



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0047409

(51)^{2022.01} C12N 1/20; A23C 9/123

(13) B

(21) 1-2023-01526

(22) 02/03/2021

(86) PCT/JP2021/008002 02/03/2021

(87) WO 2022/185419 09/09/2022

(45) 25/06/2025 447

(43) 27/11/2023 428A

(73) FUJICCO CO., LTD. (JP)

13-4, Minatojima-Nakamachi 6-chome, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 6508558 Japan

(72) WATANABE, Masamichi (JP); KOSAKA, Hideki (JP); AISO, Chisato (JP).

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

(54) CHỨNG VI KHUẨN AXIT LACTIC VÀ CHẾ PHẨM CHỨA CHỨNG VI KHUẨN
AXIT LACTIC NÀY

(21) 1-2023-01526

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic mới, cụ thể là, chủng *L. cremoris* FC mới, và các ứng dụng của chủng vi khuẩn này. Chủng vi khuẩn axit lactic theo sáng chế là *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC46 (số đăng ký: NITE BP-03310) hoặc chủng cây chuyển của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn axit lactic mới. Sáng chế cũng đề cập đến các ứng dụng khác nhau của chủng vi khuẩn axit lactic, như các chế phẩm (men và chế phẩm dùng qua đường miệng) chứa chủng vi khuẩn axit lactic và phương pháp sản xuất thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men sử dụng chủng vi khuẩn axit lactic này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong những năm gần đây, nhu cầu về các thực phẩm và đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic ngày càng gia tăng cùng với ý thức về sức khỏe ngày càng cao của người tiêu dùng, và vi khuẩn axit lactic được sử dụng rộng rãi trong quá trình sản xuất sữa lên men, đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic, và các sản phẩm tương tự khác. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, là một loại vi khuẩn axit lactic, đã được sử dụng làm vi khuẩn để sản xuất các sản phẩm sữa lên men như sữa chua và phó mát. Đã biết rằng có các loài *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* mà sản sinh các polysacarit nhót. Sữa chua thu được bằng cách lên men sử dụng chủng *L. cremoris* được phân lập bởi chủ đơn này (sau đây được gọi là “chủng *L. cremoris* FC”) làm vi khuẩn axit lactic lên men chính, trong số các loài được đề cập (tên thương mại: Caspian Sea Yogurt, nhãn hiệu đã đăng ký của chủ đơn, số đăng ký 5761425) có độ nhót đồng nhất hoàn toàn khác với độ nhót của sữa lên men thông thường. Đã có báo cáo rằng chủng *L. cremoris* FC và các polysacarit nhót được sản sinh bởi chủng *L. cremoris* FC có các hiệu quả sinh lý khác nhau, như điều hòa các chức năng của ruột, ngăn chặn sự gia tăng mức glucoza huyết, kích thích miễn dịch, bảo vệ chống lây nhiễm virus cúm, ức chế dị ứng, và cải thiện sự điều hòa thể thao (xem tài liệu phi sáng

chế (Non-patent Literature, viết tắt là NPL) 1 đến NPL 6).

Như vậy, các sản phẩm chứa chủng *L. cremoris* FC, như sữa lên men, cũng như men cho sự lên men và các thực phẩm bổ sung, đã được phát triển với mong đợi đạt được các hiệu quả sinh lý ở trên, và cần phải sử dụng liên tục chủng *L. cremoris* FC đủ để tạo ra các hiệu quả sinh lý như vậy trong ruột. Tuy nhiên, vi khuẩn axit lactic, là các vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc, được biết là giảm khả năng sống sót của chúng trong các điều kiện hiếu khí hoặc môi trường axit (độ pH thấp), và chủng *L. cremoris* FC cũng không phải là trường hợp ngoại lệ. Vì lý do này, có nhu cầu phát triển các sản phẩm chứa chủng *L. cremoris* FC mà duy trì được các hiệu quả sinh lý hữu ích, đồng thời ngăn chặn sự giảm số lượng vi khuẩn sống được gây ra trong quá trình bảo quản trong thời gian dài ở các thực phẩm và đồ uống có tính axit như sữa chua, và các dạng bột khô như các thực phẩm bổ sung vi khuẩn axit lactic.

Danh sách tài liệu viện dẫn

Tài liệu phi sáng chế

NPL 1: T. Toda et al., “Effects of fermented milk with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC on defecation frequency and fecal microflora in healthy elderly volunteers,” J. Jpn. Soc. Food. Sci. 52(6), 243-250 (2005)

NPL 2: M. Mori et al., “Beneficial effect of viscous fermented milk on blood glucose and insulin responses to carbohydrates in mice and healthy volunteers: preventive geriatrics approach by ‘slow calorie’,” Geriatrics. 141-152 (2012)

NPL 3: A. Kosaka et al., “*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC triggers IFN- γ production from NK and T cells via IL-12 and IL-18,” Int. Immunopharmacol. 14(4), 729-733 (2012)

NPL 4: T. Maruo et al., “Oral administration of milk fermented with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC protects mice against influenza virus infection,” Lett. Appl. Microbiol. 55(2), 135-140 (2012)

NPL 5: Y. Gotoh et al., “Effect of orally administered exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC on a mouse model of dermatitis induced by repeated exposure to 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene,” J. Funct. Foods. 35, 43-50 (2017)

NPL 6: Y. Gotoh et al., “Effect of yogurt fermented with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC on salivary secretory IgA levels in high school-student long-distance runners,” Japanese J. Phys. Fit. Sports Med. 68(6), 407-414 (2019)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Xét đến các vấn đề trên của các giải pháp kỹ thuật trước, mục đích của sáng chế là đề xuất chủng *L. cremoris* FC mới có tính dung nạp axit được cải thiện (chịu được độ pH thấp) và khả năng sống sót trong các điều kiện hiếu khí và các điều kiện khô được cải thiện, nói cách khác, chủng *L. cremoris* FC có khả năng sống sót tốt trong các thực phẩm và đồ uống có tính axit như sữa lên men và ở dạng bột khô. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất men cho sự lên men, chế phẩm dùng qua đường miệng như thực phẩm bổ sung hoặc thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men, và phương pháp sản xuất thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men, mà sử dụng chủng *L. cremoris* FC có tính dung nạp axit tốt và khả năng sống sót tốt trong các điều kiện hiếu khí và các điều kiện khô.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu sâu rộng để đạt được các mục đích ở trên, và phát hiện ra chủng *L. cremoris* FC mới mà có các đặc tính vi khuẩn học giống

như các đặc tính của chủng *L. cremoris* FC (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC, FERM P-20185) được sở hữu dưới dạng chủng *L. cremoris* bởi chủ đơn và có các đặc tính mà xét về cả tính dung nạp axit và khả năng sống sót trong các điều kiện hiếu khí và các điều kiện khô thì tốt hơn so với chủng *L. cremoris* FC (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC, FERM P-20185). Sáng chế đã được thực hiện bằng cách tiếp tục tiến hành nghiên cứu.

Sau đây, chủng *L. cremoris* FC đã biết được gọi là “chủng *L. cremoris* FC”, “chủng *L. cremoris* FC hiện tại”, hoặc “chủng FC cha mẹ”, và chủng *L. cremoris* FC mới phát hiện của sáng chế được gọi là “chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế”, “chủng *L. cremoris* FC46”, hoặc “chủng FC46” để phân biệt nó với chủng *L. cremoris* FC đã biết.

Sáng chế bao gồm các phương án dưới đây.

(I) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* mới (chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế)

(I-1) Vi khuẩn axit lactic mà là *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC46 (số đăng ký: NITE BP-03310) hoặc chủng cấy chuyển của nó.

(I-2) Vi khuẩn axit lactic theo mục (I-1), vi khuẩn này ở trạng thái khô.

(II) Men cho sự lên men

(II-1) Men cho sự lên men bao gồm *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC46 (số đăng ký: NITE BP-03310) hoặc chủng cấy chuyển của nó.

(II-2) Men cho sự lên men theo mục (II-1), còn bao gồm *Streptococcus thermophilus*.

(II-3) Men cho sự lên men theo mục (II-2), men này là thể cộng sinh của *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC46 (số đăng ký: NITE BP-03310) hoặc chủng cấy chuyển của nó, và *Streptococcus thermophilus*.

(II-4) Men cho sự lên men theo mục bất kỳ trong số các mục từ (II-1) đến (II-3), men này

ở trạng thái khô.

(III) Chế phẩm dùng qua đường miệng

(III-1) Chế phẩm dùng qua đường miệng chứa vi khuẩn axit lactic theo mục (I-1) hoặc (I-2).

(III-2) Chế phẩm dùng qua đường miệng theo mục (III-1), chế phẩm này là thực phẩm hoặc đồ uống, được dùng qua đường miệng, hoặc bán được dùng qua đường miệng.

(III-3) Chế phẩm dùng qua đường miệng theo mục (III-1) hoặc (III-2), chế phẩm này là thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men.

(IV) Phương pháp sản xuất thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men, và thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men

(IV-1) Phương pháp sản xuất thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men, bao gồm bước cấy vi khuẩn axit lactic theo mục (I-1) hoặc (I-2) hoặc men cho sự lên men theo mục bất kỳ trong số các mục từ (II-1) đến (II-4) vào trong nguyên liệu thô dùng cho thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men và lên men nguyên liệu thô.

Hiệu quả hữu ích của sáng chế

Chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế sáng chế có các đặc tính vi khuẩn học và các hiệu quả sinh lý hữu ích giống như các đặc tính vi khuẩn học và các hiệu quả sinh lý của chủng *L. cremoris* FC hiện tại, và dưới các điều kiện độ pH thấp quanh độ pH 4, thể hiện khả năng sống sót cao hơn, hiệu quả duy trì độ nhớt cao hơn, và tính dung nạp axit tốt hơn so với chủng *L. cremoris* FC hiện tại. Chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế cũng thể hiện khả năng sống sót cao hơn dưới các điều kiện khô và các điều kiện hiếu khí và chịu được các điều kiện khô và các điều kiện hiếu khí tốt hơn so với chủng *L. cremoris* FC hiện tại.

Như vậy, chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế có tính ổn định tốt trong các chế phẩm dùng qua đường miệng như các thực phẩm và đồ uống có tính axit (ví dụ, sữa chua và các đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic) và các thực phẩm bổ sung ở trạng thái khô và có thể duy trì và thể hiện các hiệu quả sinh lý hữu ích của nó ở dạng chế phẩm dùng qua đường miệng trong khoảng thời gian dài.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện các kết quả đo số lượng vi khuẩn sống sót (cfu/ml) của các chủng *L. cremoris* FC (chủng FC46 và chủng FC cha mẹ) trong môi trường axit theo thời gian trong Ví dụ 2.

Mô tả chi tiết sáng chế

(I) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* mới (chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế)

Chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế thuộc *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* và có các đặc tính vi khuẩn học sau đây. Một số chủng *L. cremoris* FC của sáng chế được ký gửi quốc tế dưới số đăng ký NITE BP-03310 như là dấu hiệu nhận biết “*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC46” ở Trung tâm lưu ký vi sinh vật theo sáng chế của Viện Công nghệ và Đánh giá quốc gia (Patent Microorganisms Depositary of the National Institute of Technology and Evaluation (NITE)) (Room 122, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 6 tháng 11 năm 2020.

(a) Các đặc tính vi khuẩn học

Các đặc tính vi khuẩn học (các đặc tính sinh lý và hình thái và các đặc tính đồng hóa nguồn cacbon) của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế khi được nuôi cấy tĩnh trong các điều kiện hiếu khí bằng cách sử dụng môi trường TY-Glu (1% glucoza, 0,5% Bacto(TM) Trypton (Thermo Fisher Scientific), 0,5% chất chiết nấm men Bacto(TM)

(Thermo Fisher Scientific), 0,5% NaCl) (độ pH 7,0) hoặc môi trường MRS (Difco) được thể hiện trong các Bảng 1 và Bảng 2 dưới đây.

Bảng 1

Hình dạng của tế bào	Cầu khuẩn (Coccus)
Nhuộm gram	+
Tính linh động	-
Sự hình thành bào tử	-
Hoạt tính catalaza	-
Sinh trưởng ở 10°C	+
Sinh trưởng ở 45°C	-
Sự sản sinh khí từ glucoza	-
Sự quay quang của axit lactic	L

Bảng 2

	Cơ chất đường	Kết quả		Cơ chất đường	Kết quả
0	Đối chứng	-	25	Esculin sắt xitrat	+
1	Glyxerol	-	26	Salixin	-
2	Erytritol	-	27	D-xenlobioza	-
3	D-arabinoza	-	28	D-mantoza	-
4	L-arabinoza	-	29	D-lactoza	+
5	Riboza	-	30	D-melibioza	-
6	D-xyloza	-	31	D-sucroza	-
7	L-xyloza	-	32	D-trehaloza	-
8	Adonitol	-	33	Inulin	-
9	Metyl- β -D-xylopyranosit	-	34	D-melezitoza	-
10	D-galactoza	+	35	D-rafinoza	-

11	D-glucoza	+	36	Tinh bột	-
12	D-fructoza	+	37	Glycogen	-
13	D-manoza	+	38	Xylitol	-
14	L-sorboza	-	39	Gentiobioza	-
15	L-rhamnoza	-	40	D-turanoza	-
16	Dulxitol	-	41	D-lyxoza	-
17	Inositol	-	42	D-tagatoza	-
18	D-manitol	-	43	D-fucoza	-
19	D-sorbitol	-	44	L-fucoza	-
20	Metyl- α -D-manopyranosit	-	45	D-arabitol	-
21	Metyl- α -D-glucopyranosit	-	46	L-arabitol	-
22	N-axetylglucosamin	+	47	Gluconat	-
23	Amygdalin	-	48	2-keto-gluconat	-
24	Arbutin	-	49	5-keto-gluconat	-

(b) Các đặc tính hình thái

Hình thái tế bào: (strepto)coccus

Hình dạng khuẩn lạc: tròn (bán cầu), đường kính nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,0 mm

Màu sắc khuẩn lạc: màu trắng

Sự hình thành bào tử: không

(c) Các đặc tính sinh lý

Nhuộm gram: dương tính

Tính linh động: không

Hoạt tính catalaza: không

Sự sản sinh khí từ glucoza: không

Sự quay quang của axit lactic: L

Sinh trưởng ở nhiệt độ 10°C: sống được

Sinh trưởng ở nhiệt độ 45°C: không sống được

Nhiệt độ tối ưu: nằm trong khoảng từ 25 đến 30°C

Độ pH tối ưu: độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 7

Lên men axit lactic: homo

(d) Các đặc tính đồng hóa nguồn cacbon (các đặc tính lên men đường)

Chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế đồng hóa các nguồn cacbon sau đây:

D-galactoza, D-glucoza, D-fructoza, D-manoza, D-lactoza, N-axetylglucosamin, và esculin.

(e) Các đặc tính khác mà đặc trưng cho vi sinh vật

Dựa trên các đặc tính trên xét theo K.H. Schleifer et al., “Transfer of *Streptococcus lactis* and Related Streptococci to the Genus *Lactococcus* gen. nov.,” System. Appl. Microbiol. 6, 183-195 (1985) và các kết quả tìm kiếm độ tương đồng sử dụng gen 16S rARN, chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế có độ tương đồng 100% với chủng *L. cremoris* FC hiện tại đã được đăng ký (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC, FERM P-20185) và được xác nhận là chủng thuộc *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Trình tự bazơ của gen 16S rARN của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 trong phần danh mục trình tự.

Ngoài các đặc tính vi khuẩn học ở trên, chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế sản sinh các polysaccharit nhót giống như chủng *L. cremoris* FC hiện tại. Như vậy, chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế, giống như chủng *L. cremoris* FC hiện tại, được cho là có các

hiệu quả sinh lý hữu ích khác nhau như điều hòa các chức năng của ruột, ngăn chặn sự gia tăng mức glucoza huyết, kích thích miễn dịch, bảo vệ chống lây nhiễm virus cúm, ức chế dị ứng, và cải thiện sự điều hòa thể thao.

Hơn nữa, như được thể hiện trong các Ví dụ 2 và Ví dụ 3 được mô tả dưới đây, dưới các điều kiện độ pH thấp quanh độ pH 4, chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế thể hiện khả năng sống sót cao hơn, hiệu quả duy trì độ nhớt cao hơn, và tính dung nạp axit tốt hơn so với chủng *L. cremoris* FC hiện tại. Ngoài ra, như được thể hiện trong Ví dụ 4 được mô tả dưới đây, chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế thể hiện khả năng sống sót cao hơn dưới các điều kiện khô và các điều kiện hiếu khí và chịu được các điều kiện khô và các điều kiện hiếu khí tốt hơn so với chủng *L. cremoris* FC hiện tại. Như vậy, chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế có tính ổn định tốt trong các chế phẩm dùng qua đường miệng như các thực phẩm và đồ uống có tính axit (ví dụ, sữa chua và các đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic) và các thực phẩm bổ sung ở trạng thái khô và có thể duy trì và thể hiện các hiệu quả sinh lý hữu ích của nó ở dạng chế phẩm dùng qua đường miệng trong khoảng thời gian dài.

Chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế bao gồm không chỉ chủng *L. cremoris* FC được ký gửi quốc tế dưới số đăng ký NITE BP-03310 (chủng được ký gửi) và chủng ban đầu của nó, mà còn cả các chủng cây chuyển của nó.

Sự cấy chuyển chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế có thể được thực hiện theo phương pháp thông thường thường được dùng để cấy chuyển vi khuẩn axit lactic và không bị giới hạn cụ thể. Các ví dụ bao gồm phương pháp trong đó chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế được cấy vào trong ống nghiệm chứa môi trường TY-Glu được nêu ở trên (độ pH 7,0) và được nuôi cấy ở nhiệt độ tối ưu từ khoảng 25 đến 30°C trong khoảng 12 đến 48 giờ. Glyxerol có thể được bổ sung vào các chủng *L. cremoris* FC được cấy chuyển

sao cho nồng độ sau cùng của chúng nằm trong khoảng từ 10 đến 30% trọng lượng/thể tích, và chúng có thể được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng.

Ngoài môi trường TY-Glu được nêu ở trên, môi trường thông thường chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, ion vô cơ, và hơn nữa, nếu cần, các chất dinh dưỡng vi lượng hữu cơ có thể được sử dụng làm môi trường cho chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế. Nguồn cacbon có thể là nguồn cacbon bất kỳ mà bao gồm nguồn cacbon có thể đồng hóa được, và ví dụ, các hydrat cacbon, như D-glucosa, D-galactosa, D-fructosa, D-manosa, và D-lactosa, có thể được ưu tiên sử dụng. Nguồn nitơ có thể là nguồn nitơ bất kỳ mà là, hoặc bao gồm, hợp chất nitơ có thể đồng hóa được, và ví dụ, amoni sulfat, các axit casamino, các pepton, và các hợp chất tương tự khác có thể được sử dụng. Ngoài ra, các muối vô cơ của axit phosphoric, sắt, kali, magie, kẽm, mangan, đồng, canxi, và các muối tương tự khác cũng có thể được sử dụng một cách thích hợp. Hơn nữa, các axit amin, các vitamin, như biotin, riboflavin, pyridoxin, axit nicotinic, axit pantothenic, axit folic, và thiamin, v.v., cần thiết cho sự sinh trưởng của vi khuẩn có thể được bổ sung vào môi trường nếu cần.

Chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế có thể được nuôi cấy ở nhiệt độ lớn hơn hoặc bằng 15°C, tốt hơn là từ khoảng 25 đến 30°C, và ở độ pH lớn hơn hoặc bằng 5, tốt hơn là độ pH từ khoảng 6 đến 7 để tăng cường sự tăng sinh. Chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế có thể được nuôi cấy tĩnh trong các điều kiện hiếu khí, nhưng tốt hơn là dưới các điều kiện kỵ khí để tăng cường sự tăng sinh.

Chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế, mà thể hiện khả năng sống sót cao dưới điều kiện khô và điều kiện hiếu khí như được nêu ở trên, có thể được bào chế dưới dạng sản phẩm khô bằng cách đem chủng này đi xử lý sấy như sấy chân không hoặc sấy phun sau khi tách khỏi môi trường hoặc có thể được bào chế dưới dạng sản phẩm khô bằng cách sấy chủng này cùng với các thành phần khác như các thành phần môi trường hoặc các tá

được.

(II) Men cho sự lên men

Chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng men (men cho sự lên men; mà có thể được gọi là “sự nuôi cấy men của vi khuẩn axit lactic”) được sử dụng trong quy trình sản xuất các thực phẩm lên men và đồ uống lên men bằng cách sử dụng khả năng lên men của nó.

Các ví dụ về các thực phẩm lên men và đồ uống lên men bao gồm các thực phẩm sữa lên men và đồ uống sữa lên men (sữa chua, các đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic, phó mát, v.v.) được làm chủ yếu từ sữa, các thực phẩm sữa đậu nành lên men và đồ uống sữa đậu nành lên men (sữa chua, các đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic, v.v.) được làm chủ yếu từ các loại đậu, các thực phẩm ngũ cốc lên men và đồ uống ngũ cốc lên men (*amazake* (nước ngọt được làm từ gạo lên men), bánh mì, v.v.) được làm chủ yếu từ ngũ cốc (lúa, lúa mì, v.v.), và các thực phẩm từ rau quả lên men và đồ uống từ rau quả lên men (các loại rau ngâm dấm v.v.).

Men cho sự lên men theo sáng chế tốt hơn là được sử dụng để lên men nguyên liệu thô chủ yếu bao gồm sữa hoặc sữa đậu nành, và thực phẩm hoặc đồ uống sữa lên men hoặc thực phẩm hoặc đồ uống sữa đậu nành lên men, như sữa chua hoặc đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic, được sản xuất bằng cách lên men nguyên liệu thô. Nguyên liệu thô chủ yếu bao gồm sữa hoặc sữa đậu nành (sữa nguyên liệu thô hoặc sữa đậu nành nguyên liệu thô) có thể là nguyên liệu bất kỳ mà chứa protein có nguồn gốc từ sữa hoặc các hạt đậu (tốt hơn là đậu nành), và có thể là, ví dụ, chính là sữa hoặc sữa đậu nành hoặc sữa nguyên liệu thô hoặc sữa đậu nành nguyên liệu thô mà đã được loại bỏ hoặc làm giảm lipid.

Trong bản mô tả sáng chế, “sữa” như được sử dụng trong sáng chế bao gồm sữa từ động vật, như sữa bò, sữa dê, sữa cừu, và sữa ngựa. Dạng của sữa không bị giới hạn cụ

thể và có thể được sử dụng ở dạng bất kỳ, bao gồm sữa thô, sữa nguyên kem cô đặc, sữa tách béo, bột sữa nguyên kem cô đặc, hoặc bột sữa tách béo. “Sữa đậu nành” như được sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sữa đậu nành thu được bằng cách nghiền đậu nành và nước, sau đó là ép. “Sữa đậu nành” là chất lỏng nhũ hóa (nhũ tương đậu nành) được làm từ các loại đậu và nước. Loại đậu được sử dụng làm nguyên liệu thô không bị giới hạn cụ thể, và loại đậu bất kỳ, như đậu nành, đậu adzuki, đậu Hà Lan, đậu răng ngựa, đậu cô ve, và đậu xanh, có thể được sử dụng.

Men cho sự lên men theo sáng chế tốt hơn là được cấy sao cho số lượng sống của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế là khoảng 1×10^5 đến 1×10^9 (cfu/g) trong khi sản xuất thực phẩm sữa lên men hoặc đồ uống sữa lên men, hoặc thực phẩm sữa đậu nành lên men hoặc đồ uống sữa đậu nành lên men. Như vậy, để sử dụng, tốt hơn là chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế được nuôi cấy trước bằng cách sử dụng, ví dụ, sữa nguyên liệu thô hoặc sữa đậu nành nguyên liệu thô và được điều chế sao cho số lượng sống của giống nuôi cấy là khoảng 1×10^7 đến 1×10^9 (cfu/g) (khối men). Đặc biệt, mặc dù không có sự giới hạn, ví dụ, chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế có thể được cấy vào trong nguyên liệu thô được khử trùng sơ bộ cho sự lên men (sữa nguyên liệu thô hoặc sữa đậu nành nguyên liệu thô) hoặc nguyên liệu thô cho sự lên men chứa chất chiết nấm men (ví dụ, 5 đến 10% bột sữa tách béo) và được nuôi cấy ở nhiệt độ tối ưu để thu được nồng độ vi khuẩn ở trên. Số lượng sống của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế có thể được xác định bằng cách đếm số lượng các khuẩn lạc được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy đĩa rớt (25°C) sử dụng môi trường TY-Glu (độ pH 7,0) (đếm khuẩn lạc). Số lượng tế bào và độ đục tương quan với nhau. Như vậy, nếu mối tương quan giữa số lượng tế bào và độ đục (hệ số hấp thụ ở bước sóng 600 nm) được xác định trước, số lượng tế bào có thể được tính bằng cách đo độ đục.

Men cho sự lên men theo sáng chế có thể chỉ bao gồm chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế, hoặc có thể bao gồm chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế kết hợp với một hoặc nhiều vi sinh vật khác có khả năng lên men miễn là các hiệu quả của sáng chế không bị suy giảm. Các ví dụ về các vi sinh vật khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vi khuẩn axit lactic thuộc giống *Lactococcus*, như *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* và *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*; vi khuẩn axit lactic thuộc giống *Streptococcus*, như *Streptococcus thermophilus*; và vi khuẩn axit lactic thuộc giống *Lactobacillus*, như *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus gasseri*, và *Lactobacillus acidophilus*. Một loại trong số các vi khuẩn axit lactic này có thể được sử dụng, hoặc hai hoặc nhiều loại vi khuẩn axit lactic này có thể được kết hợp bất kỳ để sử dụng.

Vi sinh vật được sử dụng kết hợp với chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế tốt hơn là *Streptococcus thermophilus* (sau đây được gọi là “*S. thermophilus*”). Như được thể hiện trong Ví dụ 3 được mô tả dưới đây, sự lên men sử dụng chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế cùng với *S. thermophilus* dưới các điều kiện độ pH thấp duy trì được số lượng vi khuẩn sống sót cao (cải thiện về khả năng sống sót) và ngăn chặn sự giảm độ nhớt sau khi bảo quản, so với sự lên men chỉ sử dụng chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế. Ở men cho sự lên men theo sáng chế bao gồm sự kết hợp của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế và *S. thermophilus* (thể cộng sinh của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế và *S. thermophilus*), tỷ lệ số lượng sống giữa hai chủng vi khuẩn không bị giới hạn. Ví dụ, tỷ lệ số lượng sống là tỷ lệ của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế : *S. thermophilus* là 1:0,001 đến 1000, tốt hơn là 1:0,01 đến 100, và tốt hơn nữa là 1:0,1 đến 10.

Số lượng sống của *S. thermophilus* có thể được xác định bằng cách đếm khuẩn lạc sử dụng phương pháp nuôi cấy đĩa rót (37°C) sử dụng môi trường thạch đếm đĩa chứa

BCP (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.).

Vi khuẩn axit axetic cũng có thể được sử dụng làm vi sinh vật được sử dụng kết hợp với chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế. Các ví dụ về vi khuẩn axit axetic bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vi khuẩn axit axetic thuộc giống *Acetobacter*, giống *Gluconobacter*, giống *Gluconacetobacter*, v.v..

Men cho sự lên men theo sáng chế có thể là dạng bất kỳ miễn là nó thể hiện khả năng lên men khi được sử dụng trong quá trình sản xuất các thực phẩm lên men và đồ uống lên men. Men cho sự lên men theo sáng chế tốt hơn là ở dạng rắn khô, tốt hơn nữa là ở dạng bột khô hoặc dạng hạt khô, xét về các khía cạnh vệ sinh, duy trì chất lượng, dễ xử lý, v.v.. Men cho sự lên men theo sáng chế cũng có thể được điều chế dưới dạng sản phẩm khô bằng cách cho men cùng với các thành phần khác, như các thành phần môi trường hoặc các tá dược, đem đi xử lý sấy khô.

Các điều kiện lên men (các điều kiện nuôi cấy) sử dụng men cho sự lên men theo sáng chế là, ví dụ, như sau: nhiệt độ nuôi cấy lớn hơn hoặc bằng 15°C, tốt hơn là từ khoảng 25 đến 30°C; độ pH nuôi cấy lớn hơn hoặc bằng 5, tốt hơn là độ pH vào khoảng 6 đến 7; và thời gian nuôi cấy lâu hơn hoặc bằng 3 giờ, tốt hơn là từ khoảng 8 đến 24 giờ.

(III) Chế phẩm dùng qua đường miệng

Chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế khác biệt bởi chứa chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế. Chế phẩm dùng qua đường miệng được điều chế ở dạng thực phẩm hoặc đồ uống bằng cách sử dụng chất mang ăn được thích hợp (nguyên liệu thực phẩm hoặc đồ uống) theo cách giống như các thực phẩm và đồ uống thông thường. Chế phẩm dùng qua đường miệng cũng được điều chế ở dạng dược (dạng thực phẩm bổ sung, dạng dược phẩm, hoặc dạng bán dược phẩm) bằng cách sử dụng nguyên liệu thô thích hợp cho các chế phẩm, như tá dược dược dụng hoặc chất pha loãng dược dụng.

Chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế được mong đợi phát huy các hiệu quả sinh lý khác nhau (điều hòa các chức năng của ruột, ngăn chặn sự gia tăng mức glucoza huyết, kích thích miễn dịch, bảo vệ chống lây nhiễm virus cúm, ức chế dị ứng, cải thiện sự điều hòa thể thao, v.v..) trong cơ thể khi được sử dụng qua đường miệng, như với chủng *L. cremoris* FC hiện tại. Các hiệu quả này được cho là các hiệu quả của chính chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế và/hoặc các polysaccharit nhót được sinh ra bởi chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế. Như vậy, chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế tốt hơn là chứa chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế ở trạng thái sống. Mong muốn rằng chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế chứa lượng lớn chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế dưới dạng vi khuẩn sống, nhưng điều này không loại trừ việc bao gồm chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế ở trạng thái bất hoạt.

Chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế có thể là dịch nuôi cấy chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế, sản phẩm thô hoặc đã tinh chế của dịch nuôi cấy, hoặc sản phẩm đông khô hoặc sản phẩm phun khô của dịch nuôi cấy miễn là nó chứa chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế. Dịch nuôi cấy không bị giới hạn và có thể thu được, ví dụ, bằng cách nuôi cấy ở nhiệt độ tối ưu khoảng 25 đến 30°C trong khoảng 12 đến 48 giờ sử dụng môi trường thích hợp cho chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế, như môi trường TY-Glu (độ pH 7,0). Các tế bào của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế có thể thu được bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy, ví dụ, ở 3000 vòng/phút trong khoảng 10 phút sau khi nuôi cấy để thu gom các tế bào. Các tế bào này cũng có thể được tinh chế theo phương pháp thông thường. Hơn nữa, các tế bào có thể được làm đông khô hoặc phun khô. Các tế bào đã làm khô thu được như vậy cũng có thể được sử dụng làm thành phần hoạt tính của chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế. Trong bản mô tả sáng chế, chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế, môi trường nuôi cấy chủng này, sản phẩm thô hoặc đã tinh chế của dịch

nuôi cấy, và sản phẩm khô của nó được gọi chung là “chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế và dịch nuôi cấy chủng này”.

Chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế còn có thể chứa lượng thích hợp của thành phần dinh dưỡng phù hợp cho sự bảo quản và sự tăng sinh của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế, nếu cần. Các ví dụ cụ thể về các thành phần dinh dưỡng bao gồm các thành phần dinh dưỡng được sử dụng trong môi trường để nuôi cấy các vi sinh vật, ví dụ, các nguồn cacbon, như glucoza, galactoza, fructoza, lactoza, và manoza; các nguồn nitơ, như chất chiết nấm men và pepton; các vitamin; các chất khoáng; các thành phần kim loại vết; và các thành phần dinh dưỡng khác.

Chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế có thể được phối chế thành các dạng thực phẩm hoặc đồ uống, dược phẩm, và bán dược phẩm theo các phương pháp thông thường. Các chất mang được sử dụng trong quy trình sản xuất các dạng này có thể là các chất mang ăn được hoặc các chất mang dược dụng, như các tá dược và các chất pha loãng. Chi tiết về quy trình sản xuất dạng thực phẩm hoặc đồ uống và các chất mang ăn được mà có thể được sử dụng trong quy trình sản xuất dạng thực phẩm hoặc đồ uống được mô tả dưới đây trong phần “Chế phẩm dùng qua đường miệng ở dạng thực phẩm hoặc đồ uống” dưới đây.

Lượng của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế chứa trong chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế có thể thường được chọn sao cho số lượng sống của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế trong chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế là khoảng 1×10^7 đến 1×10^{11} (cfu). Lượng của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế có thể được thay đổi thích hợp theo dạng của chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế được điều chế, hiệu quả mong muốn, v.v., bằng cách sử dụng lượng ở trên như một sự chỉ dẫn.

Chế phẩm dùng qua đường miệng ở dạng thực phẩm hoặc đồ uống

Chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế ở dạng thực phẩm hoặc đồ uống được tiêu thụ như thực phẩm hoặc đồ uống. Các ví dụ cụ thể được ưu tiên bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các thực phẩm sữa lên men và đồ uống sữa lên men được sản xuất bằng cách sử dụng sữa làm nguyên liệu thô, như sữa lên men (ví dụ, sữa chua) và các đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic; và các thực phẩm sữa đậu nành lên men và đồ uống sữa đậu nành lên men được sản xuất bằng cách sử dụng đậu nành làm nguyên liệu thô, như các đồ uống sữa chua đậu nành và sữa đậu nành lên men. Các ví dụ cũng bao gồm các thực phẩm và đồ uống ở các dạng dược phẩm chứa chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế, như các chế phẩm rắn (ví dụ, viên nén, viên tròn, bột, hạt, vi nang, và viên nang) và các chế phẩm lỏng (ví dụ, chất lưu, huyền phù, xi rô, và nhũ tương). Các ví dụ còn bao gồm các sản phẩm chứa chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế như bánh kẹo, như kẹo cao su, caramel, kẹo dẻo, kẹo nougat, và sôcôla; các thực phẩm và đồ uống lên men, như các loại nước rau lên men và các loại nước trái cây lên men; các sản phẩm từ bơ sữa, như bánh pudding và bánh bavarois khác với các thực phẩm lên men và đồ uống lên men được nêu ở trên; và các sản phẩm tương tự khác. Các thuật ngữ “sữa lên men” và “đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic” như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế là phù hợp với các định nghĩa ở Điều 2-40 “sữa lên men” và Điều 2-41 “đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic” của “Sắc lệnh của Bộ trưởng về Sữa và các sản phẩm sữa liên quan đến các tiêu chuẩn thành phần, v.v.” của Bộ Y tế và Phúc lợi Nhật Bản trước đây (“Ministerial Ordinance on Milk and Milk products Concerning Compositional Standards, etc.” of the former Japanese Ministry of Health and Welfare). Tức là, “sữa lên men” là để chỉ sản phẩm dạng lỏng hoặc dạng bột nhão được điều chế bằng cách lên men sữa hoặc sản phẩm từ bơ sữa với vi khuẩn axit lactic. Như vậy, “sữa lên men” bao gồm không chỉ các sản phẩm ở dạng đồ uống, mà

còn các sản phẩm ở dạng sữa chua. “Đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic” là để chỉ đồ uống được điều chế bằng cách sử dụng nguyên liệu chính là sản phẩm dạng lỏng hoặc dạng bột nhão được điều chế bằng cách lên men sữa hoặc sản phẩm từ bơ sữa với vi khuẩn axit lactic và pha loãng nó với nước.

(IV) Phương pháp sản xuất thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men, và thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men

Phương pháp sản xuất thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men theo sáng chế khác biệt ở chỗ thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men chứa chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế. Thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men có thể được sản xuất theo phương pháp thông thường. Ví dụ, thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men có thể được sản xuất bằng cách cấy chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế vào trong nguyên liệu thô thích hợp cho sự lên men chứa nguồn dinh dưỡng cho chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế (ví dụ, các nguyên liệu thô chứa sữa, sữa đậu nành (nhũ tương đậu nành), ngũ cốc, các loại rau, hoặc trái cây) và nuôi cấy nó để gây ra sự lên men nguyên liệu thô.

Phương pháp ưu tiên cho sự lên men sử dụng chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế là phương pháp mà men được chuẩn bị trước và được cấy vào trong nguyên liệu thô cho sự lên men, và nguyên liệu thô được lên men. Men có thể là, ví dụ, men cho sự lên men theo sáng chế được nêu ở trên. Tốt hơn là, men chứa chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế sao cho số lượng sống của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế là khoảng 1×10^7 đến 1×10^9 (cfu/ml).

Nguyên liệu thô cho sự lên men tùy ý có thể được bổ sung với các chất thúc đẩy sự lên men để đạt được sự sinh trưởng tốt của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế, như các nguồn cacbon, như glucoza, galactoza, fructoza, lactoza, và manoza; các nguồn nitơ, như chất chiết nấm men và pepton; các vitamin; các chất khoáng; các thành phần kim loại vết;

và các thành phần dinh dưỡng khác.

Ví dụ, khi sữa được sử dụng làm nguyên liệu thô cho sự lên men, thích hợp là lượng của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế được cấy được lựa chọn sao cho chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế được chứa ở lượng lớn hơn hoặc bằng 1×10^5 (cfu/ml), tốt hơn là từ khoảng 1×10^7 đến 1×10^9 (cfu/ml) trong sữa. Đối với các điều kiện nuôi cấy, nhiệt độ lên men thường được chọn từ khoảng lớn hơn hoặc bằng 15°C , tốt hơn là từ khoảng 25 đến 30°C , và thời gian lên men thường được chọn từ khoảng 3 đến 24 giờ.

Sản phẩm lên men thu được như vậy có thể ở dạng đông tụ (dạng giống pudding hoặc giống sữa chua), và sản phẩm như vậy có thể được sử dụng trực tiếp dưới dạng thực phẩm dạng rắn. Sản phẩm lên men ở dạng đông tụ có thể tiếp tục được đồng nhất hóa để điều chế dạng đồ uống mong muốn. Quá trình đồng nhất hóa này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng máy nhũ tương hóa thông thường (thiết bị đồng nhất hóa). Nhờ quá trình đồng nhất hóa như vậy, có thể thu được đồ uống với cảm giác trơn mịn. Trong quá trình đồng nhất hóa này, nếu cần, cũng có thể tiến hành pha loãng một cách thích hợp, bổ sung các axit hữu cơ để điều chỉnh độ pH, hoặc bổ sung các chất phụ gia khác nhau thường được dùng trong quá trình sản xuất đồ uống, như sacarit, nước ép trái cây, chất làm đặc, chất hoạt động bề mặt, và chất tạo hương. Đồ uống thu được như vậy có thể được rót vô trùng vào trong vật chứa thích hợp để tạo ra sản phẩm sau cùng.

Lượng nạp (liều lượng) của thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men (chế phẩm dùng qua đường miệng) được xác định một cách thích hợp theo độ tuổi, giới tính, thể trọng, mức độ trầm trọng của bệnh, v.v. của cơ thể mà sử dụng chế phẩm và không bị giới hạn cụ thể. Lượng nạp (liều lượng) của chế phẩm dùng qua đường miệng thường được chọn từ khoảng ở đó lượng của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế là từ khoảng 1×10^7 đến 1×10^{11} (cfu/ml). Chế phẩm dùng qua đường miệng có thể được điều chế sao cho chế

phẩm này thường được sử dụng ở lượng từ khoảng 50 đến 1000 ml cho mỗi người trong một ngày.

Các ví dụ được đặc biệt ưu tiên của chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế ở dạng thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm các thực phẩm và đồ uống ở dạng thực phẩm bổ sung, cụ thể là các thực phẩm và đồ uống ở dạng dược phẩm, như các chế phẩm rắn, như các viên nén, viên tròn, bột, hạt, vi nang, và viên nang; và các chế phẩm lỏng, như chất lưu, huyền phù, xi rô, và nhũ tương. Tốt hơn là, thực phẩm hoặc đồ uống ở dạng dược phẩm là chế phẩm rắn khô.

Thực phẩm hoặc đồ uống ở dạng thực phẩm bổ sung có thể được sản xuất bằng cách sử dụng, như chất mang dược phẩm, chất pha loãng hoặc tá dược thường được sử dụng trong lĩnh vực này, như chất độn, chất bổ sung, chất kết dính, chất làm ẩm, chất gây phân rã, chất hoạt động bề mặt, và chất làm trơn, như trong chế phẩm ở dạng dược phẩm.

Lượng vi khuẩn axit lactic của sáng chế chứa trong chế phẩm dùng qua đường miệng ở dạng thực phẩm hoặc đồ uống có thể được chọn thích hợp từ phạm vi rộng, miễn là nó đủ để phát huy các hiệu quả của vi khuẩn axit lactic. Tốt hơn là, vi khuẩn axit lactic thường được chứa ở lượng từ khoảng 1×10^7 đến 1×10^{11} (cfu) trên đơn vị của lượng nạp (liều lượng).

Phương pháp sử dụng chế phẩm không bị giới hạn cụ thể, miễn là chế phẩm được dùng qua đường miệng, và được xác định theo dạng, độ tuổi, giới tính và các điều kiện khác của người bệnh, mức độ trầm trọng của bệnh, v.v..

Lượng nạp chế phẩm được lựa chọn thích hợp theo phương pháp sử dụng, độ tuổi, giới tính và các điều kiện khác của người bệnh, v.v.. Như được nêu ở trên, tốt hơn là chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế được dùng ở lượng khoảng 1×10^7 đến 1×10^{11} (cfu) trên lượng nạp (liều lượng). Lượng nạp của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế, là thành phần

hoạt tính, tốt hơn là khoảng lớn hơn hoặc bằng 1×10^7 (cfu) cho mỗi ngày, và có thể được chia thành nhiều phần để dùng trong ngày. Tốt hơn là, chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế được dùng liên tục để thu được hiệu quả hữu hiệu của nó. Ví dụ, chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế có thể được dùng liên tục hoặc gián đoạn trong thời gian 2 tuần hoặc lâu hơn.

Chế phẩm dùng qua đường miệng chứa chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế ở trạng thái sống được mong đợi phát huy các hiệu quả sinh lý hữu ích trong cơ thể khi được dùng (sử dụng), như với chủng *L. cremoris* FC hiện tại. Như vậy, chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế có thể được sử dụng một cách hữu hiệu như là yếu tố tăng cường sức khỏe dựa trên các hiệu quả sinh lý của chế phẩm. Do vậy, chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế bao gồm các thực phẩm và đồ uống mà có chức năng cụ thể và được dùng cho mục đích duy trì sức khỏe, v.v.. Cụ thể, chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế bao gồm các thực phẩm và đồ uống mà có, ví dụ, hiệu quả điều hòa các chức năng của ruột, hiệu quả ngăn chặn sự gia tăng mức glucoza huyết, hiệu quả kích thích miễn dịch, hiệu quả bảo vệ chống lây nhiễm virus cúm, hiệu quả ức chế dị ứng, và/hoặc hiệu quả cải thiện sự điều hòa thể thao. Các thực phẩm và đồ uống này bao gồm, ví dụ, các thực phẩm và đồ uống mà được sản xuất và bán với sự ghi nhãn hoặc công bố về các hiệu quả hoặc các sử dụng được nêu ở trên, như thực phẩm có công bố về sức khỏe (thực phẩm có công bố về chức năng dinh dưỡng, thực phẩm có công bố về chức năng, và thực phẩm dùng cho mục đích sức khỏe đặc biệt), thực phẩm dùng cho chế độ ăn đặc biệt (thực phẩm dùng cho mục đích sức khỏe đặc biệt), và các thực phẩm bảo vệ sức khỏe tương tự.

Trong bản mô tả này, các thuật ngữ “bao gồm” và “chứa” bao hàm các nghĩa “gồm có” và “về cơ bản gồm có”.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả dưới đây với sự tham khảo các Ví dụ để thuận lợi cho việc hiểu rõ cấu trúc và các hiệu quả của sáng chế. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các Ví dụ này. Các thử nghiệm dưới đây được thực hiện dưới các điều kiện nhiệt độ trong phòng ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$) và áp suất khí quyển, trừ khi được quy định cụ thể. Trong phần mô tả dưới đây, trừ khi được quy định cụ thể, “%” có nghĩa là “% khối lượng”, và “phần” có nghĩa là “phần khối lượng”.

Ví dụ 1: Phân lập và nhận dạng chủng *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC mới

Chủng *L. cremoris* FC (FERMP-20185) được cấy (1%) vào trong bột sữa tách béo 8% tiệt trùng dạng lỏng và để ở nhiệt độ tối ưu của nó (25°C) trong khoảng 10 giờ để hoạt hóa chủng *L. cremoris* FC (men 1). *Streptococcus thermophilus* (sau đây được gọi là “*S. thermophilus*”) được cấy (1%) vào trong bột sữa tách béo 8% tiệt trùng dạng lỏng và để ở nhiệt độ tối ưu của nó (37°C) trong khoảng 10 giờ để hoạt hóa *S. thermophilus* (men 2). Tiếp theo, các men 1 và men 2 đã chuẩn bị ở trên được cấy vào trong sữa tiệt trùng được điều chế riêng biệt, và sự lên men được thực hiện ở nhiệt độ 30°C . Khi quan sát thấy sự hình thành sữa đông, sự làm lạnh (4°C) được bắt đầu.

Sữa lên men thu được được bảo quản trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C trong 46 ngày, được cấy vào trong 3 l môi trường TY-Gal (1% galactosa, 0,5% Bacto(TM) Trypton (Thermo Fisher Scientific), 0,5% chất chiết nấm men Bacto(TM) (Thermo Fisher Scientific), 0,5% NaCl) (độ pH 7,0) theo tỷ lệ 4%, và sau đó được nuôi cấy ở nhiệt độ 26°C trong 72 giờ. Dịch nuôi cấy được cấy lên môi trường thạch TY-Gal (độ pH 7,0) và được nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C trong 48 giờ, và các khuẩn lạc đã phát triển được nuôi cấy trong bột sữa tách béo 8% tiệt trùng dạng lỏng và được bảo quản.

Trong số các chủng, chủng có tính dung nạp cao đối với độ pH thấp (tính dung nạp

axit) được tách bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1 được thu lấy, và các đặc tính vi khuẩn học của nó được đánh giá theo phương pháp thông thường. Bảng 1 thể hiện các kết quả. Hơn nữa, khả năng chủng đồng hóa 49 nguồn cacbon (khả năng lên men đường) được đánh giá bằng cách sử dụng API 50 CHL (được sản xuất bởi bioMérieux Japan Ltd.). Bảng 2 thể hiện các kết quả. Bảng 1 như được mô tả ở đoạn [0015], và Bảng 2 như được mô tả ở đoạn [0016].

Các kết quả này đã xác nhận rằng chủng thu được có các đặc tính vi khuẩn học và các đặc tính đồng hóa đường giống như các đặc tính của chủng *L. cremoris* FC được sử dụng làm chủng cha mẹ (sau đây được gọi đơn giản là “chủng FC cha mẹ”). Như vậy, chủng này được xác nhận là chủng thuộc *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* và được đặt tên là *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC46 (sau đây được gọi là “chủng *L. cremoris* FC46” hoặc đơn giản là “chủng FC46”). Chủng *L. cremoris* FC46 được ký gửi quốc tế dưới số đăng ký NITE BP-03310 như là dấu hiệu nhận biết “*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC46” ở Trung tâm lưu ký vi sinh vật theo sáng chế của Viện Công nghệ và Đánh giá quốc gia (Patent Microorganisms Depositary of the National Institute of Technology and Evaluation) (Room 122, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan) vào ngày 6 tháng 11 năm 2020 (ngày phát hành chứng chỉ lưu ký: 30 tháng 11 năm 2020).

Ví dụ 2: Đánh giá tính dung nạp axit

Chủng FC46 thu được ở trên được cấy vào trong môi trường TY-Glu (1% glucoza, 0,5% Bacto(TM) Trypton, 0,5% chất chiết nấm men Bacto(TM), 0,5% NaCl) (độ pH 7,0) theo tỷ lệ 4% và được nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C trong 15 giờ để điều chế dịch nuôi cấy sơ bộ. Dịch nuôi cấy sơ bộ thu được được cấy vào trong 40 ml môi trường TY-Glu được điều chỉnh đến độ pH 4,0 bằng axit lactic đến nồng độ sau cùng 1%, sau đó nuôi cấy tĩnh ở

nhệt độ 26°C trong 27 giờ. Số lượng sống (cfu/ml) của chủng FC46 trong dịch nuôi cấy được đo theo thời gian bằng phương pháp nuôi cấy đĩa rót sử dụng môi trường thạch đếm đĩa chứa BCP (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), và tỷ lệ sống sót (%) sau 27 giờ được tính. Về thử nghiệm so sánh, chủng FC cha mẹ được sử dụng thay cho chủng FC46 và được nuôi cấy theo cùng một cách thức, số lượng sống (cfu/ml) của chủng FC cha mẹ trong dịch nuôi cấy được đo theo thời gian, và tỷ lệ sống sót (%) sau 27 giờ được tính.

Fig.1 thể hiện các kết quả đo số lượng sống (cfu/ml) của chủng *L. cremoris* (chủng FC46 và chủng FC cha mẹ) theo thời gian. Như được thể hiện trên Fig.1, chủng FC cha mẹ bị tiêu diệt nhanh chóng dưới các điều kiện độ pH thấp với độ pH là 4,0, và số lượng sống giảm đến $6,6 \times 10^3$ (cfu/ml) (tỷ lệ sống sót: 0,2%) sau 27 giờ nuôi cấy. Ngược lại, chủng FC46 thể hiện khả năng sống sót cao ngay cả dưới các điều kiện độ pH thấp với độ pH là 4,0 và duy trì được số lượng sống cao $1,9 \times 10^6$ (cfu/ml) (tỷ lệ sống sót: 33,6%) thậm chí sau 27 giờ nuôi cấy dưới điều kiện độ pH này. Các kết quả xác nhận rằng chủng FC46 là chủng *L. cremoris* có tính dung nạp axit tốt hơn so với chủng FC cha mẹ.

Ví dụ 3: Đánh giá tính ổn định trong sữa lên men

Sữa lên men được điều chế bằng cách sử dụng chủng FC46, và tính ổn định trong sữa lên men được đánh giá. Để làm đối chứng, sữa lên men được điều chế theo cách tương tự sử dụng chủng FC cha mẹ, và tính ổn định trong sữa lên men được đánh giá.

1. Điều chế sữa lên men

Bốn loại sữa lên men (sữa lên men 1 đến sữa lên men 4) được điều chế bằng cách sử dụng các chủng vi khuẩn được hoạt hóa dưới đây làm các men:

(1) sữa lên men 1: chủng FC cha mẹ (men 1)

(2) sữa lên men 2: chủng FC46 (men 3)

(3) sữa lên men 3: chủng FC cha mẹ (men 1) + *S. thermophilus* (chủng ST) (men 2)

(4) sữa lên men 4: chủng FC46 (men 3) + *S. thermophilus* (men 2).

Men 1 được điều chế bằng cách cấy chủng FC cha mẹ (1%) vào trong bột sữa tách béo 8% tiệt trùng dạng lỏng và để yên chúng ở nhiệt độ 30°C trong khoảng 10 giờ để hoạt hóa. Men 3 được điều chế bằng cách cấy chủng FC46 (1%) vào trong bột sữa tách béo 8% tiệt trùng dạng lỏng và để yên chúng ở nhiệt độ 30°C trong khoảng 10 giờ để hoạt hóa. Men 2 được điều chế bằng cách cấy *S. thermophilus* (1%) vào trong bột sữa tách béo 8% tiệt trùng dạng lỏng và để yên chúng ở nhiệt độ tối ưu (37°C) trong khoảng 10 giờ để hoạt hóa.

Mỗi men trong số các men đã chuẩn bị ở trên được cấy vào trong sữa tiệt trùng, và sự lên men được thực hiện ở nhiệt độ 30°C. Khi quan sát thấy sự hình thành sữa đông, quá trình làm lạnh (4°C) được bắt đầu để kìm hãm sự lên men, bằng cách đó thu được sữa lên men.

2. Đánh giá tính ổn định của vi khuẩn trong sữa lên men

Sau khi sữa lên men 1 đến sữa lên men 4 được điều chế, chúng được bảo quản trong bóng tối ở nhiệt độ 10°C trong 30 ngày. Số lượng sống (cfu/ml) trong sữa lên men sau khi bảo quản (số lượng sống của *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* trong sữa lên men 1 và sữa lên men 2, và số lượng sống của *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* và số lượng sống của *S. thermophilus* trong sữa lên men 3 và sữa lên men 4) được xác định. Số lượng sống của *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* được xác định bằng phương pháp nuôi cấy đĩa rót (25°C) sử dụng môi trường TY-Gal (độ pH 7,0), và số lượng sống của *S. thermophilus* được xác định bằng phương pháp nuôi cấy đĩa rót (37°C) sử dụng môi trường thạch đếm đĩa chứa BCP (độ pH 7,0).

Độ pH, độ axit, và độ nhớt của từng loại sữa lên men được đo bằng các phương pháp sau đây.

Đo độ pH

Độ pH của từng sản phẩm lên men được đo bằng cách sử dụng máy đo độ pH F-52 (được sản xuất bởi Horiba, Ltd.) sau khi sản phẩm lên men được điều chỉnh đến nhiệt độ 10°C.

Đo độ axit

10 g của từng sản phẩm lên men được cân chính xác và được pha loãng bằng cùng một lượng nước cất. 0,5 ml dung dịch phenolphthalein được bổ sung làm chất chỉ thị, và phép chuẩn độ được thực hiện với dung dịch nước natri hydroxit 0,1 mol/l cho đến khi màu hồng nhạt tồn tại trong 30 giây. Từ độ chuẩn này, tỷ lệ phần trăm của axit lactic trên 100 g mẫu được xác định là độ axit. Lưu ý rằng 1 ml dung dịch nước natri hydroxit 0,1 mol/l tương đương với 9 mg axit lactic.

Đo độ nhớt

Độ nhớt tuyệt đối của từng sản phẩm lên men được đo bằng cách sử dụng nhớt kế kiểu B (được sản xuất bởi Brookfield, trục số 4) sau khi sản phẩm lên men được điều chỉnh đến nhiệt độ 10°C. Thời gian quay rôto là 1 phút.

Bảng 3 thể hiện các kết quả ở ngày 1 sau khi bắt đầu bảo quản, và Bảng 4 thể hiện các kết quả ở ngày 30 sau khi bắt đầu bảo quản.

Bảng 3

		Ngày 1 sau khi bắt đầu bảo quản				
		Số lượng sống (cfu/ml)		Độ pH	Độ axit (%)	Độ nhớt (mPa.s)
		<i>Cremoris</i>	<i>Thermophilus</i>			
1	Chủng FC cha mẹ	$2,2 \times 10^8$	-	4,33	0,83	7474
2	Chủng FC46	$4,3 \times 10^8$	-	4,39	0,86	6911
3	Chủng FC cha mẹ + chủng ST	$1,4 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	4,49	0,85	6947
4	Chủng FC46 + chủng ST	$2,1 \times 10^8$	$5,6 \times 10^7$	4,50	0,88	6491

Bảng 4

		Ngày 30 sau khi bắt đầu bảo quản				
		Số lượng sống (cfu/ml)		Độ pH	Độ axit (%)	Độ nhớt (mPa.s)
		<i>Cremoris</i>	<i>Thermophilus</i>			
1	Chủng FC cha mẹ	<10	-	4,15	0,97	6083
2	Chủng FC46	$1,1 \times 10^4$	-	4,13	1,00	6551
3	Chủng FC cha mẹ + chủng ST	$8,6 \times 10^2$	$5,3 \times 10^7$	4,21	0,99	6071
4	Chủng FC46 + chủng ST	$5,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	4,16	1,00	6623

Như được thể hiện trong các Bảng 3 và Bảng 4, chủng FC cha mẹ bị tiêu diệt một cách nhanh chóng trong thời gian bảo quản, và chỉ còn lại số lượng sống là vài đơn vị hình thành khuẩn lạc trên ml sau 30 ngày (sữa lên men 1). Ngược lại, chủng FC46 duy trì được số lượng sống cao $1,1 \times 10^4$ (cfu/ml) (tỷ lệ sống sót: 0,0026%) thậm chí sau 30 ngày (sữa lên men 2). Cả chủng FC cha mẹ và chủng FC46 đều giữ được số lượng sống cao hơn khi quá trình lên men được thực hiện cùng với *S. thermophilus* so với khi

quá trình lên men được thực hiện bằng cách sử dụng chủng FC cha mẹ hoặc chủng FC46 riêng biệt (sữa lên men 3 và sữa lên men 4), và cụ thể, chủng FC46 thể hiện số lượng sống rất cao $5,8 \times 10^6$ (cfu/ml) (tỷ lệ sống sót: 2,8%) (sữa lên men 4).

Hơn nữa, chủng FC cha mẹ thể hiện sự giảm độ nhớt sau 30 ngày bảo quản, ngược lại sự giảm độ nhớt được ngăn chặn ở chủng FC46, so với chủng FC cha mẹ. Xu hướng tương tự được quan sát thấy khi quá trình lên men được thực hiện cùng với *S. thermophilus*.

Sữa lên men 1 đến sữa lên men 4 được tạo ra trong Ví dụ này đều có vẻ bên ngoài đẹp (màu sắc, có hoặc không có sự đông tụ), mùi thơm, và vị ngon, và không có các sự khác biệt về các khía cạnh này.

Ví dụ 4: Điều chế chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic và đánh giá tính ổn định

Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic được điều chế bằng cách sử dụng chủng FC46, và tính ổn định khi bảo quản của nó ở trạng thái khô được đánh giá. Để so sánh, chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic được điều chế bằng cách sử dụng chủng FC cha mẹ thay cho chủng FC46, và tính ổn định khi bảo quản của nó ở trạng thái khô cũng được đánh giá.

1. Điều chế dịch vi khuẩn axit lactic

Chủng FC46 hoặc chủng FC cha mẹ được cấy theo tỷ lệ 4% vào trong môi trường Difco M17 (BD) được bổ sung glucoza đến nồng độ sau cùng là 0,5% và được nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C trong 16 giờ để điều chế dịch nuôi cấy sơ bộ. 4% dịch nuôi cấy sơ bộ được cấy vào trong kiểu môi trường giống như môi trường ở trên và được nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C trong 16 giờ để thu 10 l dịch nuôi cấy. Dịch nuôi cấy được li tâm (3000 vòng/phút, 10 phút), và phần nổi lên trên bề mặt được loại bỏ bằng cách lắng gạn. Sau đó, phần còn lại được rửa hai lần với nước muối sinh lý để điều chế dịch vi khuẩn axit lactic trong đó

chủng FC46 hoặc chủng FC cha mẹ được cô.

Bột sữa tách béo được bổ sung theo tỷ lệ 10% vào từng dịch vi khuẩn axit lactic trong số các dịch vi khuẩn axit lactic đã điều chế, sau đó xử lý đông khô theo phương pháp thông thường sử dụng thiết bị sấy đông khô (FD-81, Tokyo Rikakikai Co., Ltd.), bằng cách đó thu được vi khuẩn axit lactic được làm đông khô (chủng FC46 và chủng FC cha mẹ, mỗi chủng khoảng 50 g).

Vi khuẩn axit lactic được làm đông khô thu được (chủng FC46 và chủng FC cha mẹ, mỗi chủng khoảng 0,5 g) được đặt vào các túi đựng có khóa kéo làm bằng màng mỏng vô trùng (LAMIZIP (nhãn hiệu đã đăng ký); được sản xuất bởi Seisannipponsha Ltd.) và được bảo quản dưới các điều kiện bóng tối ở nhiệt độ 37°C (thử nghiệm thoái hóa tăng tốc). Số lượng sống của chủng FC46 hoặc chủng FC cha mẹ trong vi khuẩn axit lactic được làm đông khô được đo theo thời gian tính từ lúc bắt đầu thử nghiệm này (ngày thứ nhất), và tỷ lệ sống sót (%) được tính.

Bảng 5 thể hiện các kết quả.

Bảng 5

Tỷ lệ sống sót (%) sau khi bảo quản ở 37°C

	Ngày thứ nhất	Sau 3 tuần	Sau 4 tuần
Chủng FC46	100,0	14,67	6,03
Chủng FC cha mẹ	100,0	1,58	0,07

Chủng FC cha mẹ bị tiêu diệt nhanh chóng trong khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C, và số lượng sống của chủng FC cha mẹ sau 3 tuần là $3,2 \times 10^9$ (cfu/g) (tỷ lệ sống sót: khoảng

1,6%). Ngược lại, chủng FC46 thể hiện số lượng sống rất cao $1,1 \times 10^{10}$ (cfu/g) (tỷ lệ sống sót: khoảng 14,7%). Các kết quả này đã xác nhận rằng chủng FC46 tính ổn định khi bảo quản tốt hơn so với chủng FC cha mẹ ngay cả ở dạng bột khô trong các điều kiện hiếu khí.

Danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1 thể hiện trình tự bazơ của gen 16S rARN của chủng *L. cremoris* FC theo sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi khuẩn axit lactic là *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC46 (số đăng ký: NITE BP-03310) hoặc chủng cấy chuyển của nó,

chủng cấy chuyển là vi khuẩn axit lactic mà thuộc *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* và có các đặc tính vi khuẩn học, các đặc tính hình thái, các đặc tính sinh lý, các đặc tính đồng hóa nguồn cacbon, các đặc tính sinh polysacarit nhót, tính dung nạp axit, và khả năng sống sót dưới các điều kiện khô và các điều kiện hiếu khí giống như các đặc tính của *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC46.

2. Vi khuẩn axit lactic theo điểm 1, vi khuẩn này ở trạng thái khô.

3. Men cho sự lên men bao gồm vi khuẩn axit lactic theo điểm 1 hoặc 2.

4. Men cho sự lên men theo điểm 3, còn bao gồm *Streptococcus thermophilus*.

5. Men cho sự lên men theo điểm 4, men này là thể cộng sinh của *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC46 (số đăng ký: NITE BP-03310) hoặc chủng cấy chuyển của nó, và *Streptococcus thermophilus*.

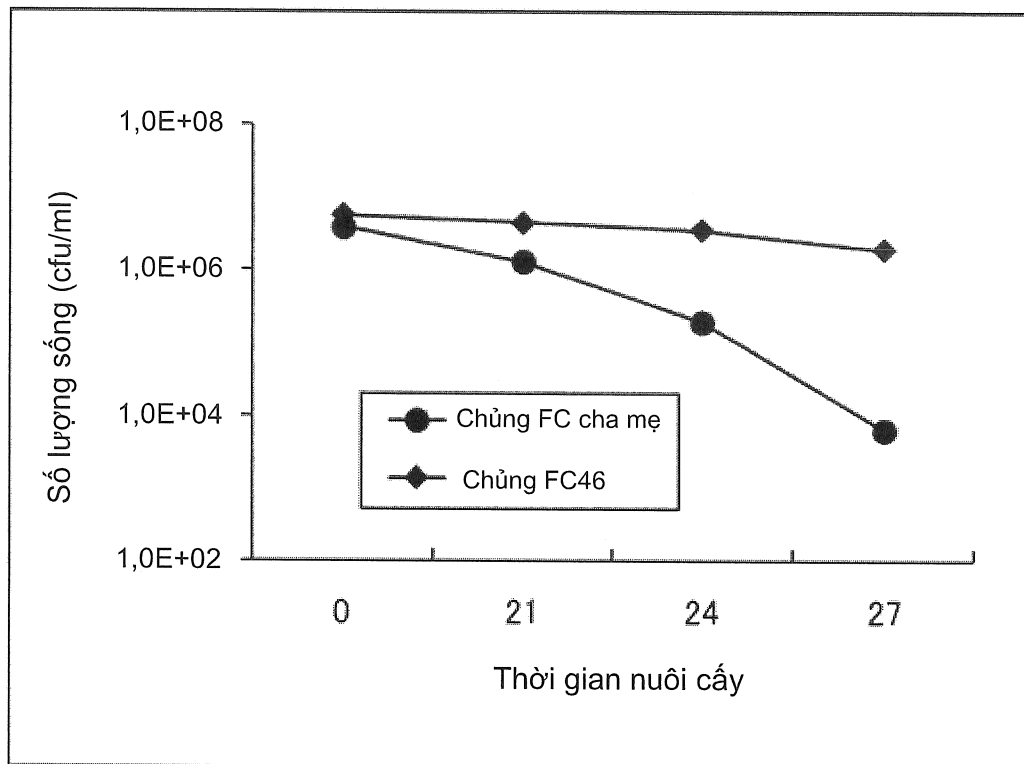
6. Men cho sự lên men theo điểm 4 hoặc 5, men này ở trạng thái khô.

7. Chế phẩm dùng qua đường miệng chứa vi khuẩn axit lactic theo điểm 1 hoặc 2.

8. Chế phẩm dùng qua đường miệng theo điểm 7, chế phẩm này là thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men.

9. Phương pháp sản xuất thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men, phương pháp này bao gồm bước cấy vi khuẩn axit lactic theo điểm 1 hoặc 2 hoặc men cho sự lên men theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 6 vào trong nguyên liệu thô dùng cho thực phẩm lên men hoặc đồ uống lên men và lên men nguyên liệu thô.

FIG.1



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> FUJICCO CO., LTD.

<120> Chủng vi khuẩn axit lactic mới và chế phẩm chứa chủng vi khuẩn axit lactic mới này

<130> P21-046WO

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1507

<212> ADN

<213> *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

<220>

<221>

<222>

<223> gen 16S rARN

<400> 1

gagtttgatc ctggctcagg acgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagttgagcg	60
atgaagattg gtgcttgac caattgaag agcagcgaac gggtagtaa cgcgtgggga	120
atctgccttt gagcggggga caacattgg aaacgaatgc taataccgca taacaactt	180
aaacataagt ttaagtttg aaagatgcaa ttgcatcact caaagatgat cccgcgtgt	240
attagctagt tggtaggta aaggctcacc aaggcgatga tacatagccg acctgagagg	300
gtgatcgcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc agcagtaggg	360
aatcttcggc aatggacgaa agtctgaccg agcaacgccg cgtgagtga gaaggtttc	420
ggatcgtaaa actctgttgg tagagaagaa cgttggtgag agtggaaagc tcatcaagt	480
acggtaacta cccagaaagg gacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg	540
tcccgagcgt tgtccgatt tattggcggt aaagcgagcg caggtggtt attaagtctg	600
gtgtaaaagg cagtggctca accattgtat gcattggaaa ctggtagact tgagtgcagg	660
agaggagagt ggaattccat gtgtagcggg gaaatgcgta gatatatgga ggaacaccgg	720
tggcgaaagc ggctctctgg cctgtaactg aactgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa	780
caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatga gtgctagatg tagggagcta	840
taagtctct gtatcgagc taacgcaata agcactccg ctggggagta cgaccgcaag	900
gttgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggttaattc	960
gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt gacatactg tgctattcct agagatagga	1020
agttccttcg ggacacggga tacagggtgt gcatggtgt cgtcagctcg tgcgtgaga	1080
tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccctattgtt agttgccatc attaagttg	1140
gcactctaac gagactgccg gtgataaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc	1200
atgccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga tggtaaacg agtcgcgaga	1260
cagtgatgt tagctaactc cttaaaacca ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactc	1320
cctacatgaa gtcggaatcg ctagtaatcg cggatcagca cgcgcggtg aatacgttcc	1380
cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca cgggagttgg gagtaccga agtaggttc	1440
ctaaccgcaa ggagggcgct tcctaaggta agaccgatga ctggggtgaa gtcgtaacaa	1500
ggtagcc	1507