



(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)



1-0044395

(51)^{2020.01} A23L 33/135; A23L 2/52; C12N 1/20; (13) B
A23C 9/00; A23L 33/125

(21) 1-2020-05659

(22) 26/03/2019

(86) PCT/JP2019/012894 26/03/2019

(87) WO2019/189200 A1 03/10/2019

(30) 2018-065647 29/03/2018 JP

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/01/2021 394A

(71) MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. (JP)

33-1, Shiba 5-chome, Minato-ku, Tokyo 108-8384 Japan

(72) TAKAHASHI Sachiko (JP); IWABUCHI Noriyuki (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) HỢP PHẦN DINH DƯỠNG, CHẾ PHẨM ĐỒ ĂN/ĐỒ UỐNG VÀ SỮA BỘT CẢI
BIẾN CHỨA HỢP PHẦN DINH DƯỠNG NÀY

(21) 1-2020-05659

(57) Sáng chế đề cập đến kỹ thuật mà có khả năng thúc đẩy sự tăng sinh của các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ (các HMO), khi có mặt của các HMO. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến hợp phần dinh dưỡng chứa các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và các oligosacarit có trong sữa mẹ. Hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế có thể được sử dụng một cách thích hợp cho đồ ăn/đồ uống, thuốc, thuốc không cần kê đơn, thức ăn gia súc, vậ tương tự.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp phần dinh dưỡng có khả năng thúc đẩy sự tăng sinh của các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ (sau đây, còn được gọi là "các HMO").

Trình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bifidobacteria là các vi khuẩn bản địa trong đường ruột của động vật có vú bao gồm cả con người, và được biết là có tác dụng ức chế sự tăng sinh của các vi khuẩn đường ruột gây bệnh trong đường ruột.

Nói chung, *Bifidobacteria* chiếm ưu thế trong hệ tập khuẩn ruột (hệ vi khuẩn đường ruột) của các trẻ nhỏ khỏe mạnh, nhưng giảm dần theo độ tuổi, và sau đó các vi khuẩn gây thối rữa như *Escherichia coli* hoặc các vi khuẩn thuộc loài *Clostridium* gia tăng, do đó ảnh hưởng bất lợi đến sức khỏe của vật chủ (con người). Do đó, để duy trì trạng thái khỏe mạnh trong thời gian dài, điều quan trọng là phải duy trì hệ tập khuẩn ruột nơi mà *Bifidobacteria* chiếm ưu thế.

Các HMO có chứa trong sữa mẹ ở mức 10 đến 20 g/L, và là hỗn hợp của 130 loại oligosacarit hoặc nhiều hơn. Các cấu trúc của chúng bao gồm 13 loại cấu trúc lõi khác nhau mà fucoza và axit sialic được bổ sung vào. Tỷ lệ đường trung tính được fucosyl hóa là cao trong sữa mẹ, và thông thường, bao gồm 2'-fucosyl lactoza (sau đây, còn được gọi là "2'-FL"), lacto-N-fucopentaoza I (sau đây, còn được gọi là "LNFP1"), lacto-N-difucohexaoza I (sau đây, còn được gọi là "LNDFP I"), và lacto-N-tetraoza (sau đây, còn được gọi là "LNT"). Bốn loại này chiếm 1/3 đến 1/4 trong toàn bộ các oligosacarit có trong sữa mẹ. Các oligosacarit chứa lacto-N-bioza được đặt là loại I, và các oligosacarit chứa N-axetylactosamin ($\text{Gal}(\beta 1-4)\text{G1cNAc}$) được đặt là loại II. Trong sữa mẹ, lượng LNT hoặc LNFP1 của loại I cao hơn lượng lacto-N-neotetraoza (sau đây, còn được gọi là "LNnT") hoặc lacto-N-fucopentaoza

III của loại II. Sự cùng tồn tại của loại I và loại II, và sự ưu tiên loại I là các đặc tính phân biệt giữa các oligosacarit có trong sữa mẹ, mà là khác với các loại oligosacarit trong sữa khác (xem các tài liệu phi sáng chế 1 và 2).

Các HMO có trong trong sữa mẹ, 2'-FL và LNnT, có hoạt tính tăng sinh *Bifidobacteria*, được biết là đóng vai trò là yếu tố tăng trưởng của *Bifidobacteria* bởi việc được *Bifidobacteria* sử dụng chọn lọc, và là quan trọng trong việc hình thành hệ tập khuẩn ruột nơi *Bifidobacteria* chiếm ưu thế. Ngoài ra, các HMO có thể được tổng hợp, và do đó có khả năng ứng dụng trong công nghiệp (xem tài liệu sáng chế 1).

Bifidobacteria chuyển hóa một số HMO bằng cách sử dụng quy trình GNB/LNB đặc hiệu cho *Bifidobacteria*. Quy trình này có mặt trong nhiều chủng thường được tìm thấy ở trẻ nhỏ, nhưng không có trong *Bifidobacteria* thường được tìm thấy trong đường ruột của người trưởng thành. Trong số bốn chủng vi khuẩn là *Bifidobacterium longum* phân loài *longum*, *Bifidobacterium longum* phân loài *infantis*, *Bifidobacterium breve*, và *Bifidobacterium bifidum*, mà là *Bifidobacteria* thường được thấy ở trẻ nhỏ, hai chủng vi khuẩn là *Bifidobacterium longum* phân loài *infantis* và *Bifidobacterium bifidum* đã được báo cáo là các chủng vi khuẩn mà có thể sử dụng các HMO làm nguồn cacbon duy nhất (xem tài liệu phi sáng chế 3).

Tài liệu trích dẫn:

Tài liệu sáng chế:

Tài liệu sáng chế 1: WO2014/086373

Tài liệu phi sáng chế:

Tài liệu phi sáng chế 1: Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria Vol. 22, No. 1 2011

Tài liệu phi sáng chế 2: Milk Science Vol. 56, No. 4 2008

Tài liệu phi sáng chế 3: Milk Science Vol. 61, No.2. 2012

Tài liệu phi sáng chế 4: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 40

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết:

Khi chuyển hóa các HMO, như được mô tả ở trên, trong số *Bifidobacteria*, có các vi khuẩn có không khả năng hoặc có khả năng đồng hóa thấp các HMO, trong khi cũng có các vi khuẩn mà có thể đồng hóa các HMO, chẳng hạn như *Bifidobacterium longum* phân loài *infantis* và *Bifidobacterium bifidum*. Sau đó, khi chuyển hóa các HMO, ví dụ, *Bifidobacterium longum* phân loài *infantis* đưa các HMO vào trong tế bào vi khuẩn, khi sử dụng, trong khi *Bifidobacterium bifidum* tạm thời thúc đẩy sự tích tụ lactoza bên ngoài tế bào vi khuẩn bằng cách phân hủy các oligosacarit này bằng enzym ngoại bào (xem các tài liệu phi sáng chế 3 và 4).

Như được mô tả ở trên, trong số các vi khuẩn, có các vi khuẩn không có khả năng hoặc có khả năng đồng hóa thấp các HMO. Tuy nhiên, ngay cả trong số các vi khuẩn như vậy, có nhiều vi khuẩn mà có thể được sử dụng làm các vi khuẩn có lợi. Do đó, ngay cả các lợi khuẩn không có hoặc có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ (sau đây, còn được gọi là "các HMO") vẫn hữu ích làm hợp phần dinh dưỡng miễn là có thể tăng sinh khi có mặt của các HMO.

Do đó, mục đích chính của sáng chế là đề xuất kỹ thuật mà có thể thúc đẩy sự tăng sinh của các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ (các HMO), khi có mặt của các HMO.

Cách thức giải quyết vấn đề:

Để giải quyết các vấn đề trên đây, các tác giả sáng chế v.v. đã quan sát thấy thực tế rằng *Bifidobacterium bifidum* thúc đẩy tạm thời sự tích tụ lactoza bên ngoài tế bào vi khuẩn bằng cách phân hủy các HMO bằng enzym ngoại bào, và sau đó đã phát hiện thấy rằng sự tăng sinh của các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các HMO được thúc đẩy khi các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các HMO, *Bifidobacterium bifidum*, và các HMO được cùng nuôi cấy.

Tức là, sáng chế đề xuất hợp phần dinh dưỡng chứa các vi khuẩn thuộc

Bifidobacterium bifidum, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và các oligosacarit có trong sữa mẹ.

Trong hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế, đối với các oligosacarit có trong sữa mẹ, 2'-fucosyllactose và/hoặc lacto-N-neotetraose có thể được sử dụng.

Trong hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế, đối với các lợi khuẩn, các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium*, ngoại trừ các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, và/hoặc *Lactobacilli* có thể được sử dụng.

Trong trường hợp này, đối với các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium*, ngoại trừ các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, ít nhất một vi khuẩn được chọn từ *Bifidobacterium longum* phân loài *longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis*, *Bifidobacterium breve*, và *Bifidobacterium pseudolongum* có thể được sử dụng.

Ngoài ra, đối với *Lactobacilli*, ít nhất một vi khuẩn được chọn từ *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus axitophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, và *Lactobacillus gasseri* có thể được sử dụng.

Trong hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế, đối với các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, ít nhất một vi khuẩn được chọn từ *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521, *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02429), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-1252), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02431), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02648), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02432), và *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02433) có thể được sử dụng.

Hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế có thể được sử dụng cho chế phẩm đồ ăn/đồ uống hoặc sữa bột cải biến.

Hiệu quả của sáng chế:

Theo sáng chế, có thể thúc đẩy sự tăng sinh của các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ (các HMO), khi có mặt của các HMO. Các hiệu quả được mô tả ở đây không nhất thiết phải bị giới hạn, và có thể là bất kỳ

hiệu quả nào được mô tả trong sáng chế này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, phương án thích hợp để thực hiện sáng chế sẽ được mô tả. Phương án cần được mô tả dưới đây được mô tả làm ví dụ về phương án đại diện cho sáng chế này, nhờ đó phạm vi của sáng chế không bị hiểu theo nghĩa hẹp. Trong bản mô tả này, liên quan đến khoảng trị số được diễn đạt là "từ giới hạn dưới đến giới hạn trên", giới hạn trên có thể là "hoặc ít hơn" hoặc "ít hơn" và giới hạn dưới có thể là "hoặc nhiều hơn" hoặc "nhiều hơn." Ngoài ra, trong bản mô tả này, tỷ lệ phần trăm được tính theo khối lượng trừ khi có quy định khác.

1. Hợp phần dinh dưỡng

Hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế chứa ít nhất các thành phần sau: (1) các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, (2) một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và (3) các oligosacarit có trong sữa mẹ. Sau đây, mỗi trong số các thành phần này sẽ được mô tả chi tiết.

(1) Các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*

Đối với các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* mà có thể được sử dụng theo sáng chế, một loại hoặc hai hoặc nhiều loại vi khuẩn đã biết hoặc chưa biết thuộc *Bifidobacterium bifidum* có thể được chọn và sử dụng một cách tùy ý miễn là không làm giảm hiệu quả của sáng chế. Cụ thể là, chẳng hạn, các ví dụ có thể bao gồm *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521, *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02429), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-1252), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02431), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02648), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02432), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02433), *Bifidobacterium bifidum* (FERM BP-791), *Bifidobacterium bifidum* (FERM P-11788), *Bifidobacterium bifidum* (FERM P-11791), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-31), *Bifidobacterium bifidum* G9-1, *Bifidobacterium bifidum* BF-1, *Bifidobacterium bifidum* Rosell-71, *Bifidobacterium bifidum* (NCDO 1453), và tương tự.

Bifidobacterium bifidum ATCC29521 có thể thu được từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hoa Kỳ (địa chỉ: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Hoa Kỳ).

Bifidobacterium bifidum (NITE BP-02429), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02431), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02432), và *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02433) đã được lưu ký quốc tế với các số lưu ký là NITE BP-02429, NITE BP-02431, NITE BP-02432, và NITE BP-02433 theo hiệp ước Budapest tại Trung tâm lưu ký vi sinh vật sáng chế, Viện công nghệ và đánh giá Quốc gia (National Institute of Technology and Evaluation - NITE) (Room No. 122, 2-5-8 Kazusakamataru Kisarazu Chiba 292-0818), ngày 21.02.2017.

Bifidobacterium bifidum (NITE BP-1252) đã được lưu ký quốc tế với số lưu ký là NITE BP-1252 theo hiệp ước Budapest tại Trung tâm lưu ký vi sinh vật sáng chế, NITE (Room No. 122, 2-5-8 Kazusakamataru Kisarazu Chiba 292-0818), ngày 23.02.2012.

Bifidobacterium bifidum (NITE BP-02648) được lưu ký với số lưu ký là NITE BP-02648 tại Trung tâm lưu ký vi sinh vật sáng chế, NITE (Room No. 122, 2-5-8 Kazusakamataru Kisarazu Chiba 292-0818), ngày 26.02.2018.

Chủng được xác định bằng tên chủng được lấy ví dụ ở trên là không bị giới hạn ở bản thân chủng mà đã được lưu ký hoặc được đăng ký ở viện được xác định trước với tên chủng tương ứng (sau đây, để thuận tiện cho việc trình bày, còn được gọi là "chủng được lưu ký"), mà còn bao gồm chủng về cơ bản tương đương với nó (còn được gọi là "chủng dẫn xuất" hoặc "chủng cảm ứng"). Tức là, ví dụ, "*Bifidobacterium bifidum* ATCC29521" không bị giới hạn ở bản thân chủng mà đã được lưu ký ở nơi lưu ký với số lưu ký là *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521, mà còn bao gồm chủng về cơ bản tương đương với nó.

Chủng về cơ bản tương đương với chủng được lưu ký có thể là, ví dụ, chủng dẫn xuất mà chủng bố mẹ của nó là chủng được lưu ký tương đương. Chủng dẫn

xuất có thể bao gồm chủng được lai tạo từ chủng được lưu ký hoặc chủng tự nhiên xuất hiện từ chủng được lưu ký này.

Đối với các chủng về cơ bản đồng nhất và các chủng dẫn xuất, có thể kể đến các chủng sau đây:

- (1) chủng được xác định là chủng đồng nhất bằng phương pháp RAPD (Randomly Amplified Polymorphic ADN – ADN đa hình được khuếch đại ngẫu nhiên) hoặc phương pháp PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis - điện di gel xung trường) (được mô tả trong tài liệu Probiotics in food/Health and nutritional properties and guidelines for evaluation 85, Page 43)
- (2) chủng mà chỉ có các gen được dẫn xuất từ chủng được lưu ký tương đương, không có các gen có nguồn gốc ngoại lai, và có sự đồng nhất về ADN là 95% hoặc cao hơn
- (3) chủng được lai tạo từ chủng tương đương (chủng có các đặc điểm giống nhau, bao gồm các thay đổi do công nghệ gen, các đột biến, và các đột biến tự nhiên)

Khi chuyển hóa các HMO, các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* tạm thời thúc đẩy sự tích tụ lactoza bên ngoài tế bào vi khuẩn bằng cách phân hủy các HMO bằng enzym ngoại bào. Lactoza được tích tụ này có thể được sử dụng bởi các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, mà sẽ được mô tả dưới đây, sao cho các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ có thể tăng sinh.

- (2) Các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ

Đối với lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, mà có thể được sử dụng theo sáng chế, một loại hoặc hai hoặc nhiều loại tế bào vi khuẩn có thể được chọn một cách tùy ý từ các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ đã biết hoặc chưa biết, miễn là không làm giảm hiệu quả của sáng chế.

Theo sáng chế, "khả năng đồng hóa các oligosacarit có trong sữa mẹ là thấp"

có nghĩa là các vi khuẩn không những ít có khả năng sử dụng các đường, mà còn ít có khả năng chuyển hóa và tăng sinh khi được nuôi cấy trong môi trường chứa các oligosacarit có trong sữa mẹ làm nguồn cacbon, so với khi được nuôi cấy trong môi trường chứa các đường chẳng hạn như glucoza hoặc lactoza, mà thường được đồng hóa bởi *Bifidobacteria* và *lactobacilli* (là các lợi khuẩn), làm nguồn cacbon.

Ví dụ, khả năng đồng hóa các oligosacarit có trong sữa mẹ có thể được xác định bằng cách đo tỷ lệ hấp thụ các oligosacarit có trong sữa mẹ được đưa vào trong tế bào, làm chỉ số, và có thể được tính bằng cách xác định xem liệu các oligosacarit có trong sữa mẹ có đang giảm theo thời gian sau khi bắt đầu nuôi cấy hay không. Nếu không thì, có thể thực hiện việc xác nhận bằng cách kiểm tra độ đục hoặc tốc độ sinh trưởng đặc hiệu của các vi sinh vật trong môi trường chỉ chứa các oligosacarit có trong sữa mẹ làm nguồn cacbon.

Tốc độ sinh trưởng đặc hiệu của các vi sinh vật được định nghĩa là sự gia tăng của tế bào trên mỗi đơn vị thời gian. Trường hợp "khả năng đồng hóa các oligosacarit có trong sữa mẹ là thấp" có nghĩa là tốc độ sinh trưởng đặc hiệu giảm xuống 80% hoặc ít hơn, tốt hơn là 70% hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là 50% hoặc ít hơn, còn tốt hơn nữa là 10% hoặc ít hơn trong trường hợp các oligosacarit có trong sữa mẹ làm nguồn cacbon so với trường hợp trong môi trường có glucoza hoặc lactoza làm nguồn cacbon. Cụ thể là, ví dụ, theo sáng chế, đối với các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, có thể kể đến các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium*, ngoại trừ các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, và/hoặc *lactobacilli*.

Theo sáng chế, tế bào vi khuẩn lợi khuẩn không có khả năng đồng hóa các oligosacarit có trong sữa mẹ có thể được sử dụng. Tế bào vi khuẩn lợi khuẩn không có khả năng đồng hóa các oligosacarit có trong sữa mẹ có nghĩa là tế bào vi khuẩn mà hoàn toàn không thể sử dụng các oligosacarit có trong sữa mẹ, hoặc nó bị thiếu một phần con đường trao đổi chất, và không có gen vận chuyển mà đưa đường được

chuyển hóa vào trong cơ thể.

Cụ thể hơn là, đối với các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium*, ngoại trừ các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, có thể kể đến *Bifidobacterium longum* phân loài *longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium pseudolongum*, và tương tự.

Cụ thể hơn nữa là, có thể kể đến *Bifidobacterium longum* phân loài *longum* ATCC15707, *Bifidobacterium longum* phân loài *longum* BB536, *Bifidobacterium adolescentis* ATCC15703, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919, *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* DSM10140, *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* MCC-525, *Bifidobacterium breve* ATCC15700, *Bifidobacterium pseudolongum* ATCC25526, *Bifidobacterium longum* (FERM P-10657), *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* Bb-12 DSM1595, *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* GCL2505, *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* CNCMI-2494, *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* LAFTI B94, *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis*, *Bifidobacterium longum* Rosell-175, *Bifidobacterium animalis* phân loài *animalis*, *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* HN019, và tương tự.

Ngoài ra, đối với *lactobacilli*, có thể kể đến *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus axitophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri*, và tương tự.

Cụ thể hơn là, có thể kể đến *Lactobacillus paracasei* ATCC25302, *Lactobacillus plantarum* ATCC14917, *Lactobacillus axitophilus* ATCC4356, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469, *Lactobacillus gasseri* ATCC33323, *Lactobacillus gasseri* FERM BP-10953, *Lactobacillus gasseri* FERM BP-6999, *Lactobacillus gasseri* (NITE BP-224R), *Lactobacillus delbrueckii* phân loài *bulgaricus* (FERM P-17227), *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103, *Lactobacillus*

reuteri DSM17938, *Bacillus coagulans* GBI-30, *Lactobacillus axitophilus*, *Lactobacillus axitophilus* LAFTI L10, *Lactobacillus casei* LAFTI (nhãn hiệu đã được đăng ký) L26, *Lactobacillus casei* LAFTI (nhãn hiệu đã được đăng ký) L26, *Lactococcus lactis* phân loài *lactis* Rosell-1058, *Lactobacillus paracasei* NCC2461, *Lactobacillus johnsonii* NCC533, *Lactobacillus rhamnosus* Rosell-11, *Lactobacillus axitophilus* Rosell-52, các chủng *Lactobacillus casei* *Lactobacillus casei shirota*, và tương tự.

Các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ này có thể tăng sinh bằng cách sử dụng dụng lactoza được sản sinh khi các HMO được chuyển hóa bởi các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* được mô tả ở trên. Tốt hơn nữa là, có mong muốn là tốc độ sinh trưởng đặc hiệu của các lợi khuẩn gia tăng bằng cách nuôi cấy cùng với các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*. Ví dụ, có nghĩa là tốc độ sinh trưởng đặc hiệu được gia tăng lên đến 105% hoặc cao hơn, tốt hơn là 110% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 120% hoặc cao hơn trong trường hợp các oligosacarit có trong sữa mẹ làm nguồn cacbon so với trường hợp trong môi trường có glucoza hoặc lactoza làm nguồn cacbon.

Theo sáng chế, "các lợi khuẩn" có nghĩa là các vi khuẩn sống mà có tác dụng có lợi cho sức khỏe con người.

(3) Các oligosacarit có trong sữa mẹ (các HMO)

Các HMO là thuật ngữ chung dùng cho các oligosacarit có ba hoặc nhiều đường, ngoại trừ lactoza mà có lượng nhỏ trong sữa mẹ. Sữa động vật có vú có 12 chuỗi khung cacbon lõi như lacto-N-tetraoza (LNT), lacto-N-neotetraoza (LNnT), lacto-N-hexaoza (LNH), và lacto-N-neohexaoza (LNnH). Axit Lewis a, b, x và α 2-3/2-6N- axetylneuraminic được bổ sung vào các khung cacbon này, sao cho có thể có đến 100 biến thể của các mạch đường.

Đối với các HMO mà có thể được sử dụng theo sáng chế, một loại hoặc hai hoặc nhiều loại HMO đã biết hoặc chưa biết, mà là các oligosacarit mà có thể được

sử dụng bởi các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, và cũng có thể không được sử dụng bởi các lợi khuẩn, có thể được chọn và sử dụng một cách tùy ý miễn là không làm giảm hiệu quả của sáng chế. Cụ thể là, ví dụ, có thể kể đến L-fucoza, Lacto-N-fucopentaoza I, Lacto-N-fucopentaoza II, 2'-Fucosyllactoza, 3'-Fucosyllactoza, Lacto-N-fucopentaoza III, 3'-Fucosyllacto-N-hexaoza, Lacto-N-difucohexaoza I, Lacto-difucotetraoza, Lacto-difucohexaoza I, Lactodifucohexaoza II, Lacto-N-tetraoza, Difucosyl syalyllacto-N-hexaoza, Syalyllacto-N-tetraoza, Fucosylsyalyllacto-N-hexaoza I, 3'-Fucosylsialyllacto-N-tetraoza(Fuc 1, 2 Gal, Fuc 1, 4 Gal NAC), Lacto-N-neotetraoza, 3'-Sialyl-3-fucosyllactoza, Disialomonofucosyllacto-N-neohexaoza, Monofucosylmonosialyllacto-N-octaoza, Sialyllacto-N-fucohexaoza II, Disialyllacto-N-fucopentaoza II, Monofucosyldisialyllacto-N-tetraoza, 2'-Sialyllactoza, 2'-Sialyllactosamin, 3'-Sialyllactoza, 3'-Sialyllactosamin, 6'-Sialyllactoza, 6'-Sialyllactosamin, Sialyllacto-N-neotetraoza c, Monosialyllacto-N-hexaoza, Disialyllacto-N-hexaoza I, Monosialyllacto-N-neohexaoza I, Monosialyllacto-N-neohexaoza II, Disialyllacto-N-neohexaoza, Disialyllacto-N-tetraoza, Disialyllacto-N-hexaoza II, Sialyllacto-N-tetraoza a, Disialyllacto-N-hexaoza I, Sialyllacto-N-tetraoza b, 2'-Fucosyllacto-N-hexaoza, 3'-Fucosyllacto-N-neohexaoza, 2'-Fucosyl-N-axetylglucosamin, Lacto-N-fucopentaoza V, Lacto-N-hexaoza, Para-lacto-N-hexaoza, Lacto-N-neohexaoza, Para-lacto-N-neohexaoza, Monofucosyllacto-N-hexaoza II, lacto-N-hexaoza được fucosyl hóa đồng phân (1), lacto-N-hexaoza được fucosyl hóa đồng phân (3), lacto-N-hexaoza được fucosyl hóa đồng phân (2), Difucosyl-para-lacto-N-neohexaoza, Difucosyl-para-lacto-N-hexaoza, 2' 3'-Difucosyllacto-N-hexaoza, Lacto-N-neocataoza, Para-lacto-N-octanoza, Iso-lacto-N-octaoza, Lacto-N-octaoza, Monofucosyllacto-neocataoza, Monofucosyllacto-N-ocataoza, Difucosyllacto-N-octaoza I,

Difucosyllacto-N-octaoza II, Difucosyllacto-N-neocataoza II,
 Difucosyllacto-N-neocataoza I, Lacto-N-decaoza, Trifucosyllacto-N-neooctaoza,
 Trifucosyllacto-N-octaoza, Trifucosyl-iso-lacto-N-octaoza, Lacto-N-difuco-hexaoza
 II, Sialyl-lacto-N-tetraoza a, Sialyl-lacto-N-tetraoza b, Sialyl-lacto-N-tetraoza c,
 Sialyl-fucosyl-lacto-N-tetraoza I, Sialyl-fucosyl-lacto-N-tetraoza II,
 Disialyl-lacto-N-tetraoza, Lacto-N-neotetraoza, v.v. và các kết hợp của chúng.

Trong số chúng, 2'-fucosyllactoza (sau đây, còn được gọi là "2'-FL"),
 lacto-N-fucopentaoza I (sau đây, còn được gọi là "LNFPI"), lacto-N-difucohexaoza I
 (sau đây, còn được gọi là "LNDFP I") và lacto-N-neotetraoza (sau đây, còn được gọi
 là "LNnT") có thể được sử dụng.

2. Sử dụng hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế

Khi hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế được sử dụng, có thể kỳ vọng thúc
 đẩy sự tăng sinh của các lợi khuẩn có tác dụng đến các vi khuẩn có lợi. Tức là, do
 các lợi khuẩn tăng sinh trong ruột, nên hệ tập khuẩn ruột được cải thiện. Việc cải
 thiện hệ tập khuẩn ruột có thể cải thiện hoặc phòng ngừa, và điều trị các bệnh do hệ
 tập khuẩn ruột gây ra.

Đối với các bệnh do hệ tập khuẩn ruột gây ra, có thể kể đến viêm đại tràng,
 loét đại tràng, đại tràng kích thích, ung thư đại trực tràng, tiểu đường, xơ vữa động
 mạch, và tương tự.

Ngoài ra, khi hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế được sử dụng, chức năng
 miễn dịch được tăng cường. Sự tăng cường chức năng miễn dịch có thể phòng ngừa
 hoặc cải thiện, và điều trị các bệnh dị ứng như dị ứng phấn hoa, bệnh hen suyễn, và
 viêm da dị ứng.

Hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế có thể được sử dụng một cách thích hợp
 trong đồ ăn/đồ uống, thuốc, thuốc không cần kê đơn, thức ăn gia súc, và tương tự.

Ứng dụng của phương án này có thể là để sử dụng nhằm mục đích trị liệu,
 hoặc sử dụng không nhằm mục đích trị liệu.

"Không nhằm mục đích không trị liệu" là khái niệm mà không bao gồm can thiệp y tế, tức là can thiệp điều trị cơ thể con người để điều trị bệnh. Ví dụ, có thể kể đến việc tăng cường sức khỏe, điều trị thẩm mỹ, và tương tự.

"Cải thiện" đề cập đến việc cải thiện bệnh, triệu chứng hoặc tình trạng; phòng ngừa hoặc làm chậm sự xấu đi của bệnh, triệu chứng hoặc tình trạng; hoặc ngược lại, phòng ngừa hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh hoặc triệu chứng.

"Phòng ngừa" đề cập đến việc phòng ngừa hoặc làm chậm sự khởi phát của bệnh hoặc triệu chứng theo mục đích sử dụng, hoặc giảm nguy cơ mắc bệnh hoặc triệu chứng theo mục đích sử dụng này.

Trong mỗi hợp phần dinh dưỡng, mong muốn là sử dụng các lợi khuẩn với lượng khoảng 10^3 đến khoảng 10^{12} CFU/g trên mỗi đơn vị liều, nhưng các giá trị cao hơn các mức này có thể cũng có thể được chấp nhận. Khi chế phẩm lợi khuẩn được sử dụng cho người trưởng thành (tức là, người trên 16 tuổi), mong muốn là sử dụng các lợi khuẩn với liều lượng, tốt hơn là, ít nhất là 10^6 CFU/g, tốt hơn nữa là 10^8 CFU/g. Khi chế phẩm lợi khuẩn được sử dụng cho trẻ nhỏ (tức là, người dưới 16 tuổi), mong muốn là sử dụng các lợi khuẩn với lượng nằm trong khoảng tốt hơn là khoảng 10^6 đến khoảng 10^8 CFU/g. CFU biểu thị đơn vị đối với sự hình thành lạc khuẩn: đơn vị hình thành lạc khuẩn.

Có mong muốn là đối tượng sử dụng theo sáng chế là trẻ sơ sinh.

Trẻ sơ sinh bao gồm trẻ nhỏ và trẻ mầm non, cụ thể hơn là bao gồm trẻ nhỏ, trẻ mầm non, và trẻ mới sinh, và cụ thể hơn là bao gồm trẻ nhỏ, trẻ mầm non, trẻ mới sinh, trẻ sinh thiếu tháng, trẻ sinh non, và trẻ sơ sinh nhẹ cân. Theo sáng chế, phạm trù trẻ sơ sinh bao gồm con người trừ khi có quy định khác. Trẻ nhỏ đề cập đến trẻ trong độ tuổi còn ẵm ngửa, và độ tuổi còn ẵm ngửa đề cập đến giai đoạn trong đó sữa như sữa mẹ là nguồn dinh dưỡng chính. Đối với con người, độ tuổi còn ẵm ngửa tương ứng với dưới 1 tuổi. Trẻ mầm non thường đề cập đến trẻ trong giai đoạn mầm non. Trẻ mới sinh đề cập đến trẻ trong giai đoạn mới sinh, và giai đoạn mới sinh có

nghĩa là giai đoạn ngay sau khi sinh ra. Đối với con người, giai đoạn mới sinh có nghĩa là trong khoảng bốn tuần sau sinh.

Ngoài ra, theo sáng chế, ngoài các oligosacarit có trong sữa mẹ, nguồn thức ăn cho các lợi khuẩn cũng có thể cùng được sử dụng cùng nhau. Nguồn thức ăn cho các lợi khuẩn là các thành phần thực phẩm khó tiêu hóa mà có tác dụng tích cực lên vật chủ và cải thiện sức khỏe của vật chủ này, bằng cách thay đổi chọn lọc sự tăng sinh và hoạt tính của các vi khuẩn nhất định trong ruột già.

Nguồn thức ăn cho các lợi khuẩn là không bị giới hạn cụ thể miễn là vẫn đạt được hiệu quả theo sáng chế khi chúng được tiêu hóa cùng với các vi khuẩn hiện có hoặc môi trường chứa nó, nhưng, ví dụ, lactuloza, raffinosa, các galactooligosacarit, các fructooligosacarit, các oligosacarit đậu tương, các lacto-fructo oligosacarit, các xylo oligosacarit, các isomalto oligosacarit, các manno-oligosacarit đậu cà phê, axit gluconic, polydextroza, inulin, v.v. là được ưu tiên. Trong số chúng, lactuloza, raffinosa, các galactooligosacarit, và tương tự được ưu tiên hơn, và lactuloza, raffinosa và các galactooligosacarit là được ưu tiên hơn.

Đồ ăn/đồ uống

Hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế có thể được bổ sung vào đồ ăn/đồ uống thông thường đã biết khi chế biến, hoặc có thể được trộn với nguyên liệu đồ ăn/đồ uống thô để sản xuất đồ ăn/đồ uống mới.

Đồ ăn/đồ uống sử dụng hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế có thể có dạng bất như dạng lỏng, bột nhão, dạng rắn, hoặc bột, và không những là bánh kẹo dạng viên, đồ ăn dạng lỏng, v.v., mà còn là, ví dụ, có thể kể đến các sản phẩm bột mì, thực phẩm ăn liền, nông sản được chế biến, sản phẩm hải sản được chế biến, sản phẩm chăn nuôi được chế biến, các sản phẩm sữa/từ sữa, dầu và chất béo, các gia vị cơ bản, các gia vị /đồ ăn phức hợp, đồ ăn đông lạnh, bánh kẹo, các đồ uống, các sản phẩm có bán trên thị trường ngoài những các sản phẩm này, v.v..

Các ví dụ về sản phẩm bột mì có thể bao gồm bánh mì, mì ống, mì ý, mì sợi,

hỗn hợp bánh, bột chiên, ruột bánh mỳ, v.v..

Các ví dụ về thực phẩm ăn liền có thể bao gồm mỳ ăn liền, mỳ ly, đồ ăn được hầm/nấu chín, đồ hộp được nấu chín, đồ ăn dùng với lò vi sóng, xúp/món hầm ăn liền, xúp/xúp miso ăn liền, xúp đóng hộp, đồ ăn đông lạnh, thực phẩm ăn liền khác, v.v..

Các ví dụ về nông sản được chế biến có thể bao gồm các nông sản đóng hộp, trái cây đóng hộp, mứt/mứt cam, dưa chua, đậu luộc, các nông sản khô, ngũ cốc (các sản phẩm hạt được chế biến), v.v..

Các ví dụ về sản phẩm hải sản được chế biến có thể bao gồm hải sản đóng hộp, giăm bông/xúc xích từ thịt cá, đồ ăn patê cá, đặc sản hải sản, tsukudani, v.v..

Các ví dụ về sản phẩm chăn nuôi được chế biến có thể bao gồm các patê/sản phẩm chăn nuôi đóng hộp, giăm bông/xúc xích thịt, v.v..

Các ví dụ về sản phẩm sữa/từ sữa có thể bao gồm sữa lên men, sữa qua chế biến, đồ uống từ sữa, sữa chua, thức uống lactic, phô mát, kem lạnh, sữa bột cải biến, kem, các sản phẩm từ sữa khác, v.v..

Các ví dụ về dầu và chất béo có thể bao gồm bơ, bơ thực vật, dầu thực vật, v.v..

Đối với các gia vị cơ bản, ví dụ, có thể kể đến nước tương, miso, nước chấm, gia vị cà chua đã qua chế biến, mirin, giấm, v.v., và đối với gia vị/đồ ăn phức hợp, có thể kể đến đồ trộn nấu, nước sốt cari, nước sốt đậu nành cay, đồ nêm, nước chấm mentsuyu, đồ gia vị, các gia vị phức hợp khác, v.v..

Các ví dụ về đồ ăn đông lạnh có thể bao gồm các thành phần đồ ăn đông lạnh, đồ ăn đông lạnh chưa nấu chín, đồ ăn đông lạnh đã nấu chín, v.v..

Các ví dụ về bánh kẹo có thể bao gồm kẹo caramen, kẹo, kẹo cao su, bánh quy tròn, bánh quy, bánh ngọt, bánh nướng, đồ ăn nhẹ, bánh quy giòn, kẹo ngọt Nhật Bản, bánh gạo, bánh đậu, các bánh kẹo khác, v.v..

Các ví dụ về đồ uống có thể bao gồm đồ uống có ga, nước trái cây tự nhiên,

đồ uống nước trái cây, đồ uống nhẹ chứa nước trái cây, đồ uống có thịt quả, đồ uống trái cây chứa hạt, đồ uống gốc thực vật, sữa đậu nành, đồ uống sữa đậu nành, đồ uống cà phê, đồ uống trà, đồ uống dạng bột, đồ uống cô, đồ uống thể thao, đồ uống dinh dưỡng, đồ uống có cồn, các đồ uống ưa thích khác, v.v..

Các ví dụ về đồ ăn bán sẵn khác có thể bao gồm đồ ăn đậm, gia vị rắc cơm furikake, rong biển ochazuke, v.v..

Lượng vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* trong đồ ăn/đồ uống theo sáng chế có thể được điều chỉnh tùy ý miễn là không làm giảm hiệu quả của sáng chế. Theo sáng chế, cụ thể là, lượng vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* trong đồ ăn/đồ uống có thể được điều chỉnh ở mức 10^3 đến 10^{12} CFU/mL hoặc g tính theo chế phẩm đồ ăn/đồ uống thành phẩm.

Hàm lượng các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ trong đồ ăn/đồ uống theo sáng chế có thể được điều chỉnh tùy ý miễn là hiệu quả của sáng chế không bị suy giảm hay hạn chế. Theo sáng chế, cụ thể là, lượng các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ trong đồ ăn/đồ uống có thể được điều chỉnh ở mức 10^3 đến 10^{12} CFU/mL hoặc g tính theo chế phẩm đồ ăn/đồ uống thành phẩm.

Lượng các HMO trong đồ ăn/đồ uống theo sáng chế có thể được điều chỉnh tùy ý miễn là hiệu quả của sáng chế không bị suy giảm hay hạn chế. Theo sáng chế, cụ thể là, lượng các HMO trong đồ ăn/đồ uống có thể được điều chỉnh ở mức 0,3% đến 5,0% tính theo chế phẩm đồ ăn/đồ uống thành phẩm.

Đồ ăn/đồ uống được dán nhãn chức năng

Ngoài ra, các đồ ăn/đồ uống và tương tự được định nghĩa theo sáng chế có thể được cung cấp hoặc được bán dưới dạng đồ ăn/đồ uống được dán nhãn với ứng dụng cụ thể (đặc biệt là, sử dụng cho sức khỏe) hoặc dán nhãn thực phẩm chức năng.

Hành động "dán nhãn" bao gồm tất cả các hành động thông tin cho người tiêu dùng về ứng dụng nêu trên, và tất cả các sự thể hiện tương ứng với hành động

"dán nhãn" theo sáng chế bất kể mục đích của nhãn, nội dung của nhãn, và đối tượng mục tiêu và vật liệu để dán nhãn, miễn là có thể gọi ra hoặc nhận biết được ứng dụng nêu trên.

Ngoài ra, có mong muốn là "việc dán nhãn" được thể hiện để người tiêu dùng có thể trực tiếp nhận biết ứng dụng nêu trên. Cụ thể là, có thể kể đến hành động phân phối và vận chuyển sản phẩm hoặc sản phẩm đóng gói liên quan đến đồ ăn hoặc đồ uống (trên đó ứng dụng nêu trên được mô tả), và trưng bày và nhập khẩu để phân phối và vận chuyển; và hành động trưng bày hoặc sắp xếp các quảng cáo, bảng giá, hoặc tài liệu giao dịch liên quan đến sản phẩm, trên đó mô tả ứng dụng nêu trên, hoặc cung cấp thông tin có nội dung là bất kỳ hành động nào trong số này, trên đó mô tả ứng dụng nêu trên, bằng phương pháp điện tử (mạng Internet, v.v.).

Trong khi đó, về nội dung nhãn, nhãn được chính phủ cho phép hoặc tương tự (ví dụ, nhãn hoặc tương tự mà được chứng nhận theo các hệ thống khác nhau được chính phủ chỉ định, và được sử dụng ở dạng đã được chứng nhận) là được ưu tiên. Ngoài ra, có mong muốn là các nội dung của nhãn như vậy được gắn vào bao bì, đồ chứa, tờ rơi, bìa quảng cáo, vật liệu quảng cáo ở điểm bán như POP, các tài liệu khác và tương tự.

Ngoài ra, đối với "nhãn", cũng có thể kể đến các nhãn dùng cho thực phẩm sức khỏe, thực phẩm chức năng, thực phẩm cho người bệnh, thực phẩm dinh dưỡng đường ruột, thực phẩm dùng cho mục đích đặc biệt, thực phẩm sức khỏe chức năng, thực phẩm dùng cho mục đích sức khỏe đặc biệt, thực phẩm dán nhãn chức năng, thực phẩm chức năng dinh dưỡng, các thuốc không cần kê đơn, v.v.. Trong số chúng, đặc biệt là, các nhãn được Cục bảo vệ người tiêu dùng chứng nhận, ví dụ, có thể kể đến các nhãn hoặc tương tự được chứng nhận bởi các hệ thống dùng cho thực phẩm dùng cho mục đích sức khỏe đặc biệt, các hệ thống dùng cho thực phẩm dán nhãn chức năng, và các hệ thống tương tự chúng. Cụ thể hơn là, có thể kể đến các nhãn dùng cho thực phẩm dùng cho mục đích sức khỏe đặc biệt, các nhãn dùng cho thực

thậm tốt cho sức khỏe được chỉ định có điều kiện, các nhãn dùng cho thực phẩm dán nhãn chức năng, các nhãn dùng cho hiệu quả mà cấu trúc hoặc chức năng của cơ thể bị ảnh hưởng, các nhãn về giảm nguy cơ bệnh tật, và tương tự. Trong số chúng, các ví dụ thông thường bao gồm các nhãn dùng cho thực phẩm dùng cho mục đích sức khỏe đặc biệt, mà được quy định cụ thể trong Luật điều chỉnh cường chế tăng cường sức khỏe (April 30, 2003, Japanese Ministry of Health, Labor, và Welfare Ordinance No. 86) (đặc biệt là, các nhãn dùng cho việc sử dụng cho sức khỏe), các nhãn dùng cho thực phẩm dán nhãn chức năng, mà được quy định trong luật ghi nhãn thực phẩm (2013, Law No. 70), và các nhãn tương tự với chúng.

Sữa bột cải biến

Hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế có thể được sử dụng một cách thích hợp trong các đồ ăn/đồ uống, đặc biệt là, trong sữa bột cải biến. Đối với sữa bột cải biến, có thể kể đến sữa bột cải biến dùng cho trẻ nhỏ, sữa bột cải biến dùng cho trẻ ăn dặm, sữa bột cải biến dùng cho trẻ sơ sinh nhẹ cân, sữa bột cải biến dùng cho trẻ em, sữa bột cải biến dùng cho người trưởng thành, sữa bột cải biến dùng cho người già, sữa bột cải biến cho người dị ứng, sữa bột cải biến dùng cho người không dung nạp lactoza, sữa bột cải biến dùng cho người có khuyết tật chuyển hóa bẩm sinh và tương tự. Đặc biệt là, mong muốn là sử dụng sữa bột cải biến dùng trẻ nhỏ, sữa bột cải biến dùng cho trẻ ăn dặm, sữa bột cải biến dùng cho trẻ sơ sinh nhẹ cân, và sữa bột cải biến trẻ em. Sữa bột cải biến dùng cho trẻ nhỏ đề cập đến sữa bột cải biến dùng cho trẻ nhỏ, mà dành cho trẻ nhỏ từ 0 đến 12 tháng tuổi, sữa ăn dặm mà dành cho trẻ nhỏ sau 6 đến 9 tháng và trẻ mới chập chững đi (đến 3 năm), sữa bột cải biến dùng cho trẻ sơ sinh nhẹ cân, mà dành cho trẻ mới sinh (trẻ sơ sinh nhẹ cân) có cân nặng nhỏ hơn 2500 g lúc sinh, các sữa điều trị khác nhau được dùng để điều trị trẻ em có các tình trạng bệnh lý như dị ứng sữa hoặc không dung nạp lactoza, hoặc tương tự. Ngoài ra, các hợp phần tương ứng có thể được sử dụng cho các thực phẩm sức khỏe chức năng hoặc các thực phẩm cho người bệnh. Hệ thực phẩm sức khỏe chức năng

được tạo ra cho các mục tiêu không những cho các thực phẩm thông thường mà còn cho các thực phẩm ở dạng viên nén, viên nang, v.v., trên cơ sở các xu hướng trong và ngoài nước, và nhất quán với hệ thực phẩm truyền thống sử dụng cho sức khỏe đặc biệt, và bao gồm hai loại như các loại các thực phẩm dùng cho mục đích sức khỏe đặc biệt (loại cho phép với cá nhân) và các thực phẩm chức năng dinh dưỡng (loại tham chiếu tiêu chuẩn).

Khi hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế được sử dụng, các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium* và/hoặc *lactobacilli* tăng sinh trong ruột của đối tượng sử dụng. Sự tăng sinh của các lợi khuẩn này trong ruột cải thiện sự miễn dịch, và còn cải thiện hệ tập khuẩn ruột. Cụ thể là, ở trẻ sơ sinh, khi hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế được sử dụng, *Bifidobacteria* trong ruột được gia tăng một cách hiệu quả, và môi trường ruột được cải thiện. Ngoài ra, bằng cách kết hợp các vi khuẩn có hại hoặc các vi khuẩn cơ hội cùng với *Bifidobacteria*, có thể thu được sự miễn dịch, và môi trường ruột như toàn bộ hệ vi khuẩn đường ruột, sẽ được duy trì, ngay cả khi đến tuổi trưởng thành.

Đối với phương pháp sản xuất sữa bột cải biến, một loại hoặc hai hoặc nhiều loại phương pháp sản xuất đã biết có thể được tùy ý sử dụng kết hợp miễn là hiệu quả của sáng chế không bị suy giảm hay hạn chế. Cụ thể là, ví dụ, khi sản xuất, sữa nguyên liệu thô có thể được trộn với hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế và các chất phụ gia khác nhau, và trải qua các quy trình như đồng nhất, tiệt trùng, cô, làm khô, tạo hạt, và rây.

Cụ thể là, sữa bột cải biến theo sáng chế có thể được sản xuất, ví dụ, bằng phương pháp sau đây.

Tức là, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sữa bột dùng để tăng cường thành phần sữa mẹ, trong đó bột tế bào vi khuẩn, mà bao gồm các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* và một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, được trộn với các oligosacarit có trong sữa mẹ

để thu được sữa bột dùng để tăng cường thành phần sữa mẹ.

Cụ thể là, phương pháp sản xuất sữa bột dùng để tăng cường thành phần sữa mẹ, mà bao gồm các bước (A) đến (C) sau đây được đề xuất:

- (A) bước nuôi cấy các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, và một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ theo sáng chế, trong môi trường chứa thành phần sữa để thu được các mẻ cấy vi khuẩn;
- (B) bước tiến hành sấy phun và/hoặc làm khô lạnh các mẻ cấy vi khuẩn này để thu được bột tế bào vi khuẩn tương ứng; và
- (C) bước trộn bột tế bào vi khuẩn này với các oligosacarit có trong sữa mẹ để thu được sữa bột cải biến.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sữa bột cải biến, mà bao gồm bước (A) sau đây:

- (A) bước trộn các oligosacarit có trong sữa mẹ, các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ theo sáng chế, và thành phần sữa để thu được sữa bột.

Ngoài ra, cụ thể là, chế phẩm đồ ăn theo sáng chế có thể là, ví dụ, chế phẩm bổ sung dùng cho trẻ nhỏ. Chế phẩm bổ sung dùng trẻ nhỏ này có thể được sản xuất, ví dụ, bằng phương pháp sau đây.

Tức là, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm bổ sung dùng để tăng cường thành phần sữa mẹ, mà bao gồm các bước (A) và (B) sau đây:

- (A) bước trộn các oligosacarit có trong sữa mẹ, các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và tá dược để thu được hỗn hợp; và
- (B) bước tạo viên nén hỗn hợp này.

Trong bất kỳ phương pháp sản xuất nào, các thành phần không phải các thành phần được đề cập trong các bước ở trên đều có thể được sử dụng kết hợp một cách thích hợp.

Phương pháp bổ sung hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế là không bị giới hạn cụ thể miễn là không làm giảm hiệu quả của sáng chế, nhưng, ví dụ, hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế có thể được bổ sung ở trạng thái lỏng tại thời điểm trộn như được mô tả ở trên, hoặc có thể được bổ sung sau khi được tạo thành bột, và sau đó việc trộn bột có thể được thực hiện để sản xuất.

Hàm lượng của các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* trong sữa bột cải biến theo sáng chế có thể được điều chỉnh tùy ý miễn là hiệu quả của sáng chế không bị suy giảm hay hạn chế. Theo sáng chế, cụ thể là, lượng vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* trong sữa bột cải biến có thể được điều chỉnh ở mức 10^3 đến 10^{12} CFU/g tính theo chế phẩm sữa bột cải biến thành phẩm.

Lượng các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ trong sữa bột cải biến theo sáng chế có thể được điều chỉnh tùy ý miễn là hiệu quả của sáng chế không bị suy giảm hay hạn chế. Theo sáng chế, cụ thể là, lượng các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ trong sữa bột cải biến có thể được điều chỉnh ở mức 10^3 đến 10^{12} CFU/g tính theo chế phẩm sữa bột cải biến thành phẩm.

Lượng các HMO trong sữa bột cải biến theo sáng chế có thể được điều chỉnh tùy ý miễn là hiệu quả của sáng chế không bị suy giảm hay hạn chế. Theo sáng chế, cụ thể là, lượng các HMO trong sữa bột cải biến có thể được điều chỉnh ở mức 0,3% đến 5,0% tính theo chế phẩm sữa bột cải biến thành phẩm.

Thuốc, thuốc không cần kê đơn

Hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế có thể được bổ sung vào thuốc hoặc thuốc không cần kê đơn đã biết thông thường (sau đây, còn được gọi là "thuốc, v.v.") khi bào chế, hoặc có thể được trộn với các nguyên liệu gốc của thuốc, v.v. để sản xuất thuốc mới, v.v..

Khi hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế được pha trộn với thuốc, v.v., thuốc tương ứng, v.v. có thể được bào chế một cách thích hợp thành dạng liều mong muốn

theo phương pháp sử dụng như sử dụng qua đường miệng hoặc sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Dạng liều là không bị giới hạn cụ thể, nhưng trong trường hợp sử dụng qua đường miệng, có thể bào chế, ví dụ, thuốc dạng rắn như bột, hạt, viên nén, viên ngậm, và viên nang; và thuốc dạng lỏng như dung dịch, sirô, huyền phù, và nhũ tương. Trong trường hợp sử dụng ngoài đường tiêu hóa, có thể bào chế, ví dụ, thuốc đạn, thuốc xịt, thuốc xông, thuốc mỡ, miếng dán, thuốc tiêm, và tương tự. Theo sáng chế, ưu tiên bào chế dạng liều dùng để sử dụng qua đường miệng.

Việc bào chế có thể được tiến hành một cách thích hợp theo dạng liều bằng phương pháp đã biết thông thường.

Khi bào chế, có thể thực hiện bào chế bằng cách pha trộn một cách thích hợp với chất mang bào chế. Ngoài ra, ngoài peptit theo sáng chế, các thành phần thông thường được sử dụng để bào chế, như tá dược, chất điều chỉnh độ pH, chất tạo màu, và chất cải biến, có thể được sử dụng. Ngoài ra, các thành phần có hiệu quả phòng ngừa, cải thiện và/hoặc điều trị các bệnh hoặc các triệu chứng mà thông thường đã biết hoặc được phát hiện trong tương lai có thể được sử dụng kết hợp một cách thích hợp tùy thuộc các mục đích.

Đối với chất mang bào chế, các chất mang vô cơ hoặc hữu cơ khác nhau có thể được sử dụng tùy thuộc dạng liều. Trong trường hợp thuốc dạng rắn, các ví dụ về các chất mang này có thể bao gồm các tá dược, chất kết dính, chất gây rã, chất làm trơn, chất ổn định, chất cải biến/chất điều vị, v.v..

Các ví dụ về tá dược có thể bao gồm các dẫn xuất đường như lactoza, sucroza, glucoza, mannitol, và sorbitol; các dẫn xuất tinh bột như tinh bột ngô, tinh bột khoai tây, tinh bột α , dextrin, và tinh bột cacboxymetyl; các dẫn xuất xenluloza như xenluloza kết tinh, hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl methyl xenluloza, cacboxymetyl xenluloza, và cacboxymetyl xenluloza canxi; gôm arabic; dextran; pullulan; các dẫn xuất silicat như axit silixic khan nhẹ, nhôm silicat tổng hợp, và magiê aluminometasilicat; các dẫn xuất phosphat như canxi phosphat; các dẫn xuất

cacbonat như canxi cacbonat; và các dẫn xuất sulfat như canxi sulfat.

Các ví dụ về chất kết dính có thể bao gồm gelatin; polyvinylpyrrolidon; macrogol và tương tự, ngoài các tá dược.

Các ví dụ về chất gây rã có thể bao gồm các dẫn xuất xenluloza hoặc tinh bột biến tính hóa học như natri croscarmellose, tinh bột natri cacboxymetyl, và polyvinylpyrrolidon liên kết ngang, ngoài các tá dược.

Các ví dụ chất làm trơn có thể bao gồm bột talc; axit stearic; các stearat kim loại như canxi stearat, và magiê stearat; silic dioxit keo; các sáp như gôm ong, và dầu cá nhà táng; axit boric; glycol; các axit cacboxylic như axit fumaric và axit adipic; các muối natri của axit cacboxylic như natri benzoat; các sulfat như natri sulfat; leuxin; các lauryl sulfat như natri lauryl sulfat, và magiê lauryl sulfat; các axit silixic như axit silixic anhydrit, và axit silixic hydrat; và các dẫn xuất tinh bột.

Các ví dụ về chất làm ổn định có thể bao gồm các este của axit paraoxybenzoic như metylparaben và propylparaben; các rượu như clobutanol, rượu benzylic, và rượu phenyletyl; benzalkoni clorua; axetic anhydrit; và axit sorbic.

Các ví dụ về chất cải biến/chất điều vị có thể bao gồm các chất tạo ngọt, các chất axit hóa, hương liệu, v.v..

Đối với chất mang được sử dụng trong trường hợp thuốc dạng nước để sử dụng qua đường miệng, có thể kể đến dung môi như nước, các chất cải biến/chất điều vị, v.v..

Lượng vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* trong thuốc, v.v. theo sáng chế có thể được điều chỉnh tùy ý miễn là hiệu quả của sáng chế không bị suy giảm hay hạn chế. Theo sáng chế, cụ thể là, lượng vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* trong thuốc, v.v. có thể được điều chỉnh ở mức 10^3 đến 10^{12} CFU/mL hoặc g tính theo chế phẩm thuốc thành phẩm, v.v..

Lượng các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ trong thuốc, v.v. theo sáng chế có thể được điều chỉnh tùy ý miễn là hiệu quả

của sáng chế không bị suy giảm hay hạn chế. Theo sáng chế, cụ thể là, hàm lượng các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ trong thuốc, v.v. có thể được điều chỉnh ở mức 10^3 đến 10^{12} CFU/mL hoặc g tính theo chế phẩm thuốc thành phẩm, v.v..

Lượng các HMO trong thuốc, v.v. theo sáng chế có thể được điều chỉnh tùy ý miễn là không làm giảm hiệu quả của sáng chế. Theo sáng chế, cụ thể là, lượng các HMO trong thuốc, v.v. có thể được điều chỉnh ở mức 0,3% đến 5,0% tính theo chế phẩm thuốc thành phẩm, v.v..

Thức ăn gia súc

Hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế có thể được bổ sung vào thức ăn gia súc đã biết thông thường khi chế biến, hoặc có thể được trộn với các nguyên liệu thức ăn gia súc thô để sản xuất thức ăn gia súc mới.

Khi hợp phần dinh dưỡng theo sáng chế được pha trộn với thức ăn gia súc, các ví dụ về các nguyên liệu thức ăn gia súc thô có thể bao gồm ngũ cốc như ngô, bột mỳ, đại mạch, và lúa mạch; cám như cám bột mỳ, cám đại mạch, cám gạo, và cám gạo được khử chất béo; sản phẩm phụ của thức ăn gia súc như bột gluten ngô và bột mầm ngô; thức ăn gia súc động vật như sữa bột không béo, nước sữa, bột cá, và bột xương; các men như men bia; thức ăn gia súc chứa khoáng chất như canxi phosphat, và canxi cacbonat; dầu và chất béo; axit amin; và đường. Ngoài ra, các ví dụ về dạng thức ăn gia súc có thể bao gồm thức ăn gia súc cho thú nuôi (đồ ăn cho thú nuôi và tương tự), thức ăn gia súc cho vật nuôi, thức ăn gia súc cho cá, và tương tự.

Lượng vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* trong thức ăn gia súc theo sáng chế có thể được điều chỉnh tùy ý theo thể trọng, v.v. miễn là hiệu quả của sáng chế không bị suy giảm hay hạn chế. Theo sáng chế, cụ thể là, lượng vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* trong thức ăn gia súc có thể được điều chỉnh ở mức 10^3 đến 10^{12} CFU/mL hoặc g tính theo chế phẩm thức ăn gia súc thành phẩm.

Lượng các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ trong thức ăn gia súc theo sáng chế có thể được điều chỉnh tùy ý theo trọng lượng cơ thể, v.v. miễn là hiệu quả của sáng chế không bị suy giảm hay hạn chế. Theo sáng chế, cụ thể là, lượng lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ trong thức ăn gia súc có thể được điều chỉnh ở mức 10^3 đến 10^{12} CFU/mL hoặc g tính theo chế phẩm thức ăn gia súc thành phẩm.

Lượng các HMO trong thức ăn gia súc theo sáng chế có thể được điều chỉnh tùy ý theo trọng lượng cơ thể, v.v. miễn là hiệu quả của sáng chế không bị suy giảm hay hạn chế. Theo sáng chế, cụ thể là, hàm lượng của các HMO trong thức ăn gia súc có thể được điều chỉnh ở mức 0,3% đến 5,0% tính theo chế phẩm thức ăn gia súc thành phẩm.

Cũng có thể thể hiện các nội dung của sáng chế như sau.

[1] Hợp phần dinh dưỡng chứa:

các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*;

một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ; và

các oligosacarit có trong sữa mẹ.

[2] Chế phẩm đồ ăn/đồ uống chứa:

các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*;

một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ; và

các oligosacarit có trong sữa mẹ.

[3] Sữa bột cải biến chứa:

các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*;

một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ; và

các oligosacarit có trong sữa mẹ.

[4] Thuốc hoặc chế phẩm thuốc không cần kê đơn chứa:

các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*;

một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ; và

các oligosacarit có trong sữa mẹ.

[5] Chế phẩm thức ăn gia súc chứa:

các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*;

một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ; và

các oligosacarit có trong sữa mẹ.

[6] Sử dụng các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và các oligosacarit có trong sữa mẹ, trong hợp phần dinh dưỡng.

[7] Sử dụng các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và các oligosacarit có trong sữa mẹ, trong chế phẩm đồ ăn/đồ uống.

[8] Sử dụng các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và các oligosacarit có trong sữa mẹ, trong sữa bột cải biến.

[9] Sử dụng các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và các oligosacarit có trong sữa mẹ, trong thuốc hoặc chế phẩm thuốc không cần kê đơn.

[10] Sử dụng các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và các oligosacarit có trong sữa mẹ, trong chế phẩm thức ăn gia súc.

[11] Sử dụng các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và các

oligosacarit có trong sữa mẹ, trong sản xuất hợp phần dinh dưỡng.

[12] Sử dụng các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và các oligosacarit có trong sữa mẹ, trong sản xuất chế phẩm đồ ăn/đồ uống.

[13] Sử dụng các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và các oligosacarit có trong sữa mẹ, trong sản xuất sữa bột cải biến.

[14] Sử dụng các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và các oligosacarit có trong sữa mẹ, trong sản xuất thuốc hoặc chế phẩm thuốc không cần kê đơn.

[15] Sử dụng các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và các oligosacarit có trong sữa mẹ, trong sản xuất chế phẩm thức ăn gia súc.

[16] Theo các mục từ [1] đến [15],
các oligosacarit có trong sữa mẹ là 2'-fucosyllactoza và/hoặc lacto-N-neotetraoza.

[17] Theo các mục từ [1] đến [16],
lợi khuẩn là các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium* (ngoại trừ các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*) và/hoặc lactobacilli.

[18] Theo mục [17],
các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium* (ngoại trừ các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*) là ít nhất một vi khuẩn được chọn từ *Bifidobacterium longum* phân loài *longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis*, *Bifidobacterium breve*, và *Bifidobacterium pseudolongum*.

[19] Theo mục [17],
lactobacilli là ít nhất một vi khuẩn được chọn từ *Lactobacillus paracasei*,

Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus axitophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, và *Lactobacillus gasseri*.

[20] Theo các mục từ [1] đến [19],

các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* là ít nhất một vi khuẩn được chọn từ *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521, *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02429), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-1252), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02431), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02648), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02432), và *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02433).

[21] Phương pháp sản xuất sữa bột cải biến, mà bao gồm các bước (A) đến (C) sau đây.

(A) bước nuôi cấy các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, và một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, trong môi trường chứa thành phần sữa để thu được các mẻ cấy vi khuẩn;

(B) bước tiến hành sấy phun và/hoặc làm khô lạnh các mẻ cấy vi khuẩn này để thu được bột tế bào vi khuẩn tương ứng; và

(C) bước trộn bột tế bào vi khuẩn này với các oligosacarit có trong sữa mẹ để thu được sữa bột cải biến.

[22] Phương pháp sản xuất sữa bột cải biến, mà bao gồm bước (A) sau đây:

(A) bước trộn các oligosacarit có trong sữa mẹ, các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và thành phần sữa để thu được sữa bột.

[23] Phương pháp sản xuất chế phẩm bổ sung dùng để tăng cường thành phần sữa mẹ, mà bao gồm các bước (A) và (B) sau đây.

(A) bước trộn các oligosacarit có trong sữa mẹ, các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*, một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ, và tá dược để thu được hỗn hợp; và

(B) bước tạo viên nén hỗn hợp này.

[24] Trong phương pháp được mô tả ở mục [21] hoặc [22], thành phần sữa là protein sữa.

[25] Trong phương pháp được mô tả ở mục [24], protein sữa là ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm nước sữa, nước sữa thủy phân, và casein.

[26] Phương pháp sản xuất chế phẩm bổ sung, mà bao gồm các bước (A) và (B) sau đây:

(A) bước trộn các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium*, và tá được để thu được hỗn hợp; và

(B) bước tạo viên nén hỗn hợp này.

[27] Theo các mục từ [21] đến [26],

các oligosacarit có trong sữa mẹ là 2'-fucosyllactoza và/hoặc lacto-N-neotetraoza.

[28] Theo các mục từ [21] đến [27],

loại khuẩn là các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium* (ngoại trừ các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*) và/hoặc lactobacilli.

[29] Theo mục [28],

các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium* (ngoại trừ các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*) là ít nhất một vi khuẩn được chọn từ *Bifidobacterium longum* phân loài *longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis*, *Bifidobacterium breve*, và *Bifidobacterium pseudolongum*.

[30] Theo mục [28],

lactobacilli là ít nhất một vi khuẩn được chọn từ *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus axitophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, và *Lactobacillus gasseri*.

[31] Theo các mục từ [21] đến [30], trong hợp phần dinh dưỡng được mô tả theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 5,

các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* là ít nhất một vi khuẩn được chọn từ

Bifidobacterium bifidum ATCC29521, *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-2429), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-1252), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-2431), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02648), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02432), và *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02433).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa vào các ví dụ. Các ví dụ được mô tả dưới đây là ví dụ đại diện cho sáng chế, do đó phạm vi của sáng chế không được hiểu theo nghĩa hẹp.

Phương pháp thực nghiệm

(1) Điều chế dung dịch đường

Dung dịch glucoza 10% (do Nakarai Tesque Inc. sản xuất), và 2'-FL ((≥ 95%) Funakoshi, mua từ sigma), và LNnT (do ELICITYL sản xuất) là các ví dụ về các HMO được điều chế bằng nước trao đổi ion, và được tiến hành lọc vô trùng bằng cách sử dụng Millex-GV (SLGV033RS).

(2) Điều chế dung dịch vi khuẩn gồm các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium* và *Lactobacilli*

Môi trường canh thang MRS để nuôi cấy *Lactobacilli* (BD) (L-Cysteine Hydrochloride 0,05% dùng cho các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium*) được cho vào các chủng ở Bảng 1 dưới đây (các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*) và Bảng 2 dưới đây. Sau khi xử lý tiệt trùng, 3% dung dịch vi khuẩn được cấy truyền, và được nuôi cấy kỵ khí (tiền nuôi cấy trước- pre-pre cultured) ở 37°C trong 16 giờ. Ngày hôm sau, 1% glucoza được bổ sung vào môi trường aga BL được cải biến (tài liệu "Studies on Bifidobacteria" của Tomotari Mitsuoka, trang 306, Japan Bifidus Foundation, ban hành năm 1994) được thể hiện ở bảng 3, để điều chế. Sau khi xử lý tiệt trùng, 3% dung dịch vi khuẩn tiền nuôi cấy trước được cấy truyền, và được nuôi cấy trước kỵ khí (được nuôi cấy trước) ở 37°C trong 12 giờ.

Dung dịch vi khuẩn được nuôi cấy trước được thu gom và được rửa một lần

bằng dung dịch nước muối sinh lý vô trùng. Sau đó, tiến hành tăng khối lượng đến thể tích tương đương bằng môi trường aga BL được cải biến (tài liệu "Studies on Bifidobacteria" của Tomotari Mitsuoka, trang 306, Japan Bifidus Foundation, ban hành năm 1994) được thể hiện ở Bảng 3 để điều chế dung dịch vi khuẩn được tạo huyền phù.

(3) Điều chế môi trường dùng để phân tích số lượng vi khuẩn tăng sinh ở vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium* và *Lactobacilli*

Môi trường aga BL được cải biến (tài liệu "Studies on Bifidobacteria" của Tomotari Mitsuoka, trang 306, Japan Bifidus Foundation, ban hành năm 1994) được thể hiện ở Bảng 3 được điều chế với hiệu suất là 60%, và được tiến hành xử lý tiệt trùng bằng nồi hấp. Sau đó, 40% mỗi dung dịch đường được điều chế ở mục (1) được bổ sung một cách vô trùng để điều chế môi trường có độ nồng độ đường là 4%.

(4) Nuôi cấy vi khuẩn riêng rẽ của các chủng ở Bảng 1 dưới đây và Bảng 2 dưới đây

Môi trường được điều chế ở mục (3) trên đây được phân tán với dung tích bằng một nửa dung tích dùng để nuôi cấy vào đĩa có 96 lỗ, và dung dịch vi khuẩn được điều chế ở mục (2) trên đây được phân tán với lượng bằng nửa dung tích còn lại sao cho dung dịch vi khuẩn có nồng độ 6%. Sau đó, nồng độ đường cuối cùng được điều chỉnh đến 2%. Đĩa trong đó dung dịch vi khuẩn được phân tán được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong 8 giờ.

(5) Nuôi cấy kết hợp vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* và lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ

Môi trường được điều chế ở mục (3) trên đây được phân tán với dung tích bằng một nửa dung tích dùng để nuôi cấy vô trùng vào đĩa có 96 lỗ, và mỗi trong số các dung dịch vi khuẩn chứa các chủng vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* ở Bảng 1 và lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ ở Bảng 2, mà được điều chế ở mục (2) trên đây, được phân tán với lượng bằng một

phần tư dung tích còn lại vào môi trường được điều chế ở mục (3) trên đây sao cho dung dịch vi khuẩn có nồng độ là 12%. Sau đó, nồng độ đường cuối cùng được điều chỉnh đến 2%. Đã trong đó dung dịch vi khuẩn được phân tán được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong 8 giờ.

(6) Phương pháp phân tích số lượng vi khuẩn tăng sinh ở vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium* và *Lactobacilli*

OD650 được đo từ mỗi lỗ trong các đĩa ở mục (4) trên đây và (5) trên đây trước khi nuôi cấy (0 giờ) và sau khi nuôi cấy (8 giờ), bằng thiết bị đọc vi đĩa (MICROPLATE READER) SH-9000 (do CORONA ELECTRIC sản xuất). Sau khi đo độ đục, tế bào vi khuẩn được thu gom, và việc tách chiết ADN được thực hiện. Sau khi tách chiết ADN, số lượng vi khuẩn *Bifidobacteria/lactobacilli* tăng sinh được phân tích bằng cách sử dụng mỗi đặc hiệu loài vi khuẩn được thể hiện ở bảng 4, bằng phương pháp PCR định lượng (xem tài liệu "Structural analysis of intestinal flora "- analysis of bacterial flora in human feces using quantitative PCR- của Kouichi Watanabe, Enterobacteriological journal, 20:35-42, 2006).

Bảng 1. Các vi khuẩn thuộc chủng *Bifidobacterium bifidum*

Chủng	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	ATCC29521 ^T
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	NITE BP-02429
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	NITE BP-1252
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	NITE BP-02431
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	NITE P-02648
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	NITE BP-02432
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	NITE BP-02433

Bảng 2. Các vi khuẩn được sử dụng trong các ví dụ ngoại trừ chủng *Bifidobacterium bifidum*

Chủng	
<i>Bifidobacterium longum</i> phân loài <i>longum</i>	ATCC15707 ^T
<i>Bifidobacterium longum</i> phân loài <i>longum</i>	BB536
<i>Bifidobacterium longum</i> phân loài <i>infantis</i>	ATCC15697 ^T
<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC15700 ^T
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC15703 ^T
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	ATCC27919 ^T
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	ATCC25526 ^T
<i>Bifidobacterium animalis</i> phân loài <i>lactis</i>	DSM10140 ^T
<i>Bifidobacterium animalis</i> phân loài <i>lactis</i>	MCC-525
<i>Lactobacillus paracasei</i>	ATCC25302 ^T
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC14917 ^T
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC4356 ^T
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC7469 ^T
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC33323 ^T

Bảng 3. Môi trường aga BL được cải biến

'LAB-LEMCO' POWDER(Oxoid)	2,4	g
Bacto Proteoza Pepton Số 3(BD)	10,0	g
BBL Trypticaza Pepton (BD)	5,0	g
BBL Phyton Pepton (BD)	3,0	g
Dịch chiết nấm men Bacto (BD)	5,0	g
Dịch chiết gan	150,0	mL
Tinh bột hòa tan (MERCK)	0,5	g
Dung dịch A	10,0	mL
Dung dịch B	5,0	mL
Tween 80 (KANTO CHEMICAL)	1,0	g
L-Cystein Hydrochloride (KANTO CHEMICAL)	0,5	g
Độ pH 7,2		

Phương pháp điều chế dịch chiết gan: 10g gan Bacto (BD) trong 170mL nước tinh khiết được ngâm trong bồn nóng ở 50 đến 60°C trong khoảng 1 giờ, sau đó được gia nhiệt ở 100°C trong vài phút và được lọc qua giấy lọc sau khi điều chỉnh độ pH về 7,2.

Phương pháp điều chế dung dịch A: Hòa tan 25g KH_2PO_4 và 25g K_2HPO_4 trong 250mL nước tinh khiết.

Phương pháp điều chế dung dịch B: Hòa tan 10g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g NaCl , và 0,337g MnSO_4 trong 250mL nước tinh khiết

Bảng 4. Đoạn môi oligo nucleotit đặc hiệu chủng

Chủng	Đơn vị sao chép	Đoạn môi xuôi	Đoạn môi ngược	Tài liệu
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	278	CCACATGATCGCATGTGATTG	CCGAAGGCTTGCTCCCCAAA	Matsuki T, et al. 1998
<i>Bifidobacterium longum</i> phân loài <i>longum</i>	831	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	GGGAAGCCGTATCTCTACGA	Matsuki T, et al. 1998
<i>Bifidobacterium</i> <i>adlescentis</i>	279	CTCCAGTTGGATGCATGTC	CGAAGGCTTGCTCCCCAGT	Matsuki T, et al. 1998
<i>Bifidobacterium nhóm</i> <i>catenulatum</i>	289	CGGATGCTCCGACTCCT	CGAAGGCTTGCTCCCCGAT	Matsuki T, et al. 1998
<i>Bifidobacterium</i> <i>pseudolongum</i>	297	CACATGAGCGCATGCGAG	TCCACTCAACACGGCCGAA	Matsuki T, et al. 1998
<i>Bifidobacterium animalis</i> phân loài <i>lactis</i>	680	GTGGAGACACGGTTTCCC	CACACCACACAATCCAATAC	M. Ventura, et. al. 2001
<i>Lactobacillus casei</i>	327	CGAGTTCTCGTTGATGATC	AAGATTCCCCTACTGCTGCC	Watanabe K, et al. 1998
<i>Lactobacillus plantarum</i>	250	AGATTTGATCATGGCTCAG	CGGTATTAGCATCTGTTTCC	F. Quere, et. al. 1997
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	420	ACAGATTCACTTCGGTG	AAAGGCCAGTTACTACCTCTATC	Watanabe K, et al. 1998

<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	446	GCAAGTCGAACGAGTTCTGATTAT	GCCGACAACAGTTACTCTGCCGACCA	Watanabe K, et al.	1998
<i>Lactobacillus gasseri</i>	319	GATGAATTGGTGCTTGCACCAG	AAGATTCCCTACTGCTGCC	Watanabe K, et al.	1998

Các kết quả đo

(1) Độ khả dụng của các HMO đối với các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*

Liên quan đến các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* ở bảng 1, mỗi chủng được nuôi cấy dưới dạng vi khuẩn riêng rẽ sử dụng 2'-FL hoặc LNnT (các HMO) làm nguồn đường, và OD650 được đo. Các kết quả được thể hiện ở bảng 5 dưới đây. Bảng 5 thể hiện các giá trị gia tăng OD650 sau khi bảy chủng vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* ở bảng 1 được nuôi cấy trong 8 giờ bằng 2'-FL hoặc LNnT làm nguồn đường.

Bảng 5. Trị số gia tăng OD650

	ATCC 29521 ^T	NITE BP-02429	NITE BP-1252	NITE BP-02431	NITE P-02648	NITE BP-02432	NITE BP-02433
2'-FL	0,060	0,167	0,225	0,037	0,470	0,430	0,431
LNnT	0,008	0,608	0,373	0,535	0,719	0,522	0,370

Như được thể hiện ở bảng 5, tất cả các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* ở bảng 1 đều có khả năng đồng hóa 2'-FL hoặc LNnT (các HMO).

(2) Độ khả dụng của các HMO đối với các lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ

Liên quan đến các chủng ở bảng 2, mỗi chủng được nuôi cấy dưới dạng vi khuẩn riêng rẽ sử dụng 2'-FL hoặc LNnT (các HMO) làm nguồn đường, và OD650 được đo. Các kết quả đối với 2'-FL được thể hiện ở bảng 6 dưới đây, và các kết quả đối với LNnT được thể hiện ở bảng 7 dưới đây.

Bảng 6. Trị số gia tăng OD650

NITE	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC
BP-02429	15700 ^T	15707 ^T	15697 ^T	15703 ^T	27919 ^T	25526 ^T	10140 ^T	25302 ^T	4356 ^T	14917 ^T	7469 ^T	33323 ^T
(PC)												
2'-FL	0,041	0,029	0,344	-0,010	0,020	0,022	0,027	-0,011	0,010	0,013	0,058	-0,017

Bảng 7. Trị số gia tăng OD650

NITE			ATCC
BP-02429	BB536	MCC-525	25302 ^T
(PC)			
LNnT	0,608	0,053	0,096
			0,052

Như được thể hiện trong các Bảng 6 và 7, trong số các chủng ở Bảng 2, tất cả các chủng ngoại trừ *Bifidobacterium Infantis* mà được cho là khả dụng, đều không có khả năng đồng hóa 2'-FL hoặc LNNt (Các HMO), hoặc khả năng đồng hóa thấp.

(3) Nuôi cấy kết hợp vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* và lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ sử dụng các HMO làm nguồn đường

Bifidobacterium bifidum (NITE BP-02429) + Lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ

Đã quyết định nuôi cấy *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02429) mà trong đó độ khả dụng 2'-FL hoặc LNNt là đã được phát hiện như được mô tả trên đây kết hợp với các chủng ở bảng 2, mà không thể sử dụng 2'-FL hoặc LNNt. *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02429) và các chủng ở bảng 2, mà không thể sử dụng 2'-FL hoặc LNNt, được nuôi cấy kết hợp sử dụng 2'-FL hoặc LNNt làm nguồn đường, và sau khi nuôi cấy trong 8 giờ, tỷ lệ tăng sinh của số lượng vi khuẩn của mỗi chủng (tỷ lệ tăng sinh = số lượng vi khuẩn sau khi nuôi cấy kết hợp trong 8 giờ / số lượng vi khuẩn sau khi nuôi cấy vi khuẩn riêng rẽ) được xác định bằng phương pháp PCR định lượng bằng cách sử dụng từng đoạn mồi oligonucleotit đặc hiệu chủng được thể hiện ở bảng 4, cho chủng ở bảng 2. Các kết quả được thể hiện ở bảng 8.

Bảng 8. Tỷ lệ tăng sinh

		ATCC	ATCC	ATCC		ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC
	BB536	15703 ^T	27919 ^T	25526 ^T	MCC-525	25302 ^T	14917 ^T	4356 ^T	7469 ^T	33323 ^T
2'-FL	4,30	1,91	3,08	1,24	2,62	6,92	1,76	3,54	2,69	3,70
LNNt	2,13	1,53	1,55	0,98	1,41	4,23	2,58	3,77	5,03	1,53

Như được thể hiện ở bảng 8, đã phát hiện thấy rằng thậm chí chủng không có khả năng đồng hóa các oligosacarit có trong sữa mẹ ở bảng 6 hoặc 7 vẫn tăng sinh thông qua việc nuôi cấy kết hợp với *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02429).

Các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* + *Bifidobacterium longum* phân loài *longum* BB536

Bảy chủng *Bifidobacterium bifidum* ở bảng 1 và *Bifidobacterium longum* phân loài *longum* BB536 mà không thể sử dụng 2'-FL hoặc LNnT được nuôi cấy kết hợp sử dụng 2'-FL hoặc LNnT làm nguồn đường. Số lượng vi khuẩn *Bifidobacterium longum* phân loài *longum* BB536 sau khi nuôi cấy trong 8 giờ, và số lượng vi khuẩn sau 8 giờ nuôi cấy vi khuẩn riêng rẽ được xác định bằng phương pháp PCR định lượng bằng cách sử dụng đoạn mồi oligo nucleotit đặc hiệu *Bifidobacterium longum* phân loài *longum* được thể hiện ở bảng 4, và các tỷ lệ tăng sinh (tỷ lệ tăng sinh=số lượng vi khuẩn được nuôi cấy kết hợp sau 8 giờ / số lượng vi khuẩn trong 8 giờ nuôi cấy vi khuẩn riêng rẽ) được so sánh. Các kết quả được thể hiện ở bảng 9.

Bảng 9. Tỷ lệ tăng sinh

	ATCC	NITE	NITE	NITE	NITE	NITE	NITE
	29521 ^T	BP-02429	BP-1252	BP-02431	P-02648	BP-02432	BP-02433
2'-FL	1,35	4,13	3,17	6,33	9,97	3,16	5,90
LNnT	1,07	3,57	1,64	3,02	4,95	1,51	3,08

Như được thể hiện ở bảng 9, đã phát hiện thấy rằng *Bifidobacterium longum* phân loài *longum* BB536 không có khả năng đồng hóa 2'-FL vẫn tăng sinh thông qua việc nuôi cấy kết hợp với các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*. Ngoài ra, đã phát hiện thấy rằng *Bifidobacterium longum* phân loài *longum* BB536 không có khả năng đồng hóa LNnT vẫn tăng sinh thông qua việc nuôi cấy kết hợp với các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*.

Các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* + *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* MCC-525

Bảy chủng *Bifidobacterium bifidum* ở bảng 1 và *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* MCC-525 mà không thể sử dụng 2'-FL hoặc LNnT được nuôi cấy kết

hợp sử dụng 2'-FL hoặc LNNt làm nguồn đường. Số lượng vi khuẩn *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* MCC-525 sau khi nuôi cấy trong 8 giờ, và số lượng vi khuẩn sau 8 giờ nuôi cấy vi khuẩn riêng rẽ được xác định bằng phương pháp PCR định lượng bằng cách sử dụng đoạn mồi oligo nucleotit đặc hiệu *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* ở bảng 4, và các tỷ lệ tăng sinh (tỷ lệ tăng sinh = số lượng vi khuẩn được nuôi cấy kết hợp sau 8 giờ / số lượng vi khuẩn trong 8 giờ nuôi cấy vi khuẩn riêng rẽ) được so sánh. Các kết quả được thể hiện ở bảng 10.

Bảng 10. Tỷ lệ tăng sinh

	ATCC	NITE	NITE	NITE	NITE	NITE	NITE
	29521 ^T	BP-02429	BP-1252	BP-02431	P-02648	BP-02432	BP-02433
2'-FL	2,01	4,85	2,06	3,82	4,35	2,45	3,67
LNNt	3,87	4,17	19,98	3,58	6,03	4,21	2,39

Trong tất cả các sự kết hợp với *Bifidobacterium bifidum*, đã phát hiện thấy rằng khi *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* MCC-525 được nuôi cấy kết hợp với bảy chủng *Bifidobacterium bifidum* sử dụng 2'-FL hoặc LNNt làm nguồn đường, số lượng vi khuẩn tăng sinh được gia tăng so với số lượng trong trường hợp mà *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* MCC-525 được nuôi cấy là vi khuẩn riêng rẽ. Trong số chúng, khi kết hợp với *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-1252), hiệu quả thúc đẩy sự tăng sinh về số lượng vi khuẩn là cao hơn đáng kể so với khi LNNt được dùng làm nguồn đường.

Các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* + *Lactobacillus gasseri* ATCC33323

Bảy chủng *Bifidobacterium bifidum* ở bảng 1 và *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323^T mà không thể sử dụng 2'-FL được nuôi cấy kết hợp sử dụng 2'-FL làm nguồn đường. Số lượng vi khuẩn *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323^T sau 8 giờ, và số lượng vi khuẩn sau 8 giờ nuôi cấy vi khuẩn riêng rẽ được xác định bằng phương

pháp PCR định lượng bằng cách sử dụng đoạn mồi oligo nucleotit đặc hiệu cho *Lactobacillus gasseri* ở bảng 4, và các tỷ lệ tăng sinh (tỷ lệ tăng sinh= số lượng vi khuẩn được nuôi cấy kết hợp sau 8 giờ / số lượng vi khuẩn trong 8 giờ nuôi cấy vi khuẩn riêng rẽ) được so sánh. Các kết quả được thể hiện ở bảng 11.

Bảng 11. Tỷ lệ tăng sinh

	ATCC	NITE	NITE	NITE	NITE	NITE	NITE
	29521 ^T	BP-02429	BP-1252	BP-02431	P-02648	BP-02432	BP-02433
2'-FL	1,45	2,33	3,99	4,42	2,88	3,99	3,64

Trong tất cả các sự kết hợp, đã phát hiện thấy rằng khi *Lactobacillus gasseri* ATCC33323T được nuôi cấy kết hợp với bảy chủng *Bifidobacterium bifidum* sử dụng 2'-FL làm nguồn đường, số lượng vi khuẩn tăng sinh được gia tăng so với số lượng vi khuẩn trong trường hợp mà *Lactobacillus gasseri* ATCC33323^T được nuôi cấy là vi khuẩn riêng rẽ. Trong số bảy chủng *Bifidobacterium bifidum*, hiệu quả tăng sinh là cao hơn ở sáu chủng không phải là *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521^T. Các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* + *Lactobacillus paracasei* ATCC 25302^T

Bảy chủng *Bifidobacterium bifidum* ở bảng 1 và *Lactobacillus paracasei* ATCC 25302^T mà không thể sử dụng 2'-FL hoặc LNnT được nuôi cấy kết hợp bằng 2'-FL hoặc LNnT làm nguồn đường. Sau 8 giờ, tỷ lệ tăng sinh về số lượng vi khuẩn *Lactobacillus paracasei* ATCC 25302^T, so với số lượng vi khuẩn sau khi nuôi cấy vi khuẩn riêng rẽ (tỷ lệ tăng sinh= số lượng vi khuẩn được nuôi cấy kết hợp sau 8 giờ/ số lượng vi khuẩn trong 8 giờ nuôi cấy vi khuẩn riêng rẽ) được xác định bằng phương pháp PCR định lượng. Các kết quả được thể hiện ở bảng 12.

Bảng 12. Tỷ lệ tăng sinh

	ATCC	NITE	NITE	NITE	NITE	NITE	NITE
	29521 ^T	BP-02429	BP-1252	BP-02431	P-02648	BP-02432	BP-02433
2'-FL	2,28	4,21	1,98	3,25	4,23	2,01	3,23
LNnT	4,26	8,04	9,18	10,10	14,78	8,76	8,85

Trong tất cả các sự kết hợp, đã phát hiện thấy rằng khi *Lactobacillus paracasei* ATCC 25302^T được nuôi cấy kết hợp với bảy chủng *Bifidobacterium bifidum* sử dụng 2'-FL hoặc LNnT làm nguồn đường, số lượng vi khuẩn tăng sinh được gia tăng so với số lượng trong trường hợp mà *Lactobacillus paracasei* ATCC 25302^T được nuôi cấy là vi khuẩn riêng rẽ.

Ví dụ sản xuất

Sau đây, các ví dụ sản xuất hợp phần dinh dưỡng, chế phẩm thuốc, và chế phẩm đồ ăn sẽ được mô tả.

Ví dụ sản xuất 1

Bifidobacterium bifidum được bổ sung vào 3mL môi trường lỏng MRS, và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong 16 giờ. Sau đó, dung dịch nuôi cấy được cô, và được làm khô lạnh để thu được bột vi khuẩn đông khô (bột vi khuẩn). Bột vi khuẩn chứa *Bifidobacterium bifidum* được trộn đồng nhất với các lợi khuẩn/các oligosacarit có trong sữa mẹ (mua từ Funakoshi)/protein nước sữa cô (whey protein concentrate-WPC), và nguồn thức ăn cho các lợi khuẩn (lactuloza, raffinosa và các galactooligosacarit) để thu được chế phẩm. 20g chế phẩm tương ứng được hòa tan trong 200g nước để thu được hợp phần dinh dưỡng.

Ví dụ sản xuất 2

Bifidobacterium bifidum được bổ sung vào 3mL môi trường lỏng MRS, và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong 16 giờ. Sau đó, dung dịch nuôi cấy được cô đặc, và được làm khô lạnh để thu được bột vi khuẩn đông khô (bột vi khuẩn). Bột vi khuẩn được trộn đồng nhất với các lợi khuẩn/các oligosacarit có trong sữa mẹ (mua

từ Funakoshi)/bột khô của protein sữa cô (MPC480, do Fonterra sản xuất, hàm lượng protein 80% tính theo khối lượng, protein casein:protein nước sữa=khoảng 8:2), và nguồn thức ăn cho các lợi khuẩn (lactuloza, raffinosa và các galactooligosacarit). 20g chế phẩm tương ứng được hòa tan trong 200g nước để thu được hợp phần dinh dưỡng.

Ví dụ sản xuất 3

Bifidobacterium bifidum được bổ sung vào 3mL môi trường lỏng MRS, và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong khoảng 16 giờ. Sau đó, dung dịch nuôi cấy được cô, và được làm khô lạnh để thu được bột vi khuẩn đông khô (bột vi khuẩn). Sau đó, bột vi khuẩn chứa *Bifidobacterium bifidum*, các lợi khuẩn/các oligosacarit có trong sữa mẹ (mua từ Funakoshi)/nguồn thức ăn cho các lợi khuẩn (lactuloza, raffinosa và các galactooligosacarit), và xenluloza kết tinh được cho vào máy tạo hạt khuấy và được trộn. Sau đó, việc tạo hạt được thực hiện bằng cách bổ sung nước tinh khiết, sản phẩm được tạo hạt được làm khô. Sau đó thu được sản phẩm được tạo hạt (chế phẩm thuốc) mà chứa thành phần chiết của vi khuẩn và nguồn thức ăn cho các lợi khuẩn/ các lợi khuẩn, và chứa tá được.

Ví dụ sản xuất 4

Phương pháp sản xuất sữa lên men mà được bổ sung *Bifidobacterium bifidum* sẽ được mô tả dưới đây.

Đầu tiên, nguyên liệu sữa thô được trộn với nước, các thành phần khác, hoặc tương tự nếu cần, và tốt hơn là tiến hành xử lý đồng nhất và xử lý tiệt trùng bằng nhiệt. Việc xử lý đồng nhất và xử lý tiệt trùng bằng nhiệt có thể được thực hiện bằng các phương pháp thông thường. Chất môi *lactobacilli* được bổ sung (được cấy truyền) vào chế phẩm sữa tiệt trùng thu được thông qua quá trình tiệt trùng bằng nhiệt, và quá trình lên men được thực hiện trong khi duy trì nhiệt độ lên men định trước, sao cho thu được sản phẩm lên men. Bằng cách lên men, sữa đông tụ được tạo ra.

Đối với chất môi lactobacilli, ví dụ, *lactobacilli* thông thường được sử dụng để sản xuất sữa chua, như *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, và *Streptococcus thermophilus* có thể được sử dụng. Khi độ pH đạt đến trị số đích, sữa đông tụ đã được tạo ra được nghiền nát bằng cách khuấy, và được làm lạnh xuống 10°C hoặc thấp hơn để thu được sản phẩm lên men. Bằng cách làm lạnh xuống 10°C hoặc thấp hơn, có thể làm giảm sự hoạt hóa của *lactobacilli* và có thể triệt tiêu sự sản sinh axit.

Sau đó, sản phẩm lên men thu được qua quy trình lên men được tiến hành xử lý gia nhiệt để thu được sản phẩm lên men được gia nhiệt (sản phẩm lên men được xử lý bằng nhiệt). Bằng cách gia nhiệt một cách thích hợp sản phẩm lên men, có thể triệt tiêu axit được *lactobacilli* sản sinh trong sản phẩm lên men được gia nhiệt. Do đó, trong quy trình sản xuất tiếp theo và/hoặc khi lưu trữ sữa lên men cô chứa *Bifidobacteria*, có thể triệt tiêu việc giảm độ pH, và kết quả là, tỷ lệ sống của *Bifidobacteria* có thể được cải thiện.

Tiếp theo, *Bifidobacterium bifidum* và các oligosacarit có trong sữa mẹ (mua từ Funakoshi) được bổ sung vào sản phẩm lên men được gia nhiệt thu được qua quy trình xử lý gia nhiệt. Lượng bổ sung *Bifidobacterium breve* MCC1274 (FERM BP-11175) tốt hơn là 1×10^7 đến 1×10^{11} CFU/mL, tốt hơn nữa là 1×10^8 đến 1×10^{10} CFU/mL tính theo sản phẩm lên men được gia nhiệt. Khi *Bifidobacterium bifidum* là tế bào chết, CFU/mL có thể được thay thế bằng tế bào riêng biệt/mL.

Sau khi *Bifidobacterium bifidum* và các oligosacarit có trong sữa mẹ được bổ sung vào sản phẩm lên men được gia nhiệt, việc cô được thực hiện. Quy trình cô có thể được thực hiện bằng cách sử dụng một cách thích hợp phương pháp cô đã biết thông thường. Trong phương pháp tách ly tâm, nước sữa trong đối tượng cô (sản phẩm lên men được gia nhiệt mà *Bifidobacteria* và các nguồn thức ăn cho lợi khuẩn được bổ sung vào) được loại bỏ để thu được sữa lên men được cô chứa *Bifidobacterium bifidum* trong đó nồng độ hàm lượng chất rắn gia tăng. Việc uống

sữa lên men thu được có thể cải thiện hệ tạp khuẩn ruột.

Ví dụ sản xuất 5

Phương pháp sản xuất sữa bột cải biến mà được bổ sung *Bifidobacterium bifidum* sẽ được mô tả dưới đây.

10kg bột protein nước sữa được khử muối (do Mirai sản xuất), 6kg bột casein sữa (do Fonterra sản xuất), 48kg lactoza (do Mirai sản xuất), 920g hỗn hợp khoáng chất (do Tomita Pharmaceutical Co., Ltd. sản xuất), 32g hỗn hợp vitamin (do Tanabe Seiyaku Co., Ltd. sản xuất), các oligosacarit có trong sữa mẹ, 500g lactuloza (do Morinaga Milk Industry Co., Ltd. sản xuất), 500g raffinosa (do Nippon Beet Sugar Manufacturing Co., Ltd. sản xuất), và 900g đường lỏng galactooligosacarit (do Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd. sản xuất) được hòa tan trong 300kg nước ấm, và sau đó được hòa tan ở 90°C trong khoảng 10 phút bằng cách gia nhiệt, và được đồng nhất bằng cách bổ sung 28kg chất béo được điều chế (do Taiyo Yushi Corp. sản xuất). Sau đó, các bước tiệt trùng và cô được thực hiện, và khoảng 95kg sữa bột cải biến được điều chế bằng cách sấy phun. 100g bột tế bào vi khuẩn chứa *Bifidobacterium bifidum*, và 100g bột tế bào vi khuẩn chứa lactobacilli/Bifidobacteria, mà được tán với tinh bột, được bổ sung vào để điều chế khoảng 95kg sữa bột cải biến được pha trộn với *Bifidobacterium bifidum*/các oligosacarit có trong sữa mẹ (mua từ Funakoshi). Khi sữa bột cải biến thu được này được hòa tan trong nước, và trở thành chế phẩm sữa có tổng nồng độ hàm lượng chất rắn là 14% (trọng lượng/thể tích) (là nồng độ chế phẩm sữa tiêu chuẩn), số lượng vi khuẩn *Bifidobacterium bifidum* trong chế phẩm sữa này có thể là $2,7 \times 10^9$ CFU/100ml. Khi sữa bột cải biến thu được như được mô tả trên đây được sử dụng, sự tăng sinh của lợi khuẩn có thể được thúc đẩy trong ruột.

Khi các hợp phần dinh dưỡng được sản xuất ở các ví dụ sản xuất 1 đến 5 được mô tả trên đây được sử dụng, lợi khuẩn có thể sử dụng các HMO và tăng sinh trong ruột, điều này mang lại sự cải thiện hệ tạp khuẩn ruột.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp phần dinh dưỡng chứa:

các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*;

một hoặc nhiều loại lợi khuẩn có khả năng đồng hóa thấp các oligosacarit có trong sữa mẹ; và

các oligosacarit có trong sữa mẹ,

trong đó oligosacarit có trong sữa mẹ là 2'-fucosyllactoza và/hoặc lacto-N-neotetraoza, và

trong đó các lợi khuẩn là các vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium* (ngoại trừ các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*) và/hoặc lactobacilli.

2. Hợp phần dinh dưỡng theo điểm 1, trong đó các lợi khuẩn là các vi khuẩn thuộc loài lactobacilli.

3. Hợp phần dinh dưỡng theo điểm 1, trong đó vi khuẩn thuộc loài *Bifidobacterium* (ngoại trừ các vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum*) là ít nhất một vi khuẩn được chọn từ *Bifidobacterium longum* phân loài *longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis*, *Bifidobacterium breve*, và *Bifidobacterium pseudolongum*.

4. Hợp phần dinh dưỡng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó lactobacilli là ít nhất một vi khuẩn được chọn từ *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, và *Lactobacillus gasseri*.

5. Hợp phần dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó vi khuẩn thuộc *Bifidobacterium bifidum* là ít nhất một vi khuẩn được chọn từ *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521, *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-2429), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-1252), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-2431), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02648), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02432), và *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-02433).

6. Chế phẩm đồ ăn/đồ uống chứa hợp phần dinh dưỡng được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

7. Sữa bột cải biến chứa hợp phần dinh dưỡng được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.

<120> Hợp phần dinh dưỡng, chế phẩm đồ ăn/đồ uống và sữa bột cải biến chứa hợp phần dinh dưỡng này

<130> FPCT729

<150> JP2018-065647

<151> 2018-03-29

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi xuôi của Bifidobacterium bifidum

<400> 1

ccacatgatc gcatgtgatt g

21

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi ngược của *Bifidobacterium bifidum*

<400> 2

ccgaaggctt gctcccaaa

19

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi xuôi của *Bifidobacterium longum* phân loài *longum*

<400> 3

ttccagttga tcgcatgggc

20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi ngược của *Bifidobacterium longum* phân loài longum

<400> 4

gggaagccgt atctctacga 20

<210> 5

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi xuôi của *Bifidobacterium adolescentis*

<400> 5

ctccagttgg atgcatgtc 19

<210> 6

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi ngược của *Bifidobacterium adolescentis*

<400> 6

cgaaggcttg ctcccagt

18

<210> 7

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi xuôi của nhóm *Bifidobacterium catenulatum*

<400> 7

cggatgctcc gactcct

17

<210> 8

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi ngược của nhóm *Bifidobacterium catenulatum*

<400> 8

cgaaggcttg ctcccgat

18

<210> 9

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi xuôi của *Bifidobacterium pseudolongum*

<400> 9

cacatgagcg catgcgag

18

<210> 10

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi ngược của *Bifidobacterium pseudolongum*

<400> 10

tccactcaac acggccgaa

19

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi xuôi của *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis*

<400> 11

gtggagacac ggtttccc

18

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi ngược của *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis*

<400> 12

cacaccacac aatccaatac

20

<210> 13

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi xuôi của *Lactobacillus casei*

<400> 13

cgagttctcg ttgatgatc

19

<210> 14

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi ngược của *Lactobacillus casei*

<400> 14

aagattccct actgctgcc

19

<210> 15

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi xuôi của *Lactobacillus plantarum*

<400> 15

agatttgatc atggctcag

19

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi ngược của *Lactobacillus plantarum*

<400> 16

cggtattagc atctgttcc 20

<210> 17

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi xuôi của *Lactobacillus acidophilus*

<400> 17

acagattcac ttcggtg 17

<210> 18

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi ngược của *Lactobacillus acidophilus*

<400> 18

aaaggccagt tactacctc atc

23

<210> 19

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi xuôi của *Lactobacillus rhamnosus*

<400> 19

gcaagtcgaa cgagttctga ttat

24

<210> 20

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi ngược của *Lactobacillus rhamnosus*

<400> 20

gccgacaaca gttactctgc cgacca

26

<210> 21

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi xuôi của *Lactobacillus gasseri*

<400> 21

gatgaatttg gtgcttgac cag

23

<210> 22

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi ngược của *Lactobacillus gasseri*

<400> 22

aagattccct actgctgcc

19