(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) **1-0049848**

(51)[2021.01] **C12N 1/20**; A23L 33/135

(13) **B**

(21) 1-2022-05143
(22) 19/01/2021
(86) PCT/JP2021/001644 19/01/2021
(87) WO 2021/149672 29/07/2021
(30) 2020-007102 20/01/2020 JP
(45) 25/08/2025 449
(43) 26/12/2022 417A
(73) MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. (JP)
33-1, Shiba 5-chome, Minato-ku, Tokyo 1088384, Japan
(72) HARA Sakiko (JP); ODAMAKI Toshitaka (JP).
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) VI KHUẨN BIFIDOBACTERIUM LONGUM SUBSP. INFANTIS, CHẾ PHẨM CHỨA VI KHUẨN NÀY, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM NÀY, VÀ CHẾ PHẨM PREBIOTIC

(21) 1-2022-05143

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn bifidobacterium có khả năng đồng hóa hai hoặc nhiều loại oligosacarit sữa người (human milk oligosaccharide, HMO). Chủng này được chọn từ nhóm gồm có *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068), *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03058) và *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi khuẩn, chế phẩm, phương pháp sản xuất chế phẩm này và chế phẩm prebiotic (thức ăn cho lợi khuẩn).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu về probiotic (lợi khuẩn) với mục đích ức chế sự khởi phát bệnh, tăng cường sức khỏe, hoặc mục đích tương tự bằng cách chủ động sử dụng các vi khuẩn ảnh hưởng tích cực đến các động vật (dưới đây còn được gọi là "các vi khuẩn tốt") và điều hòa môi trường trong ruột và nhiều nghiên cứu trên các thức ăn cho lợi khuẩn như các chế phẩm giúp phát triển các vi khuẩn tốt đã được thực hiện. Trong khi các lợi khuẩn dùng để chỉ các vi khuẩn thực hiện chức năng theo cách có lợi trong ruột, các thức ăn cho lợi khuẩn dùng để chỉ các chất là các nguồn dinh dưỡng chọn lọc cho các lợi khuẩn và thúc đẩy sự sinh trưởng của chúng. Biết được rằng các thức ăn cho lợi khuẩn có các tác dụng có lợi lên sức khỏe của con người như tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng của các vi khuẩn axit lactic và *Bifidobacterium* spp., tác dụng điều hòa đường ruột và tác dụng của phòng ngừa/cải thiện các bệnh viêm ruột.

Các oligosacarit sữa người (dưới đây còn được gọi là "HMO" (human milk oligosaccharide)) được chứa trong sữa mẹ với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 20g/l và được cho là hỗn hợp gồm 130 loại oligosacarit hoặc hơn. Các cấu trúc của chúng là các cấu trúc trong đó fucoza và axit sialic được bổ sung đến 13 loại cấu trúc lõi. Trong sữa người, tỷ lệ của các sacarit trung tính fucosyl hóa là cao, và 2'-fucosyllactoza, lacto-N-fucopentaoza I, lacto-N-difucohexaoza I và lacto-N-tetraoza là điển hình. Chỉ riêng bốn loại oligosacarit này chiếm từ 1/3 đến 1/4 của tất cả các oligosacarit sữa người. Các oligosacarit bao gồm lacto-N-bioza được gọi là loại I, và các oligosacarit bao gồm N-axetyllactosamin (LacNAc) được gọi là loại II. Trong sữa người, các lượng của lacto-N-tetraoza và lacto-N-fucopentaoza I, là loại I, cao hơn các lượng của lacto-N-neotetraoza và lacto-N-fucopentaoza III, là loại II. Sự cùng tồn tại của loại I và loại II và mức độ ưu tiên của loại I là các đặc điểm khác biệt của các oligosacarit sữa người

khác với các oligosacarit có trong sữa của các loài khác (tài liệu sáng chế (patent literature, NPL) 1 và 2).

2'-FL và LNT, là các HMO được chứa trong sữa mẹ, có hoạt tính sinh trưởng các vi khuẩn bifidobacterium. 2'-FL và LNT được biết đến là có tác động như là yếu tố sinh trưởng đối với các vi khuẩn bifidobacterium bằng cách được sử dụng chọn lọc bởi các vi khuẩn bifidobacterium và rất quan trọng đối với sự hình thành hệ vi sinh vật đường ruột trong đó các vi khuẩn bifidobacterium chiếm ưu thế. Các HMO có thể được tổng hợp và có thể được sử dụng trong công nghiệp (PTL 1).

Các vi khuẩn bifidobacterium chuyển hóa một số HMO bằng cách sử dụng con đường GNB/LNB đặc hiệu đối với các vi khuẩn bifidobacterium. Mặc dù nhiều loài thường được tìm thấy trong ruột của con người có con đường này, hầu hết các vi khuẩn bifidobacterium thường được tìm thấy trong ruột của các động vật không phải người và các côn trùng không có con đường này. Các ví dụ điển hình của các loài vi khuẩn mà có thể sinh trưởng bằng cách sử dụng các HMO làm nguồn cacbon duy nhất là bốn loài vi khuẩn gồm *Bifidobacterium longum* subsp. (subspecies _ loài phụ) *longum*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium breve* và *Bifidobacterium bifidum*, là các vi khuẩn bifidobacterium thường được tìm thấy ở trẻ sơ sinh. Cụ thể, đã có báo cáo cho rằng hai loài vi khuẩn của nó, là *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* và *Bifidobacterium bifidum*, sử dụng các HMO khác nhau (NPL 3).

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

PTL 1: WO2014/086373

Tài liệu phi sáng chế (non-patent literature, NPL)

NPL 1: Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria Vol. 22, No. 1, pp15-25 2011

NPL 2: Milk Science Vol. 56, No,4, pp155-176 2008

NPL 3: Milk Science Vol. 61, No,2, pp115-124 2012

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Như đã mô tả ở trên, trong quá trình chuyển hóa các HMO, một số vi khuẩn bifidobacterium không có khả năng hoặc có khả năng thấp trong việc đồng hóa các HMO trong lúc một số vi khuẩn, như *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* và *Bifidobacterium bifidum*, có đặc tính đồng hóa đối với hai hoặc nhiều loại HMO.

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng vi khuẩn bifidobacterium mới có khả năng đồng hóa hai hoặc nhiều loại HMO.

Giải pháp giải quyết vấn đề

Trước tiên, sáng chế đề xuất ít nhất một chủng được chọn từ mục (a) đến (c) dưới đây:

(a) *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068)

(b) *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03058)

(c) *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067).

Chủng được chọn từ các phần từ (a) đến (c) có khả năng đồng hóa 2'-fucosyllactoza và một hoặc cả hai trong số 3'-sialyllactoza và lacto-N-tetraoza.

Tiếp theo, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa ít nhất một chủng được chọn từ các mục (a) đến (c).

Chế phẩm theo sáng chế có thể là chế phẩm probiotic.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho ít nhất một mục đích sử dụng được chọn từ nhóm gồm có sử dụng cho trẻ sơ sinh hoặc trẻ nhỏ, sử dụng cho người trưởng thành và sử dụng cho người già.

Chế phẩm theo sáng chế có thể là ít nhất một loại chế phẩm được chọn từ nhóm gồm có chế phẩm điều hòa đường ruột, chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống và chế phẩm dinh dưỡng.

Chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa 2'-fucosyllactoza và một hoặc cả hai trong số 3'-sialyllactoza và lacto-N-tetraoza.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm prebiotic được sử dụng để thúc đẩy sự sinh trưởng của ít nhất một chủng được chọn từ các mục (a) đến (c) dưới đây và trong đó chế phẩm này chứa 2'-fucosyllactoza và một hoặc cả hai trong số 3'-sialyllactoza và lacto-N-tetraoza:

(a) *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068)

(b) *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03058)

(c) *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067).

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm chứa ít nhất một chủng được chọn từ các mục (a) đến (c) dưới đây:

(a) *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068)

(b) *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03058)

(c) *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067).

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, chủng vi khuẩn bifidobacterium mới có khả năng đồng hóa hai hoặc nhiều loại HMO có thể được cung cấp.

Hiệu quả được mô tả ở đây không bị giới hạn và cũng có thể là hiệu quả bất kỳ trong số các hiệu quả được mô tả trong bản mô tả này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án để thực hiện sáng chế được giải thích dưới đây. Về vấn đề này, các phương án được giải thích dưới đây thể hiện các ví dụ của các phương án điển hình của bản mô tả này, và phạm vi của sáng chế không được hiểu là hẹp hơn do các phương án này. Trong bản mô tả này, trong một phạm vi bằng số được biểu hiện bằng "giới hạn dưới đến giới hạn trên", giới hạn trên có thể là "nhỏ hơn hoặc bằng giá trị này" hoặc "nhỏ hơn giá trị này", và giới hạn dưới có thể là "lớn hơn hoặc bằng giá trị này" hoặc "lớn hơn giá trị này". Hơn nữa, tỷ lệ phần trăm trong bản mô tả này được dựa trên khối lượng trừ khi có quy định khác.

Chủng vi khuẩn bifidobacterium mới

Chủng vi khuẩn bifidobacterium mới theo sáng chế là ít nhất một chủng được chọn từ các mục (a) đến (c) nêu trên và có thể thể hiện khả năng đồng hóa hai hoặc nhiều loại HMO. Cụ thể là, chủng này có khả năng đồng hóa 2'-fucosyllactoza (dưới đây còn được gọi là "2'-FL") và một hoặc cả hai trong số 3'-sialyllactoza (dưới đây còn được gọi là "3'-SL") và lacto-N-tetraoza (dưới đây còn được gọi là "LNT"). Do

đó, chủng vi khuẩn bifidobacterium mới theo sáng chế còn có thể sinh trưởng dễ dàng trong ruột bằng cách sử dụng 2'-FL và một hoặc cả hai trong số 3'-SL và LNT.

Các chủng vi khuẩn bifidobacterium đã được báo cáo là có nhiều chức năng sinh lý khác nhau, và các chức năng này đã được báo cáo là nhờ sự sinh trưởng trong ruột và các chất tạo ra (chẳng hạn, axit axetic). Do đó, chủng vi khuẩn bifidobacterium của sáng chế còn có thể được mong đợi là rất an toàn và thể hiện các hiệu quả nói chung đã biết của chủng vi khuẩn bifidobacterium trong một nhóm tuổi rộng. Do đó, chủng vi khuẩn bifidobacterium của sáng chế có thể được sử dụng cho một khoảng rộng các chế phẩm (cho thực phẩm hoặc đồ uống, cho thực phẩm chức năng, cho sản phẩm dược, cho thức ăn chăn nuôi hoặc loại tương tự). Hơn nữa, chủng vi khuẩn bifidobacterium của sáng chế có thể được mong đợi là có tác dụng lợi khuẩn và do đó có thể còn được sử dụng cho mục đích tăng cường sức khỏe, cải thiện chế độ ăn, cải thiện môi trường trong ruột, phòng ngừa/điều trị bệnh nhiễm trùng đường ruột hoặc mục đích tương tự. Mỗi chủng được giải thích chi tiết dưới đây.

(a) *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068)

Như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả dưới đây, mỗi trong số các khả năng đồng hóa 2'-FL, 3'-fucosyllactoza (dưới đây còn được gọi là "3'-FL"), LNT và lacto-N-neotetraoza (dưới đây còn được gọi là "LNnT") của *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068) lớn hơn hoặc bằng OD0,3, là vượt trội, theo Phương pháp xác định đặc tính đồng hóa đối với nguồn sacarit dưới đây.

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* (NITE BP-03068) là *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* mới và được lưu ký, là chủng vi khuẩn mới do các đặc tính và các đặc điểm vi khuẩn học dưới đây, đối với lưu ký quốc tế vào ngày 20 tháng 11 năm 2019 ở Cơ quan lưu ký vi sinh vật bằng sáng chế (NITE Patent Microorganisms Depositary, NPMD), Viện công nghệ và đánh giá quốc gia (National Institute of Technology and Evaluation, địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản) là chủng *Bifidobacterium infantis* (số đăng ký: NITE BP-03068). Nói chung, chủng vi khuẩn này có thể thu nhận được từ cơ quan lưu giữ này. Ở đây, "*Bifidobacterium infantis*" được phân loại lại là "*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*" và đồng nghĩa.

(b) *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03058)

Như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả dưới đây, mỗi trong số các khả năng đồng hóa 2'-FL, 3'-FL, 3'-SL, 6'-sialyllactoza (dưới đây còn được gọi là "6'-SL"), LNT và LNnT của *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03058) lớn hơn hoặc bằng OD0,3, là vượt trội, theo Phương pháp xác định đặc tính đồng hóa đối với nguồn sacarit dưới đây.

Bifidobacterium bifidum (NITE BP-03058) là *Bifidobacterium bifidum* mới và được lưu ký, là chủng vi khuẩn mới do các đặc tính và các đặc điểm vi khuẩn học dưới đây, đối với lưu ký quốc tế vào ngày 8 tháng 11 năm 2019 ở Cơ quan lưu ký vi sinh vật bằng sáng chế (NITE Patent Microorganisms Depositary, NPMD), Viện công nghệ và đánh giá quốc gia (National Institute of Technology and Evaluation, địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản) là chủng *Bifidobacterium bifidum* (số đăng ký: NITE BP-03058). Nói chung, chủng vi khuẩn này có thể thu nhận được từ cơ quan lưu giữ này.

(c) *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067)

Như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả dưới đây, mỗi trong số các khả năng đồng hóa 2'-FL, 3'-FL, 3'-SL, 6'-SL, LNT và LNnT của *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067) lớn hơn hoặc bằng OD0,3, là vượt trội, theo Phương pháp xác định đặc tính đồng hóa đối với nguồn sacarit dưới đây.

Bifidobacterium bifidum (NITE BP-03067) là *Bifidobacterium bifidum* mới và được lưu ký, là chủng vi khuẩn mới do các đặc tính và các đặc điểm vi khuẩn học dưới đây, đối với lưu ký quốc tế vào ngày 20 tháng 11 năm 2019 ở Cơ quan lưu ký vi sinh vật bằng sáng chế (NITE Patent Microorganisms Depositary, NPMD), Viện công nghệ và đánh giá quốc gia (National Institute of Technology and Evaluation, địa chỉ: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Nhật Bản) là chủng *Bifidobacterium bifidum* (số đăng ký: NITE BP-03067). Nói chung, chủng vi khuẩn này có thể thu nhận được từ cơ quan lưu giữ này.

Theo sáng chế, cũng có thể sử dụng chủng vi khuẩn gần như đồng nhất của các chủng vi khuẩn được giải thích ở trên. Ví dụ của chủng vi khuẩn gần như đồng nhất của các chủng vi khuẩn theo sáng chế là chủng của cùng một giống và là chủng vi khuẩn trong đó trình tự bazơ của gen ARN ribosom 16S có độ đồng nhất tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng 99,9%, tốt hơn nữa là 100% với trình tự bazơ của gen ARN ribosom

16S của các chủng này và tốt hơn là có các đặc tính vi khuẩn học giống như các đặc tính vi khuẩn học của các chủng này.

Theo sáng chế, thể đột biến của các chủng vi khuẩn bifidobacterium cũng có thể sử dụng miễn là thể đột biến này có đặc điểm để đạt được mục đích của sáng chế (chẳng hạn, đặc điểm là có khả năng đồng hóa 2'-FL và một hoặc cả hai trong số 3'-SL và LNT). Thể đột biến này tốt hơn là chủng có các đặc tính vi khuẩn học giống như các đặc tính vi khuẩn học của chủng vi khuẩn bifidobacterium ở trên và có khả năng đồng hóa 2'-FL và một hoặc cả hai trong số 3'-SL và LNT ở mức tương đương hoặc cao hơn khả năng đồng hóa của chủng vi khuẩn bifidobacterium. Việc một thể đột biến có hay không "khả năng đồng hóa 2'-FL và một hoặc cả hai trong số 3'-SL và LNT ở mức tương đương hoặc cao hơn" khả năng đồng hóa của chủng vi khuẩn bifidobacterium ở trên có thể được xác định, chẳng hạn, bằng phương pháp của các ví dụ được mô tả dưới đây.

Thể đột biến như vậy có thể được tạo ra bằng cách đưa sự đột biến không phải nhân tạo vào chủng vi khuẩn bifidobacterium ở trên. Hơn nữa, thể đột biến như vậy có thể được xây dựng bằng cách đưa đột biến vào chủng này nhờ việc xử lý bằng cách sử dụng tác nhân gây đột biến như tia tử ngoại (ultraviolet, UV) hoặc được xây dựng bằng cách đưa đột biến vào chủng ở trên nhờ các phương pháp kỹ thuật di truyền khác nhau.

Các chủng vi khuẩn được định rõ bởi các tên chủng vi khuẩn được lấy ví dụ ở trên không bị giới hạn ở các chủng bản thân được lưu ký hoặc được đăng ký ở các cơ quan nhất định dưới các tên chủng vi khuẩn này (dưới đây còn được gọi là "các chủng vi khuẩn lưu ký" để thuận tiện cho việc giải thích) nhưng bao gồm các chủng của chúng gần như tương đương của chúng (còn được gọi là "các chủng dẫn xuất" hoặc "các chủng cảm ứng") (điều tương tự cũng áp dụng cho các chủng vi khuẩn dưới đây). "Chủng gần như tương đương của chủng vi khuẩn lưu ký ở trên" của chủng vi khuẩn này có nghĩa là chủng thuộc về cùng một loài như loài của chủng vi khuẩn lưu ký và đạt được các đặc điểm của sáng chế ở mức tương đương hoặc cao hơn so với các đặc điểm của chủng vi khuẩn lưu ký. Các ví dụ của các chủng gần như tương đương của các chủng vi khuẩn lưu ký có thể là các chủng có nguồn gốc từ các chủng vi khuẩn lưu ký dưới dạng các chủng mẹ. Các chủng dẫn xuất bao gồm các chủng được gây giống

từ các chủng vi khuẩn lưu ký hoặc các chủng được sinh ra một cách tự nhiên từ các chủng vi khuẩn lưu ký.

Các chủng vi khuẩn gần như giống nhau và các chủng dẫn xuất là các chủng sau đây.

(1) Chủng vi khuẩn được xác định là chủng vi khuẩn giống nhau bằng phương pháp ADN đa hình khuếch đại ngẫu nhiên (the Randomly Amplified Polymorphic DNA) hoặc phương pháp điện di gel trong trường được tạo xung (Pulsed-field gel electrophoresis) (được mô tả trong Probiotics in food/Health and nutritional properties and guidelines for evaluation 85 Page43).

(2) Chủng vi khuẩn có các gen chỉ có nguồn gốc từ chủng vi khuẩn lưu ký mà không có bất kỳ gen ngoại sinh nào và có độ đồng nhất ADN lớn hơn hoặc bằng 95% (thích hợp là lớn hơn hoặc bằng 98%).

(3) Chủng được gây giống từ chủng vi khuẩn (bao gồm cải biến bằng kỹ thuật di truyền, đột biến hoặc đột biến tự phát) và chủng có các đặc tính giống nhau.

Phương pháp xác định đặc tính đồng hóa đối với nguồn sacarit

Chủng vi khuẩn được gieo ở 1% thể tích vào 200µl môi trường lỏng MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) chứa nguồn sacarit và được nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí ở 37°C. Độ đục (OD660) được đo sau 16 giờ nuôi cấy. Sự có mặt hoặc vắng mặt của đặc tính đồng hóa và mức độ của khả năng đồng hóa do đó được xác định. Chủng vi khuẩn được xác định là có "đặc tính đồng hóa vượt trội" khi mức chênh lệch với đối chứng về giá trị OD660 lớn hơn hoặc bằng 0,3, "đặc tính đồng hóa vượt trội hơn" khi mức chênh lệch lớn hơn hoặc bằng 0,4, "đặc tính đồng hóa vượt trội hơn nữa" khi mức chênh lệch lớn hơn hoặc bằng 0,5 hoặc "đặc tính đồng hóa cực kỳ vượt trội" khi mức chênh lệch lớn hơn hoặc bằng 0,6.

Các chủng vi khuẩn theo sáng chế có thể được sinh trưởng, chẳng hạn, bằng cách nuôi cấy các chủng vi khuẩn.

Phương pháp nuôi cấy không bị giới hạn đặc biệt miễn là chủng vi khuẩn bifidobacterium của sáng chế có thể được sinh trưởng, và phương pháp thường được sử dụng để nuôi cấy chủng vi khuẩn bifidobacterium có thể được sử dụng với cải biến thích hợp khi cần. Chẳng hạn, nhiệt độ nuôi cấy có thể nằm trong khoảng từ 30 đến

50°C và tốt hơn là từ 35 đến 45°C. Chủng này tốt hơn là được nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí và có thể được nuôi cấy, chẳng hạn, trong lúc sử dụng khí kỵ khí như khí cacbon dioxit. Ngoài ra, chủng này có thể được nuôi cấy trong điều kiện ưa vi khí như nuôi cấy lỏng tĩnh.

Môi trường nuôi cấy chủng vi khuẩn bifidobacterium của sáng chế để sinh trưởng không bị giới hạn đặc biệt, và môi trường thường được sử dụng để nuôi cấy chủng vi khuẩn bifidobacterium có thể được sử dụng với cải biến thích hợp khi cần. Nghĩa là, dưới dạng nguồn cacbon khác với các HMO, chẳng hạn, các sacarit như galactoza, glucoza, fructoza, manoza, xenlobioza, maltoza, lactoza, sucroza, trehaloza, tinh bột hydrolysat và rỉ mật có thể được sử dụng phụ thuộc vào các đặc tính đồng hóa. Để làm nguồn nitơ, chẳng hạn, amoniac và các muối amoni hoặc các nitrat như amoni sulfat, amoni clorua và amoni nitrat có thể được sử dụng. Hơn nữa, để làm muối vô cơ, chẳng hạn, natri clorua, kali clorua, kali sulfat, magie sulfat, canxi clorua, canxi nitrat, mangan clorua hoặc sắt (II) sulfat có thể được sử dụng. Ngoài ra, các thành phần hữu cơ như pepton, bột đậu nành, bã đậu nành khử chất béo, dịch chiết thịt và dịch chiết nấm men cũng có thể sử dụng. Ngoài ra, dưới dạng môi trường cải biến, chẳng hạn, môi trường MRS có thể được sử dụng.

Các thành phần đồng hóa được ưu tiên của chủng vi khuẩn bifidobacterium của sáng chế là 2'-FL, 3'-SL và LNT. Tốt hơn là, ít nhất 2'-FL được chứa, và tốt hơn nữa là, một hoặc cả hai trong số 3'-SL và LNT cũng được chứa phụ thuộc vào khả năng đồng hóa của mỗi chủng vi khuẩn. Ngoài ra, các HMO như 3'-FL, 6'-SL và LNnT có thể được chứa phụ thuộc vào khả năng đồng hóa của mỗi chủng vi khuẩn.

2'-FL được sử dụng theo sáng chế có tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn bifidobacterium của sáng chế. Hơn nữa, bằng cách phối hợp 2'-FL và một hoặc cả hai trong số 3'-SL và LNT phụ thuộc vào khả năng đồng hóa của mỗi chủng vi khuẩn, tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn bifidobacterium của sáng chế có thể được thể hiện một cách ổn định hơn. Ngoài ra, bằng cách phối hợp các HMO như 3'-FL, 6'-SL và LNnT phụ thuộc vào khả năng đồng hóa của mỗi chủng vi khuẩn, tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn bifidobacterium của sáng chế có thể được thể hiện một cách ổn định hơn nữa.

Các HMO được sử dụng làm các thành phần đồng hóa theo sáng chế có thể là các sản phẩm thương mại, có thể được điều chế từ sữa hoặc có thể thu được bằng phương pháp đã biết như tổng hợp hữu cơ và xử lý enzym. Sữa (chẳng hạn, sữa mẹ, sữa công thức dạng bột, sữa bò hoặc sản phẩm sữa) chứa các HMO cũng có thể sử dụng. Hơn nữa, chế phẩm thu được bằng cách pha trộn các HMO với sữa (chẳng hạn, sữa bò, sữa công thức dạng bột hoặc sữa công thức dạng lỏng) (nghĩa là, sữa chứa các HMO) cũng có thể sử dụng.

Để làm các HMO mà có thể được sử dụng làm các thành phần đồng hóa theo sáng chế, 2'-FL tốt hơn là được chứa, và tốt hơn nữa là, một hoặc cả hai trong số 3'-SL và LNT cũng được chứa phụ thuộc vào khả năng đồng hóa của mỗi chủng vi khuẩn. Ngoài ra, còn tốt hơn là, 3'-FL, 6'-SL và LNnT cũng được chứa phụ thuộc vào khả năng đồng hóa của mỗi chủng vi khuẩn. Ngoài các HMO, các ví dụ chung của các HMO bao gồm 3-difucosyllactoza, 3-fucosyl-3'-sialyllactoza, lacto-N-fucopentaoza I, lacto-N-fucopentaoza II, lacto-N-fucopentaoza III, lacto-N-fucopentaoza V, lacto-N-difucosylhexaoza I, lacto-N-difucosylhexaoza II, lacto-N-sialylpentaoza, LSTa, LSTb và LSTc. Các oligosacarit của các HMO có thể thu được bằng phương pháp sản xuất đã biết. Theo sáng chế, ít nhất một loại oligosacarit sữa người được chọn từ nhóm bao gồm các loại này cũng có thể sử dụng.

Các thức ăn cho lợi khuẩn để thúc đẩy sự sinh trưởng của vi khuẩn *Bifidobacterium* của sáng chế

2'-FL và một hoặc cả hai trong số 3'-SL và LNT ở trên có tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên và có thể được sử dụng làm prebiotic (thức ăn cho lợi khuẩn). Hơn nữa, phụ thuộc vào khả năng đồng hóa của mỗi chủng vi khuẩn, một loại trong số các HMO như 3'-FL, 6'-SL và LNnT một mình hoặc phối hợp của hai hoặc nhiều loại của chúng cũng có thể sử dụng. Ngoài ra, quá trình sản xuất có thể được thực hiện một cách thích hợp bằng cách sử dụng thành phần tùy ý thích hợp để sử dụng bằng phương pháp sản xuất đã biết thích hợp để sử dụng.

Các lượng được sử dụng hoặc các lượng được chứa của các HMO như 2'-FL, 3'-SL, LNT, 3'-FL, 6'-SL và LNnT trong chế phẩm prebiotic của sáng chế, dựa trên 100 phần khối lượng của chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các phần

từ (a) đến (c) nêu trên, mỗi loại tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 1000000 phần khối lượng, tốt hơn nữa là từ 10 đến 10000 phần khối lượng.

Khi thức ăn cho lợi khuẩn được sử dụng, tác dụng lợi khuẩn có lợi lên sức khỏe của con người của chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên, như tác dụng điều hòa đường ruột, tác dụng thúc đẩy sự hấp thu khoáng chất và tác dụng của phòng ngừa/cải thiện bệnh viêm ruột, có thể cũng được mong đợi.

Chế phẩm chứa vi khuẩn *Bifidobacterium* của sáng chế

Chế phẩm của sáng chế có nghĩa bao gồm chế phẩm lợi khuẩn, chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống, dược phẩm và loại tương tự. Hơn nữa, thích hợp là chế phẩm của sáng chế là chế phẩm lợi khuẩn.

Chế phẩm chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên có thể được sử dụng cho người dưới dạng đối tượng sử dụng hoặc động vật không phải là người (thích hợp là động vật có vú). Người hoặc động vật nuôi làm cảnh là được ưu tiên, và người là được ưu tiên hơn. Đối tượng mà sáng chế được áp dụng không bị giới hạn đặc biệt miễn là đối tượng này mong muốn có tác dụng lợi khuẩn, và các ví dụ của nó bao gồm trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ, trẻ em, người trưởng thành, cá nhân khỏe mạnh, người trung niên, người già và người có môi trường đường ruột kém. Cụ thể, sáng chế tốt hơn là được sử dụng trong ít nhất một sử dụng được chọn từ nhóm gồm có sử dụng cho trẻ sơ sinh hoặc trẻ nhỏ, sử dụng cho người trưởng thành và sử dụng cho người già.

Vì các chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên được sử dụng theo sáng chế có nguồn gốc từ người, do đó có các tác dụng phụ ít hơn và có độ an toàn cao, các chủng này có thể được sử dụng liên tục trong khoảng thời gian dài. Hơn nữa, các chủng này có thể được sử dụng cho các sản phẩm với nhiều mục đích sử dụng như dược phẩm và thực phẩm hoặc đồ uống. Chế phẩm của sáng chế cũng có thể sử dụng hiệu quả đối với triệu chứng hoặc bệnh mà có thể được phòng ngừa, cải thiện hoặc điều trị bởi probiotic (các lợi khuẩn).

Theo cách này, các chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên có thể được chứa trong chế phẩm probiotic dưới dạng thành phần hoạt tính, và các chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a)

đến (c) nêu trên cũng có thể sử dụng để sản xuất chế phẩm như vậy, dược phẩm như vậy hoặc loại tương tự. Hơn nữa, các chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên cũng có thể sử dụng làm các vi khuẩn đối với các lợi khuẩn.

Chủng vi khuẩn bifidobacterium của sáng chế có thể được sử dụng trực tiếp. Chủng vi khuẩn bifidobacterium của sáng chế cũng có thể sử dụng sau khi trộn với chất mang, chất làm loãng thông thường hoặc chất tương tự sinh lý dụng hoặc chấp nhận được đối với sản phẩm dược, thực phẩm hoặc đồ uống.

Việc sử dụng chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên tốt hơn là sử dụng trong ít nhất một tuần, tốt hơn nữa là sử dụng liên tục trong ít nhất bốn tuần, còn tốt hơn là sử dụng hằng ngày.

Lượng của chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên được sử dụng không bị giới hạn cụ thể nhờ độ an toàn cao nhưng, chẳng hạn, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1×10^{6} đến 1×10^{12}CFU/kg trọng lượng cơ thể/ngày, tốt hơn nữa là 1×10^{7} đến 1×10^{11}CFU/kg trọng lượng cơ thể/ngày, còn tốt hơn là 1×10^{8} đến 1×10^{10}CFU/kg trọng lượng cơ thể/ngày. Lượng sử dụng (liều lượng) trên mỗi cá thể (trọng lượng cơ thể) tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10^{7} đến 10^{14}CFU/ngày, tốt hơn nữa là từ 10^{8} đến 10^{13}CFU/ngày, còn tốt hơn là từ 10^{9} đến 10^{12}CFU/ngày. Theo sáng chế, CFU có nghĩa là đơn vị tạo khuẩn lạc và cho biết đơn vị tạo khuẩn lạc. Khi vi khuẩn là vi khuẩn chết, CFU có thể được thay thế bằng tế bào.

Lượng của chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên được sử dụng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100ml/kg trọng lượng cơ thể/ngày, tốt hơn nữa là từ 0,1 đến 10ml/kg trọng lượng cơ thể/ngày.

Dược phẩm

Dược phẩm của sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là dược phẩm này chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các phần từ (a) đến (c) nêu trên. Dược phẩm cũng có thể sử dụng làm chế phẩm điều hòa đường ruột hoặc loại tương tự chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các phần từ (a) đến (c) nêu trên.

Để làm dược phẩm của sáng chế, chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các phần từ (a) đến (c) nêu trên có thể được sử dụng trực tiếp hoặc được sử dụng sau khi trộn lẫn chất mang dạng rắn hoặc dạng lỏng sinh lý dụng đối với chế phẩm và tạo thành thuốc.

Dược phẩm của sáng chế chứa, làm thành phần hoạt tính, chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên, mà có thể thu được từ ruột của người dưới dạng thành phần chế phẩm dùng qua đường miệng, và do đó còn có thể được sử dụng cho bệnh nhân mắc nhiều bệnh khác mà không cần lo lắng. Hơn nữa, vì chủng vi khuẩn bifidobacterium cũng tồn tại trong ruột của động vật, sáng chế được mong đợi là không dễ gây ra các tác dụng phụ ngay cả khi sáng chế liên tục được sử dụng trong một khoảng thời gian dài. Ngoài ra, chủng vi khuẩn bifidobacterium có thể được sử dụng cho trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ và trẻ em một cách an toàn. Do đó, sáng chế cũng thích hợp để phòng ngừa, cải thiện và/hoặc điều trị bệnh của trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ hoặc trẻ em hoặc triệu chứng của bệnh.

Sáng chế có thể được sử dụng cho mục đích trị liệu hoặc có thể được sử dụng cho mục đích phi trị liệu.

"Mục đích phi trị liệu" là khái niệm không bao gồm thực hành y tế, nghĩa là điều trị cơ thể người bằng liệu pháp. Các ví dụ của nó bao gồm tăng cường sức khỏe, làm đẹp và loại tương tự.

"Cải thiện" có nghĩa là cải thiện bệnh, triệu chứng hoặc tình trạng; phòng ngừa hoặc làm trì hoãn sự xấu đi của bệnh, triệu chứng hoặc tình trạng; hoặc làm đảo ngược, phòng ngừa hoặc làm trì hoãn tiến triển của bệnh hoặc triệu chứng.

"Phòng ngừa" có nghĩa là phòng ngừa hoặc làm trì hoãn sự khởi phát của bệnh hoặc triệu chứng ở đối tượng sử dụng hoặc làm giảm nguy cơ mắc bệnh hoặc triệu chứng ở đối tượng sử dụng.

Dạng liều lượng của dược phẩm của sáng chế không bị giới hạn đặc biệt, và cụ thể là, các ví dụ bao gồm viên nén, viên tròn, bột, chế phẩm lỏng, hỗn dịch, nhũ tương, hạt, viên nang, xi rô, thuốc đạn, thuốc tiêm, thuốc mỡ, cao dán, thuốc nhỏ mắt, thuốc nhỏ mũi và loại tương tự. Hơn nữa, đối với chế phẩm, chất phụ gia thường được sử dụng làm chất mang đối với chế phẩm, như các tá dược, chất kết dính, chất làm rã,

chất làm trơn, chất làm ổn định, chất tạo hương vị, chất làm loãng, chất hoạt động bề mặt và dung môi dùng để tiêm truyền, có thể được sử dụng.

Đối với chế phẩm, thành phần thường được sử dụng cho chế phẩm, như các tá dược, các chất điều chỉnh độ pH, các chất màu và các thuốc làm giảm nhẹ, có thể được sử dụng cho dược phẩm theo sáng chế. Miễn là các hiệu quả của sáng chế không bị suy giảm, thành phần có tác dụng phòng ngừa, cải thiện và/hoặc điều trị bệnh hoặc triệu chứng là đã biết hoặc sẽ được tìm thấy trong tương lai và có liên quan đến sáng chế cũng có thể sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế.

Ngoài ra, việc bào chế có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết thích hợp phụ thuộc vào dạng liều lượng. Việc bào chế có thể cũng được thực hiện bằng cách pha trộn một cách thích hợp chất mang dùng cho chế phẩm.

Lượng của chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên được chứa trong dược phẩm của sáng chế được xác định một cách thích hợp dựa trên dạng liều lượng, cách sử dụng, tuổi của bệnh nhân, giới tính, loại bệnh, mức độ của bệnh, các điều kiện khác và tương tự nhưng nói chung tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^{12}cfu/g hoặc từ 1×10^6 đến 1×10^{12}cfu/ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1×10^7 đến 1×10^{11}cfu/g hoặc từ 1×10^7 đến 1×10^{11}cfu/ml. Khi chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên là vi khuẩn chết, cfu/g hoặc cfu/ml có thể được thay thế bằng tế bào/g hoặc tế bào/ml.

Thời gian sử dụng dược phẩm của sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và thời gian sử dụng có thể được chọn một cách thích hợp theo phương pháp điều trị triệu chứng hoặc bệnh của đối tượng. Dược phẩm có thể được sử dụng phòng bệnh hoặc được sử dụng cho liệu pháp duy trì. Hơn nữa, dạng sử dụng tốt hơn là được xác định dựa trên dạng chế phẩm, tuổi của bệnh nhân, giới tính, các điều kiện khác, mức độ của triệu chứng của bệnh nhân hoặc thông số tương tự. Về vấn đề này, trong tất cả các trường hợp, dược phẩm của sáng chế có thể được sử dụng một lần một ngày hoặc theo các phần riêng rẽ và có thể được sử dụng một lần trong vài ngày hoặc trong vài tuần.

Chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống

Chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống của sáng chế có thể được sản xuất bằng cách bổ sung chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên vào thực phẩm đã biết hoặc đồ uống đã biết, hoặc chế phẩm thực phẩm hoặc

đồ uống mới có thể được sản xuất bằng cách trộn chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên vào trong các nguyên liệu của thực phẩm hoặc đồ uống.

Chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống của sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên được chứa, và các ví dụ của chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm: các đồ uống như các đồ uống không có cồn, các đồ uống có ga, các đồ uống dinh dưỡng, các nước quả ép và các đồ uống chứa vi khuẩn axit lactic (bao gồm các dung dịch đậm đặc chưa pha loãng của các đồ uống và các loại bột để pha chế chúng); các món tráng miệng đông lạnh như kem, nước quả giải khát và đá bào; bánh kẹo như kẹo, kẹo đường phèn, kẹo cao su, sô cô la, kẹo dạng viên, món ăn nhẹ, bánh quy, thạch, mứt, kem và bánh nướng; các sản phẩm sữa như sữa chế biến, đồ uống chứa sữa, sữa lên men, sữa chua uống và bơ; bánh mì; thực phẩm lỏng như sản phẩm dinh dưỡng đường ruột và cháo, thực phẩm cho trẻ em, sữa công thức dạng lỏng hoặc các đồ uống thể thao; và các thực phẩm chức năng khác. Hơn nữa, thực phẩm hoặc đồ uống có thể là sản phẩm bổ sung và có thể là, chẳng hạn, sản phẩm bổ sung ở dạng viên nén. Trong trường hợp của sản phẩm bổ sung, chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các phần từ (a) đến (c) nêu trên có thể được sử dụng trong lúc số lượng bữa ăn và calo hấp thu mỗi ngày không bị ảnh hưởng bởi các thực phẩm khác.

Trong chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế, thành phần có tác dụng lợi khuẩn hoặc thành phần bổ sung tác dụng lợi khuẩn có thể được sử dụng miễn là các tác dụng của sáng chế không bị suy giảm. Chẳng hạn, chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách phối hợp chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên với thành phần như: các protein như protein nước sữa, protein cazein, protein đậu nành và protein hạt đậu hoặc các hỗn hợp hoặc các sản phẩm phân hủy của chúng; các axit amin như leuxin, valin, isoleuxin và glutamin; các vitamin như vitamin B6 và vitamin C; creatin; axit xitric; và dầu cá.

Chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống được xác định theo sáng chế có thể cũng được cung cấp/bán dưới dạng thực phẩm hoặc đồ uống dán nhãn sử dụng các lợi khuẩn hoặc tương tự (bao gồm cả việc sử dụng cho sức khỏe). Hơn nữa, chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống có thể được cung cấp/bán dán nhãn cho "những người muốn

sử dụng chủng vi khuẩn bifidobacterium", "những người muốn cải thiện môi trường trong ruột", "những người muốn điều chỉnh tình trạng đường ruột", "những người muốn tạo ra môi trường trong ruột tốt" hoặc tương tự như đối tượng tiêu thụ thực phẩm hoặc đồ uống.

Hành vi "dán nhãn" bao gồm tất cả các hành vi để thông báo cho người tiêu dùng về mục đích sử dụng, và tất cả các cách diễn đạt có thể nhắc nhở/khiến cho người ta đoán được mục đích sử dụng này là hành vi "dán nhãn" của sáng chế, bất kể mục đích dán nhãn, các nội dung dán nhãn, các đối tượng được dán nhãn, phương tiện truyền thông và tương tự.

Tốt hơn là, "nhãn" là sự diễn đạt cho phép người tiêu dùng trực tiếp nhận biết mục đích sử dụng. Các ví dụ cụ thể bao gồm hành vi vận chuyển vật phẩm trong đó việc sử dụng được mô tả trên sản phẩm liên quan đến thực phẩm hoặc đồ uống hoặc bao bì của sản phẩm, phân phối vật phẩm như vậy, trưng bày vật phẩm như vậy để chuyển giao hoặc phân phối hoặc nhập khẩu sản phẩm như vậy, hành vi trưng bày hoặc phân phát quảng cáo sản phẩm, bảng giá hoặc tài liệu kinh doanh với mô tả về mục đích sử dụng trên đó hoặc cung cấp thông tin với các nội dung như vậy với việc mô tả về mục đích sử dụng bằng phương pháp điện từ (internet hoặc tương tự) và các hành vi khác.

Tốt hơn là, nội dung của nhãn là được phê duyệt bởi cơ quan quản lý hoặc tổ chức tương tự (chẳng hạn, nhãn được phê duyệt dựa trên hệ thống do cơ quan quản lý cung cấp và được cung cấp ở dạng dựa trên sự phê duyệt này hoặc tương tự). Được ưu tiên là nhãn có nội dung như vậy trên bao bì, đồ chứa, catalô, tập quảng cáo, tài liệu quảng cáo ở địa điểm bán hàng như điểm mua hàng (point of purchase, POP), các tài liệu khác hoặc loại tương tự.

"Nhãn" còn bao gồm nhãn dùng cho thực phẩm có lợi cho sức khỏe, thực phẩm chức năng, sản phẩm dinh dưỡng đường ruột, thực phẩm dùng cho chế độ ăn uống đặc biệt, thực phẩm với các công bố khuyến cáo về sức khỏe, thực phẩm dành cho mục đích sử dụng đối với sức khỏe đặc biệt, thực phẩm với các công bố khuyến cáo về chức năng dinh dưỡng, thực phẩm với các công bố khuyến cáo về chức năng, dược mỹ phẩm và loại tương tự. Cụ thể, nhãn là nhãn được phê duyệt bởi Cục bảo vệ người tiêu dùng, như các nhãn được phê duyệt bởi các hệ thống dành cho các thực phẩm dành

cho mục đích sử dụng cho sức khỏe đặc biệt, thực phẩm với các công bố khuyến cáo về chức năng dinh dưỡng hoặc thực phẩm với các công bố khuyến cáo về chức năng hoặc bằng hệ thống tương tự. Các ví dụ cụ thể bao gồm nhãn dùng cho thực phẩm dành cho mục đích sử dụng cho sức khỏe đặc biệt, nhãn dùng cho thực phẩm đủ tiêu chuẩn dành cho mục đích sử dụng cho sức khỏe đặc biệt, nhãn cho biết sự ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của cơ thể, nhãn dùng để giảm nguy cơ mắc bệnh hoặc nhãn có chức năng dựa trên căn cứ khoa học. Cụ thể hơn nữa là, các ví dụ điển hình bao gồm nhãn dùng cho thực phẩm dành cho mục đích sử dụng cho sức khỏe đặc biệt (đặc biệt là nhãn dành cho mục đích sử dụng cho sức khỏe) được cung cấp bởi Văn phòng nội các pháp lệnh về giấy ghép dán nhãn cho các mục đích sử dụng chế độ ăn uống đặc biệt theo đạo luật nâng cao sức khỏe (Sắc lệnh của văn phòng nội các số 57 ngày 31 tháng 8 năm 2009) (Cabinet Office Ordinance on Labeling Permission for Special Dietary Uses under the Health Promotion Act (Cabinet Office Ordinance No. 57 on August 31, 2029) và các nhãn tương tự.

Lượng của chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các phần từ (a) đến (c) nêu trên được chứa trong chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống của sáng chế được xác định một cách thích hợp dựa trên dạng của chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống nhưng nói chung tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1×10^{6} đến 1×10^{12}cfu/g hoặc từ 1×10^{6} đến 1×10^{12}cfu/ml trong thực phẩm hoặc đồ uống, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1×10^{7} đến 1×10^{11}cfu/g hoặc từ 1×10^{7} đến 1×10^{11}cfu/ml.

Chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế có thể được sử dụng làm chế phẩm dinh dưỡng. Theo sáng chế, "chế phẩm dinh dưỡng" dùng để chỉ thực phẩm hoặc đồ uống được sử dụng qua đường miệng. Loại chế phẩm dinh dưỡng có thể được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, nhưng tốt hơn là sữa công thức, thực phẩm dạng lỏng hoặc loại tương tự, tốt hơn nữa là sữa công thức. Đối tượng sử dụng có thể là trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ, trẻ em hoặc người trưởng thành nhưng tốt hơn là trẻ sơ sinh hoặc trẻ nhỏ.

Các sữa công thức bao gồm sữa công thức dạng bột và sữa công thức dạng lỏng.

Sữa công thức dạng bột được định nghĩa bởi Pháp lệnh của bộ trưởng về tiêu chuẩn chế phẩm, ví dụ đối với sữa và các sản phẩm sữa là "các sản phẩm thu được bởi quá trình chế biến sữa thô, sữa bò, sữa đã được chứng nhận hoặc thực phẩm được sản

xuất từ đó dưới dạng nguyên liệu thô hoặc bằng cách sử dụng nguyên liệu như vậy làm nguyên liệu thô chính, bổ sung các chất dinh dưỡng cần thiết cho trẻ sơ sinh và trẻ em và chế biến thành dạng bột".

Sữa công thức dạng lỏng được định nghĩa bởi Pháp lệnh của bộ trưởng là "các sản phẩm thu được bởi quá trình chế biến sữa thô, sữa bò, sữa đã được chứng nhận hoặc thực phẩm được sản xuất từ đó dưới dạng nguyên liệu thô hoặc bằng cách sử dụng nguyên liệu như vậy làm nguyên liệu thô chính, bổ sung các chất dinh dưỡng cần thiết cho trẻ sơ sinh và trẻ em và chế biến thành dạng lỏng".

Các sữa công thức còn bao gồm sữa chứa thành phần dinh dưỡng như các protein, dầu và chất béo, cacbohydrat, chất khoáng và vitamin và được chế biến thành dạng bột hoặc dạng lỏng.

Sữa công thức còn bao gồm "sữa công thức dạng bột dành cho trẻ sơ sinh", "sữa công thức dạng lỏng dành cho trẻ sơ sinh" và "sữa công thức dạng bột dành cho phụ nữ mang thai, chuẩn bị sinh và các bà mẹ đang cho con bú" gồm thực phẩm cho mục đích sử dụng trong chế độ ăn uống đặc biệt được cung cấp bởi Đạo luật nâng cao sức khỏe và còn bao gồm các dạng của sữa công thức dạng bột dành cho trẻ sơ sinh dành cho trẻ sơ sinh và trẻ em đối với trẻ sơ sinh từ 0 đến 12 tháng tuổi, sữa cho giai đoạn tiếp theo dành cho trẻ sơ sinh và trẻ em nhỏ hơn từ 6 đến 9 tháng tuổi hoặc lớn hơn (cho tới 3 năm tuổi), sữa công thức dạng bột dành cho trẻ sơ sinh đối với trẻ sơ sinh có cân nặng khi sinh thấp đối với trẻ mới sinh với trọng lượng cơ thể khi vừa sinh ra nhỏ hơn 2500g (trẻ sơ sinh sinh có cân nặng khi sinh thấp), sữa công thức để điều trị trẻ sơ sinh và trẻ em bị ốm như dị ứng sữa và không dung nạp lactoza, sữa công thức dạng bột dành cho trẻ sơ sinh dùng cho trẻ em, bột dinh dưỡng dành cho người trưởng thành, bột dinh dưỡng dành cho người già và loại tương tự.

Chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống (bao gồm chế phẩm dinh dưỡng) theo sáng chế có thể cũng được sử dụng cho thực phẩm với các công bố khuyến cáo về sức khỏe hoặc thực phẩm dành cho người bệnh. Hệ thống thực phẩm với các công bố khuyến cáo về sức khỏe đã được thiết lập không chỉ đối với các thực phẩm nói chung mà còn đối với các thực phẩm ở dạng viên nén, viên nang, và loại tương tự, dựa trên các xu hướng trong và ngoài Nhật Bản và cũng xem xét tính nhất quán với hệ thống hiện có đối với các thực phẩm cho các mục đích sức khỏe cụ thể. Hệ thống này bao gồm hai

loại, đó là các thực phẩm dành cho các mục đích sức khỏe cụ thể (hệ thống phê duyệt cá nhân) và các thực phẩm với các công bố chức năng dinh dưỡng (hệ thống quy định tiêu chuẩn).

Phương pháp sản xuất chế phẩm

Phương pháp sản xuất chế phẩm của sáng chế được giải thích dưới đây. Trong phương pháp sản xuất chế phẩm của sáng chế, bước bổ sung chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) ở trên có thể được thực hiện ở giai đoạn bất kỳ trong các bước sản xuất chế phẩm.

Ví dụ của phương pháp sản xuất chế phẩm là phương pháp sản xuất chế phẩm bao gồm bước A và bước B dưới đây.

Bước A: bước nuôi cấy chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên trong môi trường và do đó thu được giống nuôi cấy hoặc sản phẩm chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên.

Bước B: bước là làm khô giống nuôi cấy hoặc sản phẩm và do đó thu được các bột vi khuẩn hoặc sản phẩm sấy khô.

Dạng của chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên hoặc giống nuôi cấy chứa chủng này không bị giới hạn đặc biệt và có thể là dạng rắn hoặc lỏng, nhưng thích hợp khi dạng này là dạng sấy khô (chẳng hạn, các bột vi khuẩn hoặc giống nuôi cấy sấy khô) dựa vào việc dễ dàng xử lý trong quá trình sản xuất và trong quá trình bảo quản. Hơn nữa, giống nuôi cấy có thể là, như đã mô tả ở trên, các tế bào vi khuẩn từ đó dung dịch nuôi cấy đã được tách riêng, giống nuôi cấy chứa các tế bào vi khuẩn, giống nuôi cấy từ đó các tế bào vi khuẩn đã được loại bỏ hoặc tương tự.

Phương pháp làm khô không bị giới hạn đặc biệt, hoặc, miễn là các tác dụng của sáng chế không bị suy giảm nhưng có thể là phương pháp sấy phun, phương pháp hấp khử khuẩn, phương pháp làm đông khô, phương pháp tiệt khuẩn Pasteur ở nhiệt độ siêu cao (ultra high temperature, UHT), phương pháp khử khuẩn gia áp, phương pháp khử khuẩn bằng hơi cao áp, phương pháp khử khuẩn nhiệt khô, phương pháp khử khuẩn bằng dòng hơi, phương pháp khử khuẩn bằng sóng điện từ, phương pháp khử

khuẩn bằng chùm điện tử, phương pháp khử khuẩn cao tần, phương pháp khử khuẩn bằng bức xạ, phương pháp khử khuẩn bằng tia cực tím, phương pháp khử khuẩn bằng khí etylen oxit, phương pháp khử khuẩn plasma bằng khí hydro peroxit, phương pháp khử khuẩn hóa học (phương pháp khử khuẩn bằng rượu, phương pháp cố định formalin hoặc phương pháp xử lý nước điện phân) hoặc phương pháp tương tự. Theo sáng chế, quá trình làm đông khô hoặc sấy phun là thích hợp.

Các tế bào vi khuẩn có thể được đồng nhất hóa, và thể đồng nhất có thể là các tế bào vi khuẩn thu được bằng cách đồng nhất hóa vi khuẩn sống, các tế bào vi khuẩn thu được bằng cách đồng nhất hóa các vi khuẩn chết hoặc các tế bào vi khuẩn được gia nhiệt, làm đông khô hoặc tương tự sau khi đồng nhất hóa.

Trong số chúng, thích hợp là giống nuôi cấy được làm đông khô để tăng khả năng sống sót, và thích hợp là giống nuôi cấy được sấy phun để tăng hiệu quả sản xuất.

Ví dụ của phương pháp sản xuất chế phẩm là phương pháp sản xuất chế phẩm bao gồm ít nhất bước C hoặc bước D.

Bước C: bước trộn chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên và prebiotic

Bước D: bước trộn chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên và thành phần sữa

Để làm chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên ở đây, chế phẩm chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên có thể được sử dụng. Hơn nữa, chế phẩm có thể còn chứa lợi khuẩn probiotic như các chủng vi khuẩn bifidobacterium khác và các vi khuẩn axit lactic.

Khi prebiotic (thức ăn cho lợi khuẩn) được trộn, bước này có thể là bước bất kỳ trong số các bước sản xuất.

Thích hợp là thành phần sữa ở dạng bột và thích hợp hơn nữa là được trộn với các bột vi khuẩn của chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên.

Thành phần sữa không bị giới hạn cụ thể miễn là các tác dụng của sáng chế không bị suy giảm, nhưng các ví dụ của nó bao gồm sữa bò, sữa trâu, sữa cừu, sữa dê,

sữa ngựa, sữa tách béo, sữa cô đặc tách béo, sữa bột tách béo, sữa cô đặc, bột sữa toàn phần, kem, bơ, kem sữa, sữa đặc, protein sữa và loại tương tự. Một, hai hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm các loại này có thể được sử dụng. Protein sữa không bị giới hạn đặc biệt, nhưng các ví dụ của nó bao gồm nước sữa, cazein, các sản phẩm thủy phân của chúng và loại tương tự. Một, hai hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm các loại này có thể được sử dụng. Trong số các thành phần sữa, thành phần có nguồn gốc sữa bò là thích hợp.

Về các sản phẩm thủy phân, sản phẩm thủy phân nước sữa, sản phẩm thủy phân cazein hoặc loại tương tự có thể được sản xuất bằng cách thủy phân thành phần sữa (thích hợp là protein sữa). Các ví dụ của quá trình thủy phân bao gồm quá trình thủy phân axit/kiềm, quá trình thủy phân enzym và quá trình tương tự. Trong số chúng, quá trình thủy phân enzym là thích hợp, và enzym phân giải protein là thích hợp làm enzym. Các ví dụ của enzym phân giải protein bao gồm proteaza, trypsin, chymotrypsin, plasmin, pepsin, papain, peptidaza, aminopeptidaza và loại tương tự. Độ pH trong phản ứng thủy phân được điều chỉnh một cách thích hợp đến độ pH tối ưu của enzym được sử dụng, và phản ứng thủy phân có thể được thực hiện, chẳng hạn, ở độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 6 hoặc tương tự. Nhiệt độ trong quá trình phản ứng thủy phân không bị giới hạn đặc biệt nhưng nói chung thích hợp là nằm trong khoảng từ 30 đến 60°C, và thời gian phản ứng tốt hơn là từ 2 đến 10 giờ.

Khi sản phẩm bổ sung hoặc các viên nén được sản xuất làm chế phẩm của sáng chế, bước trộn giống nuôi cấy chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên và tá dược hoặc chất tương tự và do đó thu được hỗn hợp và bước tạo hình thành hình dạng nhất định có thể được bao gồm. Bước tạo hình này, chẳng hạn, là bước tạo viên nén hoặc bước tương tự, và ví dụ của bước tạo viên nén là thu được viên nén bằng cách tạo hình bằng cách nén hỗn hợp bột hoặc hạt hoặc loại tương tự.

Ngoài ra, ví dụ của phương pháp sản xuất chế phẩm của sáng chế là phương pháp sản xuất thực phẩm hoặc đồ uống lên men (thích hợp là sữa lên men) chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên.

Bước bổ sung các bột vi khuẩn thu được bằng phương pháp sản xuất đã mô tả ở trên vào nguyên liệu thô sữa lên men và thu được sữa lên men chứa chủng vi khuẩn

bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên bằng cách sử dụng chủng vi khuẩn bifidobacterium được thực hiện. Theo cách khác, bước trộn các bột vi khuẩn và sữa lên men và do đó thu được sữa lên men chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên được thực hiện. Về số lượng tế bào vi khuẩn của chủng của sáng chế trong chế phẩm, các điều kiện lên men và lượng pha trộn được điều chỉnh để đạt được số lượng tế bào vi khuẩn nhất định. Do đó, thực phẩm hoặc đồ uống lên men (thích hợp là sữa lên men hoặc sản phẩm lên men) chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium được thể hiện trong các mục (a) đến (c) nêu trên có thể được cung cấp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được giải thích chi tiết hơn dưới đây dựa trên các ví dụ. Trong phần này, các ví dụ được giải thích dưới đây thể hiện các ví dụ là các ví dụ điển hình của sáng chế, và phạm vi của sáng chế không được hiểu là hẹp hơn do các ví dụ này.

Các dung dịch vi khuẩn của bốn chủng vi khuẩn bifidobacterium thuộc sở hữu của công ty sữa Morinaga Milk Industry Co., Ltd. (dưới đây được gọi là "các chủng vi khuẩn ứng viên") được gieo ở 1% thể tích vào 200µl môi trường sau 16 giờ loại khí và được nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí ở 37°C. Để làm môi trường, môi trường lỏng MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) (chế phẩm: bảng 2) trong đó nguồn sacarit được thay đổi thành sáu loại oligosacarit sữa mẹ (sản xuất bởi Jennewein Biotechnologie GmbH) được thể hiện trong bảng 1 được cung cấp. Các độ đục (OD660) sau 16 giờ nuôi cấy được đo, và sự có mặt hoặc vắng mặt của đặc tính đồng hóa và mức độ của khả năng đồng hóa được xác định. Các chủng vi khuẩn được xác định có "đặc tính đồng hóa vượt trội" với OD660 lớn hơn hoặc bằng 0,3, "đặc tính đồng hóa vượt trội hơn" với OD660 lớn hơn hoặc bằng 0,5 hoặc "đặc tính đồng hóa cực kỳ vượt trội" với OD660 lớn hơn hoặc bằng 0,8.

Để làm đối chứng, *Bifidobacterium breve* (JCM 1192) và *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (ATCC 15697) được sử dụng. Các giá trị trung bình của các giá trị độ đục (OD660) đo được sau 16 giờ nuôi cấy được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Độ đục (OD660) sau 16 giờ nuôi cấy

	2'-FL	3'-FL	3'-SL	6'-SL	LNT	LNnT
Bifidobacterium breve JCM 1192	0,272	-	-	-	-	-
Bifidobacterium longum subsp. *infantis* ATCC 15697	0,4955	0,6935	0,1545	0,1675	0,9795	0,9895
Bifidobacterium longum subsp. *infantis* NITE BP-03068 (chủng vi khuẩn ứng viên 1)	0,5625	0,6445	0,158	0,1755	1,0610	0,9625
Bifidobacterium bifidum NITE BP-03058 (chủng vi khuẩn ứng viên 2)	0,704	0,5625	0,571	0,63	1,1515	1,085
Bifidobacterium bifidum NITE BP-03067 (chủng vi khuẩn ứng viên 3)	0,671	0,393	0,469	0,4605	1,0825	1,041

49848

Bảng 2. Chế phẩm MRS

BBL Polypepton (sản xuất bởi BD Bioscience)	10g
Dịch chiết thịt bò Bacto (Desicated, sản xuất bởi BD Bioscience)	10g
Dịch chiết nấm men Bacto (sản xuất bởi BD Bioscience)	5g
Polyoxyetylen sorbitan monooleat (sản xuất bởi Nacalai)	1g
Dikali hydrophosphat (sản xuất bởi Kokusan Chemical Co., Ltd.)	2g
Natri axetat (sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	5g
Diamoni hydro xitrat (sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	2g
Magie sulfat heptahydrat (sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	0,2g
Mangan(II) sulfat pentahydrat (sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	0,05g
Nước cất	800ml
SW (được bổ sung sau)	200ml
Tổng	1000ml
Độ pH	6,5

Từ các kết quả ở trên, đã nhận thấy rằng cả bốn chủng vi khuẩn ứng viên đều có đặc tính đồng hóa 2'-FL cao hơn các đối chứng và rằng một số chủng vi khuẩn cũng đồng hóa các oligosacarit sữa người khác.

Các ví dụ sản xuất

Các ví dụ sản xuất chế phẩm, dược phẩm, sữa lên men, sữa công thức dạng bột và chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống của sáng chế được thể hiện dưới đây, nhưng chế phẩm của sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ sản xuất 1

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* (NITE BP-03068) được bổ sung vào 3ml môi trường lỏng MRS và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong 16 giờ, và sau đó dung dịch nuôi cấy được cô đặc và được làm đông khô để thu được bột đông khô của vi khuẩn (bột vi khuẩn). Bột vi khuẩn, thể cô đặc protein nước sữa (whey protein concentrate, WPC) và các thức ăn cho lợi khuẩn (2'-FL và LNT) được trộn một cách đồng đều, và do đó thu được chế phẩm. Chế phẩm với lượng 20g được hòa tan trong 200g nước, và do đó thu được chế phẩm chứa *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068).

Ví dụ sản xuất 2

Bifidobacterium bifidum (NITE BP-03058) được bổ sung vào 3ml môi trường lỏng MRS và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong 16 giờ, và sau đó dung dịch nuôi cấy được cô đặc và được làm đông khô để thu được bột đông khô của vi khuẩn (bột vi khuẩn). Bột vi khuẩn, bột khô của thể cô đặc protein sữa (MPC480, sản xuất bởi Fonterra Co-operative Group, hàm lượng protein bằng 80% khối lượng, protein cazein:protein nước sữa = khoảng 8:2) và các thức ăn cho lợi khuẩn (2'-FL, 3'-SL và LNT) được trộn một cách đồng đều, và do đó thu được chế phẩm. Chế phẩm với lượng 20g được hòa tan trong 200g nước, và do đó thu được chế phẩm chứa *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03058).

Ví dụ sản xuất 3

Bifidobacterium bifidum (NITE BP-03067) được bổ sung vào 3ml môi trường lỏng MRS và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong 16 giờ, và sau đó dung dịch nuôi cấy được cô đặc và được làm đông khô để thu được bột đông khô của vi khuẩn (bột vi khuẩn) chứa *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067). Tiếp theo, các thức ăn cho lợi khuẩn (2'-FL, 3'-SL và LNT) và xenluloza tinh thể được đưa vào trong máy tạo hạt khuấy trộn và được trộn. Sau đó, nước tinh chế được bổ sung để tạo hạt, và hạt được làm khô để thu được các hạt (dược phẩm) chứa thành phần lên men của vi khuẩn và các thức ăn cho lợi khuẩn và chứa tá dược. Theo cách này, có thể thu được các hạt chứa *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067).

Ví dụ sản xuất 4

Phương pháp sản xuất sữa lên men chứa *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067) được thể hiện dưới đây.

Trước tiên, nguyên liệu sữa thô, nước theo nhu cầu, các thành phần khác và loại tương tự được trộn, tốt hơn là được đồng nhất hóa và được khử trùng bằng nhiệt. Quá trình đồng nhất hóa và khử trùng bằng nhiệt có thể được thực hiện bằng các phương pháp thông thường. Men vi khuẩn axit lactic được bổ sung (được gieo) vào dung dịch sữa điều chế đã được khử trùng bằng nhiệt, và dung dịch này được giữ ở nhiệt độ lên men nhất định và được lên men để thu được sản phẩm lên men. Nhờ quá trình lên men, sữa đông được hình thành.

Để làm men vi khuẩn axit lactic, chẳng hạn, các vi khuẩn axit lactic 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 giá trị đích, sữa đông tạo ra được đánh tan bằng cách khuấy trộn và làm lạnh đến nhiệt độ thấp hơn hoặc bằng 10°C, và do đó thu được sản phẩm lên men. Bằng cách làm lạnh đến nhiệt độ thấp hơn hoặc bằng 10°C, hoạt tính của vi khuẩn axit lactic có thể giảm xuống, và sự hình thành axit có thể được ức chế.

Tiếp theo, sản phẩm lên men thu được bằng bước lên men được xử lý nhiệt và do đó thu được sản phẩm lên men sau khi gia nhiệt (sản phẩm lên men sau khi xử lý nhiệt). Bằng cách gia nhiệt một cách thích hợp sản phẩm lên men, sự hình thành axit bởi vi khuẩn axit lactic trong sản phẩm lên men sau khi gia nhiệt có thể được ức chế. Do đó, sự giảm độ pH trong bước sản xuất tiếp theo và/hoặc trong quá trình bảo quản sữa lên men cô đặc chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium có thể được ức chế, và do đó, khả năng sống sót của chủng vi khuẩn bifidobacterium có thể được cải thiện.

Tiếp theo, *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067) và các thức ăn cho lợi khuẩn (2'-FL, 3'-SL và LNT) được bổ sung vào sản phẩm lên men sau khi gia nhiệt thu được bằng bước xử lý nhiệt. Lượng của *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067) được bổ sung, so với sản phẩm lên men sau khi gia nhiệt, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1×10^{7} đến 1×10^{11}Cfu/ml, tốt hơn nữa là từ 1×10^{8} đến 1×10^{10}Cfu/ml. Khi *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067) là vi khuẩn chết, cfu/ml có thể được thay thế bằng tế bào/ml.

Sau khi bổ sung *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067) và các thức ăn cho lợi khuẩn vào sản phẩm lên men sau khi gia nhiệt, hỗn hợp được cô đặc. Bước cô đặc có thể được thực hiện một cách thích hợp bằng cách sử dụng phương pháp cô đặc đã biết. Chẳng hạn, phương pháp ly tâm hoặc phương pháp tách màng có thể được sử dụng.

Nhờ phương pháp ly tâm, nước sữa trong sản phẩm cần được cô đặc (sản phẩm lên men sau khi gia nhiệt chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium và các thức ăn cho lợi khuẩn) được loại bỏ, và thu được sữa lên men cô đặc có nồng độ hàm lượng chất rắn tăng và chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium và các thức ăn cho lợi khuẩn.

Sữa lên men chứa *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03067) thu được như đã mô tả ở trên có thể được sản xuất.

Ví dụ sản xuất 5

Phương pháp sản xuất sữa công thức dạng bột chứa *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068) được thể hiện dưới đây.

Trong 300kg nước ấm, 10kg bột protein nước sữa của sữa bò đã loại muối (sản xuất bởi MILEI GmbH), 6kg bột cazein sữa bò (sản xuất bởi Fonterra Co-operative Group), 48kg lactoza (sản xuất bởi MILEI GmbH), 920g hỗn hợp khoáng chất (sản xuất bởi Tomita Pharmaceutical Co., Ltd), 32g hỗn hợp vitamin (sản xuất bởi Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 500g lactuloza (sản xuất bởi Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), 500g rafinoza (sản xuất bởi Nippon Beet Sugar Manufacturing Co., Ltd.) và 900g xi rô galactooligosacarit (sản xuất bởi Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.) được hòa tan và được gia nhiệt thêm nữa và được hòa tan ở 90°C trong 10 phút, và sau khi bổ sung 28kg chất béo cải biến (sản xuất bởi Taiyo Yushi Corp.), hỗn hợp này được đồng nhất hóa. Sau đó, sau các bước khử trùng và cô đặc, hỗn hợp được sấy phun, và do đó điều chế được khoảng 95kg sữa công thức dạng bột. Sữa công thức dạng bột này được bổ sung 100g bột vi khuẩn của *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068) ($1,8\times10^{11}$cfu/g, sản xuất bởi Morinaga Milk Industry Co., Ltd.) đã được nghiền trong tinh bột, và do đó điều chế được khoảng 95kg sữa công thức dạng bột chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium và các oligosacarit. Khi sữa công thức dạng bột thu được được hòa tan trong nước và khi dung dịch sữa công thức này có tổng nồng độ hàm lượng chất rắn dưới dạng nồng độ sữa công thức tiêu chuẩn bằng 14% (trọng

lượng/thể tích) thu được, $2,7\times10^9$cfu/100ml có thể thu được dưới dạng số đếm vi khuẩn của chủng vi khuẩn bifidobacterium trong dung dịch sữa công thức.

Bằng cách sử dụng sữa công thức dạng bột chứa *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068) thu được như đã mô tả ở trên, môi trường đường ruột của người có thể được cải thiện.

Ví dụ sản xuất 6

Phương pháp sản xuất thực phẩm để cải thiện môi trường trong ruột chứa *Bifidobacterium bifidum* (NITE BP-03058) được thể hiện dưới đây.

Bifidobacterium bifidum (NITE BP-03058) được bổ sung vào 3ml môi trường lỏng MRS và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong 16 giờ, và sau đó dung dịch nuôi cấy được cô đặc và được làm đông khô để thu được bột đông khô của vi khuẩn (bột vi khuẩn) và thu được chế phẩm của sáng chế. Các bột vi khuẩn của sáng chế có thể được bổ sung vào thực phẩm giàu xenluloza (rau, salat hoặc loại loại tương tự) và được nấu, và do đó có thể cũng thu được chế phẩm của sáng chế.

Theo cách khác, các bột vi khuẩn được sử dụng vào bữa ăn, trước bữa ăn, trong bữa ăn hoặc sau bữa ăn. Vì chất xơ thô được sử dụng tự động bằng chế độ ăn uống thông thường (chế độ ăn uống với thực phẩm chính, món ăn phụ và món ăn chính), tác dụng cải thiện môi trường trong ruột của người trưởng thành có thể được mong đợi khi sản phẩm bột vi khuẩn khô của sáng chế cùng được sử dụng trong bữa ăn.

Khi thực phẩm để cải thiện môi trường đường ruột của sáng chế liên tục được sử dụng bởi người cảm thấy có vấn đề về đường ruột, như táo bón và tiêu chảy, có thể mong đợi tác dụng cải thiện môi trường đường ruột cao hơn.

Từ các điểm ở trên, chủng vi khuẩn bifidobacterium của sáng chế, có khả năng đồng hóa 2'-FL và 3'-SL hoặc LNT, chế phẩm chứa chủng vi khuẩn bifidobacterium và chế phẩm để thúc đẩy sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn bifidobacterium có thể giúp sinh trưởng chủng vi khuẩn bifidobacterium trong ruột và có thể được sử dụng hiệu quả để hình thành hệ vi sinh vật đường ruột vượt trội, cải thiện môi trường đường ruột hoặc tương tự.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi khuẩn là *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068).

2. Vi khuẩn theo điểm 1, trong đó vi khuẩn này có khả năng đồng hóa:

2'-fucosyllactoza,

3'-fucosyllactoza,

lacto-N-tetraoza, và

lacto-N-neotetraoza.

3. Chế phẩm chứa vi khuẩn theo điểm 1 hoặc 2.

4. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chế phẩm này là chế phẩm probiotic.

5. Chế phẩm theo điểm 3 hoặc 4, trong đó chế phẩm này là ít nhất một loại chế phẩm được chọn từ nhóm bao gồm chế phẩm điều hòa đường ruột, chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống và chế phẩm dinh dưỡng.

6. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 5, trong đó chế phẩm này còn chứa:

2'-fucosyllactoza

3'-fucosyllactoza,

lacto-N-tetraoza, và

lacto-N-neotetraoza.

7. Chế phẩm prebiotic dùng để thúc đẩy sự phát triển của vi khuẩn là *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068),

trong đó chế phẩm prebiotic này chứa:

2'-fucosyllactoza

3'-fucosyllactoza,

lacto-N-tetraoza, và

lacto-N-neotetraoza.

8. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa vi khuẩn là *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068), phương pháp này bao gồm các bước A và B:

bước A: nuôi cấy *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068) trong môi trường và thu lấy dịch nuôi cấy hoặc sản phẩm chứa *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068),

bước B: sấy khô dịch nuôi cấy hoặc sản phẩm nêu ở trên để thu bột vi khuẩn hoặc sản phẩm được sấy khô.

9. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa vi khuẩn là *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068), phương pháp này bao gồm bước C hoặc bước D:

bước C: trộn *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068) và prebiotic,

bước D: trộn *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (NITE BP-03068) và thành phần sữa.