



(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)



1-0039275

(51)^{2016.01} C12N 1/20; A61K 35/745; C12N 11/00; (13) B
A23L 33/135; A61P 1/16

(21) 1-2019-04412

(22) 10/02/2017

(86) PCT/CN2017/073209 10/02/2017

(87) WO 2018/145294 16/08/2018

(45) 25/04/2024 433

(43) 30/01/2020 382A

(73) PERFECT (CHINA) CO., LTD. (CN)

Dongming North Road, Shiqi District, Zhongshan, Guangdong 528400, P.R. China

(72) ZHAO, Liping (CN); WU, Guojun (CN); ZHANG, Menghui (CN); ZHANG, Chenhong (CN); WU, Huan (CN).

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

(54) CHẾ PHẨM CHỨA CHỦNG BIFIDOBACTERIUM PSEUDOCATENULATUM
VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các chủng vi khuẩn probiotic *Bifidobacteria*, cụ thể là các chủng *B. pseudocatenulatum*, và mô tả việc sử dụng các chủng này làm các sản phẩm probiotic và sản phẩm thực phẩm, sản phẩm đồ ăn, sản phẩm bổ sung chất dinh dưỡng dùng cho ăn kiêng và dược phẩm chứa chúng. Các vi khuẩn này thích hợp để điều trị bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường và các tình trạng bệnh liên quan.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chủng *Bifidobacteria* và mô tả việc sử dụng chúng, các sản phẩm thực phẩm, sản phẩm thức ăn, sản phẩm bổ sung chất dinh dưỡng dùng cho ăn kiêng và dược phẩm chứa chúng và phương pháp tạo ra và sử dụng các sản phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn probiotic, thường được hiểu có nghĩa là “các vi sinh vật sống mà khi được sử dụng với lượng thích hợp sẽ tạo ra lợi ích về sức khỏe cho vật chủ”, đã được sử dụng rộng rãi để phòng ngừa và điều trị nhiều loại bệnh và có bằng chứng rõ rệt về hiệu quả của chúng trong một số trường hợp lâm sàng. Ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 2007/043933 mô tả việc sử dụng vi khuẩn probiotic để sản xuất các sản phẩm thực phẩm và sản phẩm thức ăn, các sản phẩm bổ sung chất dinh dưỡng dùng cho ăn kiêng, để kiểm soát sự tăng trọng lượng, phòng ngừa bệnh béo phì, làm gia tăng cảm giác no, kéo dài cảm giác no, làm giảm sự hấp thu thức ăn, làm giảm sự tích tụ chất béo, cải thiện sự chuyển hoá năng lượng, làm gia tăng tính nhạy insulin, điều trị bệnh béo phì và điều trị tính không nhạy insulin.

Công bố đơn quốc tế số WO 2009/024429 mô tả việc sử dụng chế phẩm sơ cấp chứa chất làm giảm lượng vi khuẩn phân giải protein, cụ thể là vi khuẩn trong ruột và/hoặc vi khuẩn khử sắt trong ruột để điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn chuyển hoá, hỗ trợ và/hoặc trợ giúp cho việc kiểm soát trọng lượng.

Công bố đơn quốc tế số WO 2009/004076 mô tả việc sử dụng vi khuẩn probiotic để chuẩn hoá nồng độ glucoza trong huyết tương, cải thiện tính nhạy insulin và làm giảm nguy cơ phát triển bệnh đái tháo ở phụ nữ mang thai và phòng ngừa bệnh đái tháo đường thời kỳ mang thai.

Công bố đơn quốc tế số WO 2009/021824 mô tả việc sử dụng vi khuẩn probiotic, cụ thể là *Lactobacillus rhamnosus*, để điều trị bệnh béo phì, điều trị các rối loạn chuyển hoá và trợ giúp cho việc giảm trọng lượng và/hoặc duy trì trọng lượng.

Công bố đơn quốc tế số WO 2008/016214 mô tả vi khuẩn axit lactic probiotic

thuộc chủng *Lactobacillus gasseri* BNR17 và sử dụng chủng này để ức chế sự tăng trọng lượng.

Công bố đơn quốc tế số WO 02/38165 mô tả việc sử dụng chủng *Lactobacillus* (cụ thể là *Lactobacillus plantarum*) để làm giảm các yếu tố nguy cơ có liên quan đến hội chứng chuyển hoá.

Công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2002/0037577 mô tả việc sử dụng vi sinh vật, như *Lactobacillus*, để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh béo phì hoặc bệnh đái tháo đường bằng cách làm giảm lượng monosacarit hoặc disacarit có thể được hấp thu vào cơ thể, bằng cách chuyển hoá các hợp chất này thành các chất polyme mà ruột không thể hấp thu được.

Tài liệu: Lee et al., J. Appl. Microbiol. 2007, 103, 1140-1146 mô tả hoạt tính chống béo phì của vi khuẩn sản sinh axit linoleic được liên hợp ở vị trí trans-10, cis-12 (CLA) thuộc chủng *Lactobacillus plantarum* PL62 ở chuột.

Tài liệu: Li et al., Hepatology, 2003, 37(2), 343-350 mô tả việc sử dụng các vi khuẩn probiotic và kháng thể kháng TNF trong mô hình chuột đối với bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu.

Công bố đơn sáng chế Mỹ số US2014/0369965 bộc lộ chủng *Bifidobacterium pseudocatenulatum* được phân lập từ phân của chuột khoẻ mạnh đang trong thời kỳ nuôi con bằng sữa. Tài liệu này còn bộc lộ việc sử dụng chủng này, cùng với các thành phần của tế bào của nó, các chất chuyển hoá và các phân tử được tiết ra và tổ hợp của chúng với các vi sinh vật khác để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh béo phì, thừa cân, tăng glucoza huyết và bệnh đái tháo đường, chứng nhiễm mỡ ở gan hoặc gan nhiễm mỡ, rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hoá, rối loạn chức năng hệ miễn dịch có liên quan đến tình trạng béo phì và thừa cân; và hỗn hợp không cân bằng của hệ vi sinh vật đường ruột liên quan đến tình trạng béo phì và thừa cân. Tuy nhiên, chủng này không có nguồn gốc từ người.

Đơn sáng chế quốc tế số PCT/CN2015/082887 bộc lộ các chủng *Bifidobacterium pseudocatenulatum* đã được phát hiện là có rất nhiều trong các mẫu phân của đối tượng phải can thiệp điều trị trong bệnh viện bằng chế độ ăn được thiết lập trên cơ sở các loại ngũ cốc nguyên cám, thực phẩm theo y học cổ truyền Trung Quốc và các chất xơ hòa tan (prebiotic) (chế độ ăn WTP). Sau khi can thiệp, các đối tượng này có sự giảm đáng kể về tình trạng suy giảm chuyển hóa ở cả trẻ nhỏ bị

chứng béo phì do di truyền và chứng béo phì đơn thuần sau 30 ngày can thiệp chế độ ăn. Tuy nhiên, mặc dù đã được phát hiện là có rất nhiều ở các đối tượng sau khi can thiệp chế độ ăn, các chứng này vẫn không được gia tăng đáng kể bằng cách can thiệp, hoặc để cải thiện tình trạng sức khỏe của các bệnh nhân.

Nói theo cách khác, các vi khuẩn probiotic hiện nay có nhiều hạn chế và vẫn có nhu cầu về các chủng vi sinh vật probiotic mới.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các cơ sở bộ gen về mức độ đáp ứng với sự can thiệp chế độ ăn của các vi khuẩn có lợi trong đường ruột của người vẫn chưa được xác định rõ ràng, điều này gây cản trở cho sự hoạt động chính xác của khu hệ vi sinh vật đối với sức khỏe của người. Sau khi tiếp nhận sự can thiệp chế độ ăn được làm giàu bằng các loại hydrat cacbon không tiêu hóa được trong 105 ngày, trẻ em bị chứng béo phì do di truyền có hội chứng Prader-Willi đã giảm 18,4% trọng lượng cơ thể và có sự cải thiện đáng kể về các thông số sinh học lâm sàng của mình. Năm thể phân lập (được gọi là PERFECT-2017-0001 có mã số truy cập CGMCC 13650, PERFECT-2017-0002 có mã số truy cập CGMCC 13651, PERFECT-2017-0003 có mã số truy cập CGMCC 13653, PERFECT-2017-0004 có mã số truy cập CGMCC 13654 và C95) của một trong số các loài được kích thích nhiều nhất, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, thu được từ mẫu phân sau khi can thiệp. Bất ngờ là năm chủng *B. pseudocatenulatum* này có mức độ đáp ứng khác biệt trong quá trình can thiệp. Hai chủng gần như không bị ảnh hưởng, trong khi ba chủng còn lại được kích thích đến mức độ khác nhau do sự thay đổi về nguồn hydrat cacbon trong chế độ ăn. Mức độ đáp ứng khác biệt của các chủng này là phù hợp với sự kết cụm chức năng của chúng dựa trên cơ sở dữ liệu COG (Cluster of Orthologous Group: cụm nhóm gen cùng nguồn), bao gồm các chủng liên quan đến hệ thống vận chuyển đường loại ABC, cho thấy rằng các biến thể bộ gen đặc hiệu với chủng có thể góp phần vào sự thích ứng với ổ sinh thái. Cụ thể, vi khuẩn *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0002, có các loại đa dạng nhất và số lượng bản sao gen cao nhất của các enzym có hoạt tính hydrat cacbon hướng đích các polysacarit thực vật, có mức chiếm ưu thế cao nhất sau khi can thiệp.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế mô tả việc sử dụng vi khuẩn thuộc giống *Bifidobacterium* hoặc hỗn hợp của nó để sản xuất sản phẩm thực phẩm, sản phẩm bổ

sung chất dinh dưỡng dùng cho ăn kiêng hoặc thuốc để điều trị bệnh béo phì, kiểm soát sự tăng trọng lượng và/hoặc làm giảm trọng lượng ở động vật có vú.

Theo khía cạnh khác, sáng chế bộc lộ chế phẩm chứa (1) chủng *Bifidobacterium pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0001 hoặc PERFECT-2017-0002, hoặc chủng tương tự ở mức cao, hoặc (2) chủng có nguồn gốc từ đó; (3) chất mang được dụng hoặc chất mang dùng cho ăn kiêng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế bộc lộ phương pháp tạo ra chế phẩm của sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm bước bào chế chủng *Bifidobacterium pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0001 hoặc PERFECT-2017-0002, hoặc chủng tương tự ở mức cao thành chế phẩm thích hợp.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm thừa cân, béo phì, tăng glucoza huyết, bệnh đái tháo đường, gan nhiễm mỡ, rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hoá, bệnh nhiễm khuẩn ở các đối tượng béo phì hoặc thừa cân và/hoặc chứng phì đại tế bào tạo mỡ, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng có nhu cầu sử dụng chế phẩm của sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm tình trạng béo phì đơn thuần hoặc chứng béo phì do di truyền, làm giảm sự suy giảm chuyển hoá hoặc làm giảm mức độ viêm và tích tụ chất béo ở đối tượng có nhu cầu, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng có nhu cầu sử dụng chế phẩm của sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp thiết lập các loài cơ sở để xác định cấu trúc của hệ sinh thái đường ruột khoẻ mạnh, tạo ra môi trường trong ruột bất lợi đối với vi khuẩn gây bệnh và gây hại, làm giảm nồng độ vi khuẩn đường ruột trong ruột so với đối chứng không được điều trị, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng có nhu cầu sử dụng chế phẩm của sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh đái tháo đường ở đối tượng cần điều trị, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng chế phẩm của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự cải thiện các thông số sinh học lâm sàng và các tình trạng viêm sau khi can thiệp (màu đỏ); các dấu hiệu nhân trắc học (màu xanh lá cây); sự cân

bằng nội môi lipit huyết tương (màu xanh da trời); sự cân bằng nội môi glucoza huyết tương (màu tím); các dấu hiệu liên quan đến tình trạng viêm; BMI: chỉ số khối của cơ thể; OGTT: thử nghiệm dung nạp glucoza đường uống; LBP: protein gắn kết lipopolysacarit.

Fig.2 thể hiện sự thay đổi của khu hệ vi sinh vật đường ruột trong quá trình can thiệp chế độ ăn. Hình A thể hiện các chế phẩm chứa khu hệ vi sinh vật đường ruột cấp độ giống ở 7 thời điểm. Hàng trên cùng thể hiện giá trị hệ số Shannon và hàng dưới cùng thể hiện tỷ lệ phần trăm của mỗi giống. Theo mức độ chiếm ưu thế trung bình, 15 giống hàng đầu được đánh dấu bằng tên phân loại của chúng. Hình B thể hiện mức độ chiếm ưu thế khác biệt của 5 chủng *B. pseudocatenulatum*. Giai đoạn I: từ ngày 0 đến ngày 60, sự can thiệp chế độ ăn cơ bản; Giai đoạn II: từ ngày 60 đến ngày 75, sự can thiệp cơ bản + tăng 100g sản phẩm công thức số 3; Giai đoạn III: giảm sản phẩm công thức số 1 + tăng 100g sản phẩm công thức số 3.

Fig.3 thể hiện mối tương quan giữa sự thay đổi của các thông số lâm sàng với mức độ chiếm ưu thế của năm chủng *B. pseudocatenulatum*. Hệ số tương quan Spearman được tính toán. * giá trị P được điều chỉnh $< 0,05$; ** giá trị P được điều chỉnh $< 0,01$ (Benjamini & Hochberg 1995).

Fig.4 thể hiện cụm gen trong phân loại các gen cùng nguồn (COG) từ các gen cùng nguồn của chủng *B. pseudocatenulatum*. Đối với mỗi COG, tỷ lệ phần trăm trung bình trong số sáu bộ gen *B. pseudocatenulatum* hoàn chỉnh được xác định.

Fig.5 thể hiện các biến thể bộ gen trong số các chủng *B. pseudocatenulatum*. Hình A thể hiện số liệu so sánh trên biểu đồ dấu chấm theo cặp trên cơ sở sự đóng thẳng hàng trình tự bộ gen bằng chương trình MUMmer trong số sáu bộ gen *B. pseudocatenulatum* hoàn chỉnh. Hình B là biểu đồ Venn thể hiện số lượng nhóm gen lỗi và nhóm gen đặc biệt trong mỗi chủng.

Fig.6 thể hiện sự phân bố của các COG lỗi có sự chênh lệch về số lượng bản sao với ít nhất 2 bản sao. Biểu đồ nhiệt thể hiện số lượng bản sao của các gen được giải thích dưới dạng hàm số COG cụ thể. Các chủng được kết cụm bằng phương pháp liên kết Ward với khoảng cách Euclidean.

Fig.7 thể hiện các thông số sinh học lâm sàng thay đổi trong quá trình can thiệp (màu đỏ); các dấu hiệu nhân trắc học (màu xanh lá cây); sự cân bằng nội môi lipit huyết tương (màu xanh da trời), sự cân bằng nội môi glucoza huyết tương (màu tím);

các dấu hiệu liên quan đến tình trạng viêm; SAA: protein dạng tinh bột huyết thanh A; CRP: protein có khả năng phản ứng C.

Fig.8 thể hiện mức độ chiếm ưu thế của 9 loài *Bifidobacterium* được xác định trong quần thể vi sinh vật đường ruột vào ngày 105.

Fig.9 thể hiện đường cong của toàn bộ bộ gen và bộ gen lõi của chủng *B. pseudocatenulatum*. Hình A thể hiện số lượng các gen tích tụ trong toàn bộ bộ gen của chủng *B. pseudocatenulatum* được thể hiện trên biểu đồ dấu chấm so với số lượng bộ gen được thêm vào. Hàm toán học nội suy cũng được biểu thị. Hình B thể hiện số lượng gen tích tụ giảm đặc trưng cho bộ gen lõi được thể hiện trên đồ thị dấu chấm so với số lượng bộ gen được thêm vào. Hàm toán học nội suy cũng được báo cáo.

Fig.10 thể hiện các bản đồ vật lý của các cụm gen *eps* được dự đoán từ sáu bộ gen hoàn chỉnh của chủng *B. pseudocatenulatum*. Các gen được thể hiện dưới dạng các mũi tên có màu theo chức năng tiềm tàng của chúng.

Fig.11 thể hiện sự phân bố của các COG đặc biệt hoặc có thể bỏ qua trong sáu bộ gen của chủng *B. pseudocatenulatum*. Bản đồ nhiệt cho thấy số lượng bản sao của các gen được chú thích dưới dạng hàm COG cụ thể. Các chủng được kết cụm bằng phương pháp liên kết Ward với khoảng cách Jaccard.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện được các chủng *B. pseudocatenulatum* có thể làm giảm chứng béo phì đơn thuần hoặc chứng béo phì do di truyền, làm giảm mức độ thoái biến do chuyển hoá và làm giảm mức độ viêm và tích tụ chất béo ở động vật có vú. Các chủng *B. pseudocatenulatum* của sáng chế, một mình hoặc kết hợp với các vi sinh vật probiotic khác, khi được thiết lập trong ruột, có tác dụng làm các loài cơ sở để xác định cấu trúc của hệ sinh thái ruột khoẻ mạnh, ví dụ, bằng cách tạo ra môi trường ruột bất lợi đối với các vi khuẩn gây bệnh và vi khuẩn gây hại, có thể thông qua sự sản sinh axetat gia tăng.

Như được mô tả chi tiết hơn dưới đây, các chủng *B. pseudocatenulatum* của sáng chế được phân lập từ các đối tượng được can thiệp khi điều trị trong bệnh viện bằng chế độ ăn đã được công bố từ trước trên cơ sở ngũ cốc nguyên cám, thực phẩm theo y học cổ truyền Trung Quốc và prebiotic (chế độ ăn WTP) (S. Xiao *et al.*, A gut microbiota-targeted dietary intervention for amelioration of chronic inflammation

underlying metabolic syndrome. *FEMS Microbiol Ecol* **87**, 357 (Feb, 2014). Sau khi can thiệp, các đối tượng này có sự giảm đáng kể về mức độ thoái biến do chuyển hoá ở trẻ nhỏ với cả chứng béo phì do di truyền và chứng béo phì đơn thuần sau 30 ngày can thiệp chế độ ăn.

Như được mô tả chi tiết trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, các tác giả sáng chế đã thu được một cách thành công số lượng lớn các chủng thuộc loài cơ sở theo sáng chế, được xác định như *B. pseudocatenulatum*. Các thể phân lập làm đại diện là chủng PERFECT-2017-0001 và PERFECT-2017-0002, được lưu trữ ở Trung tâm bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Trung Quốc (China General Microbiological Culture Collection Center-CGMCC) vào ngày 23 tháng 1 năm 2017, với các mã số truy cập tương ứng là CGMCC 13650 và CGMCC 13651.

Các chủng probiotic theo sáng chế có thể được nuôi cấy, duy trì và nhân giống bằng cách sử dụng các phương pháp được thiết lập đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, một số phương pháp trong số các phương pháp này được minh họa trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Vi khuẩn được sử dụng trong sáng chế là chủng *Bifidobacterium pseudocatenulatum* hoặc hỗn hợp của nó. Tốt hơn nếu vi khuẩn *Bifidobacterium* được sử dụng trong sáng chế là chủng *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0001 hoặc PERFECT-2017-0002.

Vi khuẩn có thể được sử dụng ở dạng bất kỳ có khả năng tạo ra hiệu quả được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn nếu vi khuẩn là vi khuẩn còn sống.

Vi khuẩn có thể bao gồm toàn bộ vi khuẩn hoặc có thể bao gồm các thành phần của vi khuẩn. Ví dụ về các thành phần như vậy bao gồm các thành phần của vách tế bào của vi khuẩn như peptidoglycan, các axit nucleic của vi khuẩn như ADN và ARN, các thành phần màng của vi khuẩn và các thành phần cấu trúc của vi khuẩn như protein, hydrat cacbon, lipid và hỗn hợp của các thành phần này như lipoprotein, glycolipit và glycoprotein.

Vi khuẩn cũng có thể là hoặc theo cách khác bao gồm các sản phẩm chuyển hoá của vi khuẩn. Trong bản mô tả này, thuật ngữ 'sản phẩm chuyển hoá của vi khuẩn' bao gồm tất cả các phân tử được tạo ra hoặc được cải biến bởi vi khuẩn (probiotic) nhờ sự chuyển hoá của vi khuẩn trong quá trình sinh trưởng, sống sót, tồn lưu, chuyển tiếp hoặc sự tồn tại của vi khuẩn trong quá trình sản xuất sản phẩm

probiotic và bảo quản và trong quá trình đi qua đường dạ dày-ruột ở động vật có vú. Các ví dụ bao gồm tất cả các axit hữu cơ, axit vô cơ, bazơ, protein và peptit, các enzym và co-enzym, các axit amin và axit nucleic, hydrat cacbon, lipit, glycoprotein, lipoprotein, glycolipit, vitamin, tất cả các hợp chất có hoạt tính sinh học, các sản phẩm chuyển hoá chứa thành phần vô cơ và tất cả các phân tử nhỏ, ví dụ, các phân tử nitơ hoặc các phân tử chứa axit sulfuro. Tốt hơn là vi khuẩn bao gồm toàn bộ vi khuẩn, tốt hơn nữa là toàn bộ vi khuẩn còn sống.

Tốt hơn là vi khuẩn *Bifidobacterium* được sử dụng theo sáng chế là vi khuẩn thích hợp cho việc sử dụng của người và/hoặc động vật. Theo sáng chế, vi khuẩn *Bifidobacterium* được sử dụng có thể thuộc cùng một dạng (loài và chủng) hoặc có thể bao gồm hỗn hợp của các loài và/hoặc các chủng.

Các vi khuẩn *Bifidobacterium* thích hợp được chọn từ các loài *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium adolescentis*, và *Bifidobacterium angulatum*, và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Như được thể hiện trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, *Lactobacillus mucosae*, cụ thể là chủng tương tự ở mức cao với chủng *L. mucosae* 32, được tăng lên ở mức cao sau khi can thiệp chế độ ăn. Do đó, một vi khuẩn được ưu tiên để sử dụng kết hợp với chủng *B. pseudocatenulatum* theo sáng chế là *L. mucosae*, cụ thể là chủng 32.

Theo một phương án, vi khuẩn được sử dụng theo sáng chế là vi khuẩn probiotic. Trong bản mô tả này, thuật ngữ 'vi khuẩn probiotic' được xác định là gồm vi khuẩn không gây bệnh bất kỳ mà khi được sử dụng sẽ sống với lượng thích hợp, tạo ra lợi ích về sức khoẻ cho vật chủ. Các chủng probiotic này thường có khả năng sống sót khi đi qua phần trên của đường tiêu hoá. Chúng là vi khuẩn không gây bệnh, không độc và tạo ra tác dụng có lợi của chúng đối với sức khoẻ, một mặt thông qua các tương tác sinh thái với hệ thực vật cư trú trong đường tiêu hoá và mặt khác thông qua khả năng của chúng tác động đến hệ miễn dịch theo cách tích cực thông qua mô dạng lympho liên quan với ruột (gut-associated lymphoid tissue: GALT). Tùy thuộc vào sự định nghĩa của probiotic, các vi khuẩn này, khi được sử dụng với lượng đủ, có khả năng sống sót khi đi qua ruột, tuy nhiên, chúng không đi qua màng ngăn ruột và

do đó tác dụng chính của chúng được thực hiện trong lòng và/hoặc thành của đường dạ dày-ruột. Sau đó, chúng tạo ra một phần hệ thực vật cư trú trong khoảng thời gian sử dụng. Quá trình tạo khuẩn lạc này (hoặc quá trình tạo khuẩn lạc tạm thời) cho phép vi khuẩn probiotic tạo ra tác dụng có lợi, như ngăn chặn các vi sinh vật gây bệnh tiềm ẩn có mặt trong hệ thực vật và các tương tác với hệ miễn dịch của ruột.

Theo một số phương án, vi khuẩn *Bifidobacterium* được sử dụng trong sáng chế cùng với vi khuẩn thuộc giống *Lactobacillus*. Tổ hợp của vi khuẩn *Bifidobacterium* và *Lactobacillus* theo sáng chế có tác dụng hiệp đồng trong một số ứng dụng (nghĩa là tác dụng lớn hơn so với tác dụng cộng tính của vi khuẩn khi được sử dụng theo cách riêng biệt). Ví dụ, các tổ hợp mà, ngoài việc có tác dụng đối với động vật có vú dưới dạng các thành phần đơn lẻ, có thể có tác dụng có lợi đối với các thành phần khác của tổ hợp này, ví dụ, bằng cách tạo ra các chất chuyển hoá mà sau đó lại được sử dụng làm nguồn năng lượng bởi các thành phần khác của tổ hợp này, hoặc duy trì các tình trạng bệnh lý có lợi cho các thành phần khác.

Thông thường, vi khuẩn *Lactobacillus* được chọn từ các loài *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbreuckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gassed*, *Lactobacillus johnsonii* và *Lactobacillus jensenii*, và các hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án được ưu tiên, vi khuẩn *Lactobacillus* được sử dụng trong sáng chế là *Lactobacillus probiotic*. Tốt hơn là vi khuẩn *Lactobacillus* được sử dụng trong sáng chế thuộc loài *Lactobacillus acidophilus*.

Liều và cách sử dụng

Việc sử dụng vi khuẩn probiotic có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ có khả năng đưa sinh vật vào đường tiêu hoá. Vi khuẩn có thể được trộn với chất mang và được bổ sung vào thức ăn dạng lỏng hoặc dạng rắn hoặc nước uống. Chất mang này phải là chất không độc đối với vi khuẩn và động vật. Tốt hơn là chất mang chứa thành phần thúc đẩy khả năng sống sót của vi khuẩn trong quá trình bảo quản. Vi

khuẩn cũng có thể được tạo ra dưới dạng bột nhão dùng để cấy truyền cần được bơm trực tiếp vào miệng động vật. Dạng sản phẩm này có thể chứa các thành phần bổ sung để cải thiện vị ngon, cải thiện thời hạn sử dụng, tạo ra các lợi ích về dinh dưỡng và đặc điểm tương tự. Nếu cần tạo ra liều dùng được định lượng và có thể lặp lại, vi khuẩn có thể được sử dụng qua ống thông dạ dày. Lượng vi khuẩn probiotic cần được sử dụng được kiểm soát bằng các yếu tố tác động đến hiệu quả. Khi được sử dụng trong thức ăn hoặc nước uống, liều dùng có thể được phân bố trong khoảng thời gian nhiều ngày hoặc thậm chí nhiều tuần. Tác dụng tích tụ của các liều thấp được sử dụng trong vài ngày có thể lớn hơn so với một liều lớn duy nhất của nó. Bằng cách theo dõi số lượng chủng *Salmonella* gây bệnh salmonella trong phân của người trước, trong khi và sau khi sử dụng vi khuẩn probiotic chiếm ưu thế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định dễ dàng mức liều dùng cần thiết để làm giảm lượng của chủng *Salmonella* gây ra bệnh salmonella ở người được mang bởi động vật. Một hoặc nhiều chủng vi khuẩn probiotic chiếm ưu thế có thể được sử dụng cùng nhau. Hỗn hợp của các chủng này có thể có lợi do các động vật riêng biệt có thể khác với chủng ổn định nhất trong đối tượng đã nêu.

Bifidobacterium pseudocatenulatum được sử dụng theo sáng chế có thể chứa từ 10^6 đến 10^{12} CFU vi khuẩn/g chất nền và cụ thể hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^{12} CFU vi khuẩn/g chất nền, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10^9 đến 10^{12} CFU/g đối với dạng đông khô nhanh.

Thích hợp nếu vi khuẩn *B. pseudocatenulatum* có thể được sử dụng với liều dùng nằm trong khoảng từ khoảng 10^6 đến khoảng 10^{12} CFU vi sinh vật/liều, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 10^8 đến khoảng 10^{12} CFU vi sinh vật/liều. Thuật ngữ "mỗi liều" có nghĩa là lượng của vi sinh vật này được cung cấp cho đối tượng mỗi ngày hoặc mỗi lần sử dụng, tốt hơn là mỗi ngày. Ví dụ, nếu vi sinh vật cần được sử dụng trong sản phẩm thực phẩm (ví dụ, trong sữa chua) - thì tốt hơn là sữa chua này sẽ chứa từ khoảng 10^8 đến 10^{12} CFU vi sinh vật. Tuy nhiên, theo cách khác, lượng vi sinh vật này có thể được chia nhỏ thành nhiều lần sử dụng, mỗi lần gồm lượng vi sinh vật nhỏ hơn - miễn là tổng lượng vi sinh vật mà đối tượng nhận được trong thời gian cụ thể bất kỳ (chẳng hạn, mỗi 24 giờ) nằm trong khoảng từ khoảng 10^6 đến khoảng 10^{12} CFU vi sinh vật, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 10^8 đến 10^{12} CFU vi sinh vật.

Theo sáng chế, lượng hữu hiệu của ít nhất một chủng vi sinh vật có thể ít nhất là 10^6 CFU vi sinh vật/liều, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 10^6 đến khoảng 10^{12} CFU vi sinh vật/liều, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ khoảng 10^8 đến khoảng 10^{12} CFU vi sinh vật/liều.

Theo một phương án, chủng *B. pseudocatenulatum* có thể được sử dụng với liều dùng nằm trong khoảng từ khoảng 10^6 đến khoảng 10^{12} CFU vi sinh vật/ngày, tốt là nằm trong khoảng từ khoảng 10^8 đến khoảng 10^{12} CFU vi sinh vật/ngày. Do đó, theo phương án này, lượng hữu hiệu có thể nằm trong khoảng từ khoảng 10^6 đến khoảng 10^{12} CFU vi sinh vật/ngày, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 10^8 đến khoảng 10^{12} CFU vi sinh vật/ngày.

CFU là từ viết tắt của "đơn vị tạo khuẩn lạc". Thuật ngữ "chất nền" có nghĩa là sản phẩm thực phẩm, sản phẩm bổ sung chất dinh dưỡng dùng cho ăn kiêng hoặc chất nền được dùng.

Khi *Bifidobacteria* được sử dụng theo sáng chế cùng với vi khuẩn probiotic khác, vi khuẩn này có thể có mặt với tỷ lệ bất kỳ có khả năng đạt được hiệu quả mong muốn của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này.

Đối tượng/chỉ định y khoa

Chủng *B. pseudocatenulatum* được sử dụng cho động vật có vú bao gồm, ví dụ, gia súc (bao gồm cả trâu-bò, ngựa, lợn, gà và cừu) và người. Theo một số khía cạnh của sáng chế, động vật có vú là động vật nuôi làm bạn (bao gồm cả thú cưng), ví dụ như chó hoặc mèo. Theo một số khía cạnh của sáng chế, thích hợp nếu đối tượng có thể là người.

Chủng *B. pseudocatenulatum* có thể thích hợp để điều trị nhiều bệnh hoặc tình trạng bệnh ở động vật có vú (cụ thể là người). Trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị" hoặc "việc điều trị" để chỉ việc sử dụng bất kỳ chủng *B. pseudocatenulatum* của sáng chế để (1) ngăn không cho bệnh cụ thể xuất hiện ở động vật có vú mà đối tượng này có thể có xu hướng mắc bệnh nhưng vẫn chưa mắc hoặc biểu hiện bệnh lý hoặc triệu chứng của bệnh (bao gồm cả việc phòng ngừa một hoặc nhiều yếu tố nguy cơ có liên quan đến bệnh này); (2) ức chế bệnh ở động vật có vú đang mắc bệnh hoặc biểu hiện bệnh lý hoặc triệu chứng của bệnh này hoặc (3) cải thiện bệnh ở động vật có vú đang mắc bệnh hoặc biểu hiện bệnh lý hoặc triệu chứng của bệnh.

Chủng *B. pseudocatenulatum* của sáng chế thích hợp để sử dụng cho động vật

có vú mắc cả bệnh đái tháo đường và béo phì. Chúng cũng có thể thích hợp đối với động vật có vú mắc bệnh đái tháo đường và không béo phì, cũng như động vật có vú béo phì có các yếu tố nguy cơ đối với bệnh đái tháo đường, nhưng vẫn chưa mắc bệnh đái tháo đường. Khía cạnh này được bàn luận chi tiết hơn dưới đây.

Như được mô tả chi tiết hơn trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, chủng *B. pseudocatenulatum* của sáng chế có nhiều hoạt tính sinh học. Cụ thể, *Bifidobacteria* được sử dụng trong sáng chế có khả năng chuẩn hoá tính nhạy insulin, làm gia tăng mức độ tiết insulin khi no, làm giảm mức độ tiết insulin khi đói, cải thiện mức độ dung nạp glucoza ở động vật có vú. Các tác dụng này tạo ra khả năng sử dụng để điều trị bệnh đái tháo đường và các tình trạng bệnh liên quan đến bệnh đái tháo đường (cụ thể là bệnh đái tháo đường Typ 2 và tình trạng suy giảm khả năng dung nạp glucoza).

Ngoài ra, *Bifidobacteria* được sử dụng trong sáng chế có thể làm giảm trọng lượng và làm giảm khối lượng chất béo của cơ thể (cụ thể là khối lượng chất béo ở mạc treo ruột). Các tác dụng này tạo ra khả năng sử dụng để điều trị bệnh béo phì và kiểm soát sự tăng trọng lượng và/hoặc gây ra sự giảm trọng lượng ở động vật có vú.

Cụ thể, như được mô tả chi tiết hơn trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, *Bifidobacteria* được sử dụng kết hợp với vi khuẩn *Lactobacillus* (cụ thể là vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus*) theo sáng chế có khả năng gây ra sự giảm trọng lượng và làm giảm khối lượng chất béo trong cơ thể (cụ thể là khối lượng chất béo ở mạc treo ruột). Các tác dụng này tạo ra khả năng sử dụng để điều trị bệnh béo phì và kiểm soát sự tăng trọng lượng và/hoặc gây ra sự giảm trọng lượng ở động vật có vú.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ bệnh béo phì có liên quan đến chỉ số khối của cơ thể (body mass index: BMI). Chỉ số khối của cơ thể (BMI) (được tính toán bằng cách lấy trọng lượng tính theo kg chia cho bình phương chiều cao tính theo mét) là phép đo được chấp nhận phổ biến nhất đối với sự thừa cân và/hoặc béo phì. BMI vượt quá 25 được cho là thừa cân. Béo phì được xác định khi BMI bằng hoặc lớn hơn 30, với BMI bằng 35 hoặc lớn hơn được cho là béo phì mắc cùng trạng thái bệnh trầm trọng và BMI bằng 40 hoặc lớn hơn được cho là béo phì mắc bệnh.

Như được nêu trên đây, khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "béo phì" bao gồm béo phì, béo phì mắc cùng trạng thái bệnh và béo phì mắc bệnh. Do đó, khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "béo phì" có thể được xác định là đối

tượng có chỉ số BMI lớn hơn hoặc bằng 30. Theo một số phương án, thích hợp nếu đối tượng béo phì có thể có chỉ số BMI lớn hơn hoặc bằng 30, thích hợp nếu chỉ số này bằng 35, thích hợp nếu chỉ số này bằng 40.

Trong khi chế phẩm của sáng chế đặc biệt thích hợp để sử dụng ở các bệnh nhân mắc cả bệnh đái tháo đường và béo phì, chế phẩm này cũng thích hợp cho các bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường nhưng không mắc bệnh béo phì. Chế phẩm này cũng có thể thích hợp để sử dụng cho các bệnh nhân béo phì có các yếu tố nguy cơ đối với bệnh đái tháo đường, nhưng vẫn chưa mắc bệnh đái tháo đường, do có thể dự đoán rằng người béo phì (nhưng không đái tháo đường), có thể làm giới hạn các hậu quả chuyển hoá về bệnh béo phì, nghĩa là bệnh đái tháo đường hoặc ít nhất là sự phát triển tình trạng kháng insulin.

Ngoài ra, *Bifidobacteria* được sử dụng theo sáng chế có thể được dùng để điều trị hội chứng chuyển hoá ở động vật có vú. Hội chứng chuyển hoá là sự kết hợp của các rối loạn y học làm gia tăng nguy cơ phát triển bệnh tim mạch và bệnh đái tháo đường. Hội chứng chuyển hoá cũng được gọi là hội chứng chuyển hoá X, hội chứng X, hội chứng kháng insulin, hội chứng Reaven hoặc CHAOS (Úc).

Chứng béo phì do di truyền

Theo các phương án khác, *Bifidobacteria* (và *Lactobacilli*, nếu có) được sử dụng trong sáng chế có thể được dùng để làm giảm tình trạng viêm mô (cụ thể là, mặc dù không loại trừ, tình trạng viêm mô gan, viêm mô cơ và/hoặc viêm mô mỡ) ở động vật có vú.

Các ví dụ về bệnh tim mạch có thể điều trị bằng cách sử dụng *Bifidobacteria* (và *Lactobacilli*, nếu có) theo sáng chế bao gồm phình mạch, viêm họng, xơ vữa động mạch, tai biến mạch máu não (đột quỵ), bệnh mạch máu não, suy tim do xung huyết (congestive heart failure: CHF), bệnh động mạch vành, nhồi máu cơ tim (đau tim) và bệnh mạch ngoại vi.

Trong phạm vi bảo hộ của sáng chế, dự định rằng các phương án của sáng chế có thể được kết hợp sao cho tổ hợp của dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu được mô tả trong bản mô tả này đều nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Cụ thể, trong phạm vi bảo hộ của sáng chế, dự định rằng tác dụng bất kỳ trong số các tác dụng điều trị của vi khuẩn có thể được thể hiện đồng thời.

Chế phẩm

Trong khi có thể sử dụng chủng *B. pseudocatenulatum* một mình theo sáng chế (nghĩa là không có chất nền, chất pha loãng hoặc tá dược bất kỳ), chủng *B. pseudocatenulatum* của sáng chế được sử dụng theo cách thông thường và tốt hơn là được sử dụng trên hoặc trong chất nền làm một phần của sản phẩm, cụ thể là làm thành phần của sản phẩm thực phẩm, sản phẩm bổ sung chất dinh dưỡng dùng cho ăn kiêng hoặc dược phẩm. Các sản phẩm này thường chứa các thành phần bổ sung đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Sản phẩm bất kỳ có thể có lợi từ chế phẩm này có thể được sử dụng trong sáng chế. Các sản phẩm này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thực phẩm, cụ thể là mút trái cây và thực phẩm làm từ sữa và các sản phẩm có nguồn gốc từ thực phẩm làm từ sữa và sản phẩm dược. Chủng *B. pseudocatenulatum* theo sáng chế có thể được gọi ở đây là "chế phẩm theo sáng chế" hoặc "chế phẩm".

Thực phẩm

Theo một phương án, chủng *B. pseudocatenulatum* của sáng chế được sử dụng trong sản phẩm thực phẩm như thực phẩm bổ sung, đồ uống hoặc bột trên cơ sở sữa. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thực phẩm" được sử dụng theo nghĩa rộng và bao gồm thực phẩm dùng cho người cũng như thức ăn dùng cho động vật (nghĩa là thức ăn chăn nuôi). Theo khía cạnh được ưu tiên, thực phẩm để sử dụng cho người.

Thực phẩm có thể ở dạng dung dịch hoặc dạng rắn-tùy thuộc vào mục đích và/hoặc chế độ thực hiện và/hoặc chế độ sử dụng. Khi được sử dụng ngay, hoặc trong quá trình chế biến thực phẩm, như thực phẩm chức năng, chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều thành phần trong số: chất mang chấp nhận được về mặt dinh dưỡng, chất pha loãng chấp nhận được về mặt dinh dưỡng, tá dược chất nhận được về mặt dinh dưỡng, chất phụ trợ chấp nhận về mặt dinh dưỡng, thành phần có hoạt tính về mặt dinh dưỡng.

Bằng cách ví dụ, chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng làm thành phần cho đồ uống mềm, nước ép trái cây hoặc đồ uống chứa protein nước sữa, trà có lợi cho sức khỏe, đồ uống cacao, đồ uống sữa và đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic, sữa chua và sữa chua uống, pho mát, kem, nước đá và món tráng miệng, bánh kẹo, bánh quy và bánh hỗn hợp, đồ ăn nhanh, thực phẩm và đồ uống cân bằng, nhân trái cây, lớp nước đá, nhân bánh sô cô la, nhân tạo hương bánh pho mát, nhân tạo hương bánh trái cây,

bánh và bánh rán, kem dùng làm nhân bánh, chất độn dùng để nấu ăn, nhân bánh sử dụng được ngay, chất độn giảm calo, đồ uống dinh dưỡng dùng cho người trưởng thành, đồ uống đậu nành/trái cây có vị chua, đồ uống sô cô la vô trùng/thanh trùng, hỗn hợp dạng thanh, bột dùng cho đồ uống, sữa đậu nành/sữa không đường và sữa sô cô la giàu canxi, nước uống cà phê giàu canxi.

Chế phẩm theo sáng chế còn có thể được sử dụng làm thành phần trong các sản phẩm thực phẩm như nước sốt phó mát Hoa Kỳ, chất chống vón cục dùng cho phó mát cứng và nghiền, lát nhúng, phó mát kem, kem chua không chứa chất béo ở lớp mặt trên hỗn hợp khô, kem hỗn hợp làm từ sữa đông lạnh/tan băng, kem lớp mặt ổn định đông lạnh/tan băng, phó mát dày tự nhiên chất béo ít hoặc không đáng kể, sữa chua loại của Thụy Sĩ ít chất béo, món tráng miệng đông lạnh có ga, kem gói cứng, nhân hiệu thân thiện, tính kinh tế và niềm đam mê được cải thiện của kem gói cứng, kem ít chất béo, kem tươi, nước sốt nướng, nước sốt phó mát, thêm bơ vào thịt băm viên, nước sốt Alfredo hỗn hợp khô, nước sốt phó mát hỗn hợp, nước sốt cà chua hỗn hợp khô và các sản phẩm khác.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sản phẩm làm từ sữa" có nghĩa là bao gồm môi trường chứa sữa có nguồn gốc từ động vật và/hoặc thực vật. Sữa có nguồn gốc từ động vật có thể được đề cập là sữa bò, sữa cừu, sữa dê hoặc sữa trâu. Sữa có nguồn gốc từ thực vật có thể được đề cập là chất có thể lên men bất kỳ có nguồn gốc từ thực vật có thể được sử dụng theo sáng chế, cụ thể là có nguồn gốc từ đậu nành, lúa gạo hoặc ngũ cốc.

Theo các khía cạnh nhất định, tốt hơn là sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với việc sản xuất sữa chua, như đồ uống sữa chua lên men, sữa chua, sữa chua dạng uống, phó mát, kem lên men, sữa được tạo thành chủ yếu từ đồ tráng miệng và các sản phẩm khác.

Thích hợp nếu chế phẩm của sáng chế còn có thể được sử dụng làm thành phần trong một hoặc nhiều ứng dụng về phó mát, thịt hoặc các ứng dụng chứa môi trường nuôi cấy bảo vệ.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra thực phẩm hoặc thành phần thực phẩm, phương pháp này bao gồm bước trộn chế phẩm theo sáng chế với thành phần thực phẩm khác.

Có lợi nếu sáng chế đề cập đến sản phẩm đã được cho tiếp xúc với chế phẩm

của sáng chế (và tùy ý là với các thành phần/hoạt chất khác), trong đó chế phẩm này được sử dụng với lượng có khả năng cải thiện các lợi ích về dinh dưỡng và/hoặc sức khỏe của sản phẩm.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "được cho tiếp xúc" để chỉ việc sử dụng gián tiếp hoặc trực tiếp chế phẩm của sáng chế cho sản phẩm. Ví dụ về các phương pháp sử dụng có thể được dùng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xử lý sản phẩm trong nguyên liệu chứa chế phẩm, sử dụng trực tiếp bằng cách trộn chế phẩm với sản phẩm, phun chế phẩm lên bề mặt của sản phẩm hoặc nhúng sản phẩm trong khi tạo ra chế phẩm này.

Khi sản phẩm theo sáng chế là thực phẩm, tốt hơn là chế phẩm theo sáng chế được trộn với sản phẩm này. Theo cách khác, chế phẩm có thể được đưa vào ở dạng nhũ tương hoặc các thành phần thô của thực phẩm. Theo cách khác nữa, chế phẩm có thể được sử dụng dưới dạng gia vị, lớp băng, hỗn hợp tạo màu và dạng tương tự.

Chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng để phân tán, phủ và/hoặc ngâm sản phẩm với lượng vi sinh vật có kiểm soát.

Tốt hơn là chế phẩm được sử dụng để lên men sữa hoặc sữa giàu sucroza hoặc môi trường lactic có sucroza và/hoặc maltoza, trong đó môi trường tạo thành chứa tất cả các thành phần của chế phẩm-nghĩa là vi sinh vật nêu trên theo sáng chế-có thể được bổ sung dưới dạng thành phần vào sữa chua với nồng độ thích hợp, ví dụ như với nồng độ trong sản phẩm cuối để tạo ra liều hàng ngày nằm trong khoảng từ 10^6 đến 10^{10} cfu. Vi sinh vật theo sáng chế có thể được sử dụng trước hoặc sau khi lên men sữa chua.

Theo một số khía cạnh, vi sinh vật theo sáng chế được sử dụng dưới dạng, hoặc trong khi tạo ra, thức ăn dùng cho động vật, như thức ăn gia súc, cụ thể là thức ăn dùng cho gia cầm (như gà) hoặc thức ăn dùng cho thú cưng.

Có lợi nếu sản phẩm là sản phẩm thực phẩm, chủng *B. pseudocatenulatum* theo sáng chế cần duy trì hiệu quả cho đến "thời hạn sử dụng" hoặc "hạn sử dụng" mà trong đó sản phẩm thực phẩm được bán bởi nhà bán lẻ. Tốt hơn là thời gian có hiệu quả sẽ kéo dài qua các ngày như vậy cho đến khi kết thúc khoảng thời gian tươi thông thường khi sự hư hỏng của thực phẩm trở nên rõ ràng. Khoảng thời gian mong muốn và thời hạn sử dụng bình thường sẽ thay đổi giữa các loại thực phẩm và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rằng khoảng thời hạn sử dụng sẽ thay đổi

phụ thuộc vào loại thực phẩm, kích thước của thực phẩm, nhiệt độ bảo quản, điều kiện chế biến, vật liệu bao gói và thiết bị bao gói.

Thành phần của thực phẩm, thực phẩm bổ sung và thực phẩm chức năng

Chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng làm thành phần của thực phẩm và/hoặc thành phần của thức ăn. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thành phần của thực phẩm" hoặc "thành phần của thức ăn" bao gồm các thành phần là hoặc có thể được bổ sung vào thực phẩm chức năng hoặc sản phẩm thực phẩm làm sản phẩm bổ sung dinh dưỡng. Thành phần của thực phẩm có thể ở dạng dung dịch hoặc dạng rắn-tùy thuộc vào mục đích và/hoặc chế độ thực hiện và/hoặc chế độ sử dụng.

Chế phẩm của sáng chế có thể là-hoặc có thể được bổ sung vào-thực phẩm bổ sung (còn được gọi ở đây là sản phẩm bổ sung dùng cho ăn kiêng).

Chế phẩm của sáng chế có thể là-hoặc có thể được bổ sung vào-thực phẩm chức năng. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thực phẩm chức năng" có nghĩa là thực phẩm không chỉ có khả năng tạo ra hiệu quả về dinh dưỡng mà còn có khả năng tạo ra hiệu quả có lợi khác cho người tiêu dùng.

Do đó, các thực phẩm chức năng là thực phẩm thông thường có các thành phần hoặc hoạt chất (như các thành phần được mô tả trong bản mô tả này) được kết hợp vào các thực phẩm này để mang lại chức năng cụ thể cho thực phẩm này-ví dụ, lợi ích về y học hoặc sinh lý-chứ không phải hiệu quả dinh dưỡng đơn thuần. Một số thực phẩm chức năng là dược phẩm dinh dưỡng. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "dược phẩm dinh dưỡng" có nghĩa là thực phẩm không chỉ có khả năng tạo ra hiệu quả về dinh dưỡng và/hoặc sự thoải mái về vị, mà còn có khả năng tạo ra hiệu quả điều trị (hoặc lợi ích khác) cho người tiêu dùng. Các dược phẩm dinh dưỡng vượt qua ranh giới phân chia truyền thống giữa thực phẩm và thuốc.

Thuốc

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thuốc" bao gồm các thuốc để sử dụng cho cả người và động vật trong thuốc dùng cho người và thuốc thú y. Ngoài ra, khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thuốc" có nghĩa là chất bất kỳ tạo ra hiệu quả điều trị và/hoặc có lợi. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thuốc" không nhất thiết chỉ giới hạn các chất mà cần phải có sự chấp thuận

của thị trường, mà có thể bao gồm các chất có thể được sử dụng trong thẩm mỹ, dược phẩm dinh dưỡng, thực phẩm (bao gồm thức ăn và đồ uống chẳng hạn), môi trường nuôi cấy probiotic và các sản phẩm tự nhiên. Ngoài ra, khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thuốc" bao gồm cả sản phẩm được thiết kế để kết hợp vào thức ăn cho động vật, ví dụ, thức ăn gia súc và/hoặc đồ ăn cho thú cưng.

Dược phẩm

Chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng ngay-hoặc trong quá trình bào chế dược phẩm. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "dược phẩm" được sử dụng theo nghĩa rộng-và bao gồm các dược phẩm dùng cho người cũng như dược phẩm dùng cho động vật (nghĩa là sử dụng trong thú y). Theo khía cạnh được ưu tiên, dược phẩm để sử dụng cho người và/hoặc nghề chăn nuôi. Dược phẩm này có thể dùng cho mục đích điều trị-mà bản chất có thể là chữa khỏi hoặc làm giảm hoặc phòng ngừa. Thậm chí, dược phẩm này có thể dùng cho mục đích chẩn đoán.

Chất nền dược dụng có thể là, ví dụ, chất nền ở dạng viên nén được ép, viên nén, viên nang, thuốc mỡ, thuốc đạn hoặc dung dịch uống được. Các dạng thích hợp khác được thể hiện dưới đây.

Khi được sử dụng ngay hoặc trong quá trình bào chế dược phẩm, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều thành phần trong số: chất mang dược dụng, chất pha loãng dược dụng, tá dược dược dụng, chất hỗ trợ dược dụng, thành phần có hoạt tính dược lý. Dược phẩm có thể ở dạng dung dịch hoặc dạng rắn-tùy thuộc vào mục đích và/hoặc chế độ thực hiện và/hoặc chế độ sử dụng.

Ví dụ về các chất mang chấp nhận được về mặt dinh dưỡng để sử dụng trong khi bào chế các dạng này bao gồm, ví dụ, nước, dung dịch nước muối, rượu, silicon, sáp, vazolin, dầu thực vật, polyetylen glycol, propylen glycol, liposom, đường, gelatin, lactoza, amyloza, magie stearat, bột talc, chất hoạt động bề mặt, axit silixic, parafin nhớt, dầu thơm, monoglyxerit của axit béo và diglyxerit, este của axit béo và ete dầu mỏ, hydroxymetyl xenluloza, polyvinylpyrrolidon và chất tương tự.

Đối với huyền phù trong nước và/hoặc cồn ngọt, chế phẩm của sáng chế có thể được kết hợp với các chất tạo ngọt hoặc chất tạo hương vị khác nhau, chất tạo màu hoặc thuốc nhuộm, với các chất nhũ hóa và/hoặc chất tạo huyền phù và với các chất pha loãng như nước, propylen glycol và glyxerin và các hỗn hợp của chúng. Các dạng này cũng có thể bao gồm viên nang gelatin; viên nang dạng sợi, viên nén dạng sợi,

v.v.; hoặc thậm chí là đồ uống dạng sợi. Các ví dụ khác về dạng này bao gồm kem. Theo một số khía cạnh, vi sinh vật được sử dụng theo sáng chế có thể được sử dụng trong dược phẩm và/hoặc kem mỹ phẩm như kem chống nắng và/hoặc kem sau khi đi nắng chẳng hạn.

Hỗn hợp với prebiotic

Chế phẩm của sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều prebiotic. Các prebiotic là loại thực phẩm chức năng, được định nghĩa là thành phần thực phẩm không tiêu hoá được mà tác động có lợi đến vật chủ bằng cách kích thích chọn lọc sự sinh trưởng và/hoặc hoạt tính của một hoặc số lượng giới hạn vi khuẩn trong ruột kết và do đó cải thiện sức khoẻ của vật chủ. Thông thường, các prebiotic là hydrat cacbon (như oligosacarit), nhưng định nghĩa này không loại trừ các prebiotic không phải hydrat cacbon. Dạng phổ biến nhất của các prebiotic được phân loại về mặt dinh dưỡng là sợi có thể hoà tan. Với phạm vi nhất định, nhiều dạng chất xơ có hiệu quả của prebiotic ở mức độ nhất định.

Theo một phương án, prebiotic là thành phần được lên men chọn lọc để cho phép các thay đổi đặc hiệu, cả về thành phần và/hoặc hoạt tính trong hệ vi sinh vật đường dạ dày-ruột để tạo ra các lợi ích về sức khoẻ và thể trạng của vật chủ.

Thích hợp nếu prebiotic có thể được sử dụng theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100 g/ngày, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50 g/ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20 g/ngày. Theo một phương án, prebiotic có thể được sử dụng theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100 g/ngày, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 9 g/ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 8 g/ngày. Theo phương án khác, prebiotic có thể được sử dụng theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 50 g/ngày, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 25 g/ngày.

Các ví dụ về các nguồn prebiotic dùng cho ăn kiêng bao gồm đậu nành, các nguồn inulin (như atisô Jerusalem, jicama, và rễ cây rau diếp xoăn), yến mạch thô, lúa mì chưa tinh chế, lúa mạch chưa tinh chế và sắn đất. Ví dụ về các prebiotic thích hợp bao gồm alginat, xanthan, pectin, gồm đậu locust (LBG), inulin, gồm guar, galacto-oligosacarit (GOS), fructo-oligosacarit (FOS), polydextroza (nghĩa là Litesse®), lactitol, lactosucroza, oligosacarit đậu nành, isomaltuloza (Palatinose.TM.), isomalto-oligosacarit, gluco-oligosacarit, xylo-oligosacarit, mano-oligosacarit, beta-glucan,

xenlobioza rafinoza, gentiobioza, melibioza, xylobioza, xyclodextrin, isomaltoza, trehaloza, stachyoza, panoza, pululan, verbascoza, galactomanan và tất cả các dạng tinh bột dạng bền. Ví dụ được đặc biệt ưu tiên về prebiotic là polydextroza.

Theo một số phương án, hỗn hợp của chủng *B. pseudocatenulatum* theo sáng chế và các prebiotic theo sáng chế có tác dụng hiệp đồng trong các ứng dụng nhất định (nghĩa là hiệu quả lớn hơn tác dụng cộng tính của vi khuẩn khi được sử dụng riêng rẽ).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Bằng chứng gần đây chỉ ra rằng sự rối loạn vi khuẩn của khu hệ vi sinh vật đường ruột đóng vai trò then chốt trong các bệnh ở người như bệnh béo phì và các bệnh đái tháo đường (1, 2). Các thành viên cụ thể của khu hệ vi sinh vật đường ruột với sự đóng góp nguyên nhân gây ra các kiểu hình bệnh/sức khỏe có thể không chỉ dùng làm một công cụ mạnh để chẩn đoán bệnh (3, 4) mà còn làm đích để làm giảm/điều trị bệnh thông qua nhiều phương pháp khác nhau như được chất (5), cấy vi sinh vật trong phân (6) và chế độ ăn (7). Tuy nhiên, do sự phức tạp và sự khác biệt giữa các đối tượng của chính khu hệ vi sinh vật đường ruột và sự tương tác của nó với vật chủ và chế độ ăn (8), sự hoạt động chính xác của khu hệ vi sinh vật đường ruột để đạt được sức khỏe tối ưu cho người cần sự hiểu biết cặn kẽ hơn ở cấp độ bộ gen và cấp độ phân tử.

Theo một trong số các nghiên cứu trước đây của tác giả sáng chế về sự can thiệp chế độ ăn, đã phát hiện được rằng chế độ ăn giàu hydrat cacbon không tiêu hóa được nhưng có thể lên men, bao gồm các loại ngũ cốc nguyên cám, thực phẩm theo y học cổ truyền Trung Quốc và prebiotic (chế độ ăn WTP), không chỉ làm thay đổi đáng kể khu hệ vi sinh vật đường ruột mà còn cải thiện các thông số sinh học lâm sàng và các tình trạng viêm ở trẻ em bị chứng béo phì do di truyền với hội chứng Prader-Willi (9). Một loài vi khuẩn có lợi cụ thể, *B. pseudocatenulatum* được làm giàu đáng kể sau khi can thiệp, có tương quan tiêu cực với các loài gây hại tiềm tàng khác và có liên quan tích cực đến sự cải thiện các thông số lâm sàng của vật chủ (9).

Một trẻ em từ nhóm nghiên cứu đó đã kết thúc quá trình can thiệp trong thời gian 105 ngày. Các thông số sinh học lâm sàng của trẻ này đã được cải thiện, với mức giảm cân ban đầu trên 25,8kg, cùng với sự thay đổi đáng kể về quần thể vi khuẩn

đường ruột như sự tăng lượng vi khuẩn *Faecalibacterium*, *Lactobacillus* và *Bifidobacterium spp.* Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng *B. pseudocatenulatum* là loài chiếm ưu thế nhất trong *Bifidobacterium* sau khi can thiệp. Bất ngờ là các tác giả sáng chế đã phân lập năm chủng từ mẫu phân của đứa trẻ vào ngày 105 (10) và các chủng này có các sự đáp ứng khác biệt với chế độ can thiệp giàu hydrat cacbon. Để hiểu các tính trạng di truyền liên quan đến sự thích ứng của vi khuẩn với ổ sinh thái trong hệ sinh thái của ruột và sự tương tác với vật chủ và chế độ ăn (11), các tác giả sáng chế đã thực hiện phân tích các bộ gen so sánh trên chủng *B. pseudocatenulatum*.

Kết quả và bàn luận

Các thông số sinh học lâm sàng được cải thiện và khu hệ vi sinh vật đường ruột được thay đổi

Các biến số sinh học lâm sàng của trẻ em mắc bệnh béo phì được cải thiện trong quá trình can thiệp (Fig.1 và Fig.7). Trọng lượng giảm từ 140,1kg đến 114,3kg và cả sự cân bằng nội môi glucoza và lipit trong huyết tương được cải thiện đến khoảng bình thường. Hai dấu hiệu viêm toàn thân, protein có khả năng phản ứng C (CRP) và protein dạng tinh bột huyết thanh A (SAA), đã giảm đi sau khi can thiệp. Nồng độ adiponectin tăng từ 2,17 $\mu\text{g/ml}$ đến 5,39 $\mu\text{g/ml}$ và nồng độ leptin giảm từ 63,82 ng/ml đến 34,47 ng/ml, cho thấy sự giảm bớt kiểu hình “có nguy cơ” (12). Ngoài ra, protein gắn kết lipopolysaccharit (LBP), dấu ấn thay thế cho tải lượng kháng nguyên của vi khuẩn trong máu (13), đã giảm đi.

Các tác giả sáng chế đã thu được 25,2 $\pm$ 4,8 triệu (trung bình $\pm$ s.d.) dữ liệu đọc từ hai đầu chất lượng cao trên mỗi mẫu phân ở 7 thời điểm (0, 15, 30, 45, 60, 75 và 105 ngày) bằng kỹ thuật giải trình tự bộ gen meta. Chế phẩm chứa khu hệ vi sinh vật đường ruột được thay đổi trong quá trình can thiệp (Fig.2A) và cho thấy các mẫu khác nhau đáp ứng với ba giai đoạn can thiệp (giai đoạn I: can thiệp cơ bản từ ngày 0 đến ngày 60, giai đoạn II: can thiệp cơ bản + tăng 100g sản phẩm công thức số 3 từ ngày 60 đến ngày 75, giai đoạn III: giảm sản phẩm công thức số 1 + tăng 100g sản phẩm công thức số 3 từ ngày 75 đến ngày 105, xem các phương pháp để biết chi tiết). Tần suất đi đại tiện của trẻ em mắc bệnh béo phì ở các giai đoạn khác nhau là tương tự (trung bình, 3 đến 4 lần mỗi ngày), và không xuất hiện sự tiêu chảy. Tính đa dạng của quần thể đã giảm đi trong quá trình can thiệp, điều này là phù hợp với những thay đổi

của đối tượng (9). Ở thời điểm ban đầu, *Ruminococcus* và *Blautia* là hai giống có mức độ chiếm ưu thế nhất, tương ứng là 26,95% và 18,41%. Trong khi đó, *Bacteroides* và *Prevotella* có mức độ chiếm ưu thế thấp, cho thấy rằng quần thể này có thể thuộc về enterotyp 3 (14). Sau khi can thiệp, *Ruminococcus* và *Blautia* giảm đến mức chiếm ưu thế thấp, trong khi *Bacteroides* và *Prevotella* gần như không bị ảnh hưởng bởi sự can thiệp. So với mức ban đầu, *Faecalibacterium*, đã được thông báo là loài kháng viêm (15, 16) và vi khuẩn hội sinh có lợi (5), tăng lên ở giai đoạn I, với mức độ chiếm ưu thế của nó đạt 41,95% vào ngày 15. Sự gia tăng mạnh của *Faecalibacterium* có thể góp phần làm giảm bớt mức độ viêm trong 15 ngày đầu tiên, khi CRP và SAA giảm còn 33,37% và 50,85% tương ứng, trong khoảng thời gian này. *Faecalibacterium* giảm đến mức chiếm ưu thế thấp trong giai đoạn II và III, khi cung cấp thêm các oligosacarit. Mặt khác, *Lactobacillus*, được cung cấp đầy đủ để chuyển hóa các oligosacarit (17), có mức độ chiếm ưu thế thấp ở thời điểm ban đầu và trong giai đoạn I, nhưng trở thành một trong các giống chiếm ưu thế nhất bắt đầu từ giai đoạn II. Một số nghiên cứu đã thông báo các tác dụng có lợi của chủng *Lactobacillus* đối với khả năng kháng insulin (18, 19). Sự tăng mạnh *Lactobacillus* có thể góp phần vào sự cải thiện tính nhạy insulin từ giai đoạn II như được thể hiện bởi sự giảm đáng kể AUC (diện tích dưới đường cong) của insulin theo OGTT và làm ổn định AUC của glucoza theo OGTT trong khoảng thời gian này. Mức độ chiếm ưu thế của *Bifidobacterium*, có khả năng chuyển hóa nhiều loại hydrat cacbon khác nhau thông qua con đường nội bào và ngoại bào (20), trở nên rõ rệt từ ngày 15 và vẫn là một giống chiếm ưu thế hơn hẳn trong toàn bộ thời gian can thiệp: tăng từ 27,47% khi trẻ tiếp nhận chế độ can thiệp cơ bản, đến 65,53% vào ngày 75, sau đó giảm đến 36,41% khi giảm sản phẩm công thức số 1 chứa các chất xơ phức hợp được cung cấp. Các kết quả này cho thấy rằng quần thể *Bifidobacterium* đáp ứng với sự thay đổi về các nguồn hydrat cacbon được cung cấp trong ba giai đoạn, và trong mỗi giai đoạn, nó chiếm một vị trí sinh thái ưu việt. Căn cứ vào các tác dụng có lợi đã biết của các chủng *Bifidobacterium* đối với bệnh béo phì (21, 22), vai trò thiết yếu của chúng trong mạng lưới tương tác thuộc nghiên cứu theo thời gian trước đây của các tác giả sáng chế (9) và mức độ chiếm ưu thế cao được duy trì của chúng trong quá trình can thiệp, các tác giả sáng chế dự đoán rằng chúng có thể góp phần vào sự giảm cân liên tục, BMI, chu vi vòng eo và chu vi vòng hông. Do đó, các tác giả sáng chế đã thực hiện phân tích sâu hơn về giống này.

Tổng cộng, chín loài *Bifidobacterium* được xác định trong các mẫu sau can thiệp (Fig.8). Trong số các mẫu này, *B. pseudocatenulatum* chiếm ưu thế nhất, với mức độ chiếm ưu thế là 29,36% trong toàn bộ khu hệ vi sinh vật đường ruột vào ngày 105. Mức độ chiếm ưu thế của *B. longum*, *B. breve* và *B. adolescentis* lần lượt là 9,94%, 7,61% và 3,75%, và năm loài khác có mức độ chiếm ưu thế thấp hơn 1%.

Mức độ đáp ứng khác biệt của các chủng *B. pseudocatenulatum* với sự can thiệp

Để nghiên cứu chi tiết về quần thể *B. pseudocatenulatum*, các tác giả sáng chế đã phân lập và giải trình tự hoàn chỉnh năm chủng *B. pseudocatenulatum* (sau đây được xác định là các chủng PERFECT-2017-0001, PERFECT-2017-0002, PERFECT-2017-0003, PERFECT-2017-0004 và C95 (23)) từ mẫu phân được thu gom từ các đối tượng nghiên cứu vào ngày 105 (10). Sự thay đổi về mức độ chiếm ưu thế của năm chủng này tại mỗi thời điểm được xác định bằng chương trình Sigma (24) bằng cách dóng thẳng hàng dữ liệu bộ gen meta với các bộ gen hoàn chỉnh (Fig.2B). Trước khi can thiệp, tất cả các chủng có mức độ chiếm ưu thế thấp (tối đa = 0,5%, *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0001). Mức độ chiếm ưu thế của chủng *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0003 và *B. pseudocatenulatum* C95 dường như không đáp ứng với sự can thiệp chế độ ăn, do mức độ chiếm ưu thế thấp của *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0003 duy trì trong suốt thử nghiệm và mức độ chiếm ưu thế của *B. pseudocatenulatum* C95 có sự gia tăng nhỏ chỉ trong giai đoạn II và III. Ngược lại, các chủng *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0001, *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0004 và *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0002 đáp ứng với sự can thiệp chế độ ăn. Sự thay đổi về mức độ chiếm ưu thế của chúng là phù hợp với sự thay đổi quan sát được đối với giống *Bifidobacterium*, cho thấy rằng các chủng *B. pseudocatenulatum* này chiếm ưu thế chủ yếu với những thay đổi này. Thật vậy, sau khi can thiệp, ba chủng này đã tăng lên đáng kể, đặc biệt là chủng *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0002.

Phù hợp với kết quả trong nghiên cứu trước (9), sự cải thiện của các biến số sinh học lâm sàng có tương quan với sự gia tăng các chủng *B. pseudocatenulatum* (Fig.3). Chủng *B. pseudocatenulatum* C95 tương quan tiêu cực với các dấu hiệu nhân trắc học, bao gồm trọng lượng cơ thể, BMI, chu vi vòng eo và chu vi vòng hông. Ngoài ra, chủng *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0002 cũng có tương quan với

sự cải thiện của các dấu ấn viêm, bao gồm sự giảm của nồng độ leptin và sự tăng nồng độ adiponectin.

Phân tích toàn bộ bộ gen của chủng *B. pseudocatenulatum*

Trên cơ sở năm bộ gen hoàn chỉnh của *B. pseudocatenulatum* của các tác giả sáng chế và dữ liệu công khai có sẵn, bao gồm cả 5 bộ gen phác thảo của *B. pseudocatenulatum* và bộ gen hoàn chỉnh của *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T(25), tổng cộng mười một bộ gen của *B. pseudocatenulatum* được đưa vào phân tích toàn bộ bộ gen. Đường cong phân tích toàn bộ bộ gen cho thấy các biến số sinh học lâm sàng PERFECT-2017-0001 có xu hướng tiệm cận với tốc độ tăng trưởng trung bình của 100 gen trên mỗi bộ gen trong sáu lần lặp đầu tiên và sau đó giảm xuống tỷ lệ nhỏ hơn nhiều (Fig.9A). Đường cong cuối cùng đạt mức 2.482 gen. Điều này cho thấy rằng việc đưa thêm các bộ gen bổ sung vào sẽ chỉ dẫn đến một sự gia tăng nhỏ về kích cỡ của toàn bộ bộ gen. Đường cong bộ gen lõi cho thấy xu hướng tiệm cận rõ ràng hơn và sự giảm rõ rệt trong sáu lần lặp đầu tiên (Fig.9B). Đường cong cuối cùng đạt mức 1.427 gen. Xu hướng của toàn bộ bộ gen và bộ gen lõi cho thấy rằng *B. pseudocatenulatum* có toàn bộ bộ gen được khép kín, và sáu bộ gen gần như là đủ để mô tả các tính chất gen của *B. pseudocatenulatum*. Trên cơ sở các kết quả này và để tránh sự khó đọc kết quả do các bộ gen phác thảo gây ra, các tác giả sáng chế chỉ sử dụng sáu bộ gen hoàn chỉnh này trong phân tích tiếp theo của để khám phá các đặc điểm bộ gen của *B. pseudocatenulatum*.

Đặc điểm chung của *B. pseudocatenulatum*

Các bộ gen thuộc năm chủng của tác giả sáng chế và *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T có giá trị chiều dài trung bình bằng 2.355.185 bp và 56,63 G+C%, là phù hợp với khoảng G+C% của giống *Bifidobacterium* (26). Năm hoặc sáu locus operon của rARN được xác định trong các bộ gen của *B. pseudocatenulatum*, và trong mỗi bộ gen, có thêm một bản sao của gen 5S rARN (Bảng 1). Ngoài ra, tính không đồng nhất trên các gen 16S rARN tồn tại trong tất cả các bộ gen ngoại trừ *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T (Bảng S1). Trung bình, có 54 gen tARN được chứa trong mỗi bộ gen của *B. pseudocatenulatum*.

Bảng 1: Các đặc điểm chung của sáu bộ gen hoàn chỉnh của *Bifidobacterium pseudocatenulatum*

ĐẶC ĐIỂM	Perfect- 2017- 0002	Perfect- 2017- 0001	Perfect- 2017- 0003	Perfect- 2017- 0004	C95	JCM 1200 ^T
Chiều dài bộ gen (bp)	2341029	2380612	2352149	2393824	2349745	2313752
Số lượng gen	1854	1883	1913	1895	1868	1817
tARN	55	54	54	54	54	55
16S rARN	6	5	6	5	5	6
23S rARN	6	5	6	5	5	6
5S rARN	7	6	7	6	6	7
Protein giả thuyết	372	381	366	380	363	372
Protein giả thuyết (%)	20	20	19	20	19	20
Gen với hàm được gán (%)	80	80	81	80	81	80
GC (%)	56,59	56,76	56,65	56,78	56,63	56,38
CAZy	106	104	104	106	106	111

Bảng S1. Tính không đồng nhất của gen 16S rARN

<i>B. pseudocatenulatum</i> Perfect-2017-0001						
	Bản sao 1	Bản sao 2	Bản sao 3	Bản sao 4	Bản sao 5	
Bản sao 1	100	100	100	100	99,9	
Bản sao 2	100	100	100	100	99,9	
Bản sao 3	100	100	100	100	99,9	
Bản sao 4	100	100	100	100	99,9	
Bản sao 5	99,9	99,9	99,9	99,9	100	
<i>B. pseudocatenulatum</i> Perfect-2017-0002						
	Bản sao 1	Bản sao 2	Bản sao 3	Bản sao 4	Bản sao 5	Bản sao 6
Bản sao 1	100	100	100	99,9	100	99,7
Bản sao 2	100	100	100	99,9	100	99,7
Bản sao 3	100	100	100	99,9	100	99,7
Bản sao 4	99,9	99,9	99,9	100	99,9	99,6
Bản sao 5	100	100	100	99,9	100	99,7
Bản sao 6	99,7	99,7	99,7	99,6	99,7	100
<i>B. pseudocatenulatum</i> Perfect-2017-0003						
	Bản sao 1	Bản sao 2	Bản sao 3	Bản sao 4	Bản sao 5	Bản sao 6

Bản sao 1	100	100	100	100	100	99,9
Bản sao 2	100	100	100	100	100	99,9
Bản sao 3	100	100	100	100	100	99,9
Bản sao 4	100	100	100	100	100	99,9
Bản sao 5	100	100	100	100	100	99,9
Bản sao 6	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	100
<i>B. pseudocatenulatum</i> Perfect-2017-0004						
	Bản sao 1	Bản sao 2	Bản sao 3	Bản sao 4	Bản sao 5	
Bản sao 1	100	100	99,9	100	100	
Bản sao 2	100	100	99,9	100	100	
Bản sao 3	99,9	99,9	100	99,9	99,9	
Bản sao 4	100	100	99,9	100	100	
Bản sao 5	100	100	99,9	100	100	
<i>B. pseudocatenulatum</i> C95						
	Bản sao 1	Bản sao 2	Bản sao 3	Bản sao 4	Bản sao 5	
Bản sao 1	100	99,9	100	100	100	
Bản sao 2	99,9	100	99,9	99,9	99,9	
Bản sao 3	100	99,9	100	100	100	
Bản sao 4	100	99,9	100	100	100	
Bản sao 5	100	99,9	100	100	100	
<i>B. pseudocatenulatum</i> JCM1200 ^T						
	Bản sao 1	Bản sao 2	Bản sao 3	Bản sao 4	Bản sao 5	Bản sao 6
Bản sao 1	100	100	100	100	100	100
Bản sao 2	100	100	100	100	100	100
Bản sao 3	100	100	100	100	100	100
Bản sao 4	100	100	100	100	100	100
Bản sao 5	100	100	100	100	100	100
Bản sao 6	100	100	100	100	100	100

Trung bình có 1.871 khung đọc mở (ORF) trên mỗi bộ gen được dự đoán, với 80% ORF đã phát hiện được gán theo hàm số thông qua dự đoán *in silico* trên cơ sở BLAST so với cơ sở dữ liệu NCBI nr, và 20% còn lại được dự đoán là protein giả

thuyết (Bảng 1). Việc nhận dạng các gen cùng nguồn theo COG (cụm của các nhóm gen cùng nguồn) (27) cho thấy rằng phần lớn các gen trong bộ gen của *B. pseudocatenulatum* có liên quan đến các chức năng của gen giữ nhà khác nhau, đặc biệt là các chức năng giúp vận chuyển và chuyển hóa hydrat cacbon (12,54%) cũng như vận chuyển và chuyển hóa axit amin (10,23%) (Fig.4). Các tỷ lệ phần trăm này phù hợp với tỷ lệ của các bộ gen *Bifidobacterium* khác (28, 29).

Trên cơ sở phân tích bộ gen và được chứng minh bằng các bằng chứng thực nghiệm, một số yếu tố tạo khuẩn lạc trên vật chủ của vi khuẩn *Bifidobacteria* đã được xác định bao gồm các chức năng liên quan đến khả năng kháng axit mật và độ bám dính (11). Khả năng kháng axit mật rất quan trọng đối với sự tạo khuẩn lạc của nhiều vi khuẩn đường ruột, do các axit mật có thể có hoạt tính kháng khuẩn ở các nồng độ sinh lý (30). Hydrolaza muối mật và/hoặc chất vận chuyển axit mật mang lại khả năng kháng axit mật, được xác định trong tất cả sáu chủng *B. pseudocatenulatum*. Ở khía cạnh độ bám dính, tất cả các bộ gen được chứa trong các gen mã hóa của enolaza, và DnaK, đã được chứng minh là các protein liên quan đến sự gắn kết plasminogen trong *B. animalis* subsp. *lactis* BI07 (31, 32). Ngoài ra, các gen mã hóa của transaldolaza, liên quan đến sự gắn kết dịch nhầy được tìm thấy trong bốn chủng *B. bifidum* (33) và yếu tố von Willebrand A, đã được thông báo là kích thích sự bám dính vào các chất nền ngoại bào (34), cũng tồn tại trong mỗi bộ gen. Sự tồn tại của các gen chức năng này cho thấy rằng, tương tự như loài *Bifidobacterium* khác, *B. pseudocatenulatum* có cơ sở bộ gen để tạo khuẩn lạc trong ruột của người.

Tính đa dạng vi mô của bộ gen của *B. pseudocatenulatum*

Tỷ lệ đồng dạng nucleotit trung bình (ANI) trong số sáu bộ gen *B. pseudocatenulatum* hoàn chỉnh đáp ứng ngưỡng phân định ranh giới loài (35), khi giá trị tối thiểu là 97,76%. Quan sát được tính tương tự cao hơn một chút trong các chủng được phân lập từ cùng môi trường sống (*B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0001, PERFECT-2017-0002, PERFECT-2017-0003, PERFECT-2017-0004 và C95, ANI tối thiểu = 99,88%) khi so sánh chúng với *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T (ANI tối đa = 97,80%), được phân lập từ môi trường sống khác. Các kết quả này chỉ ra mức độ tổng hợp cao trên tất cả các bộ gen này, được xác nhận bằng cách đóng thẳng hàng trình tự theo biểu đồ dấu chấm đối với các bộ gen (Fig.5A), mặc dù tính tương ứng song song thấp hơn và một vài sự khác biệt (bao gồm cả các indel) là rõ ràng trong các

biểu đồ dấu chấm giữa *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T và năm chủng khác. Ví dụ đáng chú ý về biến thể này là cụm gen *eps*, mã hóa exopolysaccharit (EPS). EPS này có thể tạo thành lớp chất nhờn bám vào tế bào và cũng có thể được giải phóng vào môi trường (36). Một số EPS do *Bifidobacterium* sản sinh ra được cho là có khả năng góp phần vào một số hoạt tính có lợi cho các vật chủ của chúng, bao gồm điều hòa hệ miễn dịch, tính đối kháng chống lại tác nhân gây bệnh, các chức năng làm chất tẩy gốc tự do và điều hòa quần thể vi sinh vật (37). Một bản sao của cụm gen *eps* được xác định trong mỗi bộ gen hoàn chỉnh của *B. pseudocatenulatum* (Fig.S4) và các cụm gen *eps* này là giống nhau trong năm chủng *B. pseudocatenulatum* của các tác giả sáng chế nhưng khác biệt hoàn toàn so với các cụm gen *eps* được tìm thấy trong *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T.

Tất cả các ORF được xác định trên sáu bộ gen hoàn chỉnh được so sánh với BLASTP và được kết cụm thêm bằng thuật toán MCL, cho thấy sự có mặt của 2.115 nhóm gen (Fig.5B). Trong số các nhóm gen này, ~72% (1.520) nhóm gen có chung cả sáu bộ gen của *B. pseudocatenulatum*, đại diện cho bộ gen lõi của *B. pseudocatenulatum*. Tổng cộng có 312 nhóm gen có thể bỏ qua, chỉ có mặt trong một tập hợp con của các bộ gen của *B. pseudocatenulatum* thử nghiệm, được xác định. Trên 61,48% các nhóm duy nhất đặc hiệu với *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T. Thu được các kết quả tương tự trên cơ sở sự phân bố COG, với 1.101 họ COG được xác định từ sáu bộ gen *B. pseudocatenulatum* hoàn chỉnh. Trong số này, 59 họ COG chỉ có mặt trong tập hợp con của các bộ gen *B. pseudocatenulatum* được thử nghiệm, và 37 họ COG bổ sung đặc biệt cho một chủng, với 35 trong số 37 họ này chỉ được xác định trong *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T (Fig.S5). Cũng có 46 họ COG được phát hiện trong các thể phân lập của tác giả sáng chế nhưng không có mặt trong bộ gen *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T. Bất ngờ là ít nhất một vài trong số những khác biệt này liên quan đến sự sắp xếp lại các yếu tố di truyền di động và ADN, với các thể phân lập của tác giả sáng chế có nhiều COG đặc biệt hơn liên quan đến các chức năng của thể tiền thực khuẩn, các quá trình tế bào và truyền tín hiệu tế bào, trong khi *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T có nhiều COG đặc biệt hơn bao gồm cả các COG liên quan đến (các) hệ thống CRISPR/Cas.

Cụ thể, các thể phân lập của tác giả sáng chế và *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T được cho tiếp xúc với các nguồn hydrat cacbon riêng biệt. Các thể phân

lập của tác giả sáng chế có nguồn gốc từ mẫu phân của trẻ bị béo phì sau can thiệp, đã được cho sử dụng nguyên liệu được trộn từ các loại ngũ cốc nguyên cám và các loại thực phẩm thực vật TCM giàu chất xơ và các bột bao gồm fructo-oligosacarit và oligoisomaltoza, trong khi *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T được phân lập từ các mẫu phân của trẻ sơ sinh, được nghiên cứu để cho sử dụng hydrat cacbon tương đối đơn giản hơn. Theo cách tương ứng, các biến thể di truyền liên quan đến sự vận chuyển và chuyển hóa hydrat cacbon được phát hiện, như *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T không có COG0383 (alpha-mannosidaza), COG3594 (fucoza 4-O-axetylaza hoặc axetyltransferaza liên quan), COG4209 (hệ thống vận chuyển polysacarit loại ABC, thành phần của permeaza) và COG4214 (hệ thống vận chuyển xyloza loại ABC, thành phần của permeaza) nhưng chỉ có COG1554 (Trehaloza và maltoza hydrolaza (có thể có phosphorylaza)).

Số lượng bản sao khác nhau của các COG lỗi cũng góp phần vào tính đa dạng vi mô của *B. pseudocatenulatum*. Trong số 1.005 COG lỗi xuất hiện trong mỗi bộ gen *B. pseudocatenulatum* hoàn chỉnh, 51 COG liên quan đến các loại chức năng khác nhau có sự chênh lệch về số lượng bản sao với ít nhất 2 bản sao (Fig.6). Theo sự phân bố của các COG này, *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T là khác biệt nhất so với 5 chủng của tác giả sáng chế.

Các nghiên cứu trước đây đã thông báo về tính đa dạng vi mô của các chủng khác nhau trong cùng một loài có nguồn gốc từ cùng môi trường sống (38-40). Trong số năm chủng *B. pseudocatenulatum* của tác giả sáng chế, sự khác biệt dường như là do sự biến đổi về số lượng bản sao của các gen được gán cho họ COG lỗi cụ thể, thay vì sự khác biệt về sự có mặt/không có mặt của các COG đặc biệt hoặc có thể bỏ qua. Kết quả kết cụm gen (Fig.6) là phù hợp với mức độ đáp ứng khác biệt của các chủng với các quá trình can thiệp bằng hydrat cacbon. Trong ngữ cảnh đó, *B. pseudocatenulatum* C95 và *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0003, gần như không bị ảnh hưởng bởi sự can thiệp, được phân lập rõ ràng từ ba chủng đáp ứng; với cả *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0001 và *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0004, có mức độ đáp ứng vừa phải với sự can thiệp được nhóm lại với nhau; và *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0002, chủng có mức độ đáp ứng cao nhất với sự can thiệp, được tách ra tiếp từ 4 chủng khác nữa, nhưng tương tự nhất với *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0001 và *B. pseudocatenulatum* PERFECT-

2017-0004.

Liên quan đến sự vận chuyển và chuyển hóa hydrat cacbon, *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0002 có số lượng bản sao lớn nhất của COG2814 (arabinoza vận chuyển ra permeaza được dự đoán, họ MFS) và COG3250 (beta-galactosidaza/beta-glucuronidaza). Ngoài ra, trong số 5 chủng, 106 ± 2 (trung bình $\pm$ s.d.) ORF được xác định là các gen của enzym có hoạt tính hydrat cacbon (CAZy), chiếm 41 họ CAZy. Bộ gen của *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0002 chứa tất cả các họ CAZy đã được xác định và có số lượng bản sao lớn nhất của các gen này. Nó cũng chứa số lượng bản sao gen lớn nhất mã hóa hydrat cacbon esteraza, đã được thông báo là khử axetyl hóa các polysacarit thực vật để khắc phục tính phức tạp và kết hợp với glycozit hydrolaza trong quá trình phân hủy polysacarit thực vật (41). Các đặc điểm này được cho là sự khác biệt chính giải thích cho tỷ lệ đáp ứng của *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0002 với sự can thiệp chế độ ăn, nhờ đó nó chiếm hơn 50% tổng số *B. pseudocatenulatum*, và tỷ lệ đáng kể trong toàn bộ quần thể *Bifidobacteria* trong suốt quá trình can thiệp.

Kết luận

Trong nghiên cứu trước đây để đánh giá chế độ ăn WTP mang lại tác dụng giảm cân ở những người mắc chứng béo phì do di truyền như thế nào, *B. pseudocatenulatum* được xác định là loài *Bifidobacterium* chiếm ưu thế nhất. Ở đây, các tác giả sáng chế chứng minh rằng các chủng *B. pseudocatenulatum* cụ thể có sự biến đổi về mức đáp ứng của chúng với sự can thiệp chế độ ăn và các tác giả sáng chế sử dụng các bộ gen so sánh để xác định lý do có thể có làm cơ sở cho những phân tích động học này. Năm chủng *B. pseudocatenulatum* được phân lập là một phần của nghiên cứu này có một số khác biệt so với *B. pseudocatenulatum* JCM1200^T được phân lập từ các mẫu phân phân của trẻ sơ sinh, cho thấy sự ảnh hưởng của các thông số môi trường khác nhau đối với tính đa dạng vi mô của bộ gen (42). Nhiều đặc điểm về tính đa dạng vi mô quan sát được trong số năm thể phân lập của các tác giả sáng chế là những biến đổi về số lượng bản sao của họ COG lõi và những khác biệt này cung cấp sự giải thích hợp lý cho sự biến đổi về các quần thể vi khuẩn của năm chủng này trong quá trình can thiệp. Cụ thể, *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0002 mà về mặt di truyền có số lượng bản sao gen đa dạng hơn và lớn hơn đối với các polysacarit thực vật, có mức độ chiếm ưu thế cao nhất khi đáp ứng với sự can thiệp chế độ ăn. Sự tồn

tại đồng thời và sự phân bố của nhiều chủng là có tính trực quan do điều này sẽ chứng minh sự sống sót của quần thể trong toàn bộ khoảng điều kiện môi trường rộng hơn so với khả năng có thể có của quần thể đồng nhất (43). Do đó, sự tồn tại đồng thời của năm chủng có mức độ đáp ứng đa dạng với sự can thiệp chế độ ăn có thể hoạt động như một cơ chế giúp đảm bảo tính ổn định và tính phục hồi của các loài có lợi quan trọng như *B. pseudocatenulatum* trong ruột của người. Điều quan trọng là năm chủng *B. pseudocatenulatum* được xác định trong nghiên cứu này cũng được phát hiện là có mối tương quan khác nhau với các thông số sinh học lâm sàng của vật chủ, điều này cho thấy rằng ít nhất một vài chức năng có lợi được gán cho sự thay đổi về khu hệ vi sinh vật trong ruột có tính đặc hiệu với chủng (44). Sẽ cần có thêm nhiều nghiên cứu về loại được trình bày ở đây để đảm bảo rằng tiềm năng đầy đủ của các lợi ích về sức khỏe được tìm thấy từ các can thiệp chế độ ăn của khu hệ vi sinh vật đường ruột được nhận biết.

Vật liệu và phương pháp

Đánh giá lâm sàng

Nghiên cứu này được thực hiện theo sự chấp thuận của Ủy ban đạo đức của khoa Công nghệ sinh học và khoa học đời sống, Đại học Jiao Tong Thượng Hải (Số 2012-2016). Thử nghiệm lâm sàng đã được đăng ký tại Cơ quan đăng ký thử nghiệm lâm sàng Trung Quốc (Số ChiCTR-ONC-12002646). Văn bản đồng ý tham gia thử nghiệm được cung cấp từ những người bảo trợ của các trẻ em mắc bệnh béo phì.

Ở bệnh viện phụ nữ và trẻ em Quảng Đông, Quảng Châu, Trung Quốc, trẻ em mắc bệnh béo phì được cho sử dụng phương pháp can thiệp chế độ ăn trong 105 ngày điều trị tại bệnh viện. Tình nguyện viên không tham gia chương trình tập thể dục bất kỳ. Chế độ ăn trên cơ sở các loại ngũ cốc nguyên cám, thực phẩm theo y học cổ truyền Trung Quốc, và prebiotic (chế độ ăn WTP) (7) (Ba loại thực phẩm chế biến sẵn, sản phẩm công thức số 1, sản phẩm công thức số 2 và sản phẩm công thức số 3 trong chế độ ăn được sản xuất bởi công ty PERFECT CO., LTD, Trung Quốc) được cho sử dụng kết hợp với lượng thích hợp của rau, trái cây và các loại hạt theo lời khuyên của bác sĩ dinh dưỡng. Quá trình can thiệp được chia thành ba giai đoạn. Trong giai đoạn I (từ ngày 0 đến ngày 60), trẻ này được cho sử dụng chế độ can thiệp cơ bản (9). Trong giai đoạn II (từ ngày 60 đến ngày 75), trẻ này được cho sử dụng thêm 100g sản phẩm công thức số 3. Trong suốt giai đoạn III (từ ngày 75 đến ngày

105), trẻ này vẫn được cho sử dụng thêm 100g sản phẩm công thức số 3 nhưng giảm lượng sản phẩm công thức số 1.

Các mẫu sinh học, dữ liệu nhân trắc học và phân tích trong phòng thí nghiệm lâm sàng thu được ở 7 thời điểm (0, 15, 30, 45, 60, 75, và 105 ngày). Các phép đo về thông số sinh học lâm sàng là giống như nghiên cứu trước đây của các tác giả sáng chế (9).

Phân tích và giải trình tự bộ gen meta

Quá trình chiết ADN từ các mẫu phân dùng cho kỹ thuật giải trình tự bộ gen meta được thực hiện theo mô tả trước đây (45). Bảy mẫu được giải trình tự bằng cách sử dụng thiết bị Illumina Hiseq 2000 của hãng Shanghai Genenergy Bio-technology Co., Ltd. Chuẩn bị thư viện ADN theo hướng dẫn của Illumina. Quá trình tạo cụm, lai hóa khuôn, khuếch đại đẳng nhiệt, tuyến tính hóa, phong bế và làm biến tính và lai hóa các đoạn mỗi giải trình tự được thực hiện theo quy trình được chỉ định bởi nhà cung cấp. Các thư viện được tạo cấu trúc, sau đó giải trình tự thông lượng cao để thu được các đoạn đọc từ hai đầu có chiều dài 151 bp theo hướng xuôi và ngược.

Flexbar (46) được sử dụng để cắt đoạn gần nối khỏi các đoạn đọc. Prinseq (47) được sử dụng để a) cắt các đoạn đọc ra khỏi đầu 3' cho đến khi đạt được nucleotit thứ nhất với ngưỡng chất lượng là 20; b) loại bỏ các cặp đoạn đọc nếu một trong hai đoạn đọc này có chiều dài ngắn hơn 75 bp hoặc chứa các bazơ 'N', và c) khử sao chép các đoạn đọc. Các đoạn đọc có thể được đóng thẳng hàng với bộ gen của người (*H. sapiens*, UCSC hg19) được loại bỏ (được đóng thẳng hàng với Bowtie2 (48), bằng cách sử dụng phương pháp `--reorder --no-hd --no-contain --dovetail`). Trung bình có 25,3±4,1 triệu (giá trị trung bình ± s.d.) dữ liệu kiểu đọc từ hai đầu cho mỗi mẫu được giữ lại và được sử dụng để phân tích thêm.

MetaPhlan (49) (`--bt2_ps` rất miễn cảm cục bộ) được sử dụng để tính toán mức độ chiếm ưu thế của các loài *Bifidobacterium* vào ngày 105. Chương trình Sigma được sử dụng để tính toán mức độ chiếm ưu thế cho năm chủng *B. pseudocatenulatum* của các tác giả sáng chế (24).

Giải trình tự bộ gen hoàn chỉnh và tập hợp dữ liệu

Các bộ gen của vi khuẩn *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0001, *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0002, *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0003, *B. pseudocatenulatum* PERFECT-2017-0004, và *B. pseudocatenulatum* C95

được giải trình tự bằng thiết bị giải trình tự PacBio RS II với độ bao phủ gấp 245, 415, 285, 459 và 198 lần tương ứng (Nextomics Biosciences, Wuhan 430000, Trung Quốc). HGAP/Quiver (50) được sử dụng để lắp ráp các đoạn đọc phụ *de novo*, sau đó là miniums2 (51) và Quiver. Mỗi chủng được lắp ráp vào một contig tương ứng với nhiễm sắc thể của nó.

Dự đoán các đặc điểm chung

Việc dự đoán khung đọc mở (ORF) được thực hiện bằng cách kết hợp phần mềm dự đoán gen Prodigal v2_60(52) và thuật toán đóng thẳng hàng trình tự BLAST. Sau đó, các khung ORF đã xác định được chú thích bằng cách sử dụng thuật toán BLASTP đối với cơ sở dữ liệu NCBI nr. Các gen ARN của ribosom được phát hiện bằng cách sử dụng chương trình Rnammer v1.2 (53) và các gen ARN vận chuyển được xác định bằng chương trình tRNAscan-SE v.14 (54). Ma trận độ tương đồng trình tự giữa tất cả các gen 16S rARN được tính toán bằng chương trình USEARCH v8.0.1517 (55). Việc gán cho các COG được thực hiện bởi hàm tam giác COG (COGtriangles) (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/wolf/COGs/COGsoft/>).

Tính toán toàn bộ bộ gen

Chương trình PGAPv1.12 (56) được sử dụng để tính toán toàn bộ bộ gen của *B. pseudocatenulatum*. Sự kết cụm gen chức năng được thực hiện bằng phương pháp GF (họ gen) và profin của toàn bộ bộ gen được thiết lập sau đó.

So sánh bộ gen

Gói phần mềm MUMmer v3.0 (57) được sử dụng để thực hiện các lần đóng thẳng hàng trình tự bộ gen hoàn chỉnh ở cấp độ nucleotit. Đối với mỗi cặp bộ gen, tỷ lệ đồng dạng nucleotit trung bình (ANI) được tính toán bằng cách sử dụng chương trình JSpecies phiên bản 1.2.1 (35). Ở cấp độ protein, tất cả các trình tự được so sánh với tất cả các cách bằng cách sử dụng thuật toán BLASTP (giá trị E tối đa bằng $1e-10$, độ tương đồng trình tự khi đóng thẳng hàng tối thiểu 50% và độ bao phủ trình tự khi đóng thẳng hàng tối thiểu 50% cho một trong hai protein) và sau đó kết cụm thành các họ gen bằng cách sử dụng Thuật toán Markov Cluster (MCL) thực hiện trong chương trình PGAP v1.12.

Nhận dạng cụm gen Exopolysaccharit (EPS)

Trong phân tích *in silico* về cụm gen Bifido-eps được thực hiện bằng cách tìm

kiểm gen GTF môi (p-gtf) giả định: rfbP (NP_695444) và cpsD (NP_695447) trong mỗi bộ gen (37), sau đó là kiểm tra các gen xung quanh p-gtf bằng phương pháp thủ công.

Nhận dạng các enzym hoạt hóa hydrat cacbon (CAZy)

Cơ sở dữ liệu phiên bản cục bộ của dbCAN v3.0(58) được tải xuống. Các gen trong mỗi bộ gen được đóng thẳng hàng với cơ sở dữ liệu này bằng cách sử dụng chương trình HMMscan (59). Sự đóng thẳng hàng được phân tích cấu trúc bằng chương trình hmmscan-parser.sh có trên cơ sở dữ liệu của dbCAN và các kết quả đạt được tốt nhất (best-hit) được giữ lại.

Tính khả dụng của dữ liệu và nguyên liệu

Tất cả các bộ gen được tạo ra trong nghiên cứu này và tập dữ liệu bộ gen meta được lưu trữ ở Kho lưu trữ nucleotit châu Âu (European Nucleotide Archive: ENA) (www.ebi.ac.uk/ena) với mã số truy cập là PRJEB18557. Tất cả các bộ gen khác của *B. pseudocatenulatum* được sử dụng cho quá trình phân tích của tác giả sáng chế được tải xuống từ cơ sở dữ liệu NCBI với mã số truy cập sau đây: AP012330.1, CDPW00000000.1, ABXX02000001, JEOD01000001, JGZF01000001 và *B. pseudocatenulatum* D2CA được tải xuống từ trang web MetaHIT (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/metahit/>).

Tất cả các tài liệu công bố được nêu trong phần mô tả trên đây được vào đây để tham khảo. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tiến hành các cải biến và thay đổi khác nhau đối với các phương pháp và hệ thống đã được mô tả của sáng chế mà vẫn nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế này. Mặc dù sáng chế đã được mô tả cùng với các phương án được ưu tiên cụ thể, cần hiểu rằng phạm vi của sáng chế như được nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể như vậy. Thực vậy, các cải biến khác nhau đối với cách thức tiến hành sáng chế đã được mô tả là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hoá sinh và công nghệ sinh học hoặc các lĩnh vực liên quan đều được dự định nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Zhao L.** 2013. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat Rev Microbiol* **11**:639-647.
2. **Boulange CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME.** 2016. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med* **8**:42.
3. Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, Guo J, Le Chatelier E, Yao J, Wu L, Zhou J, Ni S, Liu L, Pons N, Batto JM, Kennedy SP, Leonard P, Yuan C, Ding W, Chen Y, Hu X, Zheng B, Qian G, Xu W, Ehrlich SD, Zheng S, Li L. 2014. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* **513**:59-64.
4. Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D, Wu X, Li J, Tang L, Li Y, Lan Z, Chen B, Li Y, Zhong H, Xie H, Jie Z, Chen W, Tang S, Xu X, Wang X, Cai X, Liu S, Xia Y, Li J, Qiao X, Al-Aama JY, Chen H, Wang L, Wu QJ, Zhang F, Zheng W, Li Y, Zhang M, Luo G, Xue W, Xiao L, Li J, Chen W, Xu X, Yin Y, Yang H, Wang J, Kristiansen K, Liu L, Li T, Huang Q, Li Y, Wang J. 2015. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med* **21**:895-905.
5. **Xu J, Lian F, Zhao L, Zhao Y, Chen X, Zhang X, Guo Y, Zhang C, Zhou Q, Xue Z, Pang X, Zhao L, Tong X.** 2015. Structural modulation of gut microbiota during alleviation of type 2 diabetes with a Chinese herbal formula. *ISME J* **9**:552-562.
6. **Kelly CR, Kahn S, Kashyap P, Laine L, Rubin D, Atreja A, Moore T, Wu G.** 2015. Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterology* **149**:223-237.
7. Xiao S, Fei N, Pang X, Shen J, Wang L, Zhang B, Zhang M, Zhang X, Zhang C, Li M, Sun L, Xue Z, Wang J, Feng J, Yan F, Zhao N, Liu J, Long W, Zhao L. 2014. A gut microbiota-targeted dietary intervention for amelioration of chronic inflammation underlying metabolic syndrome. *FEMS Microbiol Ecol* **87**:357-367.

8. **Human Microbiome Project C.** 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**:207-214.
9. Zhang C, Yin A, Li H, Wang R, Wu G, Shen J, Zhang M, Wang L, Hou Y, Ouyang H, Zhang Y, Zheng Y, Wang J, Lv X, Wang Y, Zhang F, Zeng B, Li W, Yan F, Zhao Y, Pang X, Zhang X, Fu H, Chen F, Zhao N, Hamaker BR, Bridgewater LC, Weinkove D, Clement K, Dore J, Holmes E, Xiao H, Zhao G, Yang S, Bork P, Nicholson JK, Wei H, Tang H, Zhang X, Zhao L. 2015. Dietary Modulation of Gut Microbiota Contributes to Alleviation of Both Genetic and Simple Obesity in Children. *EBioMedicine* **2**:966-982.
10. **Wu H, Wang R, Zhao Y, Pang X, Shen J, Zhang C.** 2015. Exploring Carbohydrate Utilization Capacity of *Bifidobacterium pseudocate-*
nulatum Isolated from a Morbidly Obese Child after Dietary Intervention. *Genomics and Applied Biology* **34**:1384-1391.
12. **Grimm V, Westermann C, Riedel CU.** 2014. Bifidobacteria-host interactions--an update on colonisation factors. *Biomed Res Int* **2014**:960826.
13. **Labruna G, Pasanisi F, Nardelli C, Caso R, Vitale DF, Contaldo F, Sacchetti L.** 2011. High leptin/adiponectin ratio and serum triglycerides are associated with an "at-risk" phenotype in young severely obese patients. *Obesity (Silver Spring)* **19**:1492-1496.
14. **Zweigner J, Schumann RR, Weber JR.** 2006. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes Infect* **8**:946-952.
15. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Dore J, Meta HITC, Antolin M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C,

Denariáz G, và đồng tác giả 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174-180.

16. **Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, Kasumi E, Bamba S, Fujiyama Y, Andoh A.** 2013. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 28:613-619.

17. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottiere HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, Langella P. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16731-16736.

18. **Ganzle MG, Follador R.** 2012. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. *Front Microbiol* 3:340.

19. **Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RM, Moller K, Svendsen KD, Jakobsen M, Pedersen BK.** 2010. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr* 104:1831-1838.

20. **Hulston CJ, Churnside AA, Venable MC.** 2015. Probiotic supplementation prevents high-fat, overfeeding-induced insulin resistance in human subjects. *Br J Nutr* 113:596-602.

21. Charbonneau MR, Blanton LV, DiGiulio DB, Relman DA, Lebrilla CB, Mills DA, Gordon JI. 2016. A microbial perspective of human developmental biology. *Nature* 535:48-55.

22. **Wang J, Tang H, Zhang C, Zhao Y, Derrien M, Rocher E, van-Hylckama Vlieg JE, Strissel K, Zhao L, Obin M, Shen J.** 2015. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J* 9:1-15.

23. **Stenman LK, Waget A, Garret C, Klopp P, Burcelin R, Lahtinen S.** 2014.

Potential probiotic *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 prevents weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Benef Microbes* **5**:437-445.

24. **STALEY J, KRIEG N.** 1984. Classification of prokaryotes organisms: an overview. KRIEG, NR, HOLT, JG *Bergey's manual of systematic bacteriology* **1**.

25. **Ahn TH, Chai J, Pan C.** 2015. Sigma: strain-level inference of genomes from metagenomic analysis for biosurveillance. *Bioinformatics* **31**:170-177.

26. **Morita H, Toh H, Oshima K, Nakano A, Arakawa K, Takayama Y, Kurokawa R, Takanashi K, Honda K, Hattori M.** 2015. Complete genome sequence of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCM 1200(T) isolated from infant feces. *J Biotechnol* **210**:68-69.

27. Bottacini F, Medini D, Pavesi A, Turrone F, Foroni E, Riley D, Giubellini V, Tettelin H, van Sinderen D, Ventura M. 2010. Comparative genomics of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology* **156**:3243-3254.

28. **Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV.** 2015. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res* **43**:D261-269.

29. Bottacini F, O'Connell Motherway M, Kuczynski J, O'Connell KJ, Serafini F, Duranti S, Milani C, Turrone F, Lugli GA, Zomer A, Zhurina D, Riedel C, Ventura M, van Sinderen D. 2014. Comparative genomics of the *Bifidobacterium breve* taxon. *BMC Genomics* **15**:170.

30. **O'Callaghan A, Bottacini F, O'Connell Motherway M, van Sinderen D.** 2015. Pangenome analysis of *Bifidobacterium longum* and site-directed mutagenesis through by-pass of restriction-modification systems. *BMC Genomics* **16**:832.

31. **Begley M, Gahan CGM, Hill C.** 2005. The interaction between bacteria and bile. *Fems Microbiology Reviews* **29**:625-651.

32. **Candela M, Biagi E, Centanni M, Turrone S, Vici M, Musiani F, Vitali B, Bergmann S, Hammerschmidt S, Brigidi P.** 2009. Bifidobacterial enolase, a cell

surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host. *Microbiology* **155**:3294-3303.

33. **Candela M, Centanni M, Fiori J, Biagi E, Turroni S, Orrico C, Bergmann S, Hammerschmidt S, Brigidi P.** 2010. DnaK from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* is a surface-exposed human plasminogen receptor upregulated in response to bile salts. *Microbiology* **156**:1609-1618.

34. **Gonzalez-Rodriguez I, Sanchez B, Ruiz L, Turroni F, Ventura M, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A.** 2012. Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Appl Environ Microbiol* **78**:3992-3998.

35. **Pareti FI, Fujimura Y, Dent JA, Holland LZ, Zimmerman TS, Ruggeri ZM.** 1986. Isolation and characterization of a collagen binding domain in human von Willebrand factor. *J Biol Chem* **261**:15310-15315.

36. **Richter M, Rossello-Mora R.** 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:19126-19131.

37. **Schmid J, Sieber V, Rehm B.** 2015. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol* **6**:496.

38. **Hidalgo-Cantabrana C, Sanchez B, Milani C, Ventura M, Margolles A, Ruas-Madiedo P.** 2014. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol* **80**:9-18.

39. **Zhang XL, Gao PP, Chao QF, Wang LH, Senior E, Zhao LP.** 2004. Microdiversity of phenol hydroxylase genes among phenol-degrading isolates of *Alcaligenes* sp from an activated sludge system. *Fems Microbiology Letters* **237**:369-375.

40. **Mao YJ, Zhang XJ, Xia X, Zhong HH, Zhao LP.** 2010. Versatile aromatic compound -degrading capacity and microdiversity of *Thauera* strains isolated from a coking wastewater treatment bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **37**:927-934.

41. **Patra R, Chattopadhyay S, De R, Ghosh P, Ganguly M, Chowdhury A, Ramamurthy T, Nair GB, Mukhopadhyay AK.** 2012. Multiple Infection and Microdiversity among *Helicobacter pylori* Isolates in a Single Host in India. *Plos One* 7.
42. **Biely P.** 2012. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnol Adv* 30:1575-1588.
43. **Jezbera J, Jezberova J, Kasalicky V, Simek K, Hahn MW.** 2013. Patterns of Limnohabitans microdiversity across a large set of freshwater habitats as revealed by Reverse Line Blot Hybridization. *PLoS One* 8:e58527.
44. **Moore LR, Rocap G, Chisholm SW.** 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* 393:464-467.
45. **Zhang C, Zhao L.** 2016. Strain-level dissection of the contribution of the gut microbiome to human metabolic disease. *Genome Med* 8:41.
46. **Fei N, Zhao L.** 2013. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *ISME J* 7:880-884.
47. **Dodt M, Roehr JT, Ahmed R, Dieterich C.** 2012. FLEXBAR-Flexible Barcode and Adapter Processing for Next-Generation Sequencing Platforms. *Biology (Basel)* 1:895-905.
48. **Schmieder R, Edwards R.** 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27:863-864.
49. **Langmead B, Salzberg SL.** 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357-359.
50. **Segata N, Waldron L, Ballarini A, Narasimhan V, Jousson O, Huttenhower C.** 2012. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nat Methods* 9:811-814.
51. **Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW, Korlach J.** 2013. Nonhybrid,

finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods* **10**:563-569.

52. **Sommer DD, Delcher AL, Salzberg SL, Pop M.** 2007. Minimus: a fast, lightweight genome assembler. *BMC Bioinformatics* **8**:64.

53. **Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ.** 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**:119.

54. **Lagesen K, Hallin P, Rodland EA, Staerfeldt HH, Rognes T, Ussery DW.** 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* **35**:3100-3108.

55. **Lowe TM, Eddy SR.** 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* **25**:955-964.

56. **Edgar RC.** 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**:2460-2461.

57. **Zhao Y, Wu J, Yang J, Sun S, Xiao J, Yu J.** 2012. PGAP: pan-genomes analysis pipeline. *Bioinformatics* **28**:416-418.

58. **Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL.** 2004. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* **5**:R12.

59. **Yin Y, Mao X, Yang J, Chen X, Mao F, Xu Y.** 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res* **40**:W445-451.

60. **Finn RD, Clements J, Eddy SR.** 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* **39**:W29-37.

YÊU CẦU BẢO HỘ**1. Chế phẩm chứa**

chủng *Bifidobacterium pseudocatenulatum* Perfect-2017-0002 có mã số truy cập CGMCC 13651, và
chất mang được dụng hoặc chất mang dùng cho ăn kiêng.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa chủng Perfect-2017-0001 có mã số truy cập CGMCC 13650; và/hoặc
chủng Perfect-2017-0003 có mã số truy cập CGMCC 13653; và/hoặc
chủng Perfect-2017-0004 có mã số truy cập CGMCC 13654.

3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này là dược phẩm hoặc chế phẩm bổ sung chất dinh dưỡng hoặc chế phẩm dinh dưỡng.

4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa ít nhất từ 10^3 đến 10^{14} đơn vị tạo khuẩn lạc của chủng này trong mỗi gam hoặc milimét chế phẩm.

5. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chế phẩm này còn chứa chủng *Lactobacillus mucosae*.

6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa các thành phần của tế bào, chất chuyển hóa, các phân tử được tiết ra, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng, của chủng này.

7. Phương pháp tạo ra chế phẩm theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước bào chế chủng *Bifidobacterium pseudocatenulatum* thành chế phẩm thích hợp.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó chế phẩm này còn chứa chủng nêu trên và chủng *Lactobacillus mucosae*.

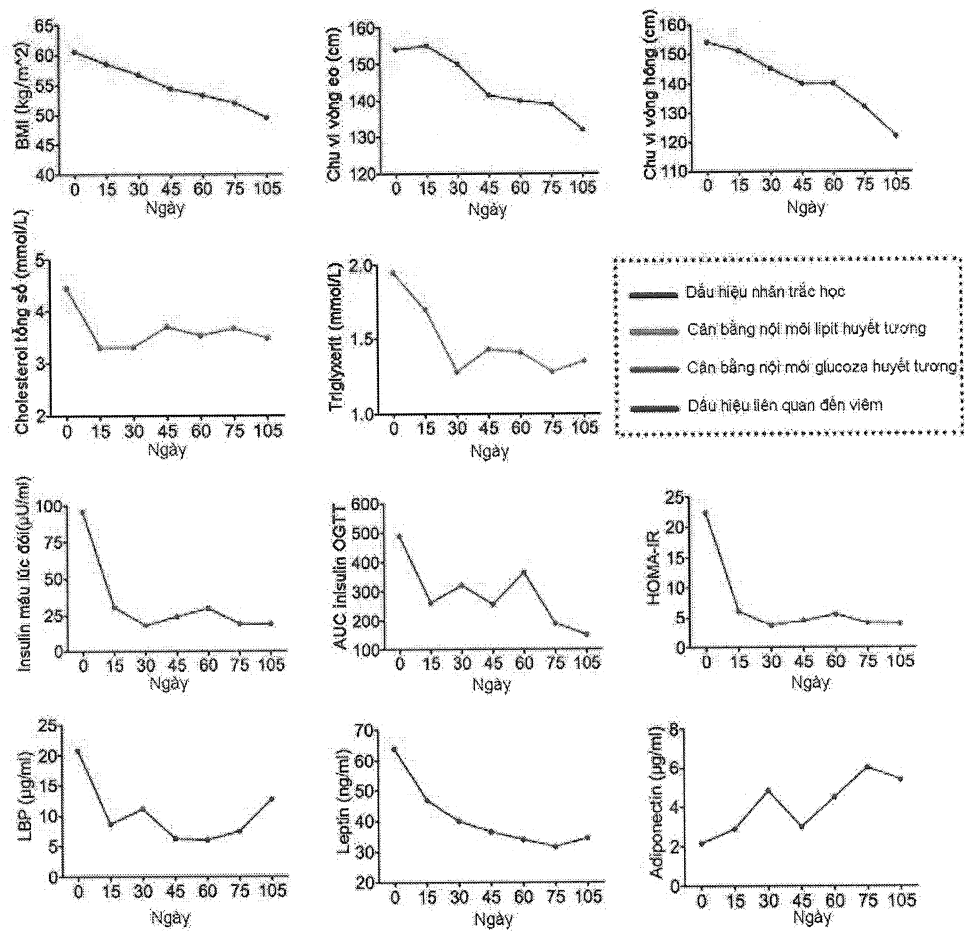


Fig. 1

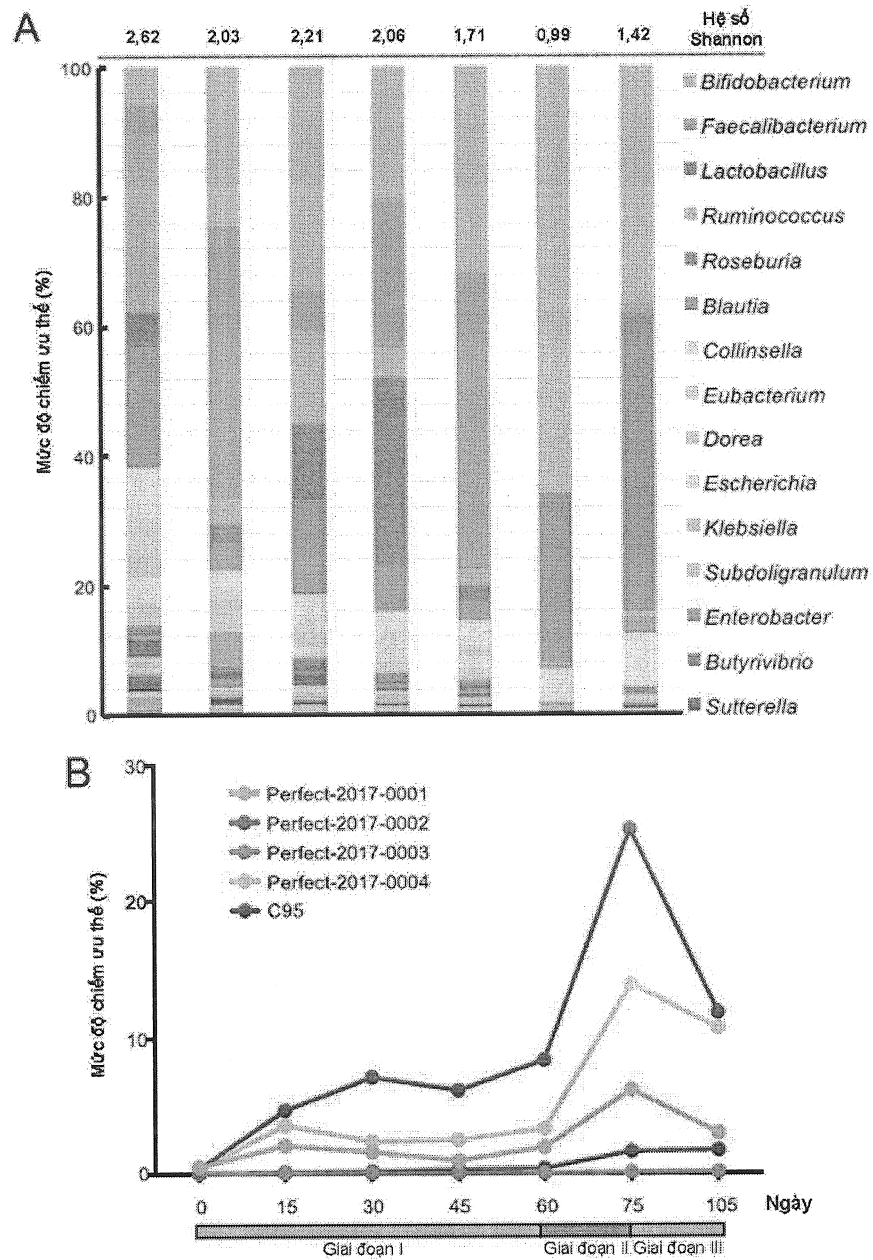


Fig. 2

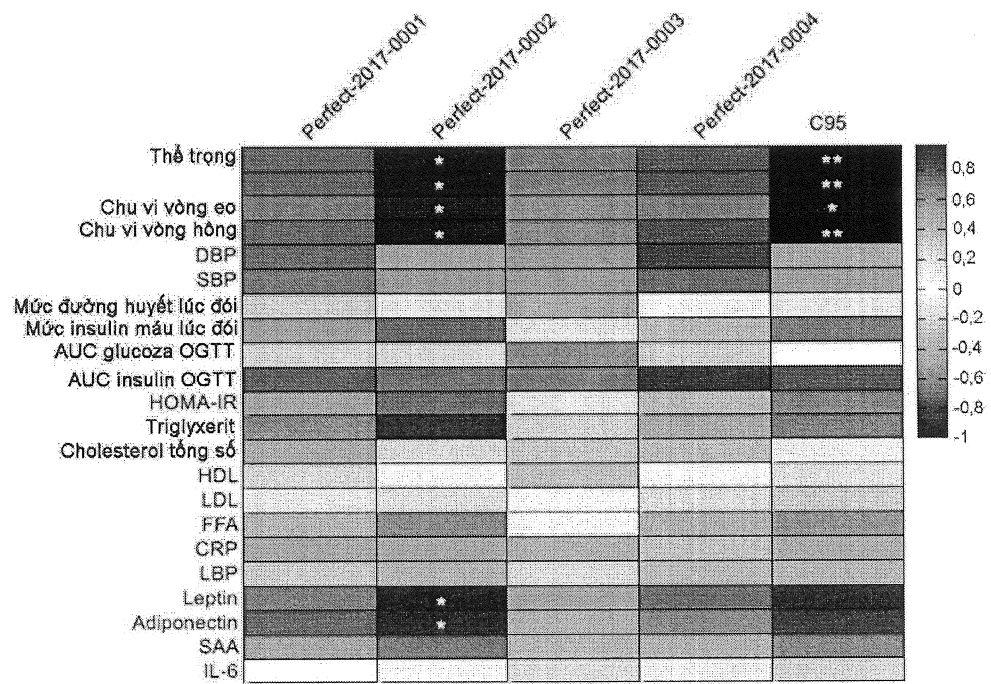


Fig. 3

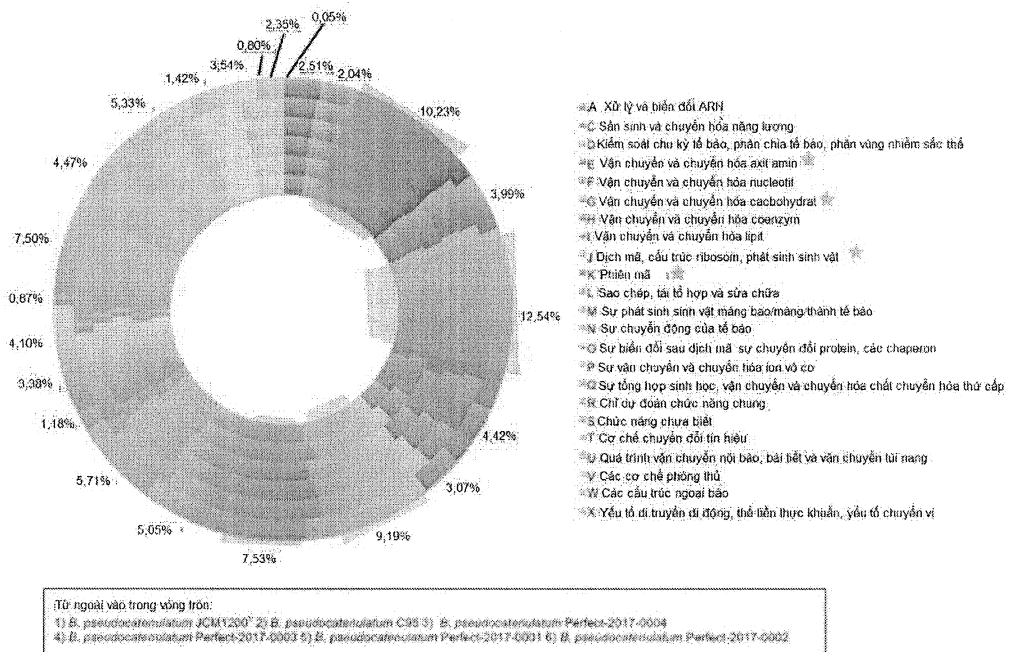


Fig. 4

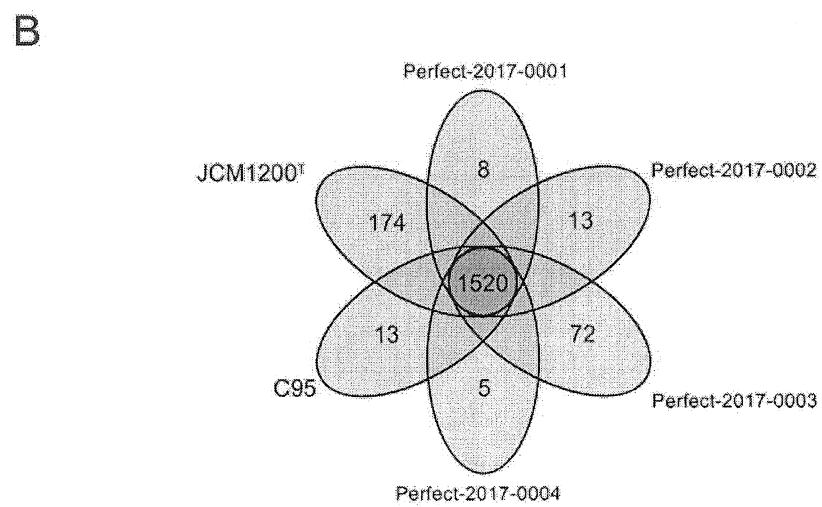
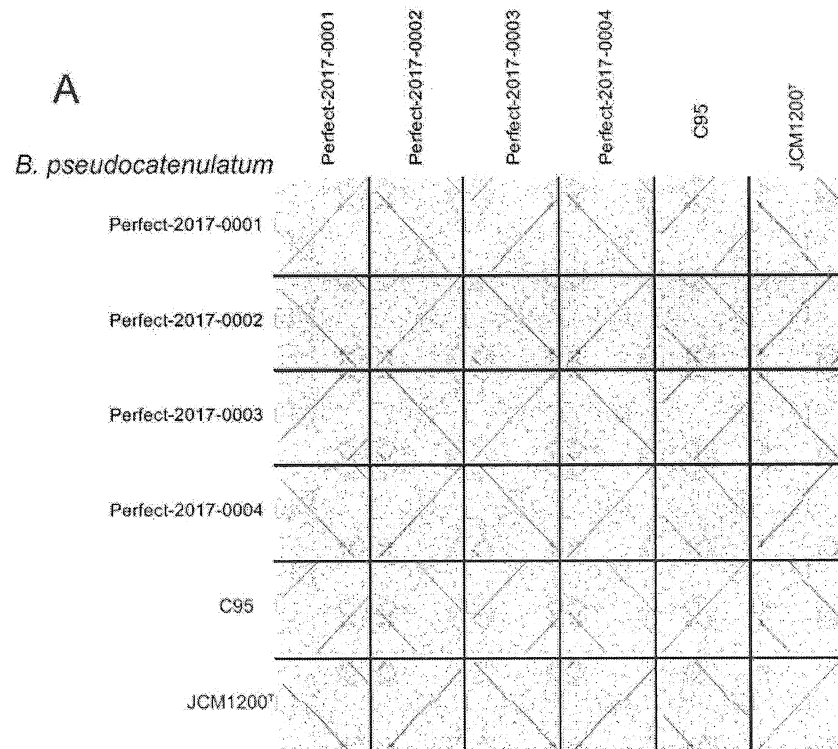


Fig. 5

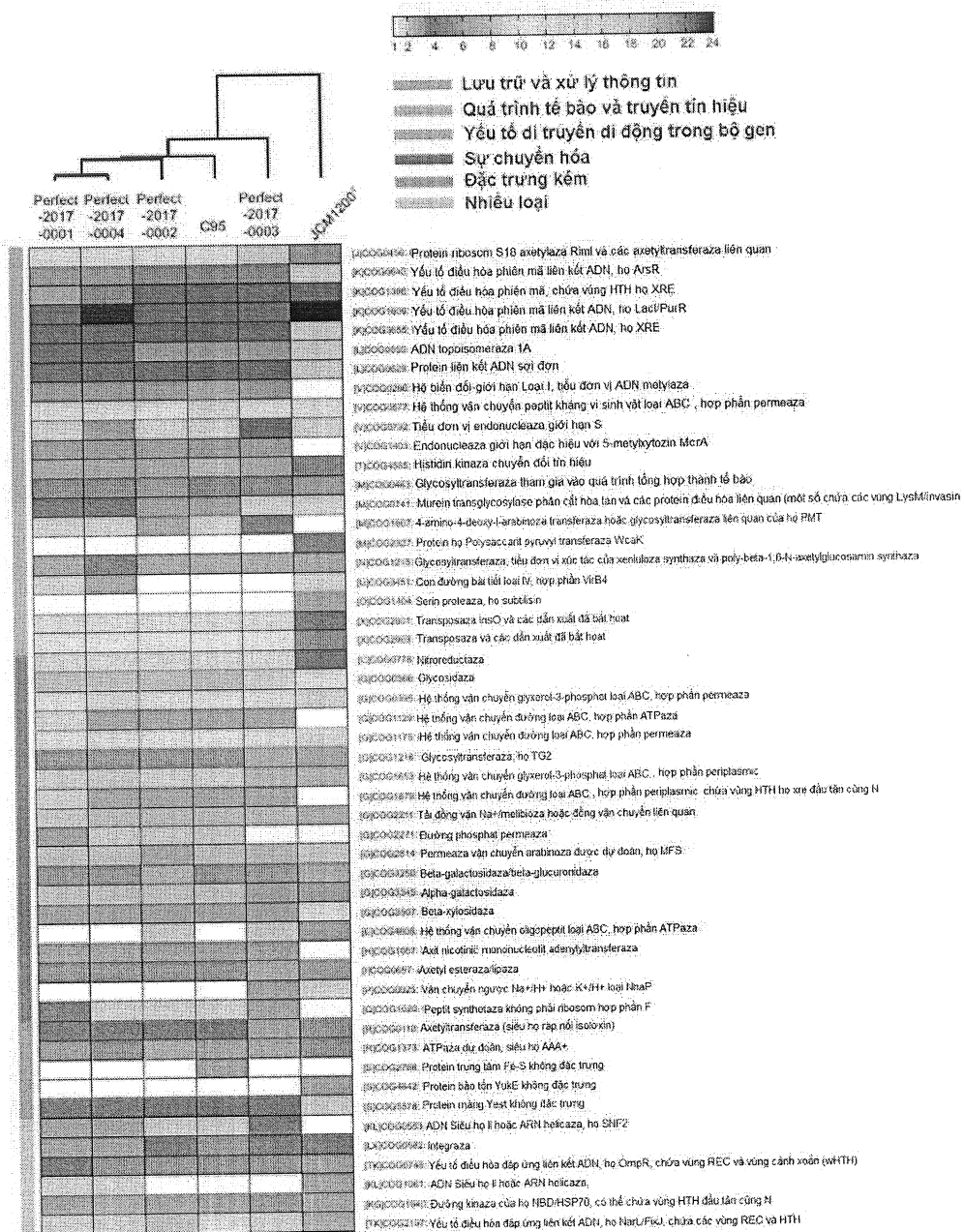


Fig. 6

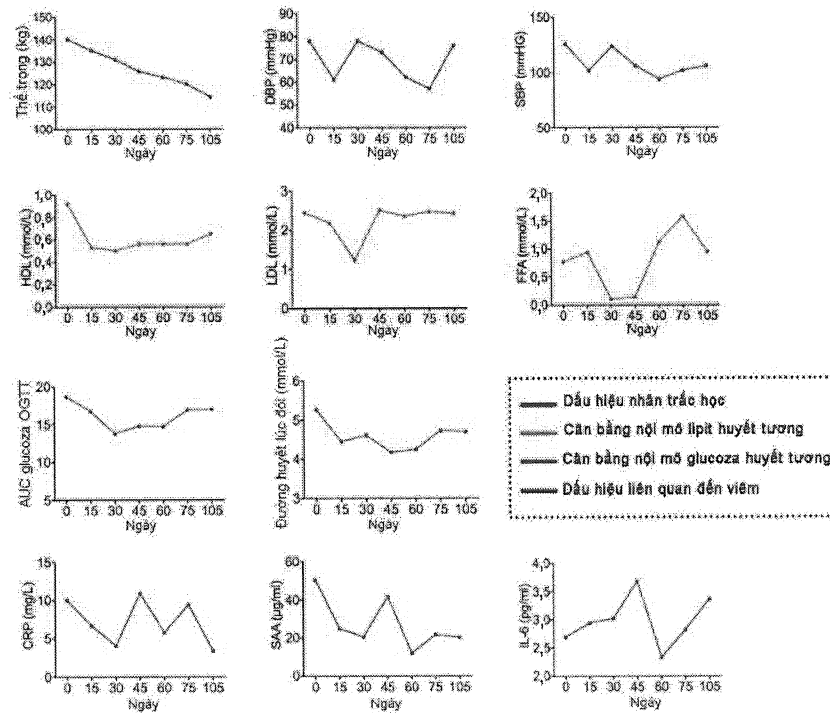


Fig. 7

Fig. 7 Các thông số sinh học thay đổi trong quá trình can thiệp. (màu đỏ) Các dấu hiệu nhân trắc học. (màu xanh lá cây) Cân bằng nội môi lipid huyết tương. (màu xanh da trời) Cân bằng nội môi glucose huyết tương. (màu tím) Các dấu hiệu liên quan đến viêm. SAA: protein amyloid huyết thanh A; CRP: protein phản ứng C

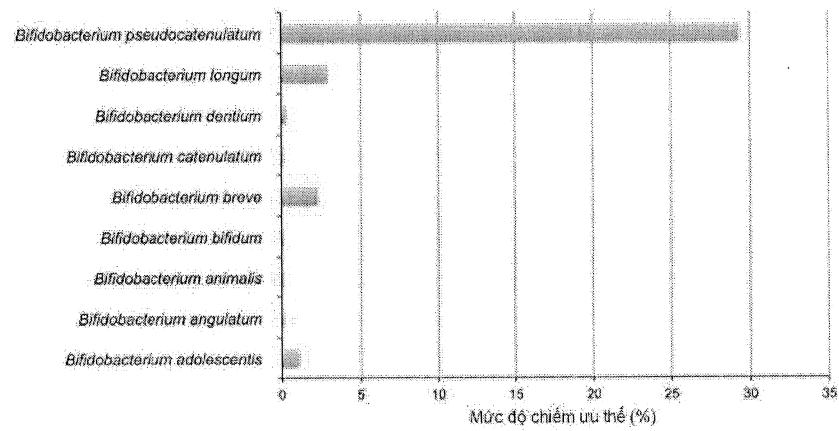


Fig. 8

Fig. 8. Mức độ chiếm ưu thế của 9 loài *Bifidobacterium* được xác định trong cộng đồng hệ vi sinh vật đường ruột vào Ngày 105.

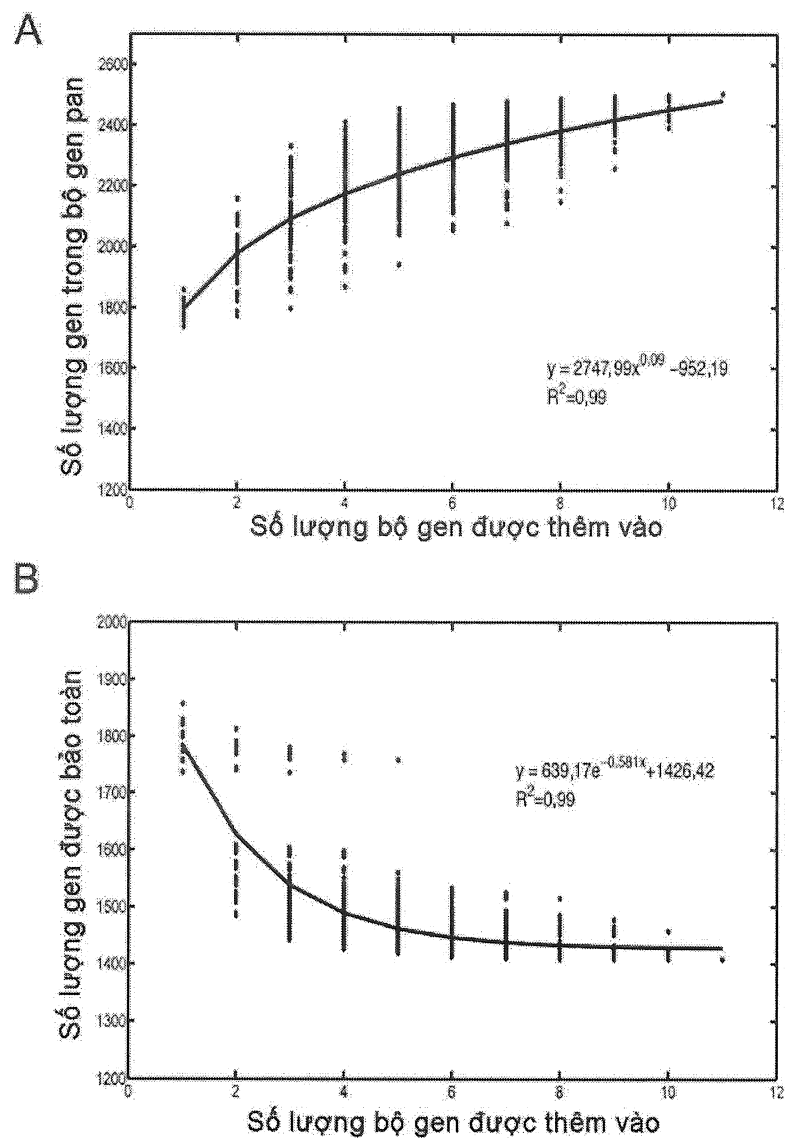


Fig. 9

Fig. 9 Đường cong bộ gen pan và bộ gen lõi của *B. pseudocatenulatum*. (A) Số lượng các gen tích tụ trong bộ gen pan của *B. pseudocatenulatum* được thể hiện trên biểu đồ chấm so với số lượng bộ gen được thêm vào. Hàm toán học nội suy cũng được biểu thị. Số lượng gen tích tụ giảm đặc trưng cho bộ gen lõi được thể hiện trên đồ thị chấm so với số lượng bộ gen được thêm vào. Hàm toán học nội suy cũng được báo cáo.

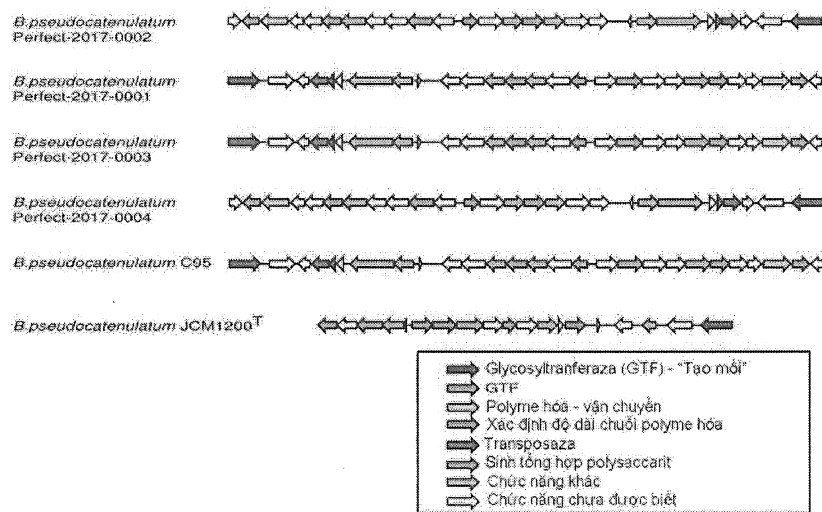


Fig. 10

Fig. 10 Các bản đồ gen vật lý của các cụm gen eps được dự đoán từ sáu bộ gen hoàn chỉnh của *B. pseudocatenulatum*. Các gen được thể hiện dưới dạng các mũi tên có màu theo chức năng tiềm tàng của chúng.



Fig. 11 Sự phân phối của các COG độc nhất hoặc phân tán trong sáu bộ gen của *B. pseudocatenulatum*. Bản đồ nhiệt (heatmap) cho thấy số lượng bản sao của các gen được chú thích dưới dạng hàm COG cụ thể. Các chủng được phân cụm bằng phương pháp liên kết Ward với khoảng cách Jaccard.