



(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)



1-0033053

(51)⁷ C12N 1/20; C12R 1/225; A61K 35/74

(13) B

(21) 1-2016-00524

(22) 21/07/2014

(86) PCT/KR2014/006611 21/07/2014

(87) WO 2015/012552 A1 29/01/2015

(30) 10-2013-0086153 22/07/2013 KR

(45) 25/08/2022 413

(43) 27/06/2016 339A

(73) PL BIO CO., LTD. (KR)

22, Jowonjungang-ro Gwanak-gu, Seoul 151-877, Republic of Korea.

(72) LEE, Yeonhee (KR); PARK, Jong-Su (KR); PAEK, Kyungsoo (KR); AHN, Ki-Hyun (KR); SHIN, Eunju (KR); HONG, Hyunjin (KR); LEE, Hak Mi (KR); LEE, Minyoung (KR); SHIN, Hyun-Jung (KR); CHO, Young-Hoon (KR).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ VIPATCO (VIPATCO CO., LTD.)

(54) CHỨNG VI KHUẨN LACTOBACILLUS FERMENTUM PL9988, CHẾ PHẨM PROBIOTIC VÀ THỰC PHẨM BỔ DƯỠNG BAO GỒM CHỨNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn mới, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* và việc sử dụng chủng mới này. Cụ thể, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9988, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9037, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9038, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9039 và chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9040, được phân lập từ những người trưởng thành ở làng sống thọ và môi trường nuôi cấy: không có khả năng truyền tính kháng kháng sinh, kháng axit và kháng dịch mật, ức chế các sinh vật gây bệnh có hại trong ruột và có tác dụng tăng cường khả năng miễn dịch, có tác dụng ngăn chặn sốc nội độc tố và có tác dụng chống oxy hóa. Đặc biệt chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 thỏa mãn đáng kể tất cả các điều kiện nhắc đến ở trên như là một chế phẩm probiotic, như vậy có thể sử dụng một cách hiệu quả chế phẩm probiotic để cải thiện và nâng cao sức khỏe đường ruột hoặc là một dạng thực phẩm bổ dưỡng.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988

Tên : Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*

Chủng: CECT562 (AJ575812)

Trạng thái: Dạng điển hình

Cấp đối-tương tự: 99,42%

```
Query 48 ACAATGCAAGT CGAACGCGTT GGCCCAATTGATTG CAGT GCTTGCACTGAT TGA TTT G 106
Sub ct 5 ACAATGCAAGT CGAACGCGTT GGCCCAATTGATTG TGGT GCTTGCACTGAT TGA TTT G 84

Query 100 GTCCGCAAGCAAT GGGGCAAGCGGT GAGTAACACG AGGTAACTGGCCAGAAAGGGGGA 106
Sub ct 65 GTCCGCAAGCAAT GGGGCAAGCGGT GAGTAACACG AGGTAACTGGCCAGAAAGGGGGA 104

Query 166 GACAT TTGGAAACAGT TGGTAATACCGCA TAACG GCGT TGT TGGAT GACACGCTTA 225
Sub ct 125 GACAT TTGGAAACAGT TGGTAATACCGCA TAACG AGGT TGT TGGAT GACACGCTTA 184

Query 220 AAA GAT GCGT TCT GCGT ATCAGCTT CT GGA TGGAC TGGCGT GCA TTAGCT TGT TGGT 285
Sub ct 165 AAA GAT GCGT TCT GCGT ATCAGCTT CT GGA TGGAC TGGCGT GCA TTAGCT TGT TGGT 244

Query 285 GTACG GCGT ACGAAGCGA TGA TGA TAGCGGAT TGAAGACT GAT CGCGCAAT G 345
Sub ct 245 GTACG GCGT ACGAAGCGA TGA TGA TAGCGGAT TGAAGACT GAT CGCGCAAT G 304

Query 345 GACTGA GAC GCGCGC TACT GCT ACGGAGCGGAGT AGGGAATCT TCGAAT GCGC 405
Sub ct 305 GACTGA GAC GCGCGC TACT GCT ACGGAGCGGAGT AGGGAATCT TCGAAT GCGC 364

Query 405 GCAAGCGTGA TGGAGCAAC CGCGGTGAGTGAAG AGCGTTT CGGCT CGAAGCT CT GT 465
Sub ct 365 GCAAGCGTGA TGGAGCAAC CGCGGTGAGTGAAG AGCGTTT CGGCT CGAAGCT CT GT 424

Query 465 TGT TAAAGAA GAA CAGTAT GAGAT AACTGTTT TACGT TGAAGGTA TTTAAGCA GAA 525
Sub ct 425 TGT TAAAGAA GAA CAGTAT GAGAT AACTGTTT TACGT TGAAGGTA TTTAAGCA GAA 484

Query 525 GTACG GCTA ACT AGGT GCGAAGCGCGCGTAA T AGGTAGGAA GCGT TATCGGA 585
Sub ct 485 GTACG GCTA ACT AGGT GCGAAGCGCGCGTAA T AGGTAGGAA GCGT TATCGGA 544

Query 585 TTTAT TGGGCTGAAGAGAGT GCGAGCGT TTTCTAG TC TGAAT TGAAGCGCTTCGCGT 645
Sub ct 545 TTTAT TGGGCTGAAGAGAGT GCGAGCGT TTTCTAG TC TGAAT TGAAGCGCTTCGCGT 604

Query 645 TAAAGGAGAGT GCGT GCGAAGCTGAGTAACTT TGAAGTGAAG AGGCT AGTGAAGCTC 705
Sub ct 605 TAAAGGAGAGT GCGT GCGAAGCTGAGTAACTT TGAAGTGAAG AGGCT AGTGAAGCTC 664

Query 705 CATGTGTAGC GGTGGAA TGGTGAATA TATGGAAGAACCAAGT GCGAAGCGCGTACG 765
Sub ct 665 CATGTGTAGC GGTGGAA TGGTGAATA TATGGAAGAACCAAGT GCGAAGCGCGTACG 724

Query 765 TGGTCTGCA CTGACGCTGAGACTGGAAGCATG TGAAGCA GAA TTAGTACCGT 825
Sub ct 725 TGGTCTGCA CTGACGCTGAGACTGGAAGCATG TGAAGCA GAA TTAGTACCGT 784

Query 825 GTAGTCCATG CGTAAAGGATGAGTAC TGGTGTGGAAGGT TTC GCGCTTCACTGCG 885
Sub ct 785 GTAGTCCATG CGTAAAGGATGAGTAC TGGTGTGGAAGGT TTC GCGCTTCACTGCG 844

Query 885 GAGCTAAGCT ATTAAAGCT CGCGCTGCGGAGTACGAGG TGAAGCTGAAGGA 945
Sub ct 845 GAGCTAAGCT ATTAAAGCT CGCGCTGCGGAGTACGAGG TGAAGCTGAAGGA 904

Query 945 ATTGACGCGG GCGCGCAAGCGGTGAGCAATGTGTAT TGAAT TGAAGCTACGGAAGAA 1005
Sub ct 905 ATTGACGCGG GCGCGCAAGCGGTGAGCAATGTGTAT TGAAT TGAAGCTACGGAAGAA 964

Query 1005 CCTTACGAG TCT TGAATCT TGGCGCAAGCTGAGAGTAAGGCG TTTCTTGGGAGC 1065
Sub ct 965 CCTTACGAG TCT TGAATCT TGGCGCAAGCTGAGAGTAAGGCG TTTCTTGGGAGC 1024

Query 1065 GATGACAG TGGT 1079
Sub ct 1025 GATGACAG TGGT 1039
```

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* mới (vi khuẩn lên men từ sữa) được phân lập từ người trưởng thành trong làng trường thọ mà có khả năng tăng cường và hỗ trợ tiêu hóa và việc sử dụng chế phẩm probiotic (vi khuẩn có lợi) của chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Từ rất lâu, con người biết rằng có mối liên hệ giữa thực phẩm mà con người dùng để ăn và bồi bổ sức khỏe là rất quan trọng. Thực tế đã được biết là các vi sinh vật đường ruột có những biến đổi phụ thuộc vào loại thực phẩm mà con người sử dụng. Theo kết quả nghiên cứu cho thấy rằng các vi sinh vật đường ruột có liên quan rất nhiều đến sức khỏe và bệnh tật của con người, qua đó xác định mức độ miễn dịch (Round JL, Mazmanian SK, 2009, The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9, 313-323) và sự béo phì (Turnbaugh PJ, et. al., 2006. The obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031), được biết đến là vi sinh vật đường ruột của từng cá nhân có ảnh hưởng nhiều nhất đối với cơ thể của từng người.

Loại vi khuẩn axit lactic nào có trong mỗi người được xác định bởi vi khuẩn axit lactic mà được đưa vào trong cơ thể vài tháng đầu sau khi được sinh ra. Sau đó, do vi khuẩn axit lactic trong cơ thể không được duy trì liên tục trong đường ruột, nên vi khuẩn đường ruột được xác định bởi vi khuẩn axit lactic mà được lấy từ thực phẩm. Ví dụ, chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* thường có ở những người phương Tây là những người tiêu thụ rất nhiều sữa và sản phẩm từ sữa thì lại không tìm thấy ở người phương Đông. Ngược lại, chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* mà thường thấy có ở người phương Đông lại rất hiếm khi thấy ở người phương Tây. Hai vi khuẩn axit lactic nói trên được tìm thấy nhiều trong các sản phẩm từ sữa ở các nước phương Tây và thực phẩm lên men ở các nước phương Đông.

Hầu hết các vi khuẩn axit lactic có mặt trên thị trường thực phẩm Hàn Quốc là vi khuẩn axit lactic mà có nguồn gốc phân lập từ người phương Tây hoặc từ thực phẩm của họ, là chủng mà hiếm khi tìm thấy trong ruột của những người Hàn Quốc. Do đó các vi khuẩn axit lactic điển hình của người Hàn Quốc được phát triển từ những người trưởng thành sống lâu nổi tiếng ở Hàn Quốc và có hoạt động đường ruột khỏe mạnh (đi đại tiện đều đặn). Các chức năng khác nhau như lợi khuẩn (probiotic) của vi khuẩn axit lactic này là đặc trưng nhất. Cụ thể là vi khuẩn axit lactic mới có thể

hỗ trợ di chuyển trong ruột khỏe mạnh mà không truyền lại khả năng kháng thuốc kháng sinh mà được phát triển và sử dụng như một probiotic hiệu quả trên toàn cầu.

Probiotic được định nghĩa là chủng đơn hoặc chủng kết hợp của vi sinh vật còn tồn tại và có tác dụng với số đông bằng cách cải thiện đặc tính của vi sinh vật đường ruột khi một lượng thích hợp probiotic được lấy, nói chung là được định nghĩa như là một dạng vi sinh vật có trong thực phẩm, thức ăn hoặc phụ gia ăn kiêng, (Salminen SJ, Gueimonde M, Isolauri E.2005. Probiotic làm thay đổi nguy cơ mắc bệnh. J Nutr. 135:1294-1298) để nâng cao sức khỏe cho con người hoặc động vật.

Vi khuẩn axit lactic-probiotic được phân loại thành *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* và *Bifidobacterium* và được biết đến để thực hiện các vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn bị nhiễm vi sinh vật trong đường ruột và cơ quan sinh dục, duy trì sức khỏe của đường ruột, làm giảm bị táo bón, ngăn chặn phát triển vi khuẩn có hại, có hiệu quả chống ung thư, tăng cường khả năng miễn dịch, giảm cholesterol, sản sinh ra CLA (axit Lionelic liên hợp) và ức chế vi khuẩn *Helicobacter pylori*, v.v. có nghĩa là đóng một vai trò quan trọng trong việc nâng cao sức khỏe của con người.

Các probiotic tốt phải có các đặc tính sau đây: an toàn, chịu được axit và dịch mật, có khả năng bám vào biểu mô ruột, ức chế vi khuẩn gây bệnh, tăng cường khả năng miễn dịch và chỉ kháng kháng sinh nội tại mà không bị chuyển đổi.

Vi khuẩn nói chung có khả năng kháng lại thuốc kháng sinh theo hai cách. Thứ nhất, đó là khả năng kháng nội mà không bị truyền lại, cụ thể là chống lại khả năng sinh sản. Ví dụ, nhiều vi khuẩn axit lactic có khả năng chống lại vancomycin (kháng sinh có nguồn gốc streptomyces) do cấu trúc đặc trưng và độ dày vách tế bào. Khả năng kháng nội này không bị truyền lại và gen nội tại không bị truyền qua vi khuẩn khác. Thứ hai, là kháng ngoại, khả năng kháng ngoại này chính là khả năng kháng lại có được từ gen kháng kết hợp với plasmid hoặc transposon và có thể đi vào vi khuẩn khác. Trong trường hợp này, gen của vi khuẩn kháng lại thuốc kháng sinh như vậy dễ dàng truyền khả năng kháng lại thuốc kháng sinh sang vi khuẩn khác.

Trước đây người ta tin rằng vi khuẩn axit lactic có khả năng kháng mạnh là loại tốt. Do vậy vi khuẩn axit lactic kháng lại thuốc kháng sinh sống sót được sau khi điều trị bằng nhiều loại kháng sinh khác nhau được cho là loại tốt. Tuy nhiên, nhiều nhà nghiên cứu đã báo cáo rằng các gen kháng lại thuốc kháng sinh của vi khuẩn axit lactic đối với các loại thuốc kháng sinh khác nhau có thể được truyền sang vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh, như vậy gây ra vấn đề về việc kháng lại thuốc kháng sinh. Để ngăn chặn việc này, các nước phương Tây đã ngăn cấm sử dụng vi khuẩn axit lactic có vấn đề đối với khả năng kháng lại thuốc kháng sinh trong thương mại hóa, nếu vi khuẩn axit lactic kháng lại thuốc kháng sinh có khả năng chuyển đổi gen.

Trong trường hợp của Hàn Quốc, một quy định về việc truyền khả năng kháng lại thuốc kháng sinh gần đây được bổ sung vào tiêu chí xác định nguyên liệu thực phẩm của vi sinh vật bởi Bộ quản lý an toàn thuốc và thực phẩm Hàn Quốc. Quy định này đã được áp dụng như là một tiêu chí xác định nguyên liệu thực phẩm của vi sinh vật.

Nghiên cứu trên việc phân bố vi sinh vật đường ruột ở những người sống trong các nông trại trường thọ khỏe mạnh hoặc ở những thành phố với độ tuổi trên 40 đã được thực hiện. Kết quả cho thấy có sự khác nhau giữa những người sống ở thành phố và những người sống ở nông trại trường thọ liên quan đến việc phân bố vi khuẩn có lợi, ví dụ như vi khuẩn *Lactobacillus*, *Lactococcus*, v.v. mà có ích đối với sức khỏe là 0,56% : 1,355% đối với tất cả các vi khuẩn trong ruột và đối với vi khuẩn *Lactococcus* là 0,02% : 0,1%, điều đó có nghĩa là so sánh với những người sống ở thành phố, thì những người sống ở nông trại trường thọ cao hơn từ 3 đến 5 lần. Không có vi khuẩn axit lactic nào là không được biết đến, chúng có thể thỏa mãn tất cả các đặc tính quan trọng như không có khả năng truyền gen kháng lại thuốc kháng sinh, kháng lại axit và dịch mật mà cần thiết đối với probiotic, bám chặt vào biểu mô đường ruột, ức chế hoạt hóa đối với vi khuẩn gây bệnh, hoạt tính chống oxy hóa và có hiệu quả tăng cường khả năng miễn dịch.

Các tác giả của sáng chế này đã cố gắng thực hiện nghiên cứu để tìm ra một loại vi khuẩn axit lactic an toàn mà không có khả năng truyền lại gen kháng thuốc kháng sinh. Kết quả của nghiên cứu nói trên đã tìm ra một chủng *Lactobacillus fermentum* mới được phân lập từ những người trưởng thành sống ở các làng trường thọ ở Hàn Quốc. Chủng vi khuẩn nói trên và môi trường nuôi cấy chủng này có khả năng bám chặt vào tế bào ruột, chống được axit và dịch mật, không có bất kỳ khả năng kháng ngoại nào đối với thuốc kháng sinh. Có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh có hại cho đường ruột, có hiệu quả nâng cao sức đề kháng, có hiệu quả ức chế sốc chống độc và có hiệu quả chống oxy hóa. Cụ thể là, do chủng *Lactobacillus fermentum* PL9988 mới thỏa mãn đầy đủ tất cả các điều kiện như các probiotic, xác nhận rằng chủng *Lactobacillus fermentum* PL9988 mới này hoặc môi trường nuôi cấy chủng này được sử dụng như là sản phẩm probiotic hoặc thực phẩm tăng cường sức khỏe để nâng cao và hỗ trợ tiêu hóa, qua đó hoàn thiện được sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục tiêu của sáng chế này là cung cấp một chủng *Lactobacillus fermentum* mới được phân lập từ những người trưởng thành sống ở khu vực có tuổi thọ cao và có hoạt động đường ruột đều đặn (đi đại tiện đều đặn).

Mục tiêu khác của sáng chế là cung cấp sản phẩm (chế phẩm) probiotic (thành phần vi khuẩn có lợi) và thực phẩm bổ dưỡng để tăng khả năng miễn dịch và đẩy

mạnh tiêu thụ các hoạt tính của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* hoặc môi trường nuôi cấy chứa chủng này.

Để đạt được các mục tiêu nói trên, ở đây sáng chế đề cập đến một chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* mới.

Để đạt được các mục đích trên, ở đây đề cập đến chế phẩm probiotic mà bao gồm bất kỳ một trong các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 mà được lưu giữ với số hiệu lưu giữ KCTC12624BP, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039, chủng *Lactobacillus fermentum* PL9040 và môi trường nuôi cấy chứa các chủng này.

Để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề cập đến thực phẩm bổ dưỡng có chứa một trong các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 mà được lưu giữ với số hiệu lưu giữ KCTC12624BP, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9040 và môi trường nuôi cấy chứa các chủng này.

Để đạt được các mục tiêu nói trên, ở đây cung cấp cách sử dụng một trong các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 mà được lưu giữ với số hiệu lưu giữ KCTC12624BP, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9040 và môi trường nuôi cấy chứa các chủng này được đóng hộp để sử dụng như là chế phẩm probiotic.

Để đạt được các mục tiêu nói trên, sáng chế đề cập đến cách sử dụng một trong các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 mà được lưu giữ với số hiệu lưu giữ KCTC12624BP, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9040 và môi trường nuôi cấy chứa các chủng này được đóng hộp như là thực phẩm bổ dưỡng.

Ưu điểm của sáng chế này là, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9040 và môi trường nuôi cấy chứa các chủng này theo sáng chế có khả năng bám chặt vào tế bào đường ruột tốt, có khả năng chống lại axit tốt, có khả năng chống lại dịch mật tốt và không có bất kỳ nguy hại nào trong việc truyền lại gen kháng thuốc kháng sinh và có khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh có hại trong ruột và có hiệu quả nâng cao sức đề kháng, ức chế sốc chống độc và chống oxy hóa. Cụ thể, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*

PL9988 có thể thỏa mãn đầy đủ các điều kiện nêu trên như probiotic, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được sử dụng có ích như probiotic hoặc thực phẩm bổ dưỡng mà có thể tăng cường tiêu hóa và nâng cao tình trạng sức khỏe đường ruột.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình vẽ thể hiện mối quan hệ giữa trình tự bazơ 16S rARN của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và chủng vi khuẩn chuẩn CECT562 (*Lactobacillus fermentum* CECT562) của *Lactobacillus fermentum*.

Hình 2 là hình vẽ thể hiện mối quan hệ giữa trình tự bazơ 16S rARN của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037 và chủng vi khuẩn chuẩn CECT562 của *Lactobacillus fermentum*.

Hình 3 là hình vẽ thể hiện mối quan hệ giữa trình tự bazơ 16S rARN của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038 và chủng vi khuẩn chuẩn CECT562 của *Lactobacillus fermentum*.

Hình 4 là hình vẽ thể hiện mối quan hệ giữa trình tự bazơ 16S rARN của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039 và chủng vi khuẩn chuẩn CECT562 của *Lactobacillus fermentum*.

Hình 5 là hình vẽ thể hiện mối quan hệ giữa trình tự bazơ 16S rARN của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9040 và chủng vi khuẩn chuẩn CECT562 của *Lactobacillus fermentum*.

Hình 6 là hình vẽ thể hiện mô hình quan sát được của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988.

Hình 7 là hình vẽ thể hiện kích thước vùng bị ức chế liên quan tới vi khuẩn gây hại của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988.

Hình 8 là hình vẽ thể hiện chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 bám vào các tế bào đường ruột.

Hình 9 là hình vẽ thể hiện hiệu quả được xác nhận trong việc tăng cường khả năng miễn dịch của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 cùng với các tế bào miễn dịch được điều trị bằng *Lipopolysaccharide* (LPS).

Hình 10 là hình vẽ thể hiện khả năng chống oxy hóa của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết như dưới đây.

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* mới.

Chủng vi khuẩn theo sáng chế này là chủng bất kỳ trong số chủng *Lactobacillus fermentum* PL9988 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 1 và được lưu giữ với số hiệu lưu giữ KCTC12624BP, chủng vi khuẩn

Lactobacillus fermentum PL9037 mới có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 2, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038 có trình tự bazơ 16A rARN được đánh dấu là trình tự số 3, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 4 và chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9040 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 5.

Theo phương án đặc trưng của sáng chế, chủng vi khuẩn được phân lập từ mẫu phân của những người trưởng thành khỏe mạnh mà sống trường thọ có bài tiết thường xuyên và được nhận diện, và chủng này được xác nhận là chủng mới cho biết đến 99,42% tương đồng với chủng vi khuẩn chuẩn CECT562 (chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* CECT562) của vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* thông qua việc phân tích trình tự bazơ 16S rARN, và đã xác nhận rằng chủng vi khuẩn nói trên có *Lactobacillus fermentum* vi khuẩn hình que Gram dương điển hình (tham khảo Hình 1 và Hình 6). Chủng vi khuẩn trong vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* mới có tên là *Lactobacillus fermentum* PL9988 và được lưu giữ tại Trung tâm tài nguyên vi sinh vật tại Viện nghiên cứu sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc ngày 16/07/2014 (số hiệu lưu giữ KCTC12624BP).

Các tác giả sáng chế đã phân lập được nhiều chủng từ các mẫu phân của người và nhận diện chúng. Bốn chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* đã được xác nhận, cho thấy sự đồng nhất trên 99% so với chủng vi khuẩn chuẩn CECT562 của *Lactobacillus fermentum* thông qua trình tự bazơ 16S rARN. Các chủng vi khuẩn nói trên được đặt tên là *Lactobacillus fermentum* PL9037, *Lactobacillus fermentum* PL9038, *Lactobacillus fermentum* PL9039 và *Lactobacillus fermentum* PL9040 (tham khảo từ Hình 2 đến Hình 5).

Sáng chế đề cập đến chế phẩm probiotic mà có chứa chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 mới được lưu giữ với số hiệu lưu giữ KCTC12624BP, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9040 hoặc môi trường nuôi cấy chứa các chủng này làm thành phần hoạt tính.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có trình tự bazơ 16S rARN được thể hiện trong trình tự số 1, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037 có trình tự bazơ 16S rARN được thể hiện trong trình tự số 2, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038 có trình tự bazơ 16S rARN được thể hiện trong trình tự số 3, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039 có trình tự bazơ 16S rARN được thể hiện trong trình tự số 4, và chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9040 có trình tự bazơ 16S rARN được thể hiện trong trình tự số 5.

Môi trường nuôi cấy chứa các vi sinh vật nói đến ở trên có chứa các axit hữu cơ kháng khuẩn và các thành phần kháng khuẩn phi protein.

Các dạng khác của các vi sinh vật đã biết đến là rất tốt để ăn cùng với vi khuẩn axit lactic của sáng chế này và ức chế sự phát triển vi sinh vật gây hại và cung cấp các hoạt động cải thiện sự cân bằng của khuẩn lạc đường ruột có thể bổ sung vào chế phẩm probiotic của sáng chế này.

Chủng vi khuẩn nói trên không có khả năng kháng nội và kháng ngoại (khả năng truyền) liên quan đến kháng sinh, ví dụ, như gentamixin, kanamixin, streptomycin, neomycin, tetracyclin, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, ampicillin, synerxit (quinupristin và dalbapristin kết hợp), linezolid, trimethoprim, ciprofloxacin và rifampicin, và có khả năng kháng nội với vancomycin mà không có bất kỳ khả năng di truyền kháng thể.

Chủng vi khuẩn này có khả năng bám chặt vào tế bào ruột tốt, kháng axit, kháng dịch mật và cung cấp tác dụng kháng khuẩn, tác dụng chống oxy hóa, hoạt tính tăng cường miễn dịch và có tác dụng ức chế sốc chống độc.

Theo phương án đặc trưng của sáng chế, để xác nhận mức độ nhạy cảm đối với kháng sinh của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*, các tác giả đã nghiên cứu, theo hướng dẫn IOS, các loại kháng sinh như gentamixin, tetracyclin, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, ampicillin, synerxit, linezolid và rifampicin đối với chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037, *Lactobacillus fermentum* PL9038, *Lactobacillus fermentum* PL9039 và *Lactobacillus fermentum* PL9040 tương ứng, kết quả của quá trình pha loãng dung dịch, xác nhận rằng so sánh với các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* khác, thì chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có nhạy cảm với tất cả các thuốc kháng sinh, do đó không có bất cứ vấn đề gì đối với việc truyền gen kháng lại kháng sinh (tham khảo Bảng 1).

Để xác nhận bất kỳ khả năng ức chế gây bệnh của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*, các tác giả đã nuôi cấy sáu vi khuẩn có hại bao gồm khuẩn *Escherichia coli* 0157:H7 ATCC43894, *Salmonella typhimurium* CCARM 8001, *Salmonella enteritidis* CCARM 8010, *Enterococcus faecalis* CCARM 0011, *Staphylococcus aureus* CCARM 0045, *Listeria monocytogenes* CCARM 0019 và các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* và xác nhận có sự hiện diện và kích cỡ trong vùng ức chế. Kết quả là, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037, *Lactobacillus fermentum* PL9038, *Lactobacillus fermentum* PL9039 và *Lactobacillus fermentum* PL9040 cho thấy có tác dụng ức chế vi khuẩn gây bệnh. Cụ thể, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 đã tiêu diệt năm loại vi khuẩn gây hại ngoại trừ vi khuẩn

Escherichia coli 0157:H7, điều đó có nghĩa là có tác dụng ức chế vi khuẩn gây hại rất tốt (tham khảo thêm Hình 7 và Bảng 2).

Để xác định mức độ ổn định của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*, các tác giả đã tiến hành kiểm tra hiện tượng tán huyết và kiểm tra việc tạo ra chất có hại, ví dụ, ure, indol, axit phenylpyruvic, v.v. và enzym có hại, ví dụ như, β -glucuronidaza, β -glucosidaza, v.v. và kiểm tra các phản ứng hóa lỏng gelatin. Kết quả được so sánh với chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037, *Lactobacillus fermentum* PL9038, *Lactobacillus fermentum* PL9039 và *Lactobacillus fermentum* PL9040, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 không cho thấy bất kỳ hiện tượng tán huyết nào và không sản sinh ra bất kỳ chất có hại và enzym có hại nào và cho thấy kết quả âm tính trong các phản ứng hóa lỏng, điều này có nghĩa là chủng vi khuẩn này có khả năng ổn định tốt nhất (tham khảo Bảng 3).

Để xác nhận tính kháng axit và kháng dịch mật của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*, các tác giả đã bổ sung thêm dịch dạ dày nhân tạo và dịch mật vào chủng vi khuẩn này, số lượng vi khuẩn còn sống được đo lại sau khi cấy. Kết quả được xác nhận là hầu hết các chủng vi khuẩn vẫn còn sống sót, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có khả năng kháng axit và kháng dịch mật rất tốt (tham khảo Bảng 4).

Để xác nhận khả năng bám chặt vào tế bào ruột của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*, các tác giả đã đưa vi khuẩn axit lactic vào đường ruột của người và số lượng vi khuẩn còn sống bám lại được đo lường sử dụng phương pháp nhuộm Gram và pha loãng liên tục. Kết quả xác nhận rằng khả năng bám chặt của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 là rất tốt (tham khảo Hình 8).

Để xác nhận tác dụng tăng cường khả năng miễn dịch của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988, các tác giả đã cho *Lipopolysacharit* (LPS) và chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 vào các dòng tế bào đại thực bào và đo nồng độ của TNF- α , IL-6 và IL-1 β mà là các cytokin gây viêm (proinflammatory cytokine). Kết quả là với trường hợp chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được đưa vào, xác nhận rằng nồng độ của ba tình huống tăng lên, và có tác dụng tăng cường khả năng miễn dịch. Hơn nữa, ở trường hợp chỉ LPS được đưa vào, nồng độ của TNF- α , IL-6 và IL-1 β tăng lên và ở trường hợp LPS và chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được đưa vào đồng thời, thì xác nhận rằng nồng độ của TNF- α , IL-6 và IL-1 β giảm xuống. Qua đó xác nhận được rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có tác dụng trong việc tối thiểu hóa sốc chống độc (tham khảo Hình 9).

Để xác nhận tác dụng chống oxy hóa của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988, các tác giả đã thực hiện thử nghiệm đo đặc chức năng chống oxy

hóa. Kết quả được xác nhận là chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có khả năng kháng lại thuốc diệt cỏ do không thấy có vùng ức chế sinh trưởng nào trong cả hai trường hợp với liều lượng 10 nM và 100 nM chất diệt cỏ, mà tạo ra anion peroxit (superoxide anion), được thêm vào. Với lý do này, thì xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có khả năng chống oxy hóa cao (tham khảo Hình 10 và Bảng 5).

Do vậy, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* và môi trường nuôi cấy theo sáng chế này có khả năng bám vào tế bào đường ruột rất tốt và có khả năng kháng axit tốt và kháng lại dịch mật tốt, không có bất cứ vấn đề gì đối với việc di truyền kháng lại kháng sinh và có thể ức chế vi khuẩn gây bệnh đường ruột có hại, nâng cao hiệu quả miễn dịch, có tác dụng ức chế sốc chống độc và có khả năng chống oxy hóa. Thực tế là, khi chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 thỏa mãn đầy đủ các điều kiện như là probiotic, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9988 và môi trường nuôi cấy chủng vi khuẩn này được sử dụng như một chế phẩm probiotic có khả năng tăng cường tiêu hóa và sức khỏe đường ruột.

Chế phẩm theo sáng chế này được điều chế dựa trên phương pháp điều chế chế phẩm probiotic điển hình và nói chung có thể ở dạng huyền phù hoặc bột khô. chế phẩm theo sáng chế này được điều chế ở dạng hợp phần của công thức điển hình theo cách là một hoặc nhiều chất mang điển hình dùng trong dược phẩm hoặc một hay nhiều loại phụ gia được chọn và bổ sung cho hiệu quả của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 hoặc môi trường nuôi cấy của chủng vi khuẩn này mà là thành phần chính.

Chất mang có thể được điều chế theo cách lựa chọn một hoặc nhiều loại trong số chất pha loãng, chất biến đổi, chất kết dính, tác nhân phân hủy, chất làm ngọt, chất ổn định và chất khử trùng. Phụ gia có thể được điều chế bằng cách chọn một hoặc nhiều loại trong số các chất tạo mùi, vitamin và một tác nhân chống oxy hóa.

Trong sáng chế này, chất mang và chất phụ gia có thể là tất cả các dạng được sử dụng trong dược phẩm. Cụ thể hơn là, chất pha loãng có thể là lactoza monohydrat, trihaloza, bột ngô, dầu đậu nành, xenlulo vi kết tinh (microcrystalline cellulose) hoặc D-manitol và chất biến đổi tốt hơn là magie stearat hoặc đá tan và chất kết dính tốt hơn là được chọn từ nhóm có chứa poluvinyropyridon (PVP) và hydroxypropynxenlulo (HPC). Hơn nữa, tác nhân phân hủy tốt hơn là được chọn từ nhóm có chứa canxi cacboxymethynxenlulo (Ca-CMC), natri glycolat tinh bột, kali polacrilin và polyvinylpyrrolidon liên kết ngang và chất làm ngọt được chọn từ nhóm có chứa sucroza (đường mía), fructoza, socbitol và aspartame và chất ổn định được chọn từ nhóm có chứa natri cacboxymethylxenlulo, β -cyclodextrin, sáp ong trắng và

xathan, và chất khử trùng được chọn từ nhóm có chứa methyn p-hydroxybenzoat methylparaben, propyn p-hydroxybenzoat propylparaben và kali sorbat.

Sáng chế đề cập đến thực phẩm dinh dưỡng mà có chứa chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9988 được lưu giữ với số hiệu lưu giữ KCTC12624BP, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9037, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9038, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9039, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9040 hoặc môi trường nuôi cấy các chủng vi khuẩn này làm thành phần hoạt tính.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 1, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 2, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 3, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 4 và chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9040 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 5.

Môi trường nuôi cấy các vi sinh vật nói trên có chứa các axit hữu cơ kháng khuẩn khác nhau và các thành phần kháng khuẩn phi protein.

Thành phần theo sáng chế này bao gồm vi khuẩn axit lactic khác mà tốt cho ăn uống, có khả năng ức chế sự phát triển của các vi sinh vật có hại và cải thiện sự cân bằng khuẩn lạc đường ruột.

Các chủng vi khuẩn theo sáng chế có khả năng bám dính vào tế bào đường ruột tốt, có khả năng kháng axit tốt, kháng dịch mật tốt và có khả năng tăng cường sức khỏe đường ruột thông qua chức năng kháng khuẩn tăng cường và hiệu quả chống oxy hóa, hoạt tính tăng cường miễn dịch, ức chế sốc chống độc và ức chế sự phát triển vi sinh vật gây bệnh đường ruột.

Tốt hơn là thực phẩm đề cập đến ở trên được chọn từ nhóm bao gồm các sản phẩm từ bơ sữa ở dạng kem lạnh, sữa, sữa đậu nành, yo-gut và pho mát, thịt, xúc xích, bánh mì, sô cô la, kẹo, đồ ăn nhẹ, bánh kẹo, bánh pizza, mì Ramen, các loại mì khác, kẹo cao su, các dạng súp, nước ngọt, chè, đồ uống, đồ uống có cồn, v.v.

Tới đây, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* theo sáng chế này được sử dụng có ích như là thực phẩm dinh dưỡng mà có khả năng tăng cường tiêu hóa và sức khỏe đường ruột do có khả năng bám dính vào tế bào đường ruột tốt, có khả năng kháng axit tốt, khả năng kháng dịch mật tốt và không có bất cứ vấn đề gì đối với việc truyền khả năng kháng kháng sinh và có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn có hại mà gây ảnh hưởng đến đường ruột trong khi đạt được hiệu quả tăng cường khả năng miễn dịch, ức chế sốc chống độc và hiệu quả chống oxy hóa.

Một ví dụ về thực phẩm dinh dưỡng theo sáng chế này, có một thành phần chữa bệnh ở nhà được làm để cải thiện chức năng đường ruột, ví dụ như trà, mứt hoa quả, nước trái cây, nước ép hoa quả, đồ uống v.v. mà có chứa, như một thành phần hoạt tính, chủng vi khuẩn *Lactobacillus* hoặc môi trường nuôi cấy. Các thực phẩm dinh dưỡng phòng bệnh theo sáng chế này được xử lý thành các dạng dễ mang đi mà không có ảnh hưởng phụ đối với cơ thể con người và được lưu trữ trong khoảng thời gian dài.

Nếu chủng vi khuẩn *Lactobacillus* hoặc môi trường nuôi cấy chứa chủng này được sử dụng làm phụ gia thực phẩm, thì chủng vi khuẩn nói trên hoặc môi trường nuôi cấy có thể trực tiếp sử dụng hoặc được sử dụng cùng với các thực phẩm khác hoặc các thành phần thực phẩm và có thể thích hợp để sử dụng theo cách truyền thống. Hỗn hợp các thành phần hoạt tính được xác định một cách thích hợp dựa trên mục đích sử dụng (ngăn chặn, tăng cường sức khỏe hoặc điều trị). Nói chung khi thực phẩm hay đồ uống được chuẩn bị, thì lượng vi khuẩn được đưa vào ít hơn 15 phần so với khối lượng tương ứng là 100 phần tính theo trọng lượng chủng vi khuẩn *Lactobacillus* hoặc môi trường nuôi cấy, tốt hơn là ít hơn 10 phần tính theo trọng lượng. Ở trường hợp theo dõi lâu dài đối với sức khỏe và vệ sinh môi trường hoặc kiểm soát sức khỏe, khối lượng nói trên có thể được giảm xuống dưới mức đề cập. Do không có bất cứ vấn đề gì về mức độ ổn định, các thành phần hoạt tính được sử dụng ở mức cao hơn mức nói trên.

Không có giới hạn đối với các loại thực phẩm, một ví dụ về thực phẩm mà chủng vi khuẩn *Lactobacillus* hoặc môi trường nuôi cấy được thêm vào, đó có thể là thịt, xúc xích, bánh mì, sô cô la, kẹo, đồ ăn nhanh, bánh, bánh piza, mì Ramen, các loại mì khác, kẹo cao su, bánh lạnh, kem lạnh, sữa, chất thay thế sữa, kem, bơ, bơ sữa, sữa chua, các sản phẩm sữa bao gồm pho mát, các loại súp, nước ngọt, chè (trà), đồ uống, đồ uống có cồn, tổ hợp vitamin, v.v. Thực phẩm nói trên bao gồm tất cả các loại thực phẩm dinh dưỡng thường thấy.

Thành phần đồ uống tăng cường sức khỏe theo sáng chế có chứa các chất tạo mùi khác nhau hoặc hydrat cacbon tự nhiên, v.v. giống như các đồ uống thông thường truyền thống. Hydrat cacbon tự nhiên có thể là đường alcohol (đường năng lượng thấp), ví dụ như, monosacharit, ví dụ như, glucoza, fructoza, v.v., disacarit, ví dụ như, mantoza, sucroza, v.v., polysacarit, ví dụ như, dextrin, cyclodextrin, v.v., xylitol, sorbitol, erythritol, v.v. Chất làm ngọt có thể là chất làm ngọt tự nhiên, ví dụ như, thaumatin, chiết xuất stevia, v.v. hoặc chất làm ngọt tổng hợp, ví dụ như, sacarin, aspatame, v.v. Tỷ lệ của hydrat cacbon tự nhiên có thể là 0,01g đến 0,04 g trên 100 ml của chủng vi khuẩn *Lactobacillus* hoặc đối với môi trường nuôi cấy, và tỷ lệ tốt nhất là khoảng 0,02 g đến 0,03 g.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus* hoặc môi trường nuôi cấy theo sáng chế này bao gồm các chất dinh dưỡng khác nhau, các vitamin, các chất điện phân, các chất tạo mùi, các chất tạo màu, các axit pectic và gốc của chúng, các axit alginic và gốc của chúng, các axit hữu cơ, các chất làm đầy dạng keo bảo vệ, chất điều chỉnh độ pH, chất ổn định, chất khử trùng, glixerin, ancolol, các chất cacbonat hóa được sử dụng cho các sản phẩm đồ uống có cacbonat, v.v. Probiotic theo sáng chế này bao gồm nước hoa quả tự nhiên, đồ uống từ nước hoa quả và hoa quả tươi được sử dụng để điều chế đồ uống thực phẩm. Các thành phần này được sử dụng một cách độc lập hoặc được sử dụng kết hợp với nhau. Tỷ lệ bổ sung các phụ gia này không cần quá quan trọng, nhưng tốt hơn hết là chủng vi khuẩn và môi trường nuôi cấy theo sáng chế này nằm trong khoảng 0,01 % tới 0,1 % tính theo trọng lượng.

Hơn nữa, để sử dụng ở dạng chế phẩm probiotic, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9988 được lưu giữ với số hiệu lưu giữ KCTC12624BP, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9037, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9038, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9039, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9040 và việc sử dụng môi trường nuôi cấy chứa các chủng vi khuẩn này.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 1, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9037 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 2, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9038 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 3, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9039 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 4 và chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9040 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 5.

Môi trường nuôi cấy chứa vi sinh vật này bao gồm các axit hữu cơ kháng khuẩn khác nhau và các thành phần kháng khuẩn phi protein.

Chế phẩm theo sáng chế này là rất tốt cho ăn uống cùng với vi khuẩn axit lactic của sáng chế. Sự phát triển của các vi sinh vật có hại được ức chế khi ăn. Các dạng vi sinh vật khác đã biết cũng có thể bổ sung thêm vào, để cung cấp hoạt động làm cải thiện sự cân bằng cộng vi khuẩn đường ruột.

Chủng vi khuẩn nói trên không có bất kỳ khả năng kháng ngoại nào (khả năng truyền) đối với kháng sinh, ví dụ như, gentamixin, kanamixin, streptomycin, neomycin, tetracylin, erythromycin, clindamycin, cloramphenicol, ampicillin, synercid (quinupristin và dalfopristin kết hợp), linezolid, trimetoprim, ciprofloxacin và rifampixin và có khả năng kháng nội đối với vancomycin mà không có bất kỳ sự truyền lại khả năng kháng lại kháng sinh nào.

Chủng vi khuẩn mới có khả năng bám dính tế bào đường ruột tốt, khả năng kháng axit tốt, khả năng kháng dịch mật tốt và có tác dụng kháng khuẩn, tác dụng chống oxy hóa, tăng cường khả năng miễn dịch và có tác dụng ức chế sốc chống độc.

Ở đây, các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* và môi trường nuôi cấy tương ứng theo sáng chế này có khả năng bám dính tế bào đường ruột tốt, kháng axit tốt, kháng dịch mật tốt và không có bất kỳ nguy hại nào đối với việc truyền kháng kháng sinh, hoạt động ức chế các vi khuẩn gây hại đường ruột và có tác dụng tăng cường khả năng miễn dịch, có tác dụng ức chế sốc chống độc và có tác dụng chống oxy hóa. Cụ thể, do chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 thỏa mãn đầy đủ tất cả các đặc tính nói trên như probiotic, nên chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 hoặc môi trường nuôi cấy chủng này được sử dụng như là chế phẩm probiotic mà có khả năng kích thích tiêu hóa và nâng cao sức khỏe đường ruột.

Trong khi đó, để sử dụng như thực phẩm bổ dưỡng, sáng chế này đề cập đến chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9988 được lưu giữ với số hiệu lưu giữ số KCTC12624BP, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9037, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9038, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9039, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9040 và môi trường nuôi cấy chứa các chủng vi khuẩn này.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 1, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9037 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 2, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9038 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 3, chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9039 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 4 và chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9040 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 5.

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật này bao gồm các axit hữu cơ kháng khuẩn khác nhau và các thành phần kháng khuẩn phi protein.

Chế phẩm theo sáng chế này là rất tốt cho ăn uống cùng với vi khuẩn axit lactic của sáng chế. Sự phát triển của các vi sinh vật có hại được ức chế khi ăn chúng. Các dạng vi sinh vật khác đã biết cũng có thể bổ sung thêm vào, để cung cấp hoạt động làm cải thiện sự cân bằng lạc khuẩn đường ruột.

Chủng vi khuẩn này có khả năng bám dính tế bào đường ruột tốt, khả năng kháng axit tốt, khả năng kháng dịch mật tốt và có thể tăng cường hoạt động sức khỏe đường ruột cùng với sự trợ giúp của khả năng kháng khuẩn, tác dụng chống oxy hóa, hoạt động tăng cường miễn dịch, ức chế sốc chống độc và ức chế sự phát triển vi sinh vật gây hại đường ruột.

Tốt hơn hết là thực phẩm nói trên được chọn từ nhóm có chứa các sản phẩm sữa được làm từ kem lạnh, sữa, sữa đậu nành, yo-gut và pho mát, thịt, xúc xích, bánh mì, sô cô la, kẹo, đồ ăn nhanh, bánh, bánh piza, mì Ramen, các loại mì khác, kẹo cao su, các loại súp, đồ uống, trà, đồ rượu, đồ uống có cồn, v.v.

Đến đây, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* theo sáng chế này có khả năng bám chặt và tế bào đường ruột tốt, kháng axit tốt, kháng dịch mật tốt và không có bất kỳ nguy hiểm nào trong việc truyền kháng thuốc kháng sinh và có khả năng ức chế các vi khuẩn gây hại đường ruột trong ruột và có khả năng tăng cường miễn dịch, ức chế sốc chống độc và chống oxy hóa, do vậy có thể được sử dụng một cách có lợi như là thực phẩm dinh dưỡng mà có khả năng kích thích đại tiện và tăng cường sức khỏe đường ruột.

Sáng chế này được mô tả chi tiết cùng với các phương án điển hình và các ví dụ điều chế.

Các phương án điển hình và các ví dụ điều chế dưới đây chỉ dành cho mục đích minh họa và nội dung của sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án và ví dụ điều chế này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phương án 1: Phân lập các chủng vi khuẩn.

Các mẫu phân người được thu thập từ 101 người trưởng thành khỏe mạnh sống ở tám ngôi làng ở vùng Jullabukdo, Hàn Quốc mà được biết đến là vành đai sống thọ ở Hàn Quốc là những người đi đại tiện thường xuyên và được bảo quản ở trạng thái đông cứng ở phòng thí nghiệm trong sáu giờ. Các mẫu phân này được pha loãng cùng với nước muối vô trùng và được cấy truyền vào môi trường nuôi cấy bằng thiết bị De Man Rogosa (MRS. Difco, Becton Dickinson, Sparks, Md.USA) được kinh phết và nuôi trong lồng kính trong 48 giờ ở nhiệt độ 37⁰ C. Các khuẩn lạc mà nhìn giống vi khuẩn axit lactic được thu thập và một khuẩn lạc được tách ra (tác giả Lee, HM, Lee Y, 2008, Letters in Applied Microbiology 46, 676-681). Trong trường hợp các mẫu giống nhau của khuẩn lạc được quan sát bởi cùng một người, thì chủng vi khuẩn được tách ly và phân tích tối đa là hai khuẩn lạc. Chủng vi khuẩn mà thể hiện phản ứng âm tính được chọn từ các khuẩn lạc phân lập thông qua phản ứng catalase. Sau đó các chủng vi khuẩn được nhuộm Gram và chủng vi khuẩn mà dương tính với Gram và ở dạng que được tách ra.

Phương án 2: Nhận diện các chủng vi khuẩn.

Trình tự bazơ gen 16S rARN được thực hiện để nhận diện các chủng vi khuẩn được phân lập ở Phương án 1.

Cụ thể hơn, chủng vi khuẩn được nhận diện bằng cách sử dụng máy chủ EzTaxon-e (<http://eztaxon-e-ezbiocloud.net/>; Kim et al., 2013) là trình tự bazơ và

thuật toán Blast tại trang web chủ Trung tâm quốc gia về thông tin sinh học (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) và phân tích phát sinh loài phân tử dựa trên trình tự bazơ 16S rARN.

Kết quả như được thể hiện ở Hình 1, xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 theo sáng chế này là một chủng mới có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 1 và nhận diện 16S rARN được 99,42% so với chủng vi khuẩn chuẩn CECT562 (chủng *Lactobacillus fermentum* CECT562) của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* (Hình 1). Hơn nữa, chủng vi khuẩn nói trên được đặt tên là *Lactobacillus fermentum* PL9988 và được gửi vào ngày 16/06/2014 có số tờ khai lưu giữ với số hiệu lưu giữ là KCTC12624BP tại Trung tâm tài nguyên vi sinh vật của Viện nghiên cứu về sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc (KRIBB).

Hơn nữa, nhiều chủng vi khuẩn được phân lập và nhận dạng theo cùng một phương pháp.

Kết quả như được thể hiện từ Hình 2 tới Hình 5, bốn chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* được phân lập và nhận diện, các chủng này khác so với chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 theo sáng chế này và có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu là trình tự số 2 đến trình tự số 5 và có độ tương đồng 16S rARN trên 99% so với chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* chuẩn CECT562 (Hình 2 tới Hình 5). Các chủng vi khuẩn nói trên được đặt tên là *Lactobacillus fermentum* PL9037, *Lactobacillus fermentum* PL9038, *Lactobacillus fermentum* PL9039 và *Lactobacillus fermentum* PL9040.

Phương án 3: Nhuộm màu chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988.

Phương pháp nhuộm Gram được thực hiện để xác nhận hình dạng của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 phân lập theo Phương án 1.

Cụ thể hơn, chủng vi khuẩn nói trên được nuôi ở môi trường nuôi cấy thạch trắng dinh dưỡng ở nhiệt độ 30⁰ C trong 24 giờ để phân tích mẫu chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được phân lập và nhận diện ở Phương án 1 và 2, chủng vi khuẩn được phết lên tấm kính trượt và mẫu chủng vi khuẩn và mẫu khuẩn lạc được quan sát bằng kính hiển vi, thí nghiệm nhuộm màu Gram được thực hiện bằng cách sử dụng bộ công cụ nhuộm Gram (Sigma Diagnostics, Kit HT 90-A) được sản xuất bởi Tập đoàn Sigma.

Kết quả được thể hiện trên Hình 6, xác nhận rằng hình dạng của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 theo sáng chế này có cùng hình dạng với chủng hình que dương tính Gram của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* điển hình (Hình 6).

Phương án 4: Xác nhận tính nhạy cảm đối với kháng sinh của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*.

Phương pháp pha loãng dung dịch được thực hiện để đo độ nhạy đối với kháng sinh của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được phân lập ở Phương án 2. Việc kiểm tra tính nhạy cảm đối với kháng sinh của vi khuẩn axit lactic theo tiêu chuẩn ISO (International Organization for Standardization), CSLI (Clinical and Laboratory Standards Institute) và EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), nhưng không thiết lập bất kỳ tiêu chí đề kháng nào đối với các loại khác nhau của vi khuẩn axit lactic. Vì vậy, sức đề kháng được xác định một cách tương đối theo cách này để thực hiện đồng thời việc kiểm tra tính nhạy cảm của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* phân lập nói trên.

Cụ thể hơn, việc kiểm tra tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn axit lactic được thực hiện bằng phương pháp pha loãng dung dịch với việc sử dụng kết hợp môi trường nuôi cấy (pH 6,7) của môi trường nuôi cấy LSM (IST nước dùng (Iso-Sensitest, 90%; Oxoid) và MRS nước dùng (10%) dựa trên hướng dẫn ISO (ISO10932:2010(E)), Sữa và cách xác định các sản phẩm sữa về nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của kháng sinh áp dụng đối với lợi khuẩn bifido và vi khuẩn axit lactic phi đường ruột (LAB). Thí nghiệm được thực hiện trong dải nồng độ từ 0,5 µg/ml tới 256 µg/ml bằng cách sử dụng kháng sinh gentamixin, tetracyclin, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, ampicillin, vancomycin, kết hợp của synergist quinupristin và dalbacin, linezolid và rifampicin mà được gợi ý trong hướng dẫn ISO. Các loại kháng sinh thử nghiệm được điều chế với nồng độ gấp đôi (2x) và các kháng sinh được điều chế đó được chia thành 50 µl cho từng lỗ trong tấm microplate. Vi khuẩn axit lactic nuôi cấy qua đêm được tiêm vào ống có chứa kháng sinh, và tấm microplate mà có các chủng vi khuẩn đã tiêm vào được nuôi cấy trong 48 giờ ở 37°C ở điều kiện kỵ khí và kết quả được quan sát.

Kết quả được thấy ở Bảng 1, xác nhận rằng chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* theo sáng chế này có sức đề kháng cao ở nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) = trên 128 µg/ml đối với vancomycin, do đó xác nhận rằng các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* có hiện tượng do thành bên trong dày là đặc trưng phổ biến của vi khuẩn axit lactic. Hơn nữa, không giống như chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037, *Lactobacillus fermentum* PL9038, *Lactobacillus fermentum* PL9039 và *Lactobacillus fermentum* PL9040 mỗi chủng có một hoặc nhiều sức đề kháng đối với gentamycin, erythromycin và clindamycin, xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có khả năng nhạy cảm với tất cả các loại kháng sinh. Điều này cho thấy rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 không có bất kỳ nguy hiểm nào đối với việc truyền kháng kháng sinh (Bảng 1).

Bảng 1 là Kết quả của các phép đo nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*.

Số nhận diện	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)									
	GEN	TET	ERY	CLI	CHL	AMP	VAN	SYN	LIN	RIF
PL9988	8	8	1	0,06	8	0,5	>128	1	4	0,5
PL9037	16	8	8	4	4	0,5	>128	0,5	4	0,25
PL9038	8	4	8	4	8	0,5	>128	0,5	4	≤1,125
PL9039	16	8	8	0,25	8	0,5	>128	0,5	8	≤0,125
PL9040	16	4	4	0,5	8	1	>128	0,5	4	≤0,125

(GEN: gentamixin, TEF: tetracilin, ERY: erythromixin, CLI: clindamixin, CHL: cloramphenicol, AMP: ampicillin, VAN: vancomixin, SYN: synerxit, LIN: linezolit và RIF: rifampixin).

Phương án 5: Xác nhận khả năng ức chế vi khuẩn gây hại của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*.

Các thí nghiệm sau đây được thực hiện để đo khả năng ức chế vi khuẩn gây hại đối với chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* được phân lập ở Phương án 1.

Cụ thể hơn, dịch trong suốt được điều chế theo cách vi khuẩn axit lactic được nuôi cấy trong 25 giờ ở môi trường nuôi cấy lỏng MRS và được ly tâm. Sáu vi khuẩn gây hại bao gồm *Escherichia coli* 0157:H7 ATCC43894, *Salmonella typhimurium* CCARM 8001, *Samonela enteritidis* CCARM 8010, *Enterococcus faecalis* CCARM 0011, *Staphylococcus aureus* CCARM 0045 và *Listeria monocytogenes* CCARM 0019 được cấy vào môi trường nuôi cấy Mullter Hinton (MH) sau khi độ đục được điều chỉnh theo tiêu chuẩn McFaland 0,5. Một lỗ được tạo ra ở môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng ống nghiệm khử trùng và 1 ml dịch trong suốt nuôi cấy chứa vi khuẩn axit lactic được trộn với 200 µl thạch trắng (3%) và hỗn hợp được đổ vào lỗ. *Listeria monocytogenes* được nuôi cấy ở 30⁰ C và vi khuẩn gây hại khác còn lại được nuôi cấy ở nhiệt độ 37⁰ C, và sự hiện diện của vùng ức chế và kích thước ức chế được xác nhận.

Kết quả được thể hiện trên Hình 7 và Bảng 2, xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có hoạt động ức chế đối với các vi khuẩn khác nhau do được xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 đã cho thấy hoạt động ức chế đối với năm loại vi khuẩn gây hại ngoại trừ *Escherichia coli* 0157:H7. Hơn nữa, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037 và *Lactobacillus fermentum* PL9038 cho thấy hoạt động ức chế đối với năm vi khuẩn và

được xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039 và *Lactobacillus fermentum* PL9040 cho thấy hoạt động ức chế vi khuẩn gây hại tương tự như chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 của sáng chế này (Hình 7 và Bảng 2).

Bảng 2

Số nhận diện	Úc chế vi khuẩn gây hại					
	EC	ST	SE	EF	SA	LM
PL9988	-	21	21	21	19	23
PL9037	18	20	22	21	-	29
PL9038	17,5	21,5	21,5	21	-	28
PL9039	16,5	21,5	20,5	20	19	27
PL9040	16,5	19,5	20	20	19,5	26

EC: *Escherichia coli* 0157:H7 ATCC43894
 ST: *Salmonella typhimurium* CCARM 8001,
 SE: *Salmonella enteritidis* CCARM 8010,
 EF: *Enterococcus faecalis* CCARM 0011,
 SA: *Staphylococcus aureus* CCARM 0045,
 LM: *Listeria monocytogenes* CCARM 0019

Phương án 6: Xác nhận mức độ nhạy cảm kháng sinh của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*.

Kiểm tra hiện tượng tán huyết và chất độc hại và kiểm tra việc tạo ra enzym có hại được thực hiện để đo sự an toàn của cơ thể con người sau khi chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* phân lập ở Phương án 1 được sử dụng. Khả năng gây bệnh của vi khuẩn phụ thuộc rất lớn vào khả năng thâm nhập tế bào. Việc thâm nhập tế bào cần phải có một khả năng phân hủy protein. Một thử nghiệm phản ứng hóa lỏng gelatin được thực hiện để xác nhận khả năng phân hủy protein.

Cụ thể hơn, vi khuẩn thí nghiệm được cấy vào môi trường nuôi cấy thạch máu và nuôi trong 24 giờ ở nhiệt độ 37⁰ C, và hiện tượng tan máu (tiêu máu) xuất hiện. Vi khuẩn thí nghiệm được cấy vào môi trường nuôi cấy gelatin MRS có chứa 0,3 g chiết xuất từ thịt bò, 0,5 g chất dẫn bạch (pepton), 12 g gelatin và 100 ml môi trường nuôi cấy MRS và được nuôi trong 6 tuần ở nhiệt độ 35⁰ C. Sau đó được làm lạnh trong 4 giờ và phản ứng hóa lỏng gelatin được quan sát cùng với nhóm kiểm soát mà không được cấy cùng với vi khuẩn. Nếu môi trường nuôi cấy không cứng lại sau khi làm lạnh, xác định rằng đó là phản ứng dương tính. Hơn nữa, các sản phẩm của bất kỳ chất gây hại nào, ví dụ, ureaza (enzym xúc tác phân hủy ure thành amonia và cacbon

đioxit), indol (một dẫn xuất của amino axit tryptophan), axit phenylpyruvic, v.v. và bất kỳ enzyme gây hại nào được sinh ra bởi một phần của các vi sinh vật đường ruột, ví dụ, β -glucuronidaza và β -glucosidaza đã được xác nhận.

Kết quả được thấy ở Bảng 3, xác nhận rằng chủng vi khuẩn mới *Lactobacillus fermentum* PL9988 là âm tính với tất cả các phản ứng hóa lỏng gelatin và với cả với ureaza, indol, axit phenylpyruvic, v.v. đó là một sự trao đổi chất có hại của sản phẩm và một trong các β -glucuronidaza và β -glucosidaza là các enzyme có hại không được sinh ra.

Ngược lại, khác với chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039 cho thấy hiện tượng tán huyết typ- α , và xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038 và chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9040 sinh ra các sản phẩm trao đổi chất có hại hoặc các enzyme có hại. Điều đó xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 là an toàn nhất (Bảng 3).

Bảng 3

Số nhận diện	Hiện tượng tán huyết	Sinh ra các chất có hại			Sinh ra các enzyme có hại	
		ureaza	indol	Axit phenylpyruvic	β -glucuronidaza	β -glucosidaza
PL9988	X	X	X	X	X	X
PL9037	X	O	X	X	X	X
PL9038	X	X	O	X	O	X
PL9039	O	X	X	X	X	X
PL9040	X	X	X	O	X	O

Phương án 7: Khả năng kháng axit và dịch mật của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*.

Các thí nghiệm về khả năng kháng axit và kháng dịch mật được thực hiện để đo khả năng kháng axit và kháng dịch mật của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* được phân lập ở Phương án 1.

Cụ thể hơn, để đo ở môi trường tương tự với điều kiện trong ống tiêu hóa, thí nghiệm về khả năng kháng axit được thực hiện bằng cách sử dụng dịch dạ dày nhân tạo trong đó 1.000 U/ml vị dịch tổ được thêm vào môi trường nuôi cấy có pH là 3,0.

Chủng vi khuẩn axit lactic đã phân lập được nuôi trong 24 giờ ở môi trường nuôi cấy dạng dịch lỏng và được ly tâm, các tế bào được thu thập và rửa sạch ba lần bằng dung dịch nước muối vô trùng. Một lượng tương tự dịch vị dạ dày nhân tạo được thêm vào dịch trong suốt và hỗn hợp được phản ứng trong 90 phút ở cùng điều kiện so với điều kiện nuôi vi khuẩn axit lactic. Mẫu và nhóm kiểm soát được pha loãng và được phết lên tấm MRS. Số lượng vi khuẩn sống được đếm và đầu ra kháng axit sẽ được đo.

Hơn nữa, thí nghiệm về kháng dịch mật được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy vi khuẩn axit lactic mà đã được xử lý trong 90 phút ở điều kiện dịch vị dạ dày nhân tạo và được thực hiện bằng cách sử dụng chất lỏng dịch mật nhân tạo trong đó có 0,3% dịch mật (chiết xuất từ mật lợn, Sigma) và 1.000U/ml tripxin được thêm vào môi trường nuôi cấy có pH là 7,0. Môi trường nuôi cấy được xử lý cùng với dịch vị dạ dày nhân tạo đã được ly tâm, và chất lỏng dịch mật nhân tạo được thêm vào cùng một lượng giống như dịch trong suốt, hỗn hợp được phản ứng trên 90 phút, hỗn hợp phản ứng được so sánh với nhóm kiểm soát và được pha loãng và phết lên tấm MRS. Số lượng vi khuẩn còn sống được đếm và đầu ra kháng dịch mật được đo.

Kết quả như được thấy trong Bảng 4, xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037, chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038 và chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039 có khả năng tồn tại thậm chí cả sau khi xử lý dịch dạ dày nhân tạo và dịch mật nhân tạo. Cụ thể, xác nhận rằng hầu hết các chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 còn sống sót sau khi xử lý dịch dạ dày nhân tạo và dịch mật nhân tạo. Có thể xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 là tuyệt vời trong việc kháng lại axit và kháng lại dịch mật (Bảng 4).

Bảng 4

Số nhận diện	MRS			Dịch dạ dày	Axit dịch mật
	0 phút	90 phút	180 phút	90 phút	90 phút
PL9988	$3,70 \times 10^8$	$4,30 \times 10^9$	$4,70 \times 10^9$	$9,60 \times 10^8$	$4,80 \times 10^8$
PL9039	$3,50 \times 10^8$	$4,10 \times 10^9$	$4,40 \times 10^9$	$7,20 \times 10^8$	$3,10 \times 10^8$
PL9038	$3,60 \times 10^8$	$4,20 \times 10^9$	$4,70 \times 10^9$	$6,80 \times 10^8$	$3,70 \times 10^8$
PL9039	$3,70 \times 10^8$	$4,30 \times 10^9$	$4,60 \times 10^9$	$8,40 \times 10^8$	$3,60 \times 10^8$
PL9040	$3,60 \times 10^8$	$3,90 \times 10^9$	$4,30 \times 10^9$	$6,50 \times 10^8$	$3,80 \times 10^8$

Phương án 8: Xác nhận khả năng bám dính vào các tế bào đường ruột của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988.

Các thí nghiệm sau đây được thực hiện để đo khả năng bám dính vào các tế bào đường ruột của người đối với chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* được phân lập ở Phương án 1.

Cụ thể hơn, tế bào Caco-2 (Ngân hàng lưu trữ tế bào Hàn Quốc) là dòng tế bào đường ruột của người được nuôi trong thiết bị nuôi cấy ở nhiệt độ 37⁰ C và 7% CO₂ bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy MEM (Eagles, Gibco) có chứa 20% huyết thanh bào thai bò không hoạt động (huyết thanh bào thai bò, FBS, Gibco) và 1% (v/v) thuốc chống nấm (kháng sinh chống nấm, Gibco). Tế bào Caco-2 phát triển hơn 70% trong tấm và vi khuẩn axit lactic (1x10⁸ CFU/ml) được nuôi bằng nước dùng MRS được rửa sạch ba lần sử dụng 10mM PBS(pH 7,0), và được khuấy đục tại 1 ml môi trường nuôi cấy MEM và được thêm vào các tấm đã điều chế tương ứng. Vi khuẩn axit lactic được phản ứng trong 1 giờ ở thiết bị nuôi cấy CO₂ tại nhiệt độ 37⁰ C, các tấm được rửa sạch ba lần bằng 10mM PBS, qua đó loại trừ được các vi khuẩn axit lactic không bám dính được, và được trộn sử dụng 4% tác nhân cố định có chứa 100 ml của 35% phormandehit, 16 g Na₂HPO₄ và 4 g NaH₂PO₄-H₂O trong 1 lít nước cất và được nhuộm Gram như đã mô tả trong Phương án 3. Hơn nữa, tấm phản ứng đo được rửa sạch ba lần bằng 10mM PBS và 1 ml TritonX-100 0,1% được thêm vào, thu được các tế bào và vi khuẩn axit lactic ngưng tụ bằng một cái nạo. Số lượng vi khuẩn axit lactic phát triển trong tấm nước dùng MRS được đếm bằng phương pháp pha loãng liên tiếp, và số lượng vi khuẩn axit lactic bám dính lên các tế bào đường ruột của người được xác nhận. Thí nghiệm bám dính nói trên được thực hiện ba lần, sau đó lấy giá trị trung bình.

Kết quả như được thấy trên Hình 8, do được xác nhận là khoảng 2,8x10⁶ CFU của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được bám dính lên các tế bào đường ruột trong từng môi trường, có thể xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có thể sống trong ruột của người và có thể phát triển ở điều kiện đường ruột (Hình 8).

Phương án 9: Xác nhận tác dụng nâng cao khả năng miễn dịch của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988.

Nếu vi khuẩn không gây bệnh (vi khuẩn axit lactic) kích thích các đại thực bào, TNF- α là cytokin gây viêm sẽ được phân tiết. Vì lý do này, mức độ của cytokin mRNA tăng lên và các phân tiết IL-10, do vậy có được tác dụng nâng cao khả năng miễn dịch. Liên quan đến hoạt động này, các thí nghiệm sau đây được thực hiện để xác nhận nồng độ của TNF- α , IL-6 và IL-1 β mà được phân tiết từ đại thực bào bởi chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được phân lập ở Phương án 1.

Cụ thể hơn, dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7 (Ngân hàng tế bào Hàn Quốc) được nuôi tại RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640, Gibco BRL, đảo Grand, Hoa Kỳ) có chứa 10% huyết thanh bào thai bò (Gibco) và 1% thuốc kháng sinh chống nấm (Gibco) được cấy vào tấm 96 lỗ ở mức $1,0 \times 10^5$ /lỗ, và các tế bào được kích thích bằng 1 $\mu\text{g/ml}$ *Lipopolysaccharit*, LPS. Sau đó, mỗi vi khuẩn axit lactic nuôi trong nước dùng MRS được rửa sạch ba lần bằng PBS, và vi khuẩn axit lactic đã rửa sạch được khuấy đục ở RPMI 1640 tạo ra số lượng vi khuẩn cuối cùng là $1,0 \times 10^8$ CFU/lỗ được chia lên các tấm và được nuôi bằng thiết bị nuôi cấy CO₂ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37⁰ C. Thu được dịch trong suốt nuôi cấy trong đó chỉ có LPS phản ứng, dịch trong suốt nuôi cấy trong đó chỉ có vi khuẩn axit lactic được phản ứng và dịch trong suốt nuôi cấy có cả LPS và vi khuẩn axit lactic được phản ứng, nồng độ của TNF- α , IL-6 và IL-1 β mà là cytokin liên quan đến việc nâng cao khả năng miễn dịch tồn tại trong dịch trong suốt nuôi cấy tế bào thu được được phân tích dựa trên các bước từ việc sản xuất sử dụng bộ công cụ Cytokin TNF- α (Biosource, CA, USA). Các thí nghiệm nói trên được thực hiện ba lần sau đó lấy kết quả trung bình.

Kết quả như được thấy ở Hình 9, trong trường hợp mà các dòng tế bào đại thực bào được kích thích bởi LPS và chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được xử lý, xác nhận rằng các việc bài tiết ra TNF- α , IL-6 và IL-1 β giảm đi so với nhóm xử lý chỉ có LPS. Vì vậy, có thể xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có tác dụng nâng cao khả năng miễn dịch và thực tế là do sự bài tiết TNF- α , IL-6 và IL-1 β được giảm đi với sự trợ giúp của LPS, thì xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có chức năng giảm thiểu bất kỳ sốc chống độc nào gây ra bởi LPS khi bị nhiễm vi khuẩn (Hình 9).

Phương án 10: Xác nhận tác dụng chống oxy hóa của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988.

Thí nghiệm đo lường chức năng chống oxy hóa được thực hiện để xác nhận tác dụng chống oxy hóa của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được phân lập ở Phương án 1.

Cụ thể hơn, chủng vi khuẩn nuôi qua đêm được thêm vào dung dịch nước muối, do đó tạo ra huyền phù 10^7 CFU/ml. 0,1 ml huyền phù được cấy vào môi trường nuôi cấy MRS và được nuôi qua đêm ở nhiệt độ 37⁰ C trong đĩa giấy có chứa 10 μl thuốc diệt cỏ mạnh tan trong dung dịch nước muối, vùng ức chế sự phát triển được đo bằng một thước đo. Hơn nữa, 10mM và 100mM thuốc diệt cỏ mạnh được thêm vào huyền phù và được nuôi qua đêm, sự phát triển của vi khuẩn được đo bằng hấp thụ 600 nm từng giờ và khả năng kháng lại loại oxy phản ứng (ROS) được đo lường. Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9005 được đánh dấu trong tờ khai gửi đi KCCM-10250 được sử dụng làm nhóm kiểm soát.

Kết quả như được thấy trên Hình 10 và Bảng 5, trong trường hợp chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9005 được đánh dấu trên tờ khai gửi đi KCCM-10250, vùng ức chế phát triển được quan sát khi 100mM thuốc diệt cỏ mạnh được thêm vào. Đối với chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 của sáng chế này, vùng ức chế phát triển như vậy không quan sát thấy khi 10nM và 100nM thuốc diệt cỏ mạnh được thêm vào, điều đó xác nhận rằng có sự kháng lại đối với thuốc diệt cỏ mạnh. Xác nhận rằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có khả năng chống oxy hóa tốt (Hình 10 và Bảng 5).

Bảng 5: Vùng ức chế phát triển do peoxit anion mà thuốc diệt cỏ tạo ra.

Nồng độ thuốc diệt cỏ (mM)	Chủng vi khuẩn <i>Lactobacillus fermentum</i>	
	PL9988	PL9005
0	0	0
10	0	0
100	0	16
Đơn vị (đường kính): mm		

Ví dụ điều chế 1: Điều chế thực phẩm.

Thực phẩm có chứa chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và môi trường nuôi cấy chứa chủng vi khuẩn này theo sáng chế được điều chế theo các cách sau đây.

1-1. Điều chế gia vị nấu ăn.

Gia vị nấu ăn dùng để cải thiện chức năng đường ruột được điều chế theo cách trộn chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và môi trường nuôi cấy với tỷ lệ 1 đến 12 phần tính theo trọng lượng tương ứng với 100 phần tính theo trọng lượng của gia vị nấu ăn.

1-2. Điều chế súp và nước sốt.

Súp và nước sốt dùng để cải thiện chức năng đường ruột được điều chế theo cách cho 1 đến 12 phần tính theo trọng lượng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và môi trường nuôi cấy chủng này vào 100 phần tính theo trọng lượng của súp và nước sốt và sản phẩm thịt được xử lý và mỳ.

1-3. Điều chế các sản phẩm từ sữa.

1 đến 12 phần tính theo trọng lượng của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và môi trường nuôi cấy chủng này theo sáng chế được thêm vào 100 phần tính theo trọng lượng sữa, do đó các sản phẩm sữa khác nhau như bơ và kem lạnh được làm sử dụng từ loại sữa nói trên.

1-4. Điều chế ngũ cốc khô.

Bột khô được chuẩn bị theo cách là chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và môi trường nuôi cấy chủng này theo sáng chế được giảm áp và làm giàu trong thiết bị làm giàu chân không và được sấy khô bằng cách xịt và sấy gió nóng, và hỗn hợp sấy khô này được sàng trên lưới 60 mắt để tuân theo kích cỡ hạt.

Ngũ cốc khô được làm theo cách trộn các hạt gạo, hạt ngũ cốc và chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và môi trường nuôi cấy chủng này.

Ví dụ điều chế 2: Điều chế đồ uống.

2-1. Điều chế đồ uống ngọt có ga.

5 đến 10 phần tính theo trọng lượng đường, 0,05 đến 0,3 phần tính theo trọng lượng axit xitric, 0,005 đến 0,02 phần tính theo trọng lượng đường caramen, 0,1 đến 1 phần tính theo trọng lượng vitamin C và phụ gia 10 phần tính theo trọng lượng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và môi trường nuôi cấy chủng này theo sáng chế được trộn với nhau, hỗn hợp trên được trộn với chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039 hoặc 94 phần tính theo trọng lượng nước cất được trộn thành si-rô. Si-rô được khử trùng trong khoảng từ 20 đến 180 giây ở nhiệt độ 95⁰ C đến 98⁰ C, hỗn hợp được trộn với nước lạnh theo tỷ lệ 1:4, và 0,5 đến 0,82 phần tính theo trọng lượng khí cacbonat được bơm vào, như vậy điều chế được nước ngọt có ga.

2-2. Điều chế nước ngọt chức năng.

10 phần tính theo trọng lượng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và môi trường nuôi cấy chứa chủng này được trộn với 0,1 phần tính theo trọng lượng vitamin C, 5,8 phần tính theo trọng lượng fructoza, 3,8 phần tính theo trọng lượng đường trắng, 0,12 phần tính theo trọng lượng axit xitric, 0,03 phần tính theo trọng lượng axit malic, 0,04 phần tính theo trọng lượng natri citrat và 0,02 phần tính theo trọng lượng dành dành xanh và hỗn hợp được hòa tan hoàn toàn trong nước đã được đông. Nước hòa tan được điều chỉnh bằng cách sử dụng thiết bị đo nước sao cho tổng lượng nước là 100 phần tính theo trọng lượng.

2-3. Điều chế đồ uống bổ dưỡng.

Các thành phần phụ, ví dụ, 0,5 phần tính theo trọng lượng si-rô đường bắp fructoza cao, 2 phần tính theo trọng lượng oligosaccharit, 2 phần tính theo trọng lượng đường, 0,5 phần tính theo trọng lượng muối ăn và 75 phần tính theo trọng lượng nước và 10 phần tính theo trọng lượng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và môi trường nuôi cấy chủng này được trộn đều và được khử trùng tức thời và được đóng vào các vật chứa nhỏ, ví dụ, như chai thủy tinh, chai nhựa, v.v.như vậy điều chế được đồ uống bổ dưỡng.

2-4. Điều chế nước ép rau.

10g sản phẩm sấy khô chân không của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và môi trường nuôi cấy chủng này được cho vào 1 lít nước ép cà chua hoặc cà rốt, như vậy điều chế được nước ép rau tăng cường sức khỏe.

2-5. Điều chế nước ép hoa quả.

10g sản phẩm sấy khô chân không của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 và môi trường nuôi cấy chủng này được cho vào 1 lít nước ép táo hoặc nho, như vậy điều chế được nước ép hoa quả tăng cường sức khỏe.

Ví dụ điều chế 3: Điều chế sữa lên men.

Dầu ăn nguyên chất trong đó có chứa hàm lượng chất rắn dầu không béo được điều chỉnh từ 8 đến 20 phần tính theo trọng lượng sử dụng sữa khô không béo được khử trùng trong 15 giây ở nhiệt độ 72⁰ C đến 75⁰ C. Dầu ăn nguyên chất đã khử trùng được làm mát xuống nhiệt độ cho trước, và chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được cấy vào nồng độ 10⁶ CFU/ml và được nuôi cho đến khi pH đạt từ 4 đến 5. Môi trường nuôi cấy được làm mát sau khi hoàn thành nuôi cấy. Si-rô được điều chế theo cách làm tan 0,1 đến 50 phần tính theo trọng lượng nồng độ nước ép hoa quả, 0,1 đến 20 phần tính theo trọng lượng chất xơ, 0,5 đến 30 phần tính theo trọng lượng đường gluco, 0,1 đến 15 phần tính theo trọng lượng oligosaccharit, 0,001 đến 10 phần tính theo trọng lượng canxi, 0,0001 đến 5 phần tính theo trọng lượng vitamin, v.v. Si-rô này được khử trùng, làm mát và được trộn theo tỷ lệ cho trước với môi trường nuôi cấy và được khuấy và đóng vào vật chứa đồng nhất, như vậy điều chế được sữa lên men.

Ví dụ điều chế 4: Điều chế vi khuẩn axit lactic dạng bột.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được cấy vào môi trường nuôi cấy MRS ở nồng độ 10⁶ CFU/ml và lên men kiểm soát pH được thực hiện từ 18 đến 24 giờ ở nhiệt độ 37⁰ C. Các tế bào vi khuẩn được thu thập bằng cách ly tâm ở 10,000x g ở 4⁰ C sau khi nuôi cấy chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 hoàn thành. Các tế bào thu được được trộn với cùng một lượng chất bảo vệ trong đó có 2,5% váng sữa và 5% đường mía được chứa trong 5% sữa gầy, và hỗn hợp được tạo bột bằng thiết bị sấy đông lạnh. Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 ở dạng bột khô đã điều chế được hòa với trihaloza để cho số lượng vi khuẩn sống lớn hơn 1x10¹¹ CFU/g.

Ví dụ điều chế 5: Điều chế công thức vi khuẩn axit lactic.

Công thức vi khuẩn axit lactic, ví dụ, thực phẩm có vi khuẩn axit lactic, thực phẩm giúp dễ tiêu hóa, v.v. được điều chế sử dụng vi khuẩn axit lactic dạng bột được điều chế trong Ví dụ điều chế 4. 10 phần tính theo trọng lượng oligosaccharit, 20 phần tính theo trọng lượng đường gluco khan, 5 phần tính theo trọng lượng fructoza dạng hạt, 2 phần tính theo trọng lượng vitamin C, 5 phần tính theo trọng lượng hương

vi bột trái cây, 5 phần tính theo trọng lượng cây lô hội, 15 phần tính theo trọng lượng chất xơ và 18 phần tính theo trọng lượng vỏ hạt mã đề *Plantago ovata* được trộn với 20 phần tính theo trọng lượng chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 ở dạng bột khô (số lượng vi khuẩn sống trên 1×10^{10} CFU/g) và được chia vào vật chứa hình ống hoặc chai với một lượng cho trước và được đóng gói lại. Công thức vi khuẩn axit lactic được điều chế này giữ cho số lượng vi khuẩn sống trên 5×10^8 CFU/g.

Dưới đây là tờ khai lưu giữ với số hiệu lưu giữ chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988.

Tên cơ quan nhận lưu giữ với số hiệu lưu giữ: Trung tâm tài nguyên vi sinh vật thuộc Viện nghiên cứu sinh vật và công nghệ sinh học Hàn Quốc.

Số gửi: KCTC12624BP

Ngày gửi: 16/07/2014

HIỆP ƯỚC BUDAPEST VỀ SỰ CÔNG NHẬN QUỐC TẾ ĐỐI VỚI VIỆC NỘP LƯU CHỦNG VI
SINH NHẪM TIẾN HÀNH CÁC THỦ TỤC VỀ SÁNG CHẾ

MẪU QUỐC TẾ
TIẾP NHẬN TRƯỜNG HỢP NỘP LƯU GỐC

Ban hành theo Quy tắc 7.1

Gửi: PLBIO Co., Ltd.

PLBIO Co., Ltd.

22, Jowonjiungang-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-887'

Republic of Korea

I. ĐỊNH DANH CHỦNG VI SINH VẬT	
Số tham chiếu định danh cho bên nộp lưu: <i>Lactobacillus fermentum</i> PL9988	Số truy cập được đưa ra bởi CƠ QUAN LƯU CHỦNG QUỐC TẾ: KCTC 12624BP
II. MÔ TẢ KHOA HỌC VÀ/HOẶC TÊN GỌI PHÂN LOẠI ĐỀ XUẤT	
Vi sinh được định danh theo đính kèm dưới đây bởi: [x] mô tả khoa học [] tên gọi phân loại đề xuất (Đánh dấu x vào mục thích hợp)	
III. TIẾP NHẬN VÀ CHẤP THUẬN	
Cơ quan lưu chủng quốc tế chấp nhận chủng vi sinh được định danh ở trên, được tiếp nhận vào ngày 16/07/2014	
IV. TIẾP NHẬN YÊU CẦU ĐỂ CHUYỂN	
Chủng vi sinh có tên như trên đã được tiếp nhận bởi Cơ quan lưu chủng quốc tế vào và yêu cầu chuyển nộp lưu gốc để nộp lưu theo Hiệp ước Budapest và đã được tiếp nhận bởi Cơ quan này.	
V. CƠ QUAN LƯU CHỦNG QUỐC TẾ	
Tên: Korean Collection for Type Cultures (Bảo tàng chủng giống vi sinh vật Hàn Quốc) Địa chỉ: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) – Viện nghiên cứu khoa học sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc 125 Gwahak-ro, Yuseong-gu Daejeon 305-806 Republic of Korea	Chữ ký của người có quyền đại diện của Cơ quan lưu chủng quốc tế trong việc ủy quyền chính thức: Đã ký PARK, Doo Sang, Giám đốc Ngày: 17/07/2014

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : **PLBIO Co., Ltd.**

PLBIO Co., Ltd.

22, Jowonjungang-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-877
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Lactobacillus fermentum</i> PL9988	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 12624BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☒ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on July 16, 2014 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____.	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 125 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):  PARK, Doo Sang, Director Date: July 17 2014

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 có trình tự bazơ 16S rARN được đánh dấu bằng trình tự số 1 và được lưu giữ với số hiệu lưu giữ KCTC12624BP.
2. Chế phẩm probiotic, bao gồm:
 chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được lưu giữ với số hiệu lưu giữ KCTC12624BP hoặc môi trường nuôi cấy chứa chủng vi khuẩn này làm thành phần hoạt tính.
3. Chế phẩm probiotic theo điểm 2, trong đó chủng vi khuẩn hoặc môi trường nuôi cấy chứa chủng này không có khả năng kháng kháng sinh bên ngoài, do đó không nguy hại đến việc di truyền tính kháng thuốc.
4. Chế phẩm probiotic theo điểm 2, trong đó chủng vi khuẩn hoặc môi trường nuôi cấy chứa chủng này có hoạt tính kháng khuẩn.
5. Chế phẩm probiotic theo điểm 2, trong đó chủng vi khuẩn hoặc môi trường nuôi cấy chứa chủng này có khả năng kháng axit tốt và kháng dịch vị mật tốt.
6. Chế phẩm probiotic theo điểm 2, trong đó chủng vi khuẩn hoặc môi trường nuôi cấy chứa chủng này có khả năng bám dính tế bào đường ruột tốt.
7. Chế phẩm probiotic theo điểm 2, trong đó chủng vi khuẩn hoặc môi trường nuôi cấy chứa chủng này có hoạt tính chống oxy hóa.
8. Chế phẩm probiotic theo điểm 2, trong đó chủng vi khuẩn hoặc môi trường nuôi cấy chứa chủng này có hoạt tính tăng cường miễn dịch.
9. Chế phẩm probiotic theo điểm 2, trong đó chủng vi khuẩn hoặc môi trường nuôi cấy chứa chủng này có hoạt tính tăng cường miễn dịch theo cách ức chế tiết TNF- α , IL-6 hoặc IL-1 β .
10. Thực phẩm bổ dưỡng, bao gồm:
 chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988 được lưu giữ với số hiệu lưu giữ KCTC12624BP hoặc môi trường nuôi cấy chứa chủng này làm thành phần hoạt tính.

11. Thực phẩm bổ dưỡng theo điểm 10, trong đó chủng vi khuẩn hoặc môi trường nuôi cấy này cho phép tăng cường hoạt động sức khỏe đường ruột theo cách ức chế sự phát triển vi sinh vật gây bệnh đường ruột.

12. Thực phẩm bổ dưỡng theo điểm 10, trong đó thực phẩm này là thực phẩm được chọn từ nhóm bao gồm sản phẩm từ sữa được làm từ kem lạnh, sữa, sữa đậu nành, sữa chua và phô mai, sản phẩm sữa đậu nành, thịt, xúc xích, bánh mì, sô cô la, kẹo, đồ ăn nhanh, bánh, bánh piza, mì Ramen, các loại mì khác, kẹo cao su, các loại súp, đồ uống, chè, rượu và các loại đồ uống có cồn.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9988

Tên : Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*

Chủng: CECT562 (AJ575812)

Trạng thái: Dạng điển hình

Cặp đôi-tương tự: 99,42%

Query	46	ACA TGCAAGT CGA ACGC GTT GGCCCAATTGATTGA CGGTGCTTGCA CCTGAT TGAT TTT G	105
Sbjct	5	ACA TGCAAGT CGA ACGC GTT GGCCCAATTGATTGA TGGT GCT TGCA CCTGAT TGAT TTT G	64
Query	106	GTCGCCAACGAGT GGCGGACGGGT GAGTAACACGT AGGTAACTGCCAGAA GCGGGGGA	165
Sbjct	65	GTCGCCAACGAGT GGCGGACGGGT GAGTAACACGT AGGTAACTGCCAGAA GCGGGGGA	124
Query	166	CAACAT TTGGAAA CAGATGCTAAT ACCGCATAACA GCGTTGTTCGCAT GAACACGCTTA	225
Sbjct	125	CAACAT TTGGAAA CAGATGCTAAT ACCGCATAACA GCGTTGTTCGCAT GAACACGCTTA	184
Query	226	AAAGAT GGCY TCT CGCT ATCACTT CTGGATGGA OCTGCGGTGCAT TAGCTTGTGGTGGG	285
Sbjct	185	AAAGAT GGCY TCT CGCT ATCACTT CTGGATGGA OCTGCGGTGCAT TAGCTTGTGGTGGG	244
Query	286	GTAACGGCCTA ACCAAGGCGA TGAT GCATAGCCGAGTTGAGAGACTGAT CGGCCACAATGG	345
Sbjct	245	GTAATGGCCTA ACCAAGGCGA TGAT GCATAGCCGAGTTGAGAGACTGAT CGGCCACAATGG	304
Query	346	GACTGA GACA CGGCCCA TACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTCTTCCA CAATGGGC	405
Sbjct	305	GACTGA GACA CGGCCCA TACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTCTTCCA CAATGGGC	364
Query	406	GCAAGCCTGA TGGAGCAACA CCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGT	465
Sbjct	365	GCAAGCCTGA TGGAGCAACA CCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGT	424
Query	466	TGT TAAAGAA GAA CAAGTAT GAGAGTAACGTGTCA TACGT TGA CGGTA TTTA ACCA GAAA	525
Sbjct	425	TGT TAAAGAA GAA CAAGTAT GAGAGTAACGTGTCA TACGT TGA CGGTA TTTA ACCA GAAA	484
Query	526	GTACGGCTA ACTACGTGCCAGCA GCGCGGTAA TACGTAGGTGGCAA GGGT TATCOGGA	585
Sbjct	485	GTACGGCTA ACTACGTGCCAGCA GCGCGGTAA TACGTAGGTGGCAA GGGT TATCOGGA	544
Query	586	TTTAT TGGGC GTAAAGAGAGTGCAGGCGGT TTTCTAAGTC TGTATG TGAAGCCCTTCGGCT	645
Sbjct	545	TTTAT TGGGC GTAAAGAGAGTGCAGGCGGT TTTCTAAGTC TGTATG TGAAGCCCTTCGGCT	604
Query	646	TAACCGGAGA AGTGCATCGGAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAAGAGGGTAGTGGAACTC	705
Sbjct	605	TAACCGGAGA AGTGCATCGGAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAAGAGGGTAGTGGAACTC	664
Query	706	CATGTGTAGC GGTGGAA TCGTAGATA TATGGAAGAACACCA GTGGGGAAGGCGCTACC	765
Sbjct	665	CATGTGTAGC GGTGGAA TCGTAGATA TATGGAAGAACACCA GTGGGGAAGGCGCTACC	724
Query	766	TGGTC TGCAA CTGACGC TGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACA GGA TTAGATACCGTG	825
Sbjct	725	TGGTC TGCAA CTGACGC TGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACA GGA TTAGATACCGTG	784
Query	826	GTAGTCCATG CCGTAAACGATGAGTGC TAGGTGT TGGAGGGT TTC CGC CCTTCAGTGCCG	885
Sbjct	785	GTAGTCCATG CCGTAAACGATGAGTGC TAGGTGT TGGAGGGT TTC CGC CCTTCAGTGCCG	844
Query	886	GAGCTAAAGC ATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGG TTGAAACTCAAAGGA	945
Sbjct	845	GAGCTAAAGC ATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGG TTGAAACTCAAAGGA	904
Query	946	ATTGACGGGG GCGCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTT TAAT TGG AAGCTACGGGAAGAA	1005
Sbjct	905	ATTGACGGGG GCGCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTT TAAT TGG AAGCTACGGGAAGAA	964
Query	1006	CCTTACCAGG TCTTGACATCT TGGGCCAACCTAGAGATAGGGGG TTTCTTCGGGAACG	1065
Sbjct	965	CCTTACCAGG TCTTGACATCT TGGGCCAACCTAGAGATAGGGGG TTTCTTCGGGAACG	1024
Query	1066	CAATGACAGG TGGT	1079
Sbjct	1025	CAATGACAGG TGGT	1039

Hình 1

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9037

Tên : Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*

Chủng: CECT562 (AJ575812)

Trạng thái: Dạng điển hình

Cặp đôi-tương tự: 99,89%

Query	50	TGCA AGT CGAA CGCGT TGGCCAAT TGATTGACGGT GCTTGACACCTGAT TGAT TTTGGTC	109
Sbjct	1	TGCA AGT CGAA CGCGT TGGCCAAT TGATTGATGGT GCTTGACACCTGAT TGAT TTTGGTC	60
Query	110	GCCA ACGAGT GGGGA GGGT GAGT AACACGTAGGT AACCTGCCAGAA GCGGGGA CAA	169
Sbjct	61	GCCA ACGAGT GGGGA GGGT GAGT AACACGTAGGT AACCTGCCAGAA GCGGGGA CAA	120
Query	170	CATT TGGAAACAGATGCT AATACCGCATAACAGCGT TGTTCGCATGAACAACGCTTAAA	229
Sbjct	121	CATT TGGAAACAGATGCT AATACCGCATAACAGCGT TGTTCGCATGAACAACGCTTAAA	180
Query	230	GATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGAOCTGGGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTA	289
Sbjct	181	GATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGAOCTGGGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTA	240
Query	290	AOGGOCTAACAAGCGATGATGCATAGCGGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGAC	349
Sbjct	241	AOGGOCTAACAAGCGATGATGCATAGCGGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGAC	300
Query	350	TGAGACA CGGCCOA TACT CCTACGGGAGGCAGCAGT AGGGAATCTTCCA CAATGGGCGCA	409
Sbjct	301	TGAGACA CGGCCOA TACT CCTACGGGAGGCAGCAGT AGGGAATCTTCCA CAATGGGCGCA	360
Query	410	AGCCTGATGGA GCAACACCGCGTGA GTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGT TGT	469
Sbjct	361	AGCCTGATGGA GCAACACCGCGTGA GTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGT TGT	420
Query	470	TAAAGAA GAACAOSTATGAGAGTAA CTGTTCATACGTTGACGGTATTTAAACCA GAAAGTC	529
Sbjct	421	TAAAGAA GAACAOSTATGAGAGTAA CTGTTCATACGTTGACGGTATTTAAACCA GAAAGTC	480
Query	530	AOGGCTA ACTA CGT GCCA GCGCGGGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGT TATCOGGA TTT	589
Sbjct	481	AOGGCTA ACTA CGT GCCA GCGCGGGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGT TATCOGGA TTT	540
Query	590	ATTGGGCGTAA AGAGAGTGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAA AGCCTTCGGCTTAA	649
Sbjct	541	ATTGGGCGTAA AGAGAGTGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAA AGCCTTCGGCTTAA	600
Query	650	COGAGAAAGTG CATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAAGGG TAGTGGAACCTCAT	709
Sbjct	601	COGAGAAAGTG CATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAAGGG TAGTGGAACCTCAT	660
Query	710	GTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACAACAGTGGCGAAGGCGCTACCTGG	769
Sbjct	661	GTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACAACAGTGGCGAAGGCGCTACCTGG	720
Query	770	TCTGCAACTGA CGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGAT TAGATACCTGGTA	829
Sbjct	721	TCTGCAACTGA CGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGAT TAGATACCTGGTA	780
Query	830	GTCCATGCCGT AAACGATGAGTACTAGGTGTGGAGGGTTCGGCCCTTCAGTGCCGGAG	889
Sbjct	781	GTCCATGCCGT AAACGATGAGTACTAGGTGTGGAGGGTTCGGCCCTTCAGTGCCGGAG	840
Query	890	CTAACGCATTA AGCACTCCGCTGGGG-AGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT	948
Sbjct	841	CTAACGCATTA AGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT	900
Query	949	TGAC 952	

Hình 2

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9038

Tên : Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*

Chủng: CECT562 (AJ575812)

Trạng thái: Dạng điển hình

Cấp đôi-trong tự: 99,52%

Query	66	GGCCCAATTGATTGAOGGTGCTTGCACCTGATTGATTTTGGTGGCCAAOGAGTGGCGGAC	125
Subject	42	GGCCCAATTGATTGATGGTGTGCTTGCACCTGATTGATTTTGGTGGCCAAOGAGTGGCGGAC	101
Query	126	GGGTGA GTAA CACGTAGGTAACCTGCCAGAAAGGGGGACAACTTTGGAAACAGATGC	185
Subject	102	GGGTGA GTAA CACGTAGGTAACCTGCCAGAAAGGGGGACAACTTTGGAAACAGATGC	161
Query	186	TAA TACCGCA TAA CAGCGTT GTTCGCATGAACAACGCTTAAAGATGGCTTCTCGCTATC	245
Subject	162	TAA TACCGCA TAA CAGCGTT GTTCGCATGAACAACGCTTAAAGATGGCTTCTCGCTATC	221
Query	246	ACTTCTGGATGGAOCTGOGGTGCA TTAGCTTGTGTGGGGTAAACGGCTACCAAGGCGA	305
Subject	222	ACTTCTGGATGGAOCTGOGGTGCA TTAGCTTGTGTGGGGTAAACGGCTACCAAGGCGA	281
Query	306	TGATGCATAGCGAGTTGAGAGACTGATCGGOCACAATGGGACTGAGACACGGGCCATAC	365
Subject	282	TGATGCATAGCGAGTTGAGAGACTGATCGGOCACAATGGGACTGAGACACGGGCCATAC	341
Query	366	TCTTACGGGA GGCAGCA GTAGGGAATCTTCCACAA TGGGGGCAAGCCTGATGGAGCAACA	425
Subject	342	TCTTACGGGA GGCAGCA GTAGGGAATCTTCCACAA TGGGGGCAAGCCTGATGGAGCAACA	401
Query	426	COGCGT GAGT GAA GAAGGGT TCGGCTCGTAAAGCTCTGTGTGTAAAGAGAACACGTAT	485
Subject	402	COGCGT GAGT GAA GAAGGGT TCGGCTCGTAAAGCTCTGTGTGTAAAGAGAACACGTAT	461
Query	486	GAGAGTAACTGTT CATACGTGACGGTATTTAAOCAGAAAGTCAACGGCTAACCTACGTGCC	545
Subject	462	GAGAGTAACTGTT CATACGTGACGGTATTTAAOCAGAAAGTCAACGGCTAACCTACGTGCC	521
Query	546	AGCAGCCCGGTAA TACGTA GGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTTGGCGTAAAGAGAG	605
Subject	522	AGCAGCCCGGTAA TACGTA GGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTTGGCGTAAAGAGAG	581
Query	606	TGCAGGCGGT TTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACC GGAAGAGTGCATCGG	665
Subject	582	TGCAGGCGGT TTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACC GGAAGAGTGCATCGG	641
Query	666	AAACTGGATAACTTGAAGTGCAGAAAGAGGTAGTGAAC TCCATGTGTAGCGGTGGAATGC	725
Subject	642	AAACTGGATAACTTGAAGTGCAGAAAGAGGTAGTGAAC TCCATGTGTAGCGGTGGAATGC	701
Query	726	GTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTAOC TGGTCTGC AACTGACGCTGA	785
Subject	702	GTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTAOC TGGTCTGC AACTGACGCTGA	761
Query	766	GACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAOCTTGGTAGTCCA TGGCGTAAACGA	825
Subject	762	GACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAOCTTGGTAGTCCA TGGCGTAAACGA	821
Query	846	TGAGTGTCTAGGTGTTGG-AGGGTTTCGCCCTTCAGTGCCGAGCTAAAGCATTAAAGCAC	904
Subject	822	TGAGTGTCTAGGTGTTGGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCCGAGCTAAAGCATTAAAGCAC	881
Query	905	TCCGCC TGGG GAGTAOCAGCGCAAGGTGAAACTCAAAGGAA TTBACGGGGGCCGCACA	964
Subject	882	TCCGCC TGGG GAGTAOCAGCGCAAGGTGAAACTCAAAGGAA TTBACGGGGGCCGCACA	941
Query	965	AGCGGTGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT	1024
Subject	942	AGCGGTGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT	1000
Query	1025	CTTGGGCCAAOCTTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATG	1084
Subject	1001	CTTGGGCCAAOCTTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATG	1059
Query	1085	GTCGTCTCA GCTCGTGTCTGAGA-TGTTGGT	1117
Subject	1060	GTCGTCTCA GCTCGTGTCTGAGA-TGTTGGT	1092

Hình 3

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9039

Tên : Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*

Chủng: CECT562 (AJ575812)

Trạng thái: Dạng điển hình

Cấp đôi-tương tự: 100%

Query	83	GGT GCT TGCACCTGATTGATTTTG GTCTGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACAAGTA	142
Subject	1	GGT GCT TGCACCTGATTGATTTTG GTCTGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACAAGTA	60
Query	143	GGTAACCTGC CCAGAAGCGGGGACAA CATT TGGAAACAGATGCT AATACCGCAT AACAG	202
Subject	61	GGTAACCTGC CCAGAAGCGGGGACAA CATT TGGAAACAGATGCT AATACCGCAT AACAG	120
Query	203	CGT TGT TCGCATGAACAACGCTTAA AAGATGGCT TCTCGCTATCA CTTCTGGATGGACCT	262
Subject	121	CGT TGT TCGCATGAACAACGCTTAA AAGATGGCT TCTCGCTATCA CTTCTGGATGGACCT	180
Query	263	GCGGTGCATT AGCTTGT TGGTGGGGTAACGGGCTACCAAGGCGAT GATGCATAGCCGAGT	322
Subject	181	GCGGTGCATT AGCTTGT TGGTGGGGTAACGGGCTACCAAGGCGAT GATGCATAGCCGAGT	240
Query	323	TGAGAGACTG ATCGGCCACAA TGGGAC TGAGACACGGCCAT ACT CCTACGGGAGGCAGC	382
Subject	241	TGAGAGACTG ATCGGCCACAA TGGGAC TGAGACACGGCCAT ACT CCTACGGGAGGCAGC	300
Query	383	AGTAGGGAAT CTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACAC CGCGTGAGTGAAGAA	442
Subject	301	AGTAGGGAAT CTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACAC CGCGTGAGTGAAGAA	360
Query	443	GGGTTTCGGC TCGTAAGCTCTGT TGT TAAAGAAGAACACGTATG AGAGTAACTGTTCAT	502
Subject	381	GGGTTTCGGC TCGTAAGCTCTGT TGT TAAAGAAGAACACGTATG AGAGTAACTGTTCAT	420
Query	503	ACGTTGACGG TATTTAAOCAGAAAGTC ACGGCTAACTACG TGCCA GCAGCCGCGTAATA	562
Subject	421	ACGTTGACGG TATTTAAOCAGAAAGTC ACGGCTAACTACG TGCCA GCAGCCGCGTAATA	480
Query	563	CGTAGGTGGC AAGCGTTATCCGGAT TTATTGGGCGTAAAGAGAGT GCAGGCGGTTTCTA	622
Subject	481	CGTAGGTGGC AAGCGTTATCCGGAT TTATTGGGCGTAAAGAGAGT GCAGGCGGTTTCTA	540
Query	623	AGTCTGATGT GAAAGGCTTCGGCT TAAOCGAGAGTGCATCGGA AACTGGATAACTTGA	682
Subject	541	AGTCTGATGT GAAAGGCTTCGGCT TAAOCGAGAGTGCATCGGA AACTGGATAACTTGA	600
Query	683	GTGCAGAAAG GGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCG TAGATATATGGAAGA	742
Subject	601	GTGCAGAAAG GGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCG TAGATATATGGAAGA	660
Query	743	ACAACAGTGG CGAAGGCGGCTA OCTGGTCTGCAACTGACGCTGAG ACTCGAAAGCATGGG	802
Subject	661	ACAACAGTGG CGAAGGCGGCTA OCTGGTCTGCAACTGACGCTGAG ACTCGAAAGCATGGG	720
Query	803	TAGCGAACAG GATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCGTAAACGAT GAGTGCTAGGTGTTG	862
Subject	721	TAGCGAACAG GATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCGTAAACGAT GAGTGCTAGGTGTTG	780
Query	863	GAGGGTTTCC GCCCTTCAGTGCGG GAGCTAAAGCA TTAAGCACTC CGCCTGGGGAGTACG	922
Subject	781	GAGGGTTTCC GCCCTTCAGTGCGG GAGCTAAAGCA TTAAGCACTC CGCCTGGGGAGTACG	840
Query	923	ACC GCAAGGT TGA AACTCAAAGGAATT GACGGGGGCGCGACAAG CGGTGGAGCATGTGG	982
Subject	841	ACC GCAAGGT TGA AACTCAAAGGAATT GACGGGGGCGCGACAAG CGGTGGAGCATGTGG	900
Query	983	TTTAATTGGA AGCTACGCGAAGAA	1005
Subject	901	TTTAATTGGA AGCTACGCGAAGAA	924

Hình 4

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* PL9040

Tên : Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*

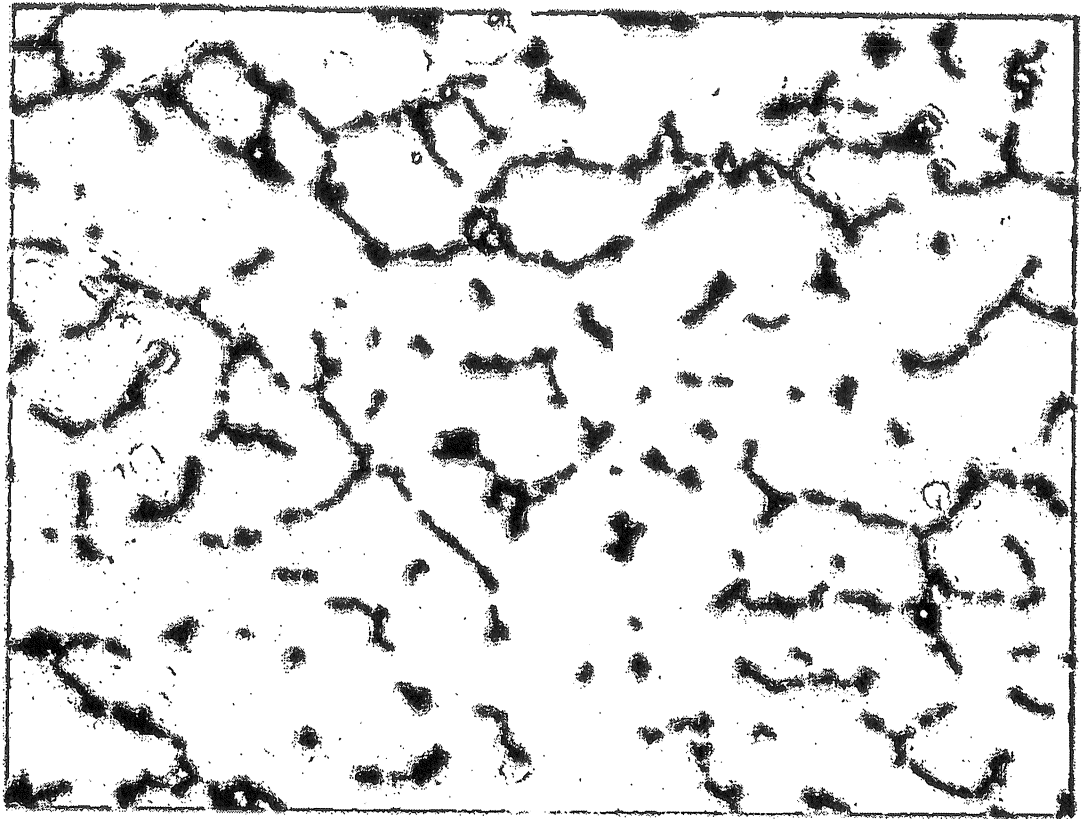
Chủng: CECT562 (AJ575812)

Trạng thái: Dạng điển hình

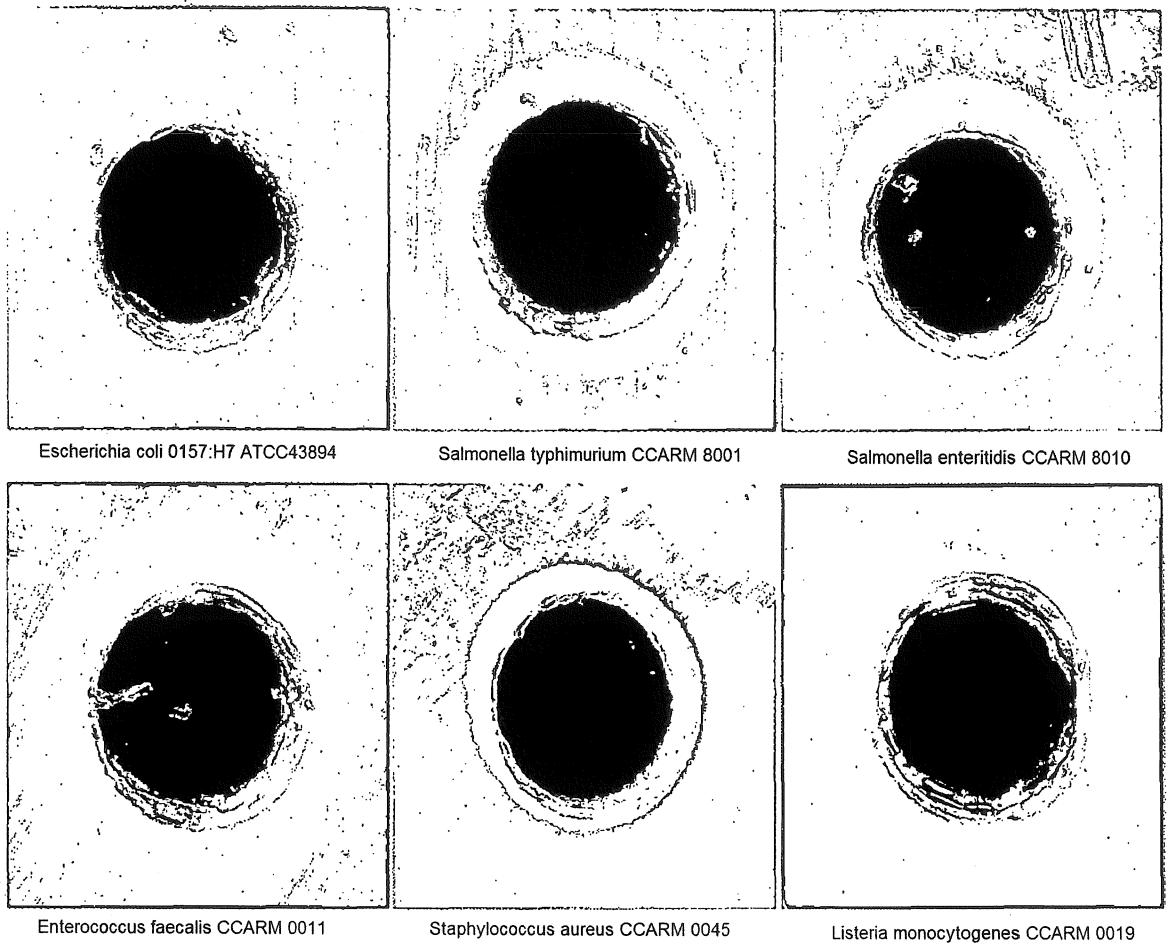
Cặp đôi-tương tự: 99,67%

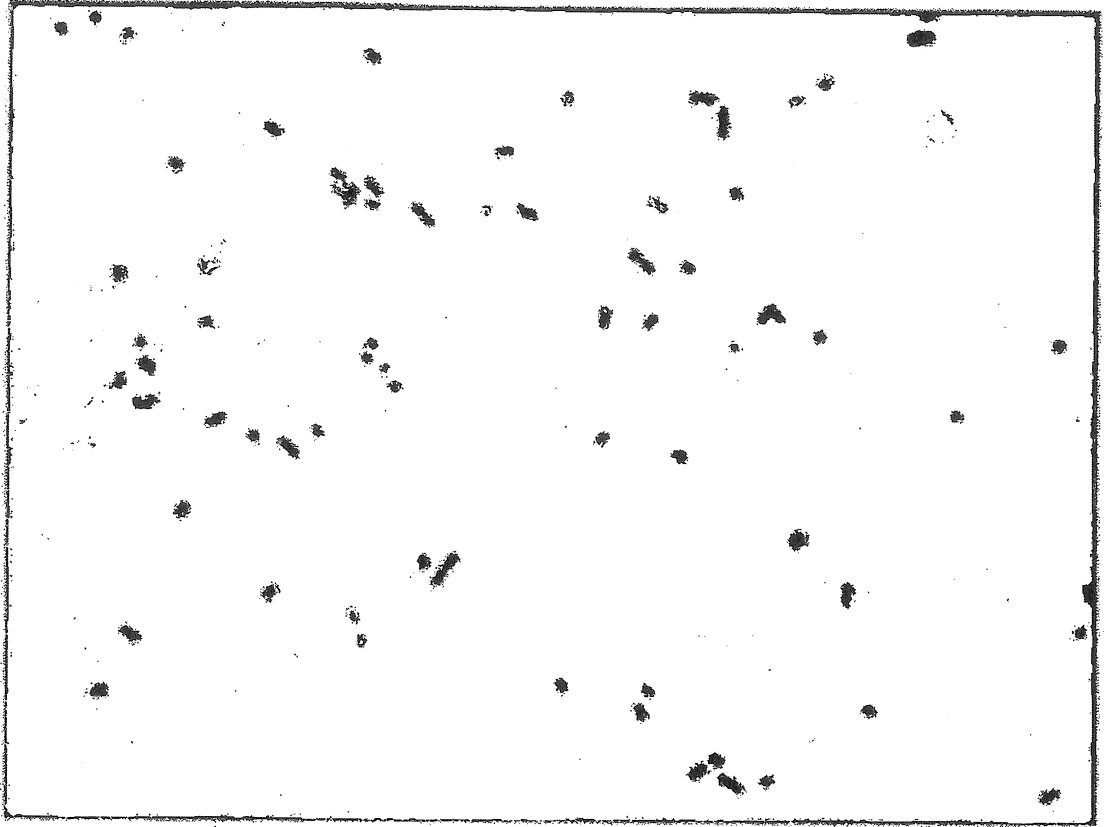
Query	50	TGCAAGTCGAA CCGGT TGGCCCAAT TGATTGA CCGT GCT TGCAOCT GAT TGAT TTTGGTC	109
Sbjct	1	TGCAAGTCGAA CCGGT TGGCCCAAT TGATTGA TGGT GCT TGCAOCT GAT TGAT TTTGGTC	60
Query	110	GCCAACGAGTG GCGGACCGGT GAGTA AACACGT AGGT AACCTGCCCA GAAGCGGGGACAA	169
Sbjct	61	GCCAACGAGTG GCGGACCGGT GAGTA AACACGT AGGT AACCTGCCCA GAAGCGGGGACAA	120
Query	170	CATT TGGAAC AGATGCTAAT AOCGCATAAC AGGT TGT TCGCATG AACAAOCTTAAAA	229
Sbjct	121	CATT TGGAAC AGATGCTAAT AOCGCATAAC AGGT TGT TCGCATG AACAAOCTTAAAA	180
Query	230	GATGGCTTCTC GCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCA TTAGCTTGTTGGTGGGGTA	289
Sbjct	181	GATGGCTTCTC GCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCA TTAGCTTGTTGGTGGGGTA	240
Query	290	ACGGCTAACA AGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATC GGCACAAATGGGAC	349
Sbjct	241	ATGGCTAACA AGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATC GGCACAAATGGGAC	300
Query	350	TGAGACACGGC CCA TACT OCTACGGGAGGCGACAGT AGGGAATCTT CCACAATGGCGCA	409
Sbjct	301	TGAGACACGGC CCA TACT OCTACGGGAGGCGACAGT AGGGAATCTT CCACAATGGCGCA	360
Query	410	AGGC TGA TGA GCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTT CCGCTCG TAAAGCTCTGT TGT	469
Sbjct	361	AGGC TGA TGA GCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTT CCGCTCG TAAAGCTCTGT TGT	420
Query	470	TAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTCATACGTTGACGGTAT TTAACCAGAAAGTC	529
Sbjct	421	TAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTCATACGTTGACGGTAT TTAACCAGAAAGTC	480
Query	530	ACGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCGCGGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGTATTCGGATTT	589
Sbjct	481	ACGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCGCGGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGTATTCGGATTT	540
Query	590	ATTGGCGTAA AGAGAGTGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAA	649
Sbjct	541	ATTGGCGTAA AGAGAGTGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAA	600
Query	650	CCGGAGAAGTG CATCGGAACTGGATAACTTGAGTGAGAGAGGG TAGTGGAACCTCAT	709
Sbjct	601	CCGGAGAAGTG CATCGGAACTGGATAACTTGAGTGAGAGAGGG TAGTGGAACCTCAT	660
Query	710	GTGTAGCGGTG GAATGCGTAGATATATGGAAGAACAACAGTGGCGA AGGCGGCTACCTGG	769
Sbjct	661	GTGTAGCGGTG GAATGCGTAGATATATGGAAGAACAACAGTGGCGA AGGCGGCTACCTGG	720
Query	770	TCTGCAACTGA CGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGGGAACAGGAT TAGATACCTGGTA	829
Sbjct	721	TCTGCAACTGA CGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGGGAACAGGAT TAGATACCTGGTA	780
Query	830	GTCATGCGGT AAACGATGAGTGCTAGGTGT TGGAGGGT TCCGCCCTTCAGTGCCGGAG	889
Sbjct	781	GTCATGCGGT AAACGATGAGTGCTAGGTGT TGGAGGGT TCCGCCCTTCAGTGCCGGAG	840
Query	890	CTAAAGCATTAGCAC TC CGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGT TGA AACTCAAAGGAATT	949
Sbjct	841	CTAAAGCATTAGCAC TC CGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGT TGA AACTCAAAGGAATT	900
Query	950	GAAGGGGGGCC 960	
Sbjct	901	GAAGGGGGGCC 911	

Hình 5

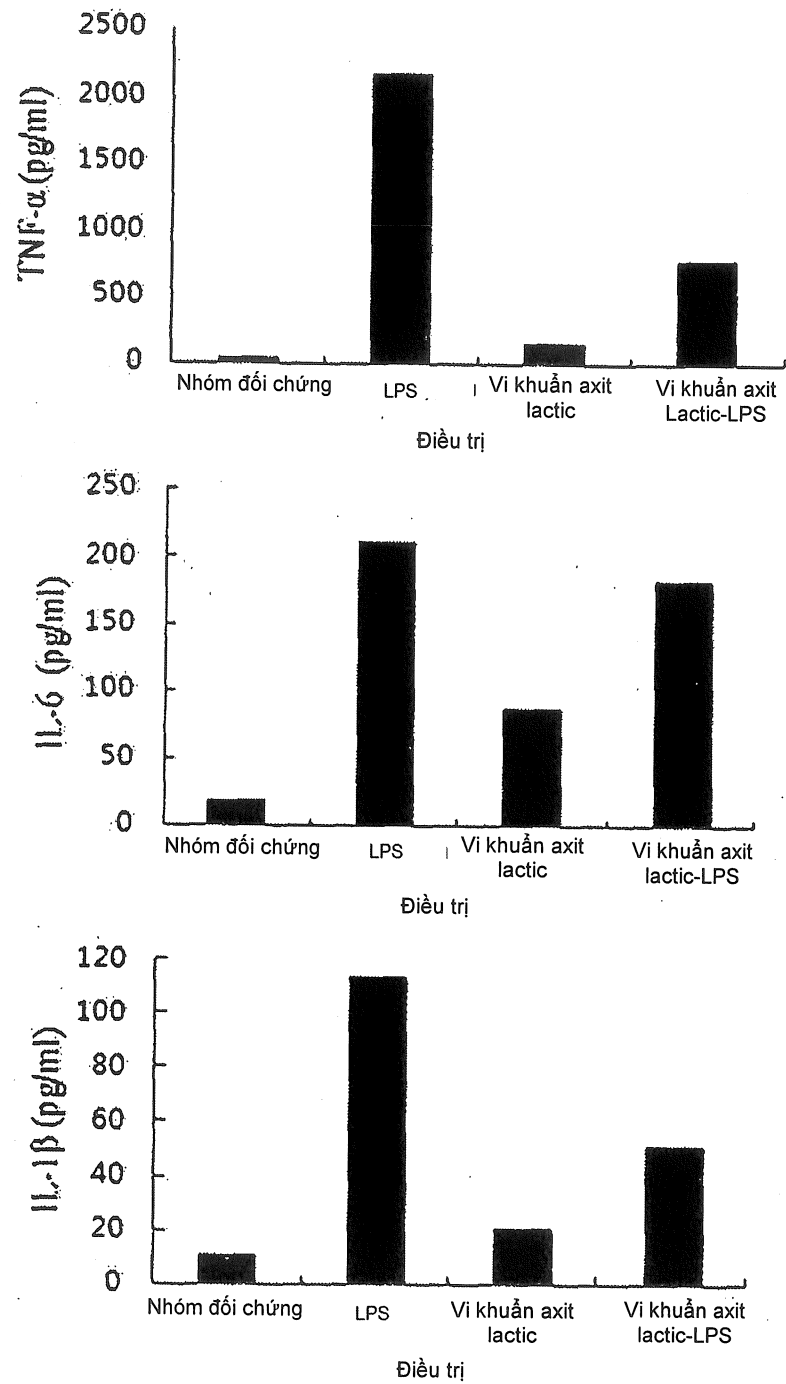


Hình 6

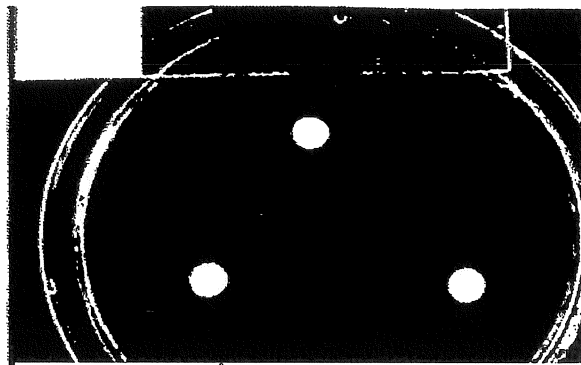
**Hình 7**



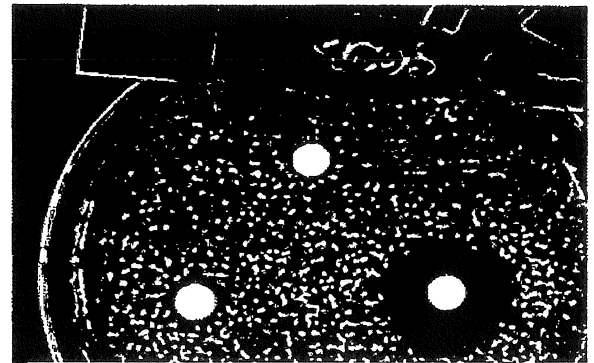
Hình 8



Hình 9



Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*
PL9988



Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*
PL9005

Trên cùng - nhóm đối chứng

Dưới và bên trái - 10mM thuốc diệt cỏ mạnh

Dưới và bên phải - 100mM thuốc diệt cỏ mạnh

Hình 10

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	PL BIO Co., LTD.	
<120>	Chủng vi khuẩn <i>Lactobacillus fermentum</i> PL9988, chế phẩm probiotic và thực phẩm bổ dưỡng bao gồm chủng này	
<130>	14FPO-07-06/ PCT	
<150>	10-2013-0086153	
<151>	2013-07-22	
<160>	5	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	1038	
<212>	ADN	
<213>	Chủng vi khuẩn <i>Lactobacillus fermentum</i>	
<400>	1	
ctacacatgc aagtcgaacg cgttgccca attgattgat ggtgcttgca cctgattgat		60
tttggtcgcc aacgagtggc ggacgggtga gtaacacgta ggtaacctgc ccagaagcgg		120
gggacaacat ttggaacag atgctaatac cgcataacaa cgttgctgc atgaacaacg		180
cttaaaagat ggcttctcgc tatcacttct ggatggacct gcggtgcatt agcttggttg		240
tggggtaatg gcctaccaag gcgatgatgc atagccgagt tgagagactg atcggccaca		300
atgggactga gacacggccc atactcctac gggaggcagc agtagggaat ctccacaat		360
gggcgcaagc ctgatggagc aacaccgcgt gagtgaagaa gggtttcggc tcgtaaagct		420
ctgttgtaa agaagaacac gtatgagagt aactgttcat acgttgacgg tatttaacca		480
gaaagtcacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttacc		540
cggatttatt gggcgtaaag agagtgcagg cggttttcta agtctgatgt gaaagccttc		600
ggcttaaccg gagaagtgc tgggaaactg gataactga gtgcagaaga gggtagtgga		660
actccatgtg tagcgggtgga atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc		720
tacctggtct gcaactgacg ctgagactcg aaagcatggg tagcgaacag gattagatac		780
cctggtagtc catgccgtaa acgatgagtg ctaggtgttg gagggtttcc gcccttcagt		840
gccggagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtagc accgcaaggt tgaaactcaa		900
aggaattgac gggggcccgcc acaagcgggtg gagcatgtgg tttaattcga agctacgcga		960
agaaccttac caggtcttga catcttgcgc caaccctaga gatagggcgt ttccttcggg		1020
aacgcaatga caggtggt		1038

<210> 2
 <211> 900
 <212> ADN
 <213> Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*

<400> 2

tgcaagtcca	acgcgttggc	ccaattgatt	gatggtgctt	gcacctgatt	gatttggtc	60
gccaacgagt	ggcggacggg	tgagtaacac	gtaggttaacc	tgcccagaag	cgggggacaa	120
catttggaag	cagatgctaa	taccgcataa	cagcgttggt	cgcataaaca	acgcttaaaa	180
gatggcttct	cgctatcact	tctggatgga	cctgcgggtgc	attagcttgt	tgggtgggta	240
acggcctacc	aaggcgatga	tgcatagccg	agttgagaga	ctgatcggcc	acatgggac	300
tgagacacgg	cccatactcc	tacgggaggg	agcagtaggg	aatcttcac	aatgggcgca	360
agcctgatgg	agcaacaccg	cgtgagtga	gaagggttc	ggctcgtaaa	gctctgttgt	420
taagaagaa	cacgtatgag	agtaactgtt	catacgttga	cggatttaa	ccagaaagtc	480
acggctaact	acgtgccagc	agccgcggta	atacgtaggt	ggcaagcgtt	atccggattt	540
attgggcgta	aagagagtgc	aggcggtttt	ctaagtctga	tgtgaaagcc	ttcggcttaa	600
ccggagaagt	gcatcggaag	ctggataact	tgagtgcaga	agagggtagt	ggaactccat	660
gtgtagcgg	ggaatcgta	gatatatgga	agaacaccag	tgcggaaggc	ggctacctgg	720
tctgcaactg	acgtgagac	tcgaaagcat	gggtagcgaa	caggattaga	taccctggta	780
gtccatgccg	taaacgatga	gtgctaggtg	ttggagggtt	tccgcccttc	agtccggag	840
ctaacgcatt	aagcactccg	cctgggggag	tacgaccgca	aggttgaaac	tcaaagggaat	900

<210> 3
 <211> 1050
 <212> ADN
 <213> Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*

<400> 3

ggccaattg	attgatggtg	cttgcacctg	attgattttg	gtcgccaacg	agtggccggac	60
gggtgagtaa	cacgtaggta	acctgcccag	aagcggggga	caacatttgg	aaacagatgc	120
taataccgca	taacagcgtt	gttcgcatga	acaacgctta	aaagatggct	tctcgtatc	180
acttctggat	ggacctgcgg	tgcattagct	tgttggtggg	gtaacggcct	accaaggcga	240
tgatgcatag	ccgagttgag	agactgatcg	gccacaatgg	gactgagaca	cggcccatat	300
cctacgggag	gcagcagtag	ggaatcttc	acaatgggcg	caagcctgat	ggagcaacac	360
cgcgtgagtg	aagaagggtt	tcggctcgta	aagctctgtt	gttaaagaag	aacacgtatg	420

agagtaactg	ttcatacggt	gacgggtat	aaccagaaag	tcacggctaa	ctacgtgcca	480
gcagccgcgg	taatacgtag	gtggcaagcg	ttatccggat	ttattgggcg	taaagagagt	540
gcaggcgggt	ttctaagtct	gatgtgaaag	ccttcggctt	aaccggagaa	gtgcatcgga	600
aactggataa	cttgagtgc	gaagagggta	gtggaactcc	atgtgtagcg	gtggaatgcg	660
tagatatatg	gaagaacacc	agtggcggaag	gcggctacct	ggcttgcaac	tgacgctgag	720
actcgaaagc	atgggtagcg	aacaggatta	gataccctgg	tagtccatgc	cgtaaacgat	780
gagtgcctagg	tggtgggagg	gtttccgccc	ttcagtgccg	gagctaacgc	attaagcact	840
ccgcctgggg	agtagcaccg	caaggttgaa	actcaagga	attgacgggg	gcccgcacaa	900
gcggtggagc	atgtggttta	attcgaagct	acgcgaagac	cttaccaggt	cttgacatct	960
gcgccaaccc	tagagatagg	gcgtttcctt	cgggaacgca	atgacagggtg	gtgcatggtc	1020
gtcgtcagct	cgtgtcgtga	gaatgtgggt				1050

<210> 4

<211> 924

<212> ADN

<213> Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*

<400> 4

ggtgcttgca	cctgattgat	tttggtcgcc	aacgagtggc	ggacgggtga	gtaacacgta	60
ggtaacctgc	ccagaagcgg	gggacaacat	ttggaaacag	atgctaatac	cgcataacag	120
cgtgttcgc	atgaacaacg	cttaaaagat	ggcttctcgc	tatcattct	ggatggacct	180
gcggtgcatt	agcttggtg	tggggtaacg	gcctaccaag	gcgatgatgc	atagccgagt	240
tgagagactg	atcgccacac	atgggactga	gacacggccc	atactcctac	gggaggcagc	300
agtagggaat	cttcacacat	gggcgcaagc	ctgatggagc	aacaccgcgt	gagtgaagaa	360
gggtttcggc	tcgtaaagct	ctgtgttaa	agaagaacac	gtatgagagt	aactgttcat	420
acgttgacgg	tatttaacca	gaaagtcacg	gctaactacg	tgccagcagc	cgcggttaata	480
cgtaggtggc	aagcgttate	cggatttatt	gggcgtaaag	agagtgcagg	cggttttcta	540
agtctgatgt	gaaagccttc	ggcttaaccg	gagaagtgc	tcggaaactg	gataacttga	600
gtgcagaaga	gggtagtgg	actccatgtg	tagcgggtga	atgcgtagat	atatggaaga	660
acaccagtgg	cgaaggcggc	tacctggtct	gcaactgacg	ctgagactcg	aaagcatggg	720
tagcgaacag	gattagatac	cctggtagtc	catgccgtaa	acgatgagtg	ctaggtgttg	780
gagggtttcc	gcccttcagt	gccggagcta	acgcattaag	cactccgcct	ggggagtagc	840
accgcaaggt	tgaactcaa	aggaattgac	gggggcccgc	acaagcggtg	gagcatgtgg	900
tttaattcga	agctacgcga	agaa				924

<210> 5
 <211> 911
 <212> ADN
 <213> Chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*

<400> 5

tgcaagtcga	acgcgttggc	ccaattgatt	gatggtgctt	gcacctgatt	gattttggtc	60
gccaacgagt	ggcggacggg	tgagtaacac	gtaggtaacc	tgcccagaag	cgggggacaa	120
catttgga	cagatgctaa	taccgcataa	caacgttgtt	cgcataaaca	acgcttaaaa	180
gatggcttct	cgctatcact	tctggatgga	cctgcggtgc	attagcttgt	tggtggggta	240
atggcctacc	aaggcgatga	tgcatagccg	agttgagaga	ctgatcggcc	acaatgggac	300
tgagacacgg	cccatactcc	tacgggaggg	agcagtaggg	aatcttcac	aatgggcgca	360
agcctgatgg	agcaacaccg	cgtgagtga	gaagggtttc	ggctcgtaaa	gctctgttgt	420
taaagaagaa	cacgtatgag	agtaactgtt	catacgttga	cggatattaa	ccagaaagtc	780
acggctaact	acgtgccagc	agccgcggta	atacgtaggt	ggcaagcgtt	atccggattt	540
attgggcgta	aagagagtgc	aggcggtttt	ctaagtctga	tgtgaaagcc	ttcggcttaa	600
ccggagaagt	gcatcggaaa	ctggataact	tgagtgcaga	agagggtagt	ggaactccat	660
gtgtagcgg	ggaatgcgta	gatatatgga	agaacaccag	tggcgaaggc	ggctacctgg	720
tctgcaactg	acgctgagac	tcgaaagcat	gggtagcgaa	caggattaga	taccctggta	780
gtccatgccg	taaacgatga	gtgctaggtg	ttggagggtt	tccgcccttc	agtgccggag	840
ctaacgcatt	aagcactccg	cctggggagt	acgaccgcaa	ggttgaaact	caaaggaatt	900
gacgggggcc	c					911