



(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)



1-0025355

(51)⁷ A23L 1/20; A23C 11/10; A23C 9/13

(13) B

(21) 1-2015-04104

(22) 02/04/2014

(86) PCT/JP2014/059786 02/04/2014

(87) WO 2014/163123 09/10/2014

(30) 2013-076517 02/04/2013 JP

(45) 25/09/2020 390

(43) 25/03/2016 336A

(73) KIKKOMAN CORPORATION (JP)

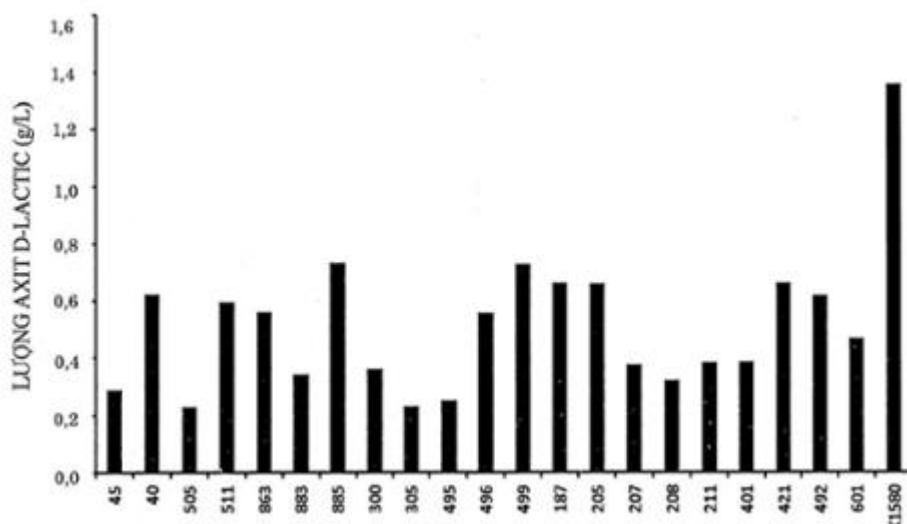
250 Noda, Noda-shi, Chiba 2788601, Japan

(72) KANEKO Daisuke (JP); AOYAMA Kenji (JP); WIM Engels (NL); ARNO Wegkamp (NL); FEDDE Kingma (NL).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) SẢN PHẨM LÊN MEN TỪ SỮA ĐẬU NÀNH, CHẤT MÔI HỖN HỢP VI KHUẨN AXIT LACTIC VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến sản phẩm lên men từ sữa đậu nành có vị và hương vị hoặc tính chất vật lý dễ chịu tương tự với vị của sữa chua thu được bằng cách lên men sữa với axit lactic mà không áp dụng việc xử lý bằng quy trình như xử lý enzym hoặc xử lý chiết xuất đối với nguyên liệu sữa đậu nành và không cần bổ sung nguyên liệu như nguồn đường, ngay cả trong trường hợp chỉ sử dụng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* làm chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic tại thời điểm tạo thành sản phẩm lên men sử dụng sữa đậu nành làm nguyên liệu. Vấn đề này được giải quyết nhờ sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách sử dụng chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic bao gồm: *Streptococcus thermophilus* có khả năng tích lũy fructoza với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men khi được cấy và nuôi cấy trong sữa đậu nành; và *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* có khả năng tích lũy axit D-lactic với lượng là 0,4 g/L trong sản phẩm lên men khi được cấy và nuôi cấy trong sữa đậu nành.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách lên men sữa đậu nành với vi khuẩn axit lactic. Sáng chế cũng đề cập đến chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic và phương pháp sản xuất chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đậu tương được xem là “thịt trên cánh đồng”, và là nguyên liệu thực phẩm chứa protein thực vật dồi dào, và sữa đậu nành là đồ uống giống như sữa thu được bằng cách tách rửa protein. Sữa đậu nành có thể được lên men bằng vi khuẩn axit lactic, vi khuẩn này rất có lợi cho sức khỏe của vật chủ của nó, và sản phẩm tạo thành rất giống với sữa chua. Do cả sữa đậu nành và vi khuẩn axit lactic đều là nguyên liệu có lợi cho sức khỏe, nên sản phẩm lên men từ sữa đậu nành được dự đoán là có lợi cho sức khỏe theo cách hiệp đồng. Tuy nhiên, mùi khó chịu đặc trưng của đậu tương hoặc mùi lên men hoặc mùi giống như dưa chua tạo ra bởi vi khuẩn axit lactic gây trở ngại cho việc tạo dựng thị trường cho các sản phẩm sữa đậu nành lên men.

Mặt khác, đã biết rằng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, thiết lập mối quan hệ cộng sinh trong sữa, hai vi khuẩn này được CODEX của Ủy ban Tiêu chuẩn hóa thực phẩm của FAO/WHO (the Joint FAO/WHO Food Standard Committee) (CODEX Alimentarius) (dưới đây được gọi là “CODEX”) định nghĩa là vi khuẩn axit lactic trong sữa chua. Cũng đã biết rằng, bằng cách thiết lập mối quan hệ cộng sinh này, sự sinh trưởng của cả hai loài vi khuẩn được cải thiện đáng kể so với sự lên men bằng một chủng đơn lẻ, sản xuất sữa chua có vị và hương vị ngon.

Tuy nhiên, trong sữa đậu nành, ngay cả khi *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được cấy đồng thời, thì quy trình lên men vẫn không được tiến hành một cách đầy đủ, nếu không bổ sung lactoza vào sữa đậu nành, và đã biết là rất khó tạo ra sản phẩm có tính chất vật lý tốt và tạo ra vị và hương vị ngon bởi sự sản xuất axit lactic. Nguyên nhân chính của khó khăn này là do *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* không có khả năng đồng hóa sucroza chứa trong sữa đậu nành, và không thể tiến hành lên men axit lactic một cách bình thường và làm tăng số lượng vi khuẩn được.

Cho đến nay, có nhiều phương pháp sản xuất sản phẩm lên men từ sữa đậu nành có vị và hương vị ngon nhờ lên men axit lactic. Ví dụ, có một phương pháp để cải thiện vị và hương vị bằng cách trộn giống cấy chứa năm loại vi khuẩn axit lactic, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, và *Streptococcus thermophilus*, và bổ sung đường, lipit, gelatin vào sữa đậu nành tinh khiết chưa được cải biến (tham khảo tài liệu sáng chế 1).

Ngoài ra, đã có nhiều báo cáo khác nhau về biện pháp thúc đẩy sự lên men axit lactic trong sữa đậu nành và cải thiện vị và hương vị bằng cách bổ sung các loài vi khuẩn khác nhau khác vào *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, hoặc thay thế các loài vi khuẩn này hoàn toàn bằng các loài vi khuẩn khác, như: phương pháp cải thiện vị và hương vị bằng cách lên men hai loại vi khuẩn axit lactic, *Lactobacillus plantarum* và *Lactococcus lactis* (tham khảo tài liệu sáng chế 2); phương pháp thu nhận sản phẩm lên men từ sữa đậu nành có hương vị được cải thiện bằng cách lên men với ít nhất ba loài vi khuẩn, loài *Lactobacillus acidophilus* hoặc *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium*, và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (tham khảo tài liệu sáng chế 3); và phương pháp lên men sữa đậu

nành với ba loại vi khuẩn axit lactic: một chủng vi khuẩn được chọn lọc từ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus casei*; và *Streptococcus thermophilus* (tham khảo tài liệu sáng chế 4). Ngoài ra, đã có báo cáo về phương pháp tiến hành lên men bằng cách bổ sung đồng thời đường và vi khuẩn axit lactic và proteaza trong sữa đậu nành để cải thiện vị và hương vị (tham khảo tài liệu sáng chế 5).

Danh sách tài liệu sáng chế được trích dẫn

Tài liệu sáng chế 1: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật chưa được xét nghiệm số 63-7743

Tài liệu sáng chế 2: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật chưa được xét nghiệm số 5-184320

Tài liệu sáng chế 3: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật chưa được xét nghiệm số 10-201415

Tài liệu sáng chế 4: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật chưa được xét nghiệm số 2011-167190

Tài liệu sáng chế 5: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật chưa được xét nghiệm số 7-147898

Tuy nhiên, trong tình trạng kỹ thuật này, sữa đậu nành được lên men bằng cách sử dụng không chỉ hai vi khuẩn axit lactic, *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, là vi khuẩn được CODEX định nghĩa là vi khuẩn axit lactic trong sữa chua, mà còn sử dụng cả các loài vi khuẩn axit lactic khác có các đặc tính khác nhau từ hai vi khuẩn axit lactic này; và do đó, gây ra vấn đề về vị thô hoặc mùi dưa chua do các loại vi khuẩn axit lactic khác này và sữa đậu nành được lên men có hương vị và tính chất vật lý khác biệt đáng kể so với hương vị và tính chất vật lý của sữa chua thu được bằng cách lên men sữa bò. Ngoài ra, còn

gặp một vấn đề khác là do khó xử lý ba hoặc nhiều chủng vi khuẩn axit lactic trong quy trình lên men, nên rất khó duy trì chất lượng của các lô sản phẩm, và rất khó tạo chế phẩm một số nguyên liệu thực phẩm khác với nguyên liệu có nguồn gốc từ đậu tương hoặc bổ sung các enzym vào sữa đậu nành đồng thời khi cấy axit lactic.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất sản phẩm lên men từ sữa đậu nành có vị và hương vị hoặc tính chất vật lý dễ chịu tương tự với vị của sữa chua thu được bằng cách lên men sữa bò với vi khuẩn axit lactic mà không cần áp dụng việc xử lý theo quy trình như xử lý enzym hoặc xử lý chiết xuất đối với nguyên liệu sữa đậu nành, và cũng không cần bổ sung nguyên liệu như nguồn đường vào sữa đậu nành, ngay cả trong trường hợp chỉ sử dụng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* làm chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic tại thời điểm tạo thành sản phẩm lên men chỉ sử dụng sữa đậu nành làm nguyên liệu.

Cách thức để giải quyết vấn đề

Kết quả của việc tiến hành nghiên cứu kỹ lưỡng để giải quyết các vấn đề đã nêu trên đây, tác giả sáng chế và cộng sự đã phát hiện ra rằng, trong chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic thu được bằng cách kết hợp hai vi khuẩn axit lactic, *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* là vi khuẩn được CODEX định nghĩa là vi khuẩn axit lactic trong sữa chua, với nhau, *Streptococcus thermophilus* có khả năng tích lũy 0,4 g/L fructoza trong sữa đậu nành và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có khả năng tạo ra axit D-lactic với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn khi được kết hợp với *Streptococcus thermophilus* này, nhờ đó, cũng như trong môi trường sữa đậu nành, cả hai loài vi khuẩn được sinh trưởng đến mức độ sao cho sự phát triển về cơ bản giống với sự phát triển trong

môi trường sữa bò, và sản phẩm lên men từ sữa đậu nành có vị và hương vị hoặc tính chất vật lý tương tự với sữa chua thu được bằng cách lên men sữa bò với vi khuẩn axit lactic, và tạo ra sáng chế.

Tức là, sáng chế đề xuất (1) sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách sử dụng chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic bao gồm: *Streptococcus thermophilus* có khả năng tích lũy fructoza với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men khi chủng này được cấy và nuôi cấy trong sữa đậu nành; và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có khả năng tạo ra axit D-lactic với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men khi chủng này và *Streptococcus thermophilus* trên đây đồng thời được cấy và nuôi cấy trong sữa đậu nành.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất (2) chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic bao gồm: *Streptococcus thermophilus* có khả năng tích lũy fructoza với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men khi chủng này được cấy và nuôi cấy trong sữa đậu nành; và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có khả năng tạo ra axit D-lactic với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men khi chủng này và *Streptococcus thermophilus* trên đây đồng thời được cấy và nuôi cấy trong sữa đậu nành.

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, sản phẩm lên men từ sữa đậu nành có vị và hương vị hoàn hảo hoặc tính chất vật lý tương tự với sữa chua thu được bằng cách lên men sữa bò bằng vi khuẩn axit lactic mà không áp dụng việc xử lý theo quy trình như xử lý enzym hoặc xử lý chiết xuất đối với nguyên liệu sữa đậu nành và không cần bổ sung nguyên liệu như nguồn đường, ngay cả trong trường hợp chỉ sử dụng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* làm chất môi hỗn hợp

vi khuẩn axit lactic trong khi sản phẩm lên men sử dụng sữa đậu nành làm nguyên liệu. Sản phẩm lên men từ sữa đậu nành giống sữa chua theo sáng chế không tạo cảm giác về mùi khó chịu đặc trưng của sản phẩm lên men đậu tương và do đó có thể dự đoán rằng sản phẩm này được sử dụng rộng rãi làm nguyên liệu có lợi cho sức khỏe có chức năng hoàn hảo do tác dụng hiệp đồng của đậu tương và vi khuẩn axit lactic.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là đồ thị mô tả lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách trộn *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* đã được nhân giống (chủng K1581) và chủng *Streptococcus thermophilus* được phân lập và được chọn từ chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường hoặc chủng *Streptococcus thermophilus* đã được nhân giống (chủng K1580) với nhau, cấy hỗn hợp trong sữa đậu nành, và tiến hành lên men ở nhiệt độ 42 độ bách phân trong thời gian 24 giờ.

Fig. 2 là đồ thị mô tả lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách trộn *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* đã được nhân giống (chủng K1585) và các chủng *Streptococcus thermophilus* được phân lập và được chọn từ chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường với nhau, cấy hỗn hợp này vào sữa đậu nành, và tiến hành lên men ở nhiệt độ 42 độ bách phân trong thời gian 24 giờ.

Fig. 3 là đồ thị mô tả lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách trộn chủng *Streptococcus thermophilus* đã được nhân giống (chủng K1580) và các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được phân lập từ chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường, cấy hỗn hợp này vào trong sữa đậu nành, và tiến hành lên men ở nhiệt độ 42 độ bách phân trong thời gian 24 giờ.

Fig. 4 là đồ thị mô tả lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách chỉ lên men (ở nhiệt độ 42 độ bách phân trong thời gian 24 giờ) chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường mà không được nhân giống hoặc phân

lập hoặc chọn lọc hoặc công đoạn tương tự (chất môi hỗn hợp của *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*).

Fig. 5 là biểu đồ xác định lượng sản xuất axit D-lactic dịch lên men thu được bằng cách lên men vật liệu thấm màng sữa đậu nành thu được bằng cách bổ sung 1/0% (trọng lượng/thể tích) fructoza trong vật liệu thấm bằng cách thấm sữa đậu nành tinh khiết qua màng siêu lọc MF, ở nhiệt độ 42 độ bách phân trong thời gian 24 giờ, chỉ riêng với *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Fig. 6 là biểu đồ xác định lượng sản xuất axit D-lactic trong dịch lên men thu được bằng cách lên men vật liệu thấm màng sữa đậu nành có tính axit thu được bằng cách bổ sung 1,0% (trọng lượng/thể tích) fructoza trong vật liệu thấm thu được bằng cách thấm sữa đậu nành tinh khiết trong màng siêu lọc MF và điều chỉnh độ pH đến 5,0, và chỉ được lên men bằng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Fig. 7 là biểu đồ xác định nồng độ fructoza trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách lên men, ở nhiệt độ 42 độ bách phân trong thời gian 24 giờ, chủng *Streptococcus thermophilus* được phân lập từ chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường (chất môi hỗn hợp của *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*).

Fig. 8 là biểu đồ xác định lượng sản xuất axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách trộn, ở tỷ lệ bằng 1:1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được phân lập chẳng hạn từ chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường YO-MIX505, 511, 863, với chủng *Streptococcus thermophilus* được phân lập từ chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường YO-MIX305, 499, và tiến hành lên men ở nhiệt độ 42 độ bách phân trong thời gian 24 giờ.

Fig. 9 là đồ thị mô tả sự thay đổi nồng độ sucroza theo thời gian khi sữa đậu nành được lên men ở nhiệt độ 42 độ bách phân chỉ bằng chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 là vi khuẩn axit lactic được nhân giống.

Fig. 10 là đồ thị mô tả sự thay đổi nồng độ fructoza theo thời gian khi sữa đậu nành được lên men ở nhiệt độ 42 độ bách phân chỉ bằng chủng *Streptococcus*

thermophilus K1580 là vi khuẩn axit lactic được nhân giống.

Fig. 11 là đồ thị mô tả sự thay đổi nồng độ fructoza theo thời gian khi sữa đậu nành được lên men đồng thời ở nhiệt độ 42 độ bách phân, với chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 là vi khuẩn axit lactic được nhân giống và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* K1581 là vi khuẩn axit lactic được nhân giống.

Fig. 12 là đồ thị mô tả kết quả thu được bằng cách xác định sự phân bố cỡ hạt của sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách lên men nhờ chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường hoặc chất môi hỗn hợp của chủng được nhân giống, hoặc theo cách khác, chất môi hỗn hợp của chủng được chọn lọc.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết.

Sản phẩm lên men từ sữa đậu nành theo sáng chế thu được bằng cách lên men chỉ với hai loài vi khuẩn axit lactic, *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mà không áp dụng việc xử lý theo quy trình đặc biệt như xử lý enzym đối với sữa đậu nành.

Đối với sữa đậu nành được sử dụng trong sáng chế, có thể sử dụng loại sữa đậu nành bất kỳ với điều kiện là sữa đậu nành này thu được bằng phương pháp thông thường, hoặc theo cách khác, có thể sử dụng sữa đậu nành có bán trên thị trường. Ví dụ, có thể sử dụng dịch lỏng thu được bằng cách đun sôi và nghiền đậu nành thu được bằng cách ngâm và làm nở đậu tương đã bóc vỏ hoặc đậu tương đã tách béo, và tốt hơn nữa nếu dịch lỏng đã được loại bỏ xơ đậu tương từ quan điểm về vị hoặc cấu trúc. Ngoài ra, có thể sử dụng dịch lỏng thu được bằng cách hòa tan bột đậu nành nguyên hạt, bột đậu nành đã tách béo hoặc các loại bột đậu nành tương tự. Mặc dù, theo tiêu chuẩn JAS, sữa đậu nành được định nghĩa là có hàm lượng chất rắn trong đậu tương bằng 8,0% hoặc nhiều hơn, sữa đậu nành tinh khiết được định nghĩa là có

hàm lượng chất rắn trong đậu tương bằng 6,0% hoặc nhiều hơn, và đồ uống sữa đậu nành được định nghĩa là có hàm lượng chất rắn trong đậu tương bằng 4,0% hoặc nhiều hơn, nhưng hàm lượng chất rắn trong đậu tương không bị giới hạn một cách cụ thể.

Streptococcus thermophilus được sử dụng theo sáng chế có thể được sinh trưởng trong sữa đậu nành, và cần phải có đặc tính phân hủy sucroza trong sữa đậu nành và tiếp đó sản xuất glucoza và fructoza trong trường hợp *Streptococcus thermophilus* chỉ được sinh trưởng trong sữa đậu nành, và tích lũy fructoza ở nồng độ bằng 0,4 f/L hoặc nhiều hơn.

Mặc dù *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* không có khả năng đồng hóa nguồn đường sucroza chứa trong sữa đậu nành, nhưng *Streptococcus thermophilus* phân hủy sucroza thành glucoza và fructoza, nhờ đó chúng được đồng hóa và khi đó *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cũng có thể sinh trưởng được.

Mặc dù *Streptococcus thermophilus* dùng sản phẩm phân hủy làm nguồn đường trong khi phân hủy sucroza, nếu chúng có khả năng phân hủy cao cụ thể được chọn, thì đường được phân hủy trong sản phẩm lên men sẽ được đồng hóa. Ngoài ra, trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành mà lượng fructoza tích lũy được vượt quá 0,4 g/L, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được sinh trưởng tốt, và có khả năng đóng vai trò quan trọng trong việc sản xuất các chất chuyển hóa khác nhau và tạo thành vị và hương vị của sữa chua trong quá trình phát triển.

Do đó, mặc dù sự chuyển hóa của *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* đóng vai trò quan trọng trong việc lên men sữa đậu nành giống như sữa chua, nhưng axit D-lactic được sản xuất bởi sự chuyển hóa này không được sản xuất bởi

Streptococcus thermophilus, *Streptococcus thermophilus* chỉ tạo ra axit L-lactic, và do đó, axit D-lactic có thể được sử dụng làm chỉ số có thể xác định dễ dàng hoạt tính chuyển hóa của *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Theo sáng chế, nhận thấy rằng sản phẩm lên men đặc trưng ở chỗ lượng axit D-lactic bằng 0,4 g/L hoặc nhiều hơn tích lũy trong đó cải thiện vị và hương vị cụ thể là do *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* đã sản xuất một cách tích cực chất chuyển hóa này.

Vi khuẩn axit lactic có đặc tính nêu trên có thể được chọn từ vi khuẩn axit lactic được sử dụng để sản xuất sữa chua từ sữa hoặc chủng vi khuẩn axit lactic tương tự trong môi trường này. Trong trường hợp vi khuẩn axit lactic được nhân giống, có thể sử dụng tất cả các phương pháp đã được áp dụng rộng rãi. Ví dụ, kích thích đột biến sử dụng tia cực tím hoặc kích thích đột biến sử dụng được chất, cấy chuyển trên môi trường về cơ bản chứa sữa đậu nành hoặc các phương pháp tương tự, có thể thu được *Streptococcus thermophilus* tích lũy fructoza với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sữa đậu nành hoặc *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sản xuất axit D-lactic với lượng lớn bằng 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sữa đậu nành khi chúng được nuôi cấy đồng thời.

Khi nhân giống vi khuẩn axit lactic, chủng có khả năng sản xuất axit cao có thể được nhân giống bằng cách cấy đồng thời *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và tiếp đó tiến hành lên men ở nhiệt độ lên men nằm trong khoảng từ 30 đến 45 độ bách phân, tốt hơn nữa nếu ở nhiệt độ lên men nằm trong khoảng từ 32 đến 42 độ bách phân và trong thời gian lên men từ 4 đến 24 giờ.

Mặc dù vi khuẩn axit lactic sản xuất ra axit D-lactic là *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, nhưng vi khuẩn này không thể đồng hóa sucroza mà về cơ bản chứa đường trong sữa đậu nành và do đó vi khuẩn này không thể sinh trưởng được

một cách riêng rẽ, và có thể bị chết. Nói cách khác, tác giả sáng chế và cộng sự đã nhận thấy rằng, trong nhiều trường hợp, *Streptococcus thermophilus* có khả năng đồng hóa và phát triển sucroza đến mức độ nhất định trong sữa đậu nành, và tại thời điểm đó, vi khuẩn axit lactic này phân hủy sucroza, nhờ đó tạo ra glucoza và fructoza, và nếu *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được tồn tại đồng thời, chúng được đồng hóa, và có thể sinh trưởng được dần dần.

Mặc dù được cho là đường được bổ sung vào sữa đậu nành và được bù vào để phát triển *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, có thể có trường hợp trong đó lượng axit D-lactic tạo ra đủ không chỉ được thể hiện bởi đường bù vào, và tính tương hợp của hai chủng khác với mối quan hệ bổ sung của đường đang có và do đó điều quan trọng là chọn lọc *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* với sự chuyển hóa tích cực có khả năng sản xuất lượng axit D-lactic là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn tại thời điểm nuôi cấy với *Streptococcus thermophilus* là vi khuẩn tích lũy fructoza.

Bằng cách chọn lọc hoặc nhân giống hỗn hợp của các chủng thích hợp trong số các chủng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* hiện tại, cả hai loài vi khuẩn này đều được hoạt hóa trong sữa đậu nành và có thể tạo ra vị và hương vị ngon hoặc tính chất vật lý giống sữa chua; và tuy nhiên, *Streptococcus thermophilus* đồng hóa một cách tích cực sucroza, và kết quả là, axit L-lactic được sản xuất bởi vi khuẩn này cũng được tạo ra trong sản phẩm lên men.

Để thu được sản phẩm lên men từ sữa đậu nành giống sữa chua, cần phải có axit L-lactic được sản xuất bởi *Streptococcus thermophilus* cũng như axit D-lactic.

Vi khuẩn axit lactic được sử dụng theo sáng chế có thể thu được bằng cách chọn lọc hoặc nhân giống như đã nêu trên đây, và các ví dụ của sáng chế bao gồm:

hỗn hợp của chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* K1581; hỗn hợp của chủng *Streptococcus thermophilus* K1584 và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* K1585; và hỗn hợp của chủng *Streptococcus thermophilus* có sẵn từ Danisco Inc. (chủng được phân lập từ chất môi hỗn hợp YO-MIX499) và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có sẵn từ Danisco Inc. (chủng này được phân lập từ chất môi hỗn hợp YO-MIX505, 511, 863) hoặc các hỗn hợp tương tự. Sản phẩm lên men từ sữa đậu nành theo sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng vi khuẩn axit lactic có các đặc tính nêu trên, và sản phẩm này không bị giới hạn ở các chủng được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Phương pháp lên men sữa đậu nành bằng vi khuẩn axit lactic có thể được tiến hành trên cơ sở phương pháp sản xuất sữa chua hoặc đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic chung đã biết; ví dụ, *Streptococcus thermophilus* được cấy trong sữa đậu nành với mật độ nằm trong khoảng từ 1×10^4 đến 1×10^8 cfu/mL là đủ, tốt hơn nữa nếu từ 1×10^5 đến 1×10^7 cfu/mL, và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được cấy trong sữa đậu nành với mật độ nằm trong khoảng từ 1×10^2 đến 1×10^7 cfu/mL, tốt hơn nữa nếu từ 1×10^3 đến 1×10^5 cfu/mL, và phương pháp lên men được tiến hành ở nhiệt độ lên men nằm trong khoảng từ 30 đến 45 độ bách phân, tốt hơn nữa nếu nhiệt độ nằm trong khoảng từ 37 đến 42 độ bách phân và thời gian nằm trong khoảng từ 4 đến 24 giờ, và chế độ lên men không bị giới hạn một cách cụ thể.

Theo sáng chế, sản phẩm lên men từ sữa đậu nành giống sữa chua thu được theo cách này khác biệt ở chỗ chứa 0,4 g/L axit D-lactic hoặc nhiều hơn, sự chuyển hóa của cả *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* đều rất tích cực, nhờ đó sản xuất được lượng axit lactic chưa từng thu được cho đến nay, trong trường hợp chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic có bán trên thị trường được sử dụng theo cách đó, tạo ra sản phẩm lên men từ sữa đậu nành

có tính chất vật lý tốt hoặc hương vị giống sữa chua, có các thành phần hương liệu có nguồn gốc từ các loài vi khuẩn tương ứng. Ngoài ra, có thể tiến hành lên men mà không cần bổ sung thêm nguyên liệu khác với nguyên liệu có nguồn gốc từ đậu tương và do đó sản phẩm không bị ảnh hưởng bởi vị nhận được từ nguyên liệu bổ trợ. Hơn nữa, sản phẩm lên men từ sữa đậu nành theo sáng chế có tính đa năng, và có thể được áp dụng cho sản phẩm đồ uống hoặc thực phẩm bất kỳ có liên quan đến đậu tương như gia vị hoặc pho-mát và đồ uống cũng như thức ăn giống sữa chua.

Mặc dù phương án theo sáng chế mô tả ví dụ về việc sản xuất sản phẩm lên men axit lactic bằng cách chỉ sử dụng hai loài vi khuẩn *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở ví dụ này, và ngoài hai loài vi khuẩn axit lactic được thể hiện theo sáng chế, có thể sử dụng đồng thời vi khuẩn axit lactic khác với *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* với điều kiện là nó không ảnh hưởng đến sự lên men axit lactic của *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hoặc hương vị của sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được.

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách cụ thể hơn bằng các ví dụ. Cần phải hiểu rằng phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

1. Phép xác định lượng axit D-lactic của sản phẩm lên men từ sữa đậu nành sử dụng chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic có bán trên thị trường

(1) Chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic

Đối với chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic, sử dụng chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic có bán trên thị trường để sản xuất sữa chua (có sẵn từ Danisco Inc., sản phẩm được sấy thăng hoa bao gồm cả hai chủng *Streptococcus thermophilus* và

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*. Dưới đây, các sản phẩm này có thể thường gọi là “chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường”). Do các chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường này, tồn tại nhiều sản phẩm khác nhau dựa theo đặc tính của chủng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Cụ thể, các chất môi ở trên bao gồm: YO-MIX300, YO-MIX305, YO-MIX496, YO-MIX499, YO-MIX505, YO-MIX511, YO-MIX863, YO-MIX883, YO-MIX885, YO-MIX401, YO-MIX421, YO-MIX495, YO-MIX601 (trong đó tất cả các con số chỉ số của sản phẩm).

(2) Điều kiện lên men và phương pháp xác định

Đối với dịch lỏng nguồn sữa đậu nành, sử dụng sữa đậu nành tinh khiết không được điều chỉnh có bán trên thị trường (có sẵn từ Kokkoman Soy Foods Corporation). Mặt khác, sản phẩm sấy thăng hoa của mỗi chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic được nuôi cấy trong 10 mL trong môi trường nuôi cấy LM17 (Terzaghi and Sandine, Appl. Microbiol. 29, 807 to 813, 1975), và dịch lỏng nuôi cấy được ly tâm và được rửa bằng dung dịch NaCl 0,9% và tiếp đó được tạo huyền phù lại trong 10mL dung dịch NaCl 0,9%. Huyền phù được bào chế như vậy được cấy 1,0% (thể tích/thể tích) trong dịch lỏng nguồn lên men sữa đậu nành nêu trên, và tiến hành lên men ở nhiệt độ 42 độ bách phân và trong thời gian 24 giờ. Sau đó, quy trình lên men được hoàn thành sau 24 giờ, và lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành được xác định bằng phương pháp điện cực enzym (có sẵn từ Oji Scientific Instruments, Biosensor BF-5).

(3) Kết quả

Kết quả được thể hiện trên Fig. 4. Khi xác định lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách lên men trong thời gian 24 giờ, nhận thấy rằng axit D-lactic rất khó được tạo ra, và không thu được sản phẩm lên men từ sữa đậu nành có hương vị giống sữa chua mong muốn (Fig. 4).

2. Phân lập, chọn lọc, và nhân giống các chủng đã được lấy mẫu

(1) *Streptococcus thermophilus*

Từ các chất môi có bán trên thị trường (mỗi chất môi trong số đó bao gồm hai loài vi khuẩn *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), chỉ có các chủng *Streptococcus thermophilus* được phân lập. Chủng được phân lập, trên cơ sở số sản phẩm của các chất môi có bán trên thị trường là: chủng *Streptococcus thermophilus* 45; chủng St. 40; chủng St. 505; chủng St. 511; chủng St. 863; chủng St. 883; chủng St. 885; chủng St. 300; chủng St. 305; chủng St. 495; chủng St. 496; chủng St. 499; chủng St. 187; chủng St. 205; chủng St. 207; chủng St. 208; chủng St. 211; chủng St. 401; chủng St. 421; chủng St. 492; chủng St. 601.

Trong số các chủng đã phân lập được đề cập ở trên, nguyên liệu cấy của các chủng vi khuẩn đã phân lập được cấy trong sữa đậu nành ở tỷ lệ 1%, và khi tiến hành nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 37 đến 45 độ bách phân và trong khoảng thời gian từ 12 đến 24 giờ, chủng *Streptococcus thermophilus* có khả năng tích lũy fructoza với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn được chọn lọc trong sản phẩm lên men và tiếp đó được sử dụng làm chủng chọn lọc. Cụ thể là, chủng *Streptococcus thermophilus* (St.), chủng St. 511, chủng St. 863, chủng St. 885, chủng St. 496, chủng St. 499, chủng St. 187, chủng St. 205, chủng St. 401, chủng St. 421, chủng St. 492, chủng St. 601 được sử dụng làm các chủng chọn lọc.

Ngoài ra, chủng *Streptococcus thermophilus* St. 2333 và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb. 185, sở hữu bởi tập đoàn nghiên cứu thực phẩm NIZO của Hà Lan, được cấy trong sữa đậu nành tinh khiết (có sẵn từ Kikkoman Soy Foods Corporation), và tiến hành cấy chuyển. Sản phẩm lên men từ sữa đậu nành được cấy lặp lại trong sữa đậu nành ở tỷ lệ bằng 1% (thể tích/thể tích), và tiến hành

nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 37 đến 45 độ bách phân và trong thời gian từ 12 đến 24 giờ. Tiến hành cấy chuyển khoảng 700 thể hệ, và sử dụng chủng *Streptococcus thermophilus* phân lập từ sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được làm chủng K1580.

Hơn nữa, chủng *Streptococcus thermophilus* St. 131 và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb. 194, cũng được sở hữu bởi tập đoàn nghiên cứu thực phẩm NIZO, được cấy trong sữa đậu nành tinh khiết (có sẵn từ Kokkoman Soy Foods Corporation), và tiến hành cấy chuyển. Sản phẩm lên men từ sữa đậu nành được cấy lặp lại trong sữa đậu nành ở tỷ lệ bằng 1% (thể tích/thể tích), và tiến hành cấy chuyển ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 37 đến 45 độ bách phân và trong thời gian từ 12 đến 24 giờ. Tiến hành cấy chuyển đến khoảng 700 thể hệ, và chủng *Streptococcus thermophilus* phân lập từ sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được được sử dụng làm chủng K1584.

(2) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Từ các chất môi có bán trên thị trường được đề cập ở trên, chỉ có chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được phân lập. Chủng được phân lập, trên cơ sở số sản phẩm của các chất môi có bán trên thị trường là: chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Lb. 300; chủng Lb. 305; chủng Lb. 401; chủng Lb. 421; chủng Lb. 492; chủng Lb. 495; chủng Lb. 496; chủng Lb. 499; chủng Lb. 505; chủng Lb. 511; chủng Lb. 601; chủng Lb. 863; chủng Lb. 883; chủng Lb. 885.

Trong số các chủng đã phân lập được đề cập ở trên, cùng với 1,0% chủng *Streptococcus thermophilus* chọn lọc đã nêu trên đây, 1,0% nguyên liệu cấy của các chủng được phân lập ở trên được cấy vào trong sữa đậu nành, và khi tiến hành nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 37 đến 45 độ bách phân và trong thời gian từ 12

đến 24 giờ, các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tích lũy 0,4 g/L axit D-lactic hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men được chọn lọc, và được sử dụng làm chủng chọn lọc. Cụ thể, chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb.) 492, chủng Lb. 505, chủng Lb. 511, chủng Lb. 601, được sử dụng làm chủng chọn lọc.

Ngoài ra, chủng *Streptococcus thermophilus* St. 2333 và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb. 185, sở hữu bởi tập đoàn nghiên cứu thực phẩm NIZO, được cấy trong sữa đậu nành tinh khiết (có sẵn từ Kikkoman Soy Foods Corporation), và tiến hành cấy chuyển. Sản phẩm lên men từ sữa đậu nành được cấy lặp lại vào trong sữa đậu nành ở tỷ lệ bằng 1% (thể tích/thể tích), và tiến hành nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 37 đến 45 độ bách phân và trong thời gian từ 12 đến 24 giờ. Tiến hành cấy chuyển đến khoảng 700 thể hệ, và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phân lập từ sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được được sử dụng làm chủng K1581.

Hơn nữa, chủng *Streptococcus thermophilus* St. 131 và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb. 194, cũng được sở hữu bởi tập đoàn nghiên cứu thực phẩm NIZO, được cấy trong sữa đậu nành tinh khiết (có sẵn từ Kikkoman Soy Foods Corporation), và tiến hành cấy chuyển. Sản phẩm lên men từ sữa đậu nành được cấy lặp lại trong sữa đậu nành ở tỷ lệ bằng 1% (thể tích/thể tích), và tiến hành nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 37 đến 45 độ bách phân và trong thời gian từ 12 đến 24 giờ. Tiến hành cấy chuyển đến khoảng 700 thể hệ, và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phân lập từ sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được được sử dụng làm chủng K1585. Tương tự, chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phân lập từ sự cấy chuyển chủng 131 và Lb. 185 được sử dụng làm chủng K1583.

3. So sánh lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành

(1) Chúng được lấy mẫu

Sữa đậu nành được lên men bằng cách sử dụng vi khuẩn axit lactic phân lập từ chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường và vi khuẩn axit lactic được chọn lọc và nhân giống (tham khảo mục 2 ở trên), và lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được được xác định và so sánh với nhau.

(2) Điều kiện lên men và phương pháp xác định

Đối với nguyên liệu lên men, sử dụng sữa đậu nành tinh khiết (có sẵn từ Kikkoman Soy Foods Corporation). Chế phẩm chứa chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic làm từ chủng *Streptococcus thermophilus* và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được bổ sung vào nguyên liệu lên men này, và quy trình lên men được tiến hành ở nhiệt độ 42 độ bách phân và trong thời gian 24 giờ. Sau khi quy trình lên men hoàn thành, lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được được xác định bằng phương pháp enzym (có sẵn từ Oji Scientific Instruments, Biosensor BF-5).

(3) Kết quả

Fig. 1 là đồ thị mô tả kết quả thu được bằng cách xác định lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách lên men, giả định trước rằng chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic bao gồm: nhiều chủng *Streptococcus thermophilus* khác nhau; và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* K1581 là chủng được nhân giống.

Fig. 2 là đồ thị mô tả kết quả thu được bằng cách xác định lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách lên men sữa đậu nành trong điều kiện tương tự, giả định trước rằng chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* K1585 tức là chủng được nhân giống được sử dụng tương tự làm chất

môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic thay cho chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* K1581.

Như được thể hiện trên Fig. 1 và Fig. 2, dù là các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* giống hệt nhau, nhưng lượng sản xuất axit D-lactic khác nhau phụ thuộc vào các chủng *Streptococcus thermophilus* mà được kết hợp với nhau; và do đó, nhận thấy rằng khả năng chuyển hóa của chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thay đổi phụ thuộc vào đặc tính của chủng *Streptococcus thermophilus*. Cụ thể, trong các chủng được chọn lọc dựa trên chỉ số cho thấy rằng lượng sản xuất fructoza là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn, lượng sản xuất axit D-lactic được chứng minh là tăng lên đáng kể.

FIG. 3 là đồ thị mô tả kết quả thu được bởi lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách lên men trong điều kiện tương tự, giả định trước rằng chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic bao gồm: chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 là chủng được nhân giống; và mỗi chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được phân lập từ chất môi có bán trên thị trường, và tiếp đó, chất môi được cấy vào sữa đậu nành.

Như được thể hiện trên Fig. 3, ngay cả trong trường hợp sử dụng chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 được nhân giống, thì vẫn nhận thấy rằng có sự khác biệt đáng kể về lượng axit D-lactic sản xuất được, phụ thuộc vào chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Như được thể hiện trên Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, và Fig. 4, axit D-lactic không được sản xuất quá nhiều trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách lên men trong khi chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic có bán trên thị trường được sử dụng như thế, trong các chủng *Streptococcus thermophilus* và chủng *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. *bulgaricus*, trong khi chất môi được thay thế bởi các chủng thu được bằng cách chọn lọc và nhân giống cả hai chủng *Streptococcus thermophilus* và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, nhờ đó có thể thu được sản phẩm lên men từ sữa đậu nành chứa 0,4 g/L axit D-lactic hoặc nhiều hơn. Cụ thể, trong trường hợp chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic bao gồm: vi khuẩn axit lactic (chủng *Streptococcus thermophilus* chủng K1580 và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* K1581) được nhân giống theo sáng chế, kết quả trên đây cho thấy rằng có thể thu được sản phẩm lên men từ sữa đậu nành với lượng axit D-lactic lớn hơn nữa (đề cập đến trên Fig. 1).

Do sự thay đổi đáng kể về lượng sản xuất axit D-lactic được tạo ra bởi chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* được lên men cùng với các đặc tính mà chủng *Streptococcus thermophilus* có, và lượng sản xuất axit D-lactic trong sữa đậu nành cũng khác biệt đáng kể phụ thuộc vào chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

4. So sánh lượng axit D-lactic sau khi lên men bằng chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* trong vật liệu thấm màng sữa đậu nành tinh khiết

(1) Như đã nêu trên đây, nhận thấy rằng lượng sản xuất axit D-lactic được tạo ra bởi các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thay đổi đáng kể phụ thuộc vào đặc tính của các chủng *Streptococcus thermophilus*. Do đó, để xác nhận sự khác biệt về khả năng chuyển hóa trong vật liệu thấm màng sữa đậu nành của chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được chọn lọc và được nhân giống và các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được phân lập từ chất môi có bán trên thị trường, lượng sản xuất axit D-lactic trong vật liệu thấm màng sữa đậu nành thu được bằng cách bổ sung fructoza làm nguồn đường trước được so sánh với nhau. Vật liệu thấm màng sữa đậu nành thu được bằng cách loại bỏ protein hoặc lipid bị bất hoạt với polyme cao ra khỏi từ sữa đậu nành, và cho rằng

không có khác biệt đáng kể giữa các axit amin tự do trong sữa đậu nành, peptit không hòa tan, hàm lượng đường hoặc chất khoáng hoặc các chất tương tự.

(2) Điều chế vật liệu thấm màng sữa đậu nành tinh khiết

Sữa đậu nành tinh khiết có bán trên thị trường được hút (-60 kPa) bằng bơm chân không sử dụng modul siêu lọc dạng sợi rỗng (mô hình: USP-143 (có sẵn từ Asahi Kasei Corporation)), và màng thấm dịch lỏng được sử dụng làm chất thấm sữa đậu nành tinh khiết. Đối với dịch lỏng này, fructoza được bổ sung vào một cách vô trùng để thu được nồng độ cuối cùng bằng 1,0% (thể tích/thể tích) (vật liệu thấm màng sữa đậu nành tinh khiết). Ngoài ra, axit clohydric được bổ sung vào vật liệu thấm màng sữa đậu nành này, và điều chế được vật liệu thấm màng sữa đậu nành có tính axit được điều chỉnh đến độ pH=5,0.

(3) Phép xác định lượng sản xuất axit D-lactic sau khi nuôi cấy trong vật liệu thấm màng sữa đậu nành

Các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được phân lập từ chất môi hỗn hợp bột mì có bán trên thị trường để làm sữa chua (có sẵn từ Danisco Inc., sản phẩm sấy thăng hoa bao gồm các chủng *Streptococcus thermophilus* được nhân giống và chủng *Lactobacillus bulgaricus*); ba chủng nhân giống của chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (chủng K1581, chủng K1583, chủng K1585); và chủng kiểu đại (chủng ATCC11842) được nuôi cấy lần lượt trong môi trường nuôi cấy MRS. Dịch lỏng vi khuẩn thu được được ly tâm và rửa bằng nước muối vô trùng 0,85% hai lần, viên tròn thu được được tạo huyền phù trong vật liệu thấm màng sữa đậu nành tinh khiết, và chất thấm được sử dụng làm dịch lỏng vi khuẩn chất môi.

Dịch lỏng vi khuẩn được rửa và được vô trùng trong một phản tương ứng của vật liệu thấm màng sữa đậu nành tinh khiết và vật liệu thấm màng sữa đậu nành có

tính axit (độ pH=5,0) được cấy 1,0% và được nuôi cấy ở nhiệt độ 42 độ bách phân và trong thời gian 24 giờ (các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được nuôi cấy riêng), và lượng axit D-lactic của dịch lỏng vi khuẩn sau khi nuôi cấy được xác định (Fig. 5 và Fig. 6).

Trong vật liệu thấm màng sữa đậu nành tinh khiết, so với các chất môi có bán trên thị trường hoặc chủng ATCC11842, lượng sản xuất axit D-lactic được tạo ra bởi các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được nhân giống theo sáng chế có trị số cao. Tương tự, trong vật liệu thấm màng sữa đậu nành có tính axit, so với vật liệu thấm màng sữa đậu nành tinh khiết, quan sát thấy rằng có sự khác biệt đáng kể về lượng sản xuất axit D-lactic giữa các chất môi có bán trên thị trường và các chủng được nhân giống. Trong các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được phân lập từ chất môi có bán trên thị trường, cụ thể là, trong điều kiện có độ pH thấp (độ pH=5,0), nhận thấy rằng lượng sản xuất axit D-lactic là thấp, trong khi các chủng được nhân giống tạo ra lượng axit D-lactic cao gấp ba lần hoặc nhiều hơn trong điều kiện tương tự. Khi lên men đồng thời với các chủng *Streptococcus thermophilus* trong sữa đậu nành, nhận thấy rằng độ pH sớm hạ thấp do sự phát triển của các chủng *thermophilus*, và sau đó, các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sinh trưởng. Trong các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có bán trên thị trường, nhận thấy rằng, trong môi trường như đã nêu trên đây, không có chủng nào sản xuất axit D-lactic vượt quá 0,4 (g/L), và sự phát triển và chuyển hóa bị giới hạn trong môi trường sữa đậu nành. Ngoài kết quả nêu trên, đối với các chủng được nhân giống, ngay cả đối với độ pH thấp và cũng như môi trường sữa đậu nành, khi so sánh với các chủng có bán trên thị trường hoặc chủng ATCC11842, đánh giá rằng sự chuyển hóa tăng lên rất tích cực, và kết quả là, nhận thấy rằng có thể tạo thành sản phẩm lên men từ sữa đậu nành có vị hoặc hương vị axit giống sữa chua.

Bất ngờ, các chủng được phân lập có nguồn gốc từ chất môi có bán trên thị trường bao gồm chủng sản xuất axit D-lactic với lượng là 0,4g/L hoặc nhiều hơn là chủng được chọn lọc trên Fig. 3, như chủng Lb. 505 hoặc chủng Lb. 511, và cũng như trên Fig. 5 và Fig. 6, các chủng này thể hiện sự sản xuất axit F-lactic cao hơn so với các chủng có nguồn gốc từ chất môi có bán trên thị trường bất kỳ khác; và tuy nhiên, không thể thu được lượng sản xuất bằng 0,4 g/L. Nhận thấy rằng điều này là do không có *Streptococcus thermophilus* tồn tại trong các thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 5 và Fig. 6. Mặc dù fructoza được bổ sung làm nguồn đường trong vật liệu thấm màng sữa đậu nành tinh khiết, nhưng xem xét thấy rằng *Streptococcus thermophilus* không chỉ hoạt hóa sự chuyển hóa của *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và tăng cường lượng sản xuất axit D-lactic, mà còn đóng một vai trò khác.

5. Phép xác định lượng đường fructoza còn lại trong dịch lỏng lên men sữa đậu nành thu được bằng cách lên men với chỉ riêng *thermophilus*

Từ chất môi chứa hỗn hợp vi khuẩn axit lactic có bán trên thị trường (có sẵn từ Danisco Inc.), YO-MIX300, 305, 496, 499, 501, 885, chỉ có các chủng *Streptococcus thermophilus* (chủng St. 300, chủng St. 305, chủng St. 496, chủng ST. 499, chủng St. 501, chủng St. 885) được phân lập. Mỗi chủng trong số các chủng đã phân lập được nuôi cấy trong 10 mL môi trường nuôi cấy LM17, và dịch lỏng của môi trường nuôi cấy được ly tâm và rửa bằng dung dịch NaCl 0,9% và được tạo huyền phù lại trong 10 mL dung dịch NaCl 0,9%. Đối với dịch lỏng nguồn lên men sữa đậu nành, sử dụng sữa đậu nành tinh khiết có bán trên thị trường (có sẵn từ Kikkoman Sot Foods Corporation). Trong dịch lỏng nguồn lên men sữa đậu nành này, sữa đậu nành tinh khiết được điều chế như đã nêu trên đây được cấy 1,0% (thể tích/thể tích), và quy trình lên men được tiến hành ở nhiệt độ 42 độ bách phân và trong thời gian 24 giờ. Tiếp theo quy trình lên men, phần nổi trên bề mặt đã ly tâm được thu lại, và lượng đường fructoza còn lại được xác định bằng kit F D-glucosa/fructoza (có sẵn từ JK International Corporation). Kết quả được thể hiện

trên Fig. 7.

Như được thể hiện trên Fig. 7, nhận thấy rằng trong số các chủng *Streptococcus thermophilus*, tồn tại các chủng tích lũy fructoza với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành như chủng St. 496, chủng St. 499, chủng St. 885, và các chủng không tích lũy fructoza.

6. Ảnh hưởng của sự kết hợp các chất môi hỗn hợp vi khuẩn đến lượng axit lactic sản xuất được

Chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic được kết hợp, ở tỷ lệ 1:1, với các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (chủng Lb. 505, chủng Lb. 511, chủng Lb. 863) thu được bằng cách phân lập chủng *Streptococcus thermophilus* (St. 499) đặc trưng bởi sự tích lũy fructoza và chủng (chủng St. 305) không tích lũy fructoza từ chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường YO-MIX505, 511, 863 được ly tâm. Bổ sung chất môi này vào sữa đậu nành tinh khiết có bán trên thị trường (có sẵn từ Kikkoman Soy Foods Corporation), tiến hành lên men ở nhiệt độ 42 độ bách phân và trong thời gian 24 giờ, và thu sản phẩm lên men từ sữa đậu nành. Sau khi hoàn thành quy trình lên men, lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được được xác định bằng phương pháp điện cực enzym (Oji Scientific Instruments, Biosensor BF-5).

Fig. 8 thể hiện kết quả xác định về lượng sản xuất axit D-lactic trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành. Như được thể hiện trên Fig. 8, kết hợp với chủng *Streptococcus thermophilus* tích lũy fructoza, nhận thấy rằng sản xuất được 0,4 g/L axit D-lactic hoặc nhiều hơn, và dù là không có nguyên liệu bổ trợ nào được bổ sung, nhưng mối quan hệ cộng sinh với *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cũng được thiết lập trong sữa đậu nành.

7. Sự thay đổi nồng độ đường trong quy trình lên men sữa đậu nành theo thời gian

Để đảm bảo rằng chủng *Streptococcus thermophilus* và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thiết lập mối quan hệ cộng sinh trong sữa đậu nành, tuyệt đối cần thiết là sucroza, hàm lượng đường chính của sữa đậu nành, được phân hủy bởi chủng *Streptococcus thermophilus* và tiếp đó fructoza được tích lũy để nhờ đó cung cấp nguồn đường cho chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Trong trường hợp này, lượng đường sucroza và fructoza còn lại khi chỉ có chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 được lên men và khi chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* K1581 được lên men đồng thời được xác định theo thời gian. Nhiệt độ lên men được đặt ở 42 độ bách phân. Sự thay đổi của sucroza theo thời gian được thể hiện trên Fig. 9, và sự thay đổi của fructoza theo thời gian được thể hiện trên Fig. 10.

Fig. 11 là đồ thị mô tả sự thay đổi nồng độ fructoza theo thời gian khi sữa đậu nành được lên men đồng thời với chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* K1581 ở nhiệt độ 42°C.

Với điều kiện là chỉ có chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 được lên men, nhận thấy rằng lượng sucroza giảm theo thời gian và tiếp đó sự tích lũy fructoza tăng lên (Fig. 9 và Fig. 10). Mặt khác, khi sữa đậu nành được lên men đồng thời với chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* K1581, nhận thấy rằng một lượng nhỏ fructoza được tích lũy một lần, và sau đó giảm dần (Fig. 11).

Do hai kết quả này, có thể nhận thấy rằng fructoza được chuyển hóa bởi chủng K1581, góp phần tạo ra axit D-lactic hoặc thành phần hương liệu khác. *Streptococcus thermophilus* được chia thành chủng tích lũy tích cực fructoza và chủng không tích lũy fructoza, và bằng cách sử dụng *Streptococcus thermophilus* với đặc tính tích lũy

như vậy trong sản phẩm lên men, cũng như trong sữa đậu nành, mối quan hệ cộng sinh với *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được thiết lập, vị và hương vị có nguồn gốc từ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có thể thu được, và kết quả là, có thể tạo thành sản phẩm lên men từ sữa đậu nành có vị và hương vị ngon.

8. Đánh giá chức năng sử dụng các chủng nhân giống

Chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic được làm từ chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* K1581 là các chủng đã nhân giống được bảo chế, và bằng cách sử dụng chất môi này, tiến hành lên men sữa đậu nành tinh khiết có sẵn từ Kikkoman Soy Foods Corporation ở nhiệt độ 42 độ bách phân và trong thời gian 24 giờ, và thu sản phẩm lên men từ sữa đậu nành. Mặt khác, chỉ bổ sung chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 vào sữa đậu nành tinh khiết, tiến hành lên men ở nhiệt độ 42 độ bách phân và trong thời gian 24 giờ, và thu sản phẩm lên men từ sữa đậu nành. Các trị số phân tích thành phần tương ứng như sau.

Bảng 1

<i>S. thermophilus</i>	<i>L. delbrueckii</i>	Độ pH	Độ axit (%)	Axit D-lactic (g/L)	Axit L-lactic (g/L)
K1580	K1581	4,00	0,993	1,56	7,68
K1580	Không có	4,18	0,829	0	7,8

Tiếp theo, lượng axit D-lactic trong sản phẩm lên men được phối trộn một cách thích hợp bằng cách trộn sản phẩm lên men từ sữa đậu nành và sản phẩm được lên men đồng thời. Tức là, 100% sản phẩm được lên men đồng thời (mẫu 1), 40% sản phẩm được lên men đồng thời (mẫu 2), 30% sản phẩm được lên men đồng thời (mẫu 3), 20% sản phẩm được lên men đồng thời (mẫu 4), 15% sản phẩm được lên men đồng thời (mẫu 5), 10% sản phẩm được lên men đồng thời (mẫu 6), và 100% sản phẩm được lên men riêng rẽ (mẫu 7) được phối trộn, một cách lần lượt. Các trị số

axit D-lactic ước tính và tỷ lệ D/L ước tính của các mẫu tương ứng được thể hiện trong bảng 2.

Ngoài ra, các mẫu tương ứng được nếm, và mối quan hệ giữa lượng axit D-lactic và hương vị của sản phẩm lên men từ sữa đậu nành được đánh giá dựa trên các tiêu chuẩn dưới đây.

(Tiêu chuẩn)

- ◎ : Vị và hương vị rất ngon
- : Vị và hương vị ngon
- △ : Hương vị không ngon lắm
- × : Hương vị không ngon

Kết quả được thể hiện trong bảng 2. Như được thể hiện trong bảng 2, nhận thấy rằng từ mẫu 1 đến mẫu 3, mỗi mẫu đều có vị và hương vị ngon. Do đó, trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành, nhận thấy rằng hương vị được cải thiện bằng cách sử dụng chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tạo ra ít nhất 0,4 g/L axit D-lactic hoặc nhiều hơn. Ngoài ra, rõ ràng rằng không thu được vị và hương vị ngon đơn thuần chỉ bằng sự phát triển tích cực chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mà quan trọng là phải làm cân bằng sự phát triển của chủng *Streptococcus thermophilus*, và tốt hơn nếu tỷ lệ axit D/L lactic là 0,05 hoặc lớn hơn.

Bảng 2

	Lượng axit D-lactic ước tính (g/L)	Tỷ lệ D/L	Đánh giá chức năng
Mẫu 1	1,56 (trị số thực tế được xác định)	0,203	◎
Mẫu 2	0,62	0,081	○
Mẫu 3	0,47	0,061	○
Mẫu 4	0,31	0,04	△

Mẫu 5	0,23	0,03	×
Mẫu 6	0,15	0,019	×
Mẫu 7	0 (trị số thực tế được xác định)	0	×

9. Đánh giá chức năng sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách lên men sử dụng các chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường khác

Bột mì chứa các chất môi hỗn hợp bột mì có bán trên thị trường để làm sữa chua (có sẵn từ Danisco Inc., sản phẩm sấy thăng hoa bao gồm các chủng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus bulgaricus* YO-MIX300, YO-MIX305, YO-MIX511, YO-MIX863 (trong đó tất cả các con số đều chỉ số của sản phẩm) được hòa tan trong nước vô trùng, huyền phù với lượng tương tự được cấy trong sữa đậu nành tinh khiết (có sẵn từ Kikkoman Soy Foods Corporation), quy trình lên men được tiến hành ở nhiệt độ 42 độ bách phân và trong thời gian 24 giờ, và thu được sản phẩm lên men từ sữa đậu nành.

Mặt khác, các chủng *Streptococcus thermophilus* (chủng St. 885, chủng St. 496) có nguồn gốc từ chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường, YO-MIX885, YO-MIX496, được phân lập. Ngoài ra, các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (chủng Lb. 305, chủng Lb. 492, chủng Lb. 601) có nguồn gốc từ chất môi hỗn hợp có bán trên thị trường YO-MIX305, YO-MIX492, YO-MIX601 được phân lập và được bảo quản tương ứng dưới dạng dịch lỏng vi khuẩn dự trữ glyxerol và tiếp đó các dịch lỏng được sử dụng trong thử nghiệm.

Ngoài ra, sử dụng các chủng *Streptococcus thermophilus* K1580 và K1584 và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* K1581 và K1585 để làm các chủng nhân giống.

Chủng *Streptococcus thermophilus* (chủng St.) được điều chế và chủng

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* (chủng Lb.) được trộn tương ứng với nhau ở tỷ lệ bằng 1:1 (như chủng K1580 + chủng K1581 hoặc chủng St. 885 + chủng Lb. 305, chẳng hạn), tiến hành quy trình lên men với 10 mL sữa đậu nành tinh khiết (có sẵn từ Kikkoman Soy Foods Corporation), thu sản phẩm được lên men sơ bộ. Sản phẩm được lên men sơ bộ này với tỷ lệ 1,0% (thể tích/thể tích) được cấy vào sữa đậu nành tinh khiết (có sẵn từ Kikkoman Soy Foods Corporation), tiến hành lên men ở nhiệt độ 42 độ bách phân và trong thời gian 24 giờ, và thu sản phẩm lên men từ sữa đậu nành. Trị số phân tích axit lactic của các sản phẩm lên men từ sữa đậu nành tương ứng được thể hiện dưới đây.

Bảng 3

<i>S. thermophilus</i>	<i>L. delbrueckii</i>	Độ pH	Độ axit (%)	Axit L-lactic (g/L)	Axit D-lactic (g/L)	Tỷ lệ D/L
K1580	K1581	4,00	0,993	7,68	1,56	0,203
K1584	K1585	4,31	0,734	6,28	0,50	0,080
St. 885	Lb. 305	4,27	0,752	6,46	0,75	0,116
St. 885	Lb. 492	4,31	0,735	6,18	0,81	0,131
St. 885	Lb. 601	4,30	0,746	6,08	0,95	0,156
St. 496	Lb. 305	4,56	0,556	4,72	0,68	0,144
St. 496	Lb. 492	4,54	0,563	4,76	0,64	0,134
St. 496	Lb. 601	4,54	0,568	4,76	0,61	0,128
Chất môi có bán trên thị trường		Độ pH	Độ axit (%)	Axit L-lactic (g/L)	Axit D-lactic (g/L)	Tỷ lệ D/L
YO-MIX300		4,37	0,617	5,42	0,00	0
YO-MIX305		4,35	0,639	5,64	0,00	0
YO-MIX511		4,26	0,691	6,28	0,00	0
YO-MIX863		4,25	0,692	6,34	0,04	0,006

Trong các sản phẩm lên men từ sữa đậu nành tương ứng thu được theo cách mô

tả ở đây, bổ sung để thu được nồng độ cuối cùng bằng 6,0% (trọng lượng/thể tích), và tiến hành đánh giá chức năng đối với vị hoặc hương vị. Kết quả là, trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành không chứa axit D-lactic, độ ngọt là đáng kể và thu được kết quả được ưu tiên; và tuy nhiên, trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành bao gồm 0,4 g/L axit D-lactic hoặc nhiều hơn, nhận thấy rằng thu được sự cân bằng giữa độ axit và độ ngọt, và thu được sản phẩm lên men từ sữa đậu nành có vị ngon. Từ phần mô tả trên đây, trong trường hợp đường cũng được bổ sung vào sản phẩm lên men từ sữa đậu nành, nhận thấy rằng sản phẩm lên men từ sữa đậu nành được tạo thành bằng cách sử dụng chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic theo sáng chế (chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic được tạo thành từ các chủng được chọn lọc hoặc được nhân giống) có hương vị hoặc vị tuyệt vời.

10. Phép xác định tính chất vật lý của sản phẩm lên men từ sữa đậu nành

Tính chất vật lý của sản phẩm lên men từ sữa đậu nành được xác định, và tiến hành đánh giá. Để đánh giá tính chất vật lý, sử dụng chỉ số phân bố cỡ hạt là chỉ số biểu thị cỡ hạt và tỷ lệ của các hạt được bao gồm trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành. Bằng cách xác định sự phân bố cỡ hạt, có thể đánh giá được cảm giác trên lưỡi hoặc cảm nhận thấy sự dễ chịu khi đưa sản phẩm lên men vào miệng.

Sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng phương pháp lên men với các chất môi hỗn hợp bột mì có bán trên thị trường để làm sữa chua (có sẵn từ Danisco Inc., sản phẩm sấy thăng hoa bao gồm các chủng *Streptococcus thermophilus* và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) YO-MIX300, YO-MIX305 (trong đó các con số đều chỉ số của sản phẩm); và sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng phương pháp lên men với các chủng được chọn lọc hoặc được nhân giống (chủng K1580 + chủng K1581, St. 496 + Lb. 601, St. 885 + Lb. 305) được khuấy đều và được cho qua thiết bị xác định phân bố cỡ hạt loại nhiễu xạ laze (SALD-2200 (Shimadzu Corporation)), và xác định sự phân bố cỡ hạt.

Kết quả của phép xác định được thể hiện trên Fig. 12. Trong đồ thị, kết quả của phép tích phân cũng được thể hiện cùng với tần suất xuất hiện cỡ hạt theo các ký tự giống nhau đối với các mẫu tương ứng. So với sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách lên men với chất mồi có bán trên thị trường, trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách lên men các chủng được chọn lọc hoặc được nhân giống, nhận thấy rằng tỷ lệ của các hạt có cỡ hạt bằng 100 micromet hoặc lớn hơn trong tổng số hạt là 10% hoặc nhỏ hơn, và sản phẩm lên men từ sữa đậu nành, mỗi sản phẩm đều có cảm giác dễ chịu trên lưỡi. Điều này cho thấy rằng sự chuyển hóa của chủng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ở thời điểm lên men sữa đậu nành được hoạt hóa tương ứng bằng cách nhân giống hoặc chọn lọc, nhờ đó sự sản xuất các polysacarit bởi các vi khuẩn axit lactic này cũng trở nên tích cực, và kết quả là, cảm giác khó chịu do sự ngưng tụ quá mức của protein đậu nành được ngăn chặn và tính chất vật lý được cải thiện.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Sản phẩm lên men từ sữa đậu nành thu được bằng cách sử dụng chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic mà không bổ sung nguồn đường và có tỷ lệ axit D/L lactic là 0,05 hoặc lớn hơn, chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic nêu trên chứa:

Streptococcus thermophilus có khả năng tích lũy fructoza với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành khi được cấy và nuôi cấy trong sữa đậu nành một cách riêng lẻ; và

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* có khả năng tích lũy axit D-lactic với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành khi được cấy và nuôi cấy với *Streptococcus thermophilus* nêu trên trong sữa đậu nành, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* loại trừ các chủng mà có thể phát triển độc lập trong sữa đậu nành,

trong đó, *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được cấy và nhân giống đồng thời trong môi trường nuôi cấy chứa sữa đậu nành làm thành phần chính.

2. Sản phẩm lên men từ sữa đậu nành theo điểm 1, trong đó, trong phân bố cỡ hạt của sản phẩm lên men từ sữa đậu nành, tỷ lệ của các hạt có cỡ hạt là 100 micromet trong tổng số hạt bằng 10% hoặc nhỏ hơn.

3. Chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic chứa:

Streptococcus thermophilus có khả năng tích lũy fructoza với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành khi được cấy và nuôi cấy trong sữa đậu nành một cách riêng lẻ; và

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* có khả năng tích lũy axit D-lactic với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men từ sữa đậu nành khi được cấy và nuôi cấy với *Streptococcus thermophilus* nêu trên trong sữa đậu

nành, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* loại trừ các chủng mà có thể phát triển độc lập trong sữa đậu nành,

trong đó *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được cấy và nhân giống đồng thời trong môi trường nuôi cấy chứa sữa đậu nành làm thành phần chính.

4. Phương pháp sản xuất sản phẩm lên men từ sữa đậu nành, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) chọn *Streptococcus thermophilus* có khả năng tích lũy fructoza với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men khi được cấy và nuôi cấy trong môi trường chứa sữa đậu nành làm thành phần chính;

(b) cấy và nuôi cấy *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* với chủng được chọn trong bước (a) đồng thời vào môi trường chứa sữa đậu nành làm thành phần chính, và chọn *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mà có khả năng tích lũy axit D-lactic với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men;

(c) cấy hỗn hợp các chủng trong bước (a) và bước (b) vào sữa đậu nành mà không bổ sung nguồn đường; và

(d) lên men để thu sản phẩm lên men từ sữa đậu nành có axit D-lactic với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn.

5. Phương pháp sản xuất sản phẩm lên men từ sữa đậu nành theo điểm 4, trong đó bước (a) được tiến hành ở nhiệt độ từ 37 đến 45 độ bách phân trong thời gian từ 12 đến 24 giờ.

6. Phương pháp sản xuất sản phẩm lên men từ sữa đậu nành theo điểm 4, trong đó bước (b) được tiến hành ở nhiệt độ từ 30 đến 45 độ bách phân trong thời gian từ 4 đến 24 giờ.

7. Phương pháp sản xuất sản phẩm lên men từ sữa đậu nành theo điểm 4, trong đó bước nuôi cấy trong bước (a) và/hoặc bước (b) được tiến hành trong bước cấy chuyển.

8. Phương pháp tạo ra chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) chọn *Streptococcus thermophilus* có khả năng tích lũy fructoza với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men khi được cấy và nuôi cấy trong môi trường chứa sữa đậu nành làm thành phần chính; và

(b) cấy và nuôi cấy *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* với chủng được chọn trong bước (a) đồng thời vào môi trường chứa sữa đậu nành làm thành phần chính, và chọn *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mà có khả năng tích lũy axit D-lactic với lượng là 0,4 g/L hoặc nhiều hơn trong sản phẩm lên men.

9. Phương pháp tạo ra chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic theo điểm 8, trong đó bước (a) được tiến hành ở nhiệt độ từ 37 đến 45 độ bách phân trong thời gian từ 12 đến 24 giờ.

10. Phương pháp tạo ra chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic theo điểm 8, trong đó bước (b) được tiến hành ở nhiệt độ từ 30 đến 45 độ bách phân trong thời gian từ 4 đến 24 giờ.

11. Phương pháp tạo ra chất môi hỗn hợp vi khuẩn axit lactic theo điểm 8, trong đó bước nuôi cấy trong bước (a) và/hoặc bước (b) được tiến hành trong bước cấy chuyển.

FIG. 1

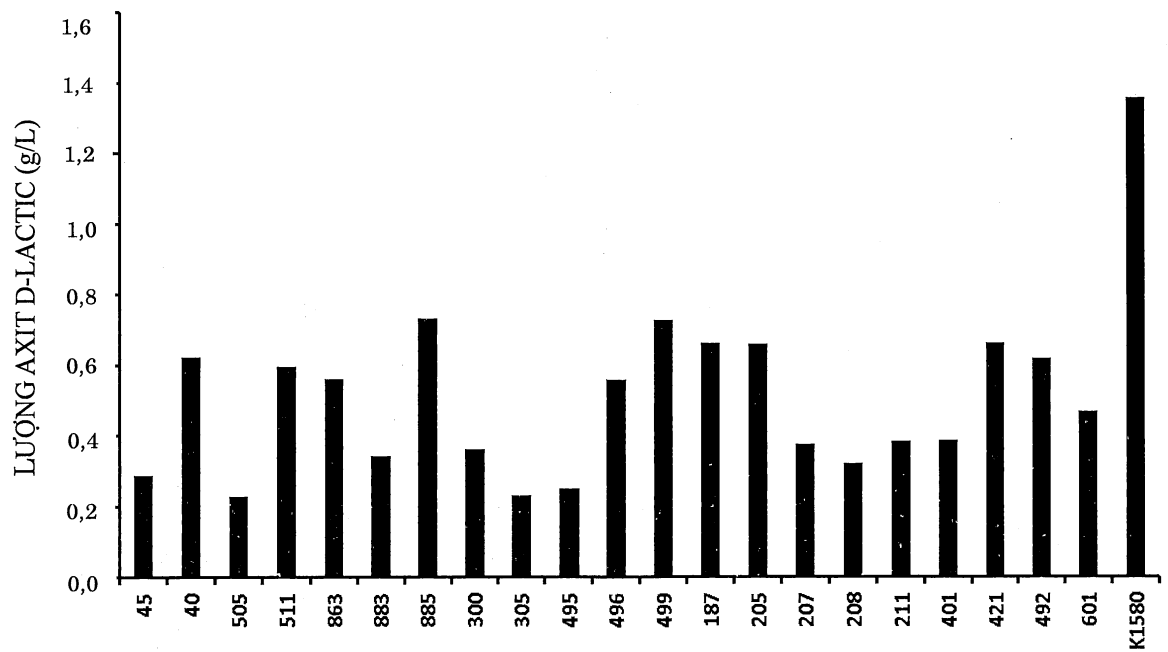


FIG. 2

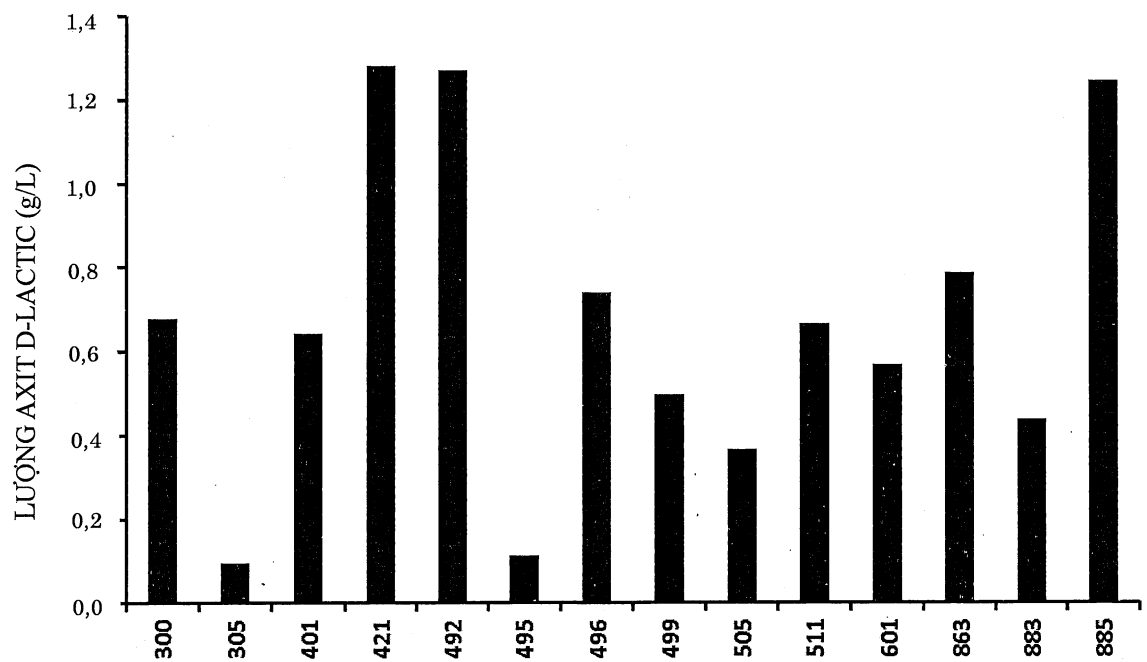


FIG. 3

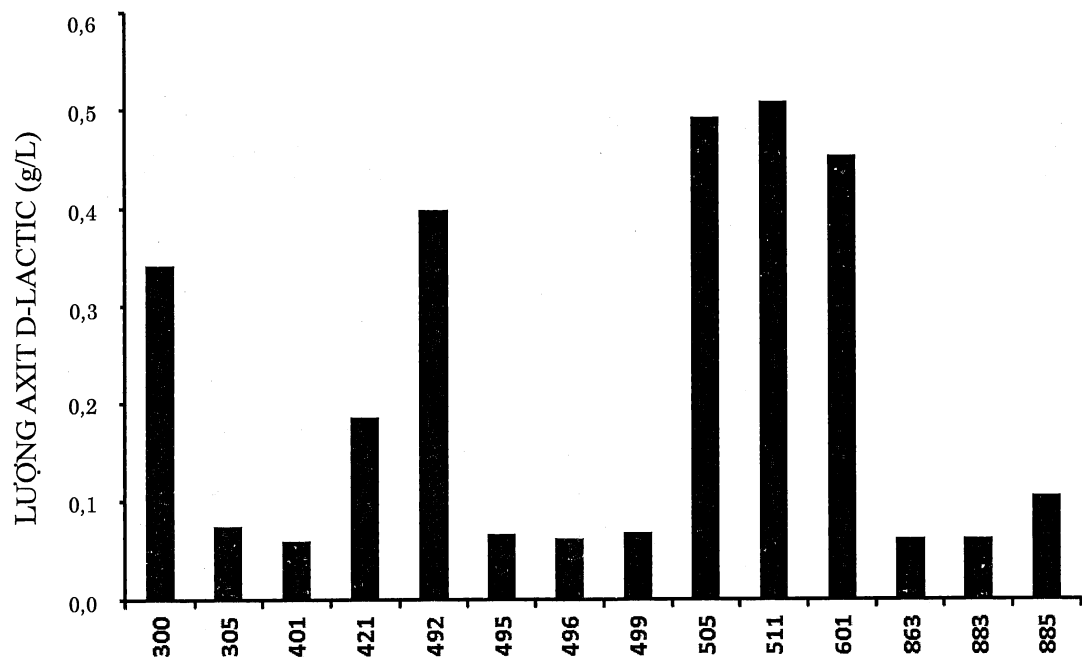


FIG. 4

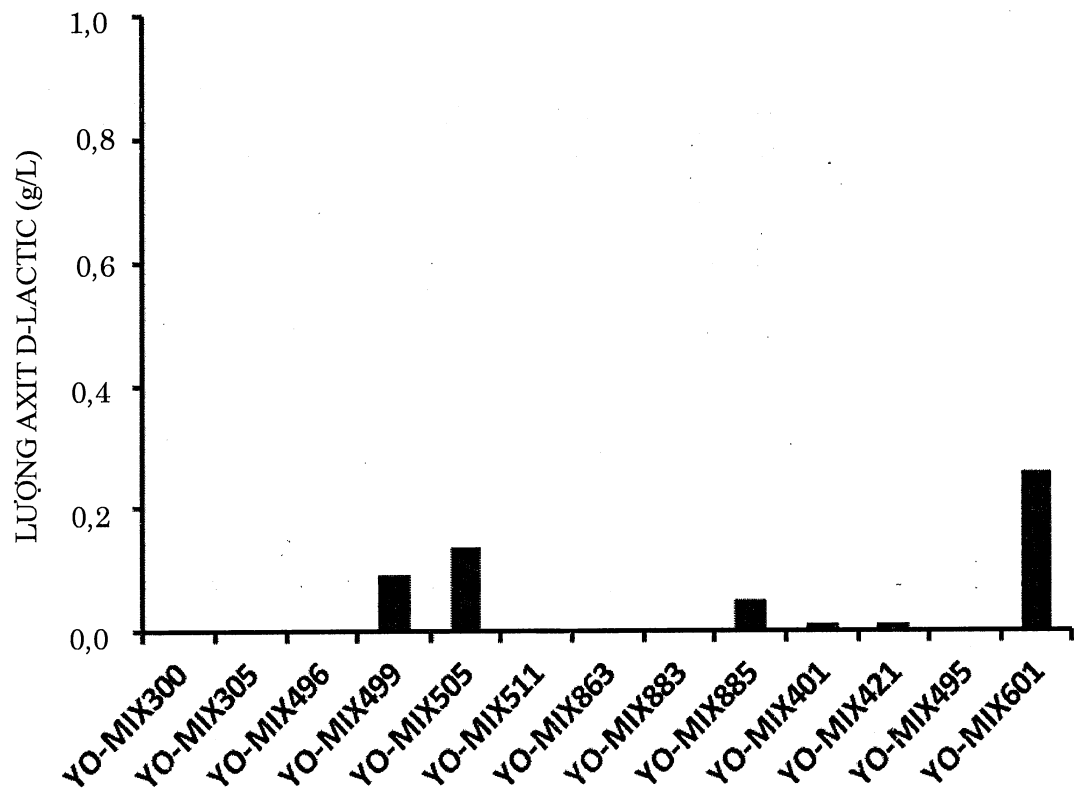


FIG. 5

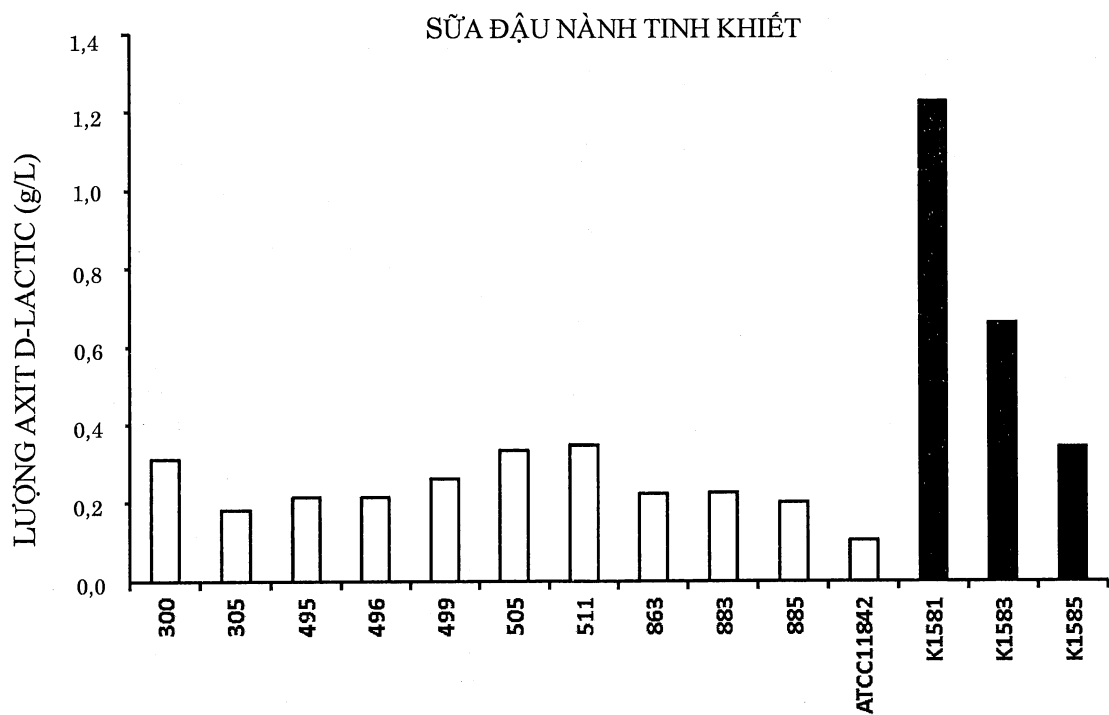


FIG. 6

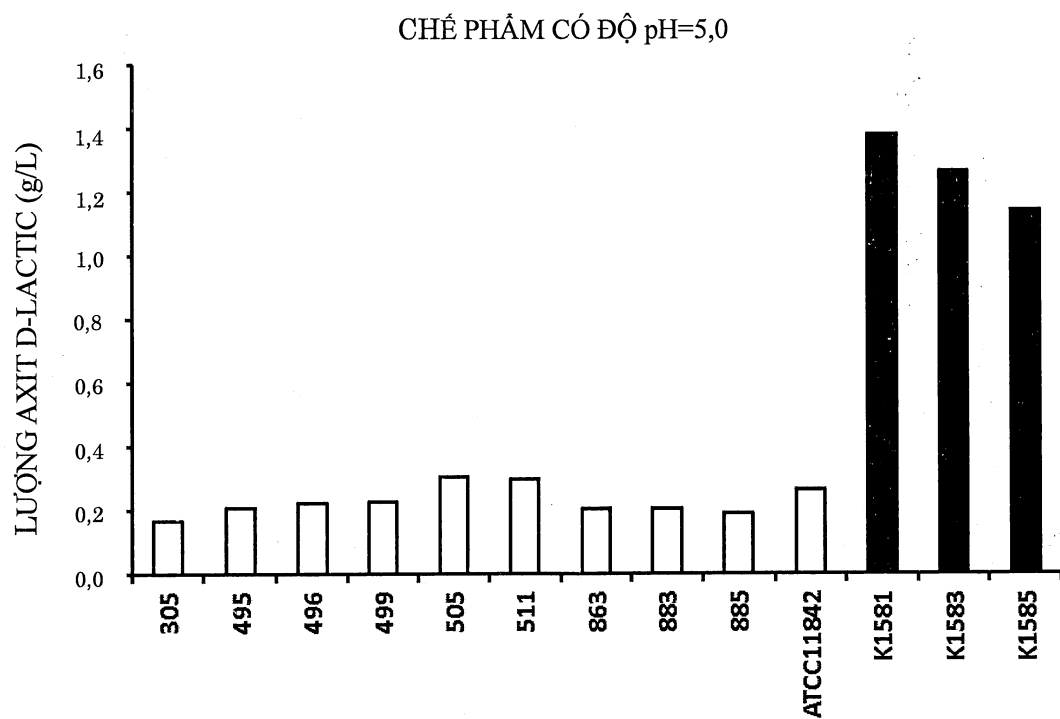


FIG. 7

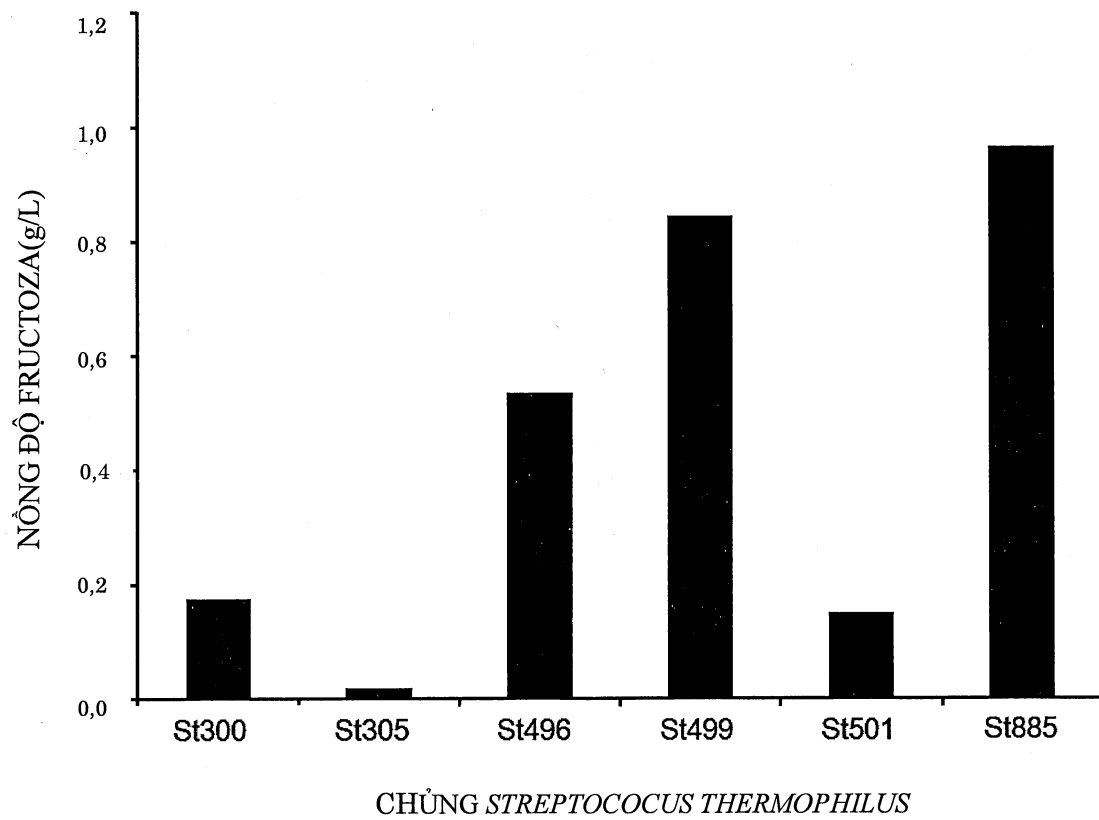


FIG. 8

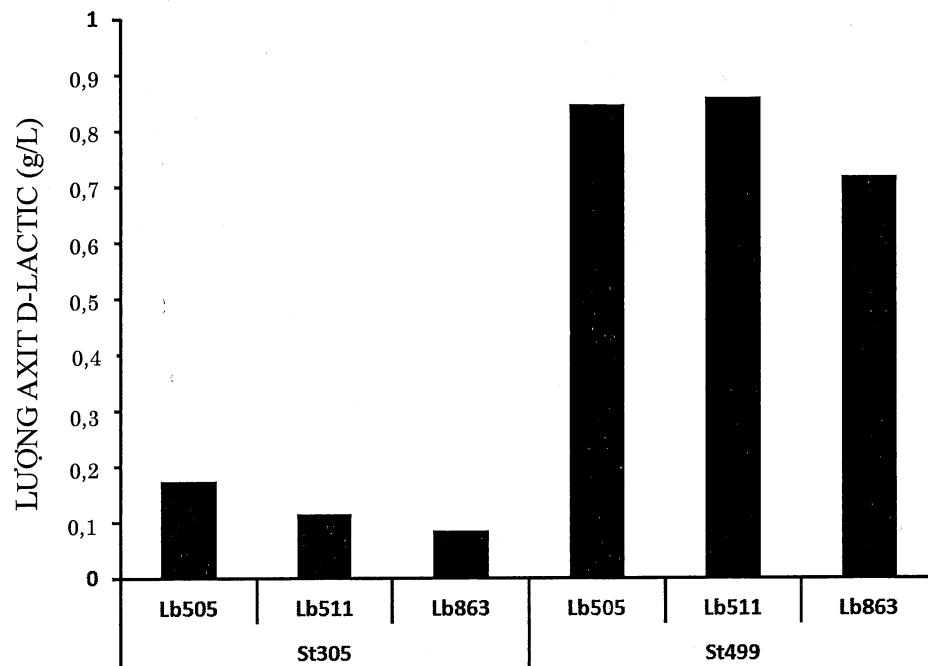


FIG. 9

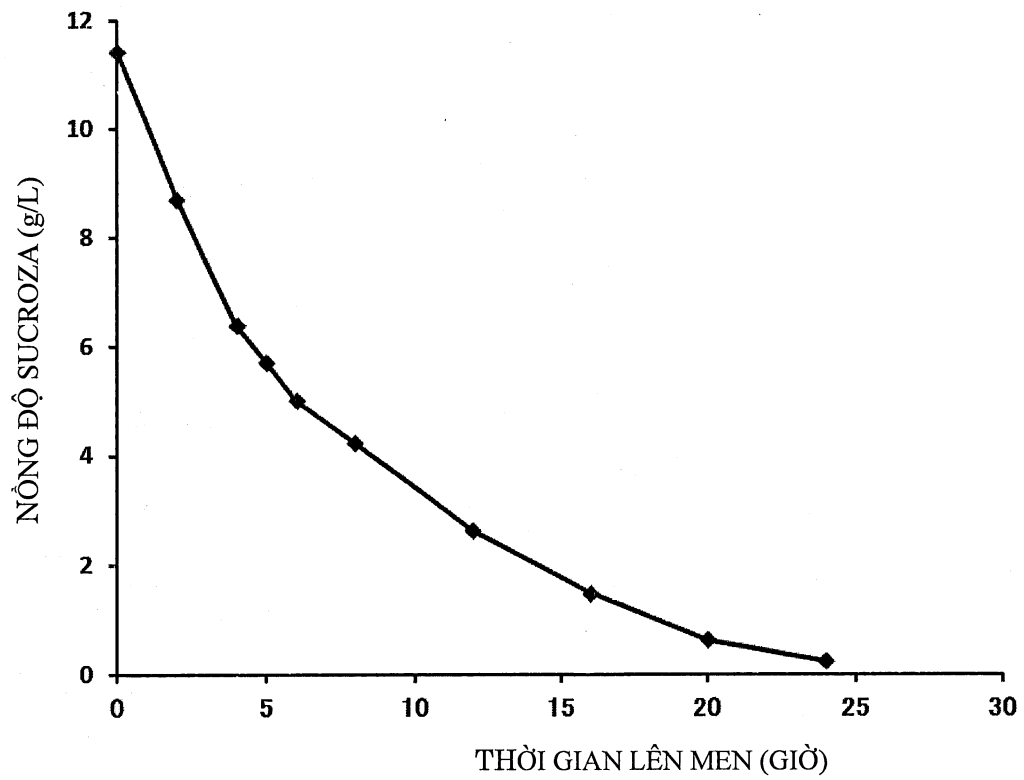


FIG. 10

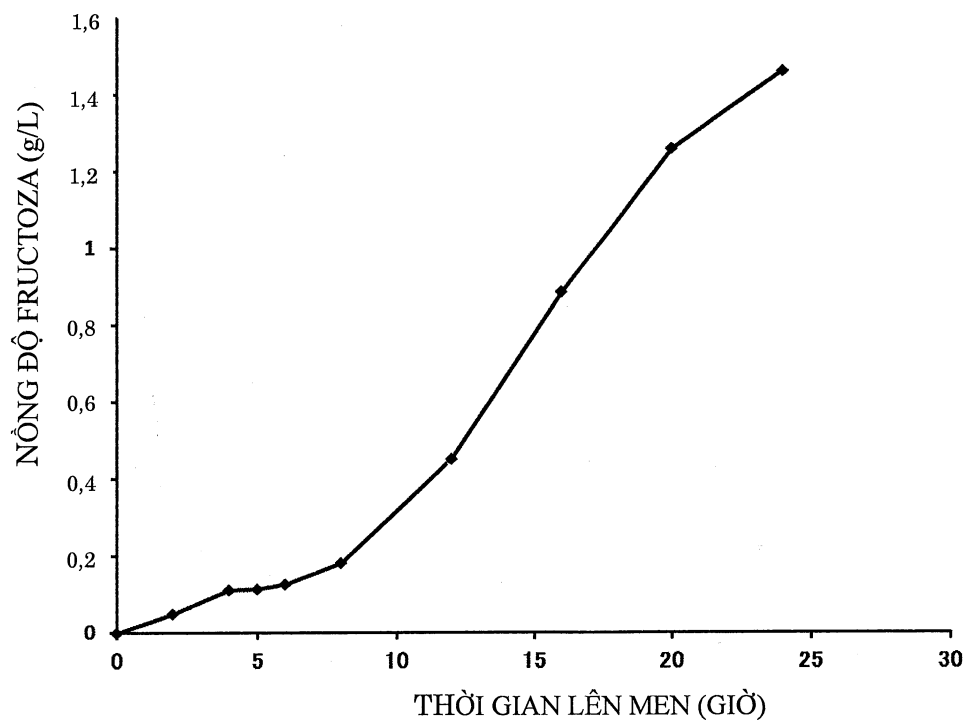


FIG. 11

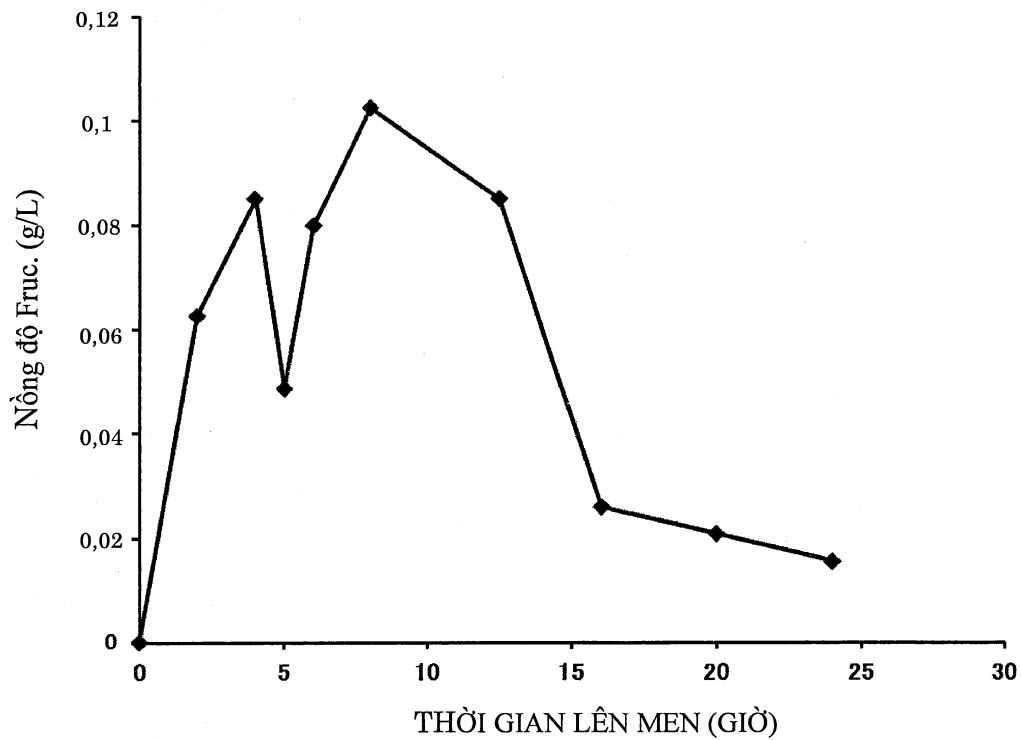


FIG. 12

