactosaminidaza, O-glucosidaza, một đơn vị được xác định là lượng enzym cần thiết để phân cắt $> 95\%$ α -D-N-axetyl-galactosamin đầu cuối từ 1 nmol (GalNAca1-3)(Fucol1-2)Gala1-4Glc-7-amino-4-methyl-coumarin (AMC), trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tổng thể tích phản ứng là 10 l.

Đối với tất cả các glycosidaza được thử nghiệm, N-glucosidaza cũng như O-glucosidaza GalNAC, độ rắn chắc của gel được nhận thấy là được cải thiện một cách rõ rệt. Ở các nồng độ thử nghiệm nhận thấy là PNGaza-F được thu nhận thương mại có công hiệu tiềm năng nhất đến độ rắn chắc của gel của sữa chua có hàm lượng chất béo thấp.

Kết luận:

Các kết quả nêu trên đã chứng tỏ rằng đối với tất cả các glycosidaza thử nghiệm, N-glucosidaza cũng như O-glucosidaza GalNAC, độ rắn chắc của gel được nhận thấy là được cải thiện một cách rõ rệt.

Ví dụ 6: Thử nghiệm tách do co bằng cách sử dụng glycosidaza tác động đến sự glycosyl hoá liên kết với O.

Patent Mỹ số 7,560,127 đã cho thấy là α -glucosidaza GalNAC có thể dẫn đến sự tạo sữa đông pho mát/sự đông cục. Các tác giả ở đây phân tích xem tác động nào GalNAC có ở sữa chua có hàm lượng chất béo thấp. Thử nghiệm này được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 3 phương pháp 2. Sữa chua được tạo ra trực tiếp trong cốc của thiết bị đo tốc lực dung tích 100 ml. Ở đây thu nhận được sữa chua đông lại. Sữa gầy (0,1% fat, Arla Express, Slagelse) được làm đậm đặc thêm bằng 2% bột sữa gầy (SMP, Arla Express, Slagelse) và được đưa vào tủ lạnh để qua đêm. Dung dịch này được xử lý bằng nhiệt trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 90°C, làm nguội xuống nhiệt độ 43°C, được cấy bằng 0,02% YoFlex Advance 2.0 và GalNAC ở nồng độ 100 U/ml sữa. Đối với mẫu tham chiếu không có enzym giá trị % nước sữa whey sau 21 ngày là $0,3 \pm 0,04\%$ trong khi phần nước sữa whey đối với mẫu được xử lý bằng enzym này là $0,2 \pm 0,08\%$. Bất ngờ, do đó đã nhận thấy rằng việc xử lý bằng GalNAC không làm gia tăng sự tách do co khi so với mẫu tham chiếu được lên men ằng cùng giống nuôi cấy. Kết quả này là bất ngờ vì US 7,560,127 có chỉ ra rằng glycan liên kết với O dẫn đến tạo thành cục sữa đông và do đó tách nước sữa whey ra.

Kết luận:

Các kết quả nêu trên đã chứng tỏ rằng glycosidaza liên kết với O được thử nghiệm không làm gia tăng sự tách do co trong quá trình sản xuất sữa chua.

Ví dụ 7: LAB và sữa được axit hóa bằng phương pháp hóa học

Trong ví dụ này các tác giả sáng chế muốn đánh giá xem liệu hiệu ứng của PNGaza-F phụ thuộc vào cơ chế axit hoá. Điều này được đánh giá bằng thử nghiệm bằng cách so sánh tác động của PNGaza-F đến sữa chua được lên men và sữa chua được axit hóa bằng phương pháp hoá học bằng Glucono--lacton (GDL).

Sữa bao gồm 9,5% chất khô, được cấy bằng YoFlexAdvance 2.0 hoặc Glucono--lacton (GDL) và PNGaza-F như được thể hiện trong bảng 3, được gia nhiệt đến nhiệt độ 43°C và được lên men đến độ pH 4,55. Sau khi các mẫu đã được bảo quản trong thời gian 3 ngày ở nhiệt độ 5°C, các mẫu này được khuấy bằng máy khuấy và được rót vào cốc của thiết bị đo tốc lực và đo tính lưu biến theo ví dụ 2 và 3.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 3 khẳng định rằng tác động của PNGaza-F có thể là được mô tả như là hiện tượng vật lý. Sữa chua được axit hóa bằng phương pháp hóa học tạo ra gel cứng hơn nhiều nuôi cấy Advance 2.0. Tuy nhiên, đối với cả hai phương pháp axit hoá rõ ràng là việc bổ sung PNGaza-F cải thiện độ rắn chắc của gel.

Bảng 3		
Kết quả thử nghiệm của thử nghiệm điều chế quy mô phòng thí nghiệm 200 ml sữa chua có hàm lượng chất béo thấp trong sự có mặt của PNGaza-F bằng cách sử dụng Advance 2.0 hoặc GDL để axit hoá		
	Nồng độ (sữa U/ml)	độ rắn chắc của gel (Pa)
Advance 2.0 + PNGaza-F	250	35,3 ± 7,8
Advance 2.0	0	24,7 ± 0,9
GDL + PNGaza-F	250	148,0 ± 7,0
GDL	0	121,5 ± 6,4

Kết luận:

Các kết quả nêu trên đã cho thấy cả hai phương pháp axit hoá rõ ràng là việc bổ sung PNGaza-F cải thiện độ rắn chắc của gel.

Phương án được ưu tiên của sáng chế được mô tả nêu trong bản mô tả này, bao gồm các phương án tốt nhất được biết đến đối với các tác giả sáng chế để thực hiện sáng chế. Các biến đổi khác nhau của các phương án được ưu tiên này có thể trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này khi tham khảo phần mô tả nêu trên. Các tác giả sáng chế cho rằng người có hiểu biết trung bình có trình độ trung bình sử dụng các biến đổi như vậy khi thích hợp, và các tác giả sáng chế dự định là sáng chế được thực hiện theo cách khác với cách được mô tả nêu trong bản mô tả này. Do đó, sáng chế bao gồm tất cả các thay đổi và biến đổi tương đương nêu trong yêu cầu hộ được kèm theo đây như là luật sáng chế quy định. Hơn nữa, kết hợp bất kỳ của các yếu tố được mô tả trên đây trong tất cả các thay đổi biến đổi của nó được bao hàm trong sáng chế trừ khi được quy định khác đi nêu trong bản mô tả này hoặc theo nội dung được chỉ ra rõ ràng là ngược lại.

Tài liệu tham khảo

1. US2005/0095316A1 (Danone)
2. US2005/0095317A1 (Danone)
3. WO2007/095958A1 (Chr. Hansen A/S)
4. A.N. Hassan et al (J. Dairy Sci: 86:1632-1638; 2003)
5. US7560127B2 (DSM)
6. E. Cases et al (Journal of Food Science; Vol. 68, Nr. 8, 2003, Pages 2406-2410)
7. EP1489135A1

8. R. Scott, (1986), Cheesemaking process, second ed., Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.

9. G. Bylund, (1995), Dairy processing handbook, Tetra Pak Processing Systems, Lund, Sweden

10. F. Kosikowski, (1982), Cheese and fermented milk foods, second ed., Kosikowski & Associates, New York

Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong tài liệu patent này được kết hợp toàn bộ vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa chua bao gồm các bước:

(a) cung cấp cơ chất sữa;

(b) xử lý cơ chất sữa này bằng enzym có hoạt tính glycosidaza liên kết với N; và

(c) lên men cơ chất sữa này bằng vi sinh vật lên men để tạo ra sản phẩm sữa chua.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước (b) được thực hiện trước khi hoặc trong quá trình thực hiện bước (c).

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này thuộc loài được chọn từ nhóm bao gồm: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactobacillus cazai* subsp. *Cazai*, *Lactobacillus paracazai* subsp. *Paracazai*, *Bifidobacterium bifidum*, và *Bifidobacterium longum*.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó glycosidaza liên kết với N là ít nhất một glycosidaza được chọn từ nhóm bao gồm: Peptit-N(4)-(N-axetyl-beta-glucosaminyl)asparagin amidaza (số EC: 3.5.1.52) và Endo- β -N-axetylglucosaminidaza H (số EC: 3.2.1.96).

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cơ chất sữa này được chọn từ nhóm bao gồm sữa từ động vật và sữa có nguồn gốc thực vật.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó sữa từ động vật là sữa thu từ bò, cừu, động vật cái, dê, trâu hoặc lạc đà.

7. Phương pháp theo điểm 5, trong đó sữa có nguồn gốc thực vật là sữa đậu nành, sữa sồi, sữa gạo hoặc sữa hạnh nhân.
8. Sản phẩm sữa chua thu được bằng phương pháp theo điểm 1.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật lên men là vi khuẩn axit lactic.