



(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) 
1-0019858

(51)⁷ **A61K 35/741**

(13) **B**

(21) 1-2016-03484

(22) 19.09.2016

(45) 25.09.2018 366

(43) 25.11.2016 344

(76) **ĐINH THÚY HÀNG (VN)**

Nhà số 11, ngách 22, ngõ 4, phường Phương Mai, quận Đống Đa, thành phố Hà Nội

(54) **CHỦNG VI KHUẨN BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SUBSP. LACTIS BFH THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC ĐỂ SỬ DỤNG LÀM PROBIOTIC**

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BfH thuần khiết về mặt sinh học để sử dụng làm probiotic phân lập được từ phân trẻ sơ sinh dưới 1 tháng tuổi ở Việt Nam. Chủng *B. animalis subsp. lactis* BfH này là vi khuẩn bản địa, phân lập từ đường ruột trẻ sơ sinh khỏe mạnh ở Việt Nam, là nguồn lợi khuẩn tiềm năng cho sản xuất dược phẩm và thực phẩm chức năng cho cộng đồng người Việt Nam. Chủng *B. animalis subsp. lactis* BfH này đã được nghiên cứu chi tiết về các đặc tính sinh lý, các đặc tính probiotic cũng như được xác định về vị trí phân loại, khẳng định tính an toàn và hiệu quả của chủng trong việc sử dụng làm probiotic.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BfH thuần khiết về mặt sinh học để sử dụng làm probiotic cho người và động vật. Chủng vi khuẩn này được phân lập từ phân trẻ sơ sinh dưới 1 tháng tuổi ở Việt Nam.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Probiotic là các vi sinh vật sống được đưa vào cơ thể vật chủ với số lượng phù hợp để có thể tồn tại trong hệ đường ruột; các vi sinh vật này phải có tác dụng tích cực đối với vật chủ (Gismondo *et al.*, 1999). Một vi sinh vật probiotic cần có các đặc tính phù hợp như an toàn tuyệt đối với vật chủ; sống sót được trong đường ruột có độ pH thấp và muối mật; có khả năng bám dính vào tế bào niêm mạc ruột; sinh chất kháng khuẩn; ức chế sự bám dính của vi khuẩn gây bệnh; được khảo sát về khả năng kháng chất kháng sinh; bền vững trong các chất phụ gia thực phẩm và trong khối thức ăn (Havenaar *et al.*, 1992). Các chủng vi sinh vật probiotic sử dụng trong các sản phẩm thương mại thường chỉ có vài đặc tính tiêu biểu thỏa mãn tiêu chí probiotic, nhưng bên cạnh đó lại có khả năng duy trì bền vững trong các quy trình công nghệ. Các chủng probiotic thương mại đã biết được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Một số chủng probiotic thương mại

TT	Tên loài	Tên chủng	Hãng sản xuất/ sản phẩm
1	<i>Bifidobacterium animalis</i>	Bb-12	Chr. Hansen
2	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Bb-11	Chr. Hansen
3	<i>Bifidobacterium infantis</i>	Shirota Immunitas®	Yakult Danone®
4	<i>Bifidobacterium lactis</i>	Bb-02, Lafti™ B94	DSM
5	<i>Bifidobacterium longum</i>	BB536 SBT-2928	Morinaga Milk Industry Snow Brand Milk Products
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA-1/LA-5 DDS-1	Chr. Hansen Nebraska Cultures
8	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Lb12	Nhiều sản phẩm sữa lên men
9	<i>Lactobacillus cazai</i>	Shirota	Yakult®
10	<i>Lactobacillus lactis</i>	L1A	Essum AB

11	<i>Lactobacillus paracazai</i>	CRL 431	Chr. Hansen
12	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GR-1 LB21	Urex Biotech Essum AB
13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	299v Lp01	Probi AB
14	<i>Lactobacillus reuteri</i>	SD2112/ MM2	Biogaia
15	<i>Bacillus lactis</i>	DR10	Danisco (Howaru TM)

Các vi sinh vật probiotic thông dụng nhất là *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* và *Streptococcus*, trong đó hai chi đầu được biết đến với nhiều đặc tính quý đã công bố gồm khả năng chống chịu cao ở đường ruột có độ pH thấp và hàm lượng cao của muối mật và các enzym của tuyến tụy, bám dính tốt vào niêm mạc ruột và chiếm ưu thế trong hệ vi sinh đường ruột. Đối với cơ thể vật chủ (người và động vật), các vi sinh vật này đã được chứng minh là có khả năng hỗ trợ trao đổi chất (lên men các thành phần thức ăn, tích lũy năng lượng dưới dạng axit béo mạch ngắn, sinh vitamin K, hấp phụ các ion) và tăng cường sức đề kháng (kiểm soát sự tăng trưởng và biệt hóa của tế bào biểu mô, sự phát triển và cân bằng miễn dịch, tạo hàng rào ngăn chặn vi sinh vật gây bệnh) (Piano *et al.*, 2006).

Bifidobacteria gồm các vi khuẩn gram dương, không sinh bào tử, không chuyển động, catalaza âm tính, sinh trưởng kỵ khí hoàn toàn (Biavati, Mattarelli, 2006). Các loài vi khuẩn thuộc chi này có một số hình thái tế bào đặc trưng như que ngắn, cong, tạo nhóm, đôi khi có hình chữ Y hoặc V. Hiện nay chi *Bifidobacterium* có 30 loài, trong số đó 10 loài có nguồn gốc từ người (răng sâu, phân, âm đạo) và 17 loài từ hệ đường ruột của động vật, hai loài phân lập từ nước thải và 1 loài từ sữa lên men (Gomes, Malcata, 1999).

Bifidobacteria sử dụng con đường trao đổi chất với hexoza là “*bifid shunt*” với sự tham gia của enzym fructoza-6-phosphoketolaza (F-6-PPK). Đây là điểm khác biệt với các nhóm vi khuẩn lactic khác như *Lactobacillus*, do vậy enzym này cũng như gen *xfp* mã hóa cho nó được sử dụng làm phân tử chỉ thị của nhóm (Lauer, Kandler, 1976; Biavati, Mattarelli, 2000).

Bifidobacteria là nhóm vi sinh vật có vị trí cực kỳ quan trọng trong hệ sinh thái vi sinh vật đường ruột ở người và các động vật máu nóng, và cân trùng duy nhất là ong mật (Gomes, Malcata, 1999). Chúng phân bố ở nhiều vùng vi môi trường trong hệ đường ruột và hệ sinh dục ở người, số lượng và tỷ lệ phụ thuộc vào độ tuổi cũng như thói quen ăn uống. Bifidobacteria chiếm ưu thế trong hệ vi sinh đường ruột bản địa ở trẻ sơ sinh nhờ được kích thích bởi các thành phần glycoprotein từ K-casein có nhiều trong sữa non và sữa mẹ (với tỷ lệ ít hơn). Số lượng bifidobacteria giảm

dần theo lứa tuổi, trở thành nhóm vi sinh vật đường ruột quan trọng thứ ba ở người trưởng thành (chiếm 25%), đứng sau *Bacteroides* và *Eubacterium* (Finegold *et al.*, 1983).

Trong số các vi sinh vật sử dụng làm probiotic, *Bifidobacterium* là nhóm nhận được nhiều quan tâm và được minh chứng có nhiều đặc tính probiotic quan trọng (Ouweland, Phillip, 2004; Sanders, 2006; Ouweland *et al.*, 2009). Nghiên cứu trên *B. longum* cho thấy các chủng thuộc loài vi khuẩn này có khả năng kích thích các tế bào máu sinh cytokin với các mức khác nhau, qua đó tác động tới các phản ứng miễn dịch (Medina *et al.*, 2007). *B. lactis* được chứng minh là có tác dụng ngăn bệnh tiêu chảy ở người lớn và trẻ nhỏ (kể cả trẻ sơ sinh) (Weizman *et al.*, 2005). Nghiên cứu thử nghiệm trên chuột cho thấy chủng *B. longum* HY8001 có khả năng ngăn chặn sự phân chia của các tế bào ung thư (Lee *et al.*, 2004). Thử nghiệm sữa công thức có bổ sung probiotic *B. lactis* Bb12 đối với trẻ bú mẹ bị bệnh chàm (eczema) cho thấy trẻ hoàn toàn khỏi bệnh sau 2 tháng do vi khuẩn có khả năng ngăn chặn chứng dị ứng ở trẻ (Isolauri *et al.*, 2000).

Thực phẩm chức năng chứa probiotic là hình thức phổ biến nhất để bổ sung lợi khuẩn đường ruột vào cơ thể qua thức ăn hàng ngày. Những loại thực phẩm này rất đa dạng về chủng loại, bao gồm các loại có nguồn gốc từ sữa, từ đậm đặc vật hay từ rau củ (Tamime *et al.*, 2005). Các nguyên liệu thực phẩm không những là phương tiện đưa lợi khuẩn vào hệ tiêu hóa mà còn cung cấp cho vi khuẩn những thành phần chức năng (như chất béo, protein hay hydratcarbon) có tác dụng hỗ trợ mức sống sót và tăng cường hoạt tính của chúng. Các sản phẩm sữa lên men có vị trí quan trọng hàng đầu trong việc đưa lợi khuẩn đường ruột vào cơ thể người (Bảng 2), trong đó probiotic được bổ sung vào sữa ở thời điểm (i) đồng thời với giống khởi động (starter culture) hoặc (ii) theo mẻ lên men độc lập và sau đó trộn với mẻ lên men với giống khởi động để đảm bảo số lượng trong sản phẩm (Tamime *et al.*, 2005). Nếu như probiotic được bổ sung đồng thời với giống khởi động thì thời gian lên men thường kéo dài hơn, theo đó probiotic còn có thể tạo những hương vị đặc trưng cho sản phẩm (Saarela *et al.*, 2000; Ostlie *et al.*, 2003).

Bảng 2: Probiotic dùng trong công nghiệp chế biến sữa ở châu Âu

Loại sản phẩm	Sản phẩm thương mại đại diện	Vi sinh vật probiotic
Sữa lên men có độ dẻo cao	Bifisoft, Bifidus, Bioghurt, Fit&Aktiv, LC1, Probiotisches Joghurt, Vitality, ProViva...	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. cazai</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> .

Sữa lên men dạng uống (sữa chua uống...)	Actimel, Biofit, Biola, Yakult, Bifidus, LC 1 Go, Yoco Acti-Vit	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12, <i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> , <i>B. longum</i> BB536
--	---	---

Bifidobacterium được sử dụng trong chăn nuôi ít phổ biến hơn, ví dụ như *B. longum* được bổ sung vào thức ăn nuôi gà thịt có hiệu quả tăng sức đề kháng cho vật nuôi nhờ tạo ra chất diệt khuẩn chống lại vi sinh vật gây bệnh, trong đó có *Campylobacter* (Santini *et al.*, 2010); hoặc *Bifidobacterium* sp. được bổ sung vào thức ăn cho gà đẻ, làm tăng tỷ lệ sống sót ở gà con (Yoruk *et al.*, 2004).

Các chủng probiotic thương mại cần thỏa mãn yêu cầu về hoạt tính sinh học cũng như về công nghệ như (i) dễ dàng nuôi tăng sinh trong các thiết bị lên men, (ii) có khả năng sống sót cao và bảo toàn hoạt tính trong quá trình thu sinh khối (ly tâm hay lọc qua màng) và quá trình phát triển sản phẩm (đông khô, sấy phun, màng bao,...) (Lacroix, Yildirim, 2007).

Bifidobacterium animalis là một trong số các loài vi khuẩn *Bifidobacterium* thường tìm thấy trong hệ đường ruột của người và các động vật khác. *B. animalis* bao gồm hai dạng mà trước kia được cho là hai loài khác nhau. *B. animalis* và *B. lactis* rất giống nhau khi xem xét dựa trên trình tự 16S rADN (98,8% tương đồng) (Cai *et al.*, 2000). Theo các tài liệu phân loại hiện nay hai loài này được xếp chung vào *B. animalis* với hai dưới loài là subsp. *animalis* và subsp. *lactis* dựa trên phân tích trình tự gen *atpD* (1133 bp) và gen *groEL* (1158 bp) (Masco *et al.*, 2004). Gen *groEL* là một gen chức năng được sử dụng khá rộng rãi để phát hiện và xác định số lượng bifidobacteria trong mẫu tự nhiên cho kết quả chi tiết đến mức độ loài (Masco *et al.*, 2004; Junick, Blaut, 2012). Cả hai tên khoa học *B. animalis* và *B. lactis* đều xuất hiện trong các sản phẩm thương mại, trong nhiều trường hợp không rõ dưới loài nào được sử dụng.

Nhà sản xuất các sản phẩm sữa lên men khổng lồ Dannon (Tập đoàn xuyên quốc gia của Pháp về thực phẩm, thành lập từ 1919) sử dụng *B. animalis* cho dòng sữa chua Activia và kinh doanh loại sữa chua này như một dạng probiotic đặc biệt hỗ trợ hệ tiêu hóa một cách tự nhiên. Các nghiên cứu do hãng Dannon thực hiện cho thấy *B. animalis* có khả năng sống sót khi đi qua hệ tiêu hóa và làm giảm đáng kể thời gian lưu thức ăn trong ruột (colonic transit time). Ngoài ra, một nghiên cứu gần đây của Dannone Research còn cho thấy việc sử dụng sữa chua có probiotic (gồm *B. animalis*, *L. bulgaricus*, *S. thermophiles*, *L. lactis* và *Lactococcus lactis*) có tác động đến trung tâm xử lý cảm xúc và cảm giác của não bộ (thông qua công nghệ chẩn đoán hình ảnh), có khả năng giúp điều trị hội chứng ruột kích thích và lo âu.

Năm 2005 một nghiên cứu do hãng Hansen Chr (Đan Mạch) thực hiện đã minh họa được ảnh hưởng của hỗn hợp probiotic (trong đó có *B. animalis*) tới đặc tính phản vệ của đường ruột và các vi khuẩn có hại (<http://www.chr-hansen.com/>). Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ cao trong số các ca được bổ sung *B. animalis* giảm nhu động ruột cũng như hiện tượng đi ngoài phân lỏng. Nghiên cứu này kết luận rằng bổ sung probiotic có thể chữa bệnh viêm ruột già và thay đổi điều kiện phản vệ của ruột (nguyên nhân dẫn đến bệnh tiêu chảy).

Trong một nghiên cứu khác, các nhà khoa học Ý đã nghiên cứu ảnh hưởng của *B. animalis* trên chuột bị thiếu kẽm (Mengheri *et al.*, 1999). Mặc dù thiếu kẽm trong cơ thể dẫn đến các hiện tượng loét dạ dày, phù nề, xâm nhập của các tế bào phản vệ, suy yếu thành mạch máu, nhưng niêm mạc ở chuột được bổ sung *B. animalis* vẫn được bảo toàn. Ngoài ra, phần lớn các triệu chứng do thiếu kẽm ở chuột uống probiotic cũng được đưa về trạng thái bình thường. *B. animalis* có mặt với mật độ cao trong phân của chuột, chứng tỏ vi khuẩn này sống sót qua hệ đường ruột và thậm chí phát triển ở điều kiện thiếu kẽm. Như vậy *B. animalis* có thể giúp bảo vệ hệ đường ruột trong các trường hợp thiếu kẽm.

Một nghiên cứu khác ở Nhật Bản năm 2006 (Shirakawa *et al.*, 2006) còn cho thấy bổ sung *B. animalis* theo đường uống có thể giúp ngăn ngừa nhiễm khuẩn *Samonella*. Tác động ảnh hưởng của *B. animalis* vẫn đang tiếp tục được nghiên cứu, tuy nhiên rõ ràng là lợi khuẩn này có rất nhiều ảnh hưởng tốt đối với hệ đường ruột của người và động vật. Các sản phẩm thương mại có sử dụng *B. animalis* được liệt kê tại bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Các sản phẩm thương mại có sử dụng *B. animalis*

TT	Sản phẩm	Công ty	Quốc gia	Tên chủng	Tên thương mại
1	Sữa chua Activia	Danone (Đa quốc gia)	Anh	DN 173 010	Bifidus Digestivum
			Mỹ và Mexico		Bifidus Regularis
			Canada		Bifidobacterium lactis hoặc B.L. regularis
			Brazil		DanRegularis
			Áo, Bỉ, Pháp, Đức, ...		Bifidus Actiregularis
			Trung Đông		Bifidus Essensis
2	Nguyên liệu cho thực phẩm	Chr. Hansen A/S	Đan Mạch	BB-12	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>

3	Proviact	Lidl	Đức (Hệ thống siêu thị toàn cầu)		<i>Bifidobacterium</i> BB-12
4	Theralac	Master Supplements	Mỹ	Probiotic capsule	<i>Bifidobacterium lactis</i> BI-07 <i>Bifidobacterium lactis</i> BL-34
5	Attune Wellness Bars	Attune Foods (Thực phẩm chức năng)	Mỹ		<i>Bifidobacterium lactis</i> HN-019
6	Clinical GI probiotic	Now Foods (Thực phẩm chức năng)	Mỹ Illinois, 1968		<i>Bifidobacterium lactis</i> HN-019

Ở Việt Nam, *Bifidobacterium* spp. có mặt trong một số thực phẩm chức năng và sữa chua cao cấp trên thị trường. Tuy nhiên, các chủng sản xuất này đều có xuất xứ từ nước ngoài, được nhập khẩu về Việt Nam dưới dạng chủng khởi động cho quá trình lên men sữa hoặc sản phẩm sinh khối để phối trộn sản xuất thực phẩm chức năng hỗ trợ hệ tiêu hóa ở người và động vật. Việc tìm kiếm và đưa ra chủng *Bifidobacterium* có nguồn gốc bản địa để ứng dụng trong các sản phẩm hỗ trợ sức khỏe ở Việt Nam theo như công bố tại sáng chế này có ý nghĩa rất quan trọng, nhằm tiến tới (i) chủ động và ổn định nguồn *Bifidobacterium* cho người Việt Nam (chủng bản địa), và (ii) giảm giá thành của các loại sản phẩm chứa vi khuẩn này trên thị trường, qua đó nâng cao sức khỏe ở người và vật nuôi.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BfH thuần khiết về mặt sinh học để sử dụng làm probiotic cho người và động vật. Đây là một loại lợi khuẩn đường ruột có khả năng sử dụng cho cả người và vật nuôi. Loại vi khuẩn tương tự hiện nay có nguồn gốc nước ngoài đã có mặt trên thị trường trong nhiều loại sản phẩm thực phẩm chức năng hỗ trợ hệ tiêu hóa ở trẻ em và người trưởng thành.

Tuy nhiên, khác với các loại vi khuẩn tương tự đang sử dụng trong các sản phẩm thương mại có nguồn gốc từ nước ngoài, chủng *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BfH là chủng vi khuẩn thuần khiết được phân lập tại Việt Nam, từ chất thải đường ruột của trẻ sơ sinh, được nghiên cứu chi tiết và bảo quản thuần khiết trong điều kiện phòng thí nghiệm ở Việt Nam.

Chủng *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BfH theo sáng chế có thể được cung cấp một cách chủ động cho việc sản xuất dược phẩm và thực phẩm chức năng

phù hợp cho người Việt Nam và vật nuôi ở Việt Nam và đảm bảo an toàn (có kiểm soát của cơ quan chuyên môn và cơ quan chức năng).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh phân lập vi khuẩn *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BfH trong ống thạch bán lỏng.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái tế bào của chủng *B. animalis* subsp. *lactis* BfH dưới kính hiển vi phản pha (A) và dưới kính hiển vi điện tử quét (B).

Hình 3 là hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các gen sử dụng để định danh chủng BfH, gồm có 16S rADN, đoạn gen *xfp* mã hóa cho enzym F6-PPK, và đoạn gen *groEL*.

Hình 4 là hình ảnh cây phân loại dựa trên trình tự gần đủ của 16S rADN (A) và đoạn gen *xfp* mã hóa cho enzym fructoza-6-phosphoketolaza (F-6-PPK) (B) ở chủng BfH so với các loài gần gũi.

Hình 5 là biểu đồ thể hiện đường cong sinh trưởng của chủng BfH trong môi trường MRS dịch thể kỵ khí trên thiết bị lên men thể tích 5 lít (thể tích thực môi trường là 4,5 lít).

Hình 6 là hình ảnh chủng *B. animalis* subsp. *lactis* BfH được bảo quản trong điều kiện lạnh sâu (glycerol 25%, -20°C) (A) và đông khô (sau đó giữ tại -20°C) (B).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập tới chủng vi khuẩn *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BfH thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ phân trẻ sơ sinh dưới 1 tháng tuổi ở Việt Nam.

Phân trẻ sơ sinh dưới 1 tháng tuổi ở Việt Nam được thu vào dụng cụ lấy mẫu kỵ khí có chứa môi trường MRS kỵ khí, bảo quản ở nhiệt độ phòng trong thời gian ngắn nhất có thể (dưới 24 h) và sử dụng làm nguyên liệu phân lập. Ở đây, phương pháp Hungate (Widdel, Bak, 1992) phân lập vi khuẩn trong điều kiện kỵ khí hoàn toàn đã được áp dụng. Ba môi trường khác nhau được sử dụng, gồm có BIM25 (Munoz, Pares, 1988), BFM (Nebra, Blanch, 1999) và MRS (HiMedia), thành phần các môi trường được thể hiện trong Bảng 4. Việc loại oxy được thực hiện bằng cách bổ sung L-cystein và sục khí N₂ (Messer Việt Nam) để sử dụng cho mục đích phân lập.

Bảng 4: Môi trường sử dụng để phân lập và nuôi cấy vi khuẩn *Bifidobacterium*

Thành phần hóa chất	Môi trường MRS (HiMedia)	Môi trường BIM25 (Munoa, Pares, 1988)	Môi trường BFM (Nebra, Blanch, 1999)
Cazein (pancreatic digest)	–	5 g	–
Pepton	10 g	–	5 g
Pepton đậu tương	–	5 g	–
Trypton	–	–	2 g
Cao thịt bò	10 g	5 g	2 g
Cao nấm men	5 g	2,5 g	7 g
Glucosa	20 g		–
Tinh bột	–		2 g
Lactuloza	–		5 g
L-cystein	–		0,5 g
NaCl	–		5 g
Riboflavin	–		1 mg
Thiamin	–		1 mg
Tween 80	1 g		–
KH ₂ PO ₄	2 g		–
Na-axetat	5 g		–
(NH ₄) ₂ -H-citrat	2 g		–
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g	0,25 g	–
MnSO ₄ .nH ₂ O	0,05 g		–
Axit ascorbic	–	0,5 g	–
Di-sodium-β-glycerophosphat	–	19 g	
Thuốc nhuộm Methylene blue	–		16 mg
Lithium chlorua	–		2 g
Axit propionic 99%	–		5 ml (sau khử trùng)
Nước cất	1 lít	1 lít	
Thạch (rửa sạch)	15 g	11 g	15 g
độ pH	6 - 6,5		5,5 (dùng 10N NaOH)
Khử trùng			
Bổ sung sau khử trùng		50 ml lactoza 10% (vô trùng)	

Kết quả cho thấy môi trường BFM phù hợp nhất đối với việc phân lập bifidobacteria từ đường ruột, tuy nhiên để duy trì và nuôi tăng sinh vi khuẩn này thì môi trường MRS kỵ khí hoàn toàn là thích hợp hơn cả.

Chủng *B. animalis* subsp. *lactis* BfH đã được nghiên cứu chi tiết về hình thái tế bào, môi trường nuôi cấy và các đặc tính sinh trưởng, cũng như một số đặc tính probiotic quan trọng để đánh giá tiềm năng ứng dụng (như khả năng sinh axit, khả năng chống chịu nồng độ muối mật cao). Các gen mã hóa cho 16S rARN, *groEL* và đoạn gen *xfp* mã hóa cho enzym fructoza-6-phosphoketolaza (F-6-PPK) đặc trưng cho loài đã được giải trình tự và so sánh với các trình tự liên quan trên GenBank. Dữ liệu so sánh được sử dụng để dựng cây phân loại bằng phần mềm ClustalX 1.8 và thuật toán neighbour-joining (Saitou, Neil, 1987).

Chủng *B. animalis* subsp. *lactis* BfH được bảo quản ở điều kiện lạnh sâu trong ống thủy tinh 1 ml có đệm cao su và nắp xoáy tại -20°C trong dung dịch 25% glycerol (kỵ khí hoàn toàn) và đông khô trong các lọ 3 ml có nắp cao su và kẹp nhôm. Ở điều kiện bảo quản này, chủng có thể giữ hoạt tính trong thời gian 1 – 2 năm. Chủng có thể dễ dàng hoạt hóa trở lại trong môi trường MRS dịch thể kỵ khí sau 24 – 48 giờ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập chủng *B. animalis* BfH từ phân trẻ sơ sinh

A. Thu và xử lý mẫu

Phân trẻ sơ sinh dưới 1 tháng tuổi được chuyển trực tiếp vào ống môi trường MRS kỵ khí (đảm bảo thời gian tiếp xúc với không khí là ngắn nhất) rồi đưa về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập.

B. Phân lập

Mẫu được pha loãng trong dung dịch muối sinh lý 0,9% không có oxy, sau đó 0,1 ml mẫu ở mỗi mức pha loãng (10^{-2} - 10^{-6}) được chuyển vào các ống môi trường thạch bán lỏng (1% thạch, môi trường MRS hoặc BFM hoặc BIM25, đầy kín bằng nắp cao su, đang giữ ở nhiệt độ 40°C trong bể ổn nhiệt), sau đó trộn đều bằng cách đảo đầu ống và để nguội tới nhiệt độ phòng để đông thạch. Đuổi oxy trong các ống phân lập bằng khí nitơ (99,9%, Messer Việt Nam) trong thời gian 30 giây, sau đó đặt các ống phân lập trong tủ ấm 37°C ở tư thế đảo ngược.

Sau thời gian 2 - 3 ngày, khuẩn lạc vi khuẩn xuất hiện trong ống thạch, bao gồm các khuẩn lạc có tạo bọt khí và các khuẩn lạc không sinh khí (Hình 1). Các khuẩn lạc nằm sâu trong cột thạch có dạng hình đĩa lồi hai mặt hoặc múi khế, hoặc

hình cầu nhỏ li ti (chỉ quan sát được dưới kính lúp) được tách bằng mao quản thủy tinh (là đầu pipet Pasteur kéo dài) thực hiện dưới kính lúp và chuyển sang môi trường dịch thể tương ứng. Bước tinh sạch này được lặp lại 2 – 3 lần cho đến khi thu được chủng thuần khiết.

Trong số các khuẩn lạc không sinh khí có loại hình đĩa lồi hai mặt, loại hình múi khế có kích thước lớn hơn và loại nhỏ li ti thường nằm sâu ở phía dưới cột thạch. Các khuẩn lạc nhỏ là đối tượng được quan tâm, được tách ra bằng mao quản thủy tinh (là đầu pipet Pasteur kéo dài) rồi chuyển sang ống môi trường dịch thể kỵ khí tương ứng với môi trường trong ống thạch. Nuôi vi khuẩn trong tủ ấm 37°C, sau đó lặp lại bước phân lập trong ống thạch bán lỏng để tinh sạch và thu nhận chủng thuần khiết.

Theo phương pháp mô tả như trên, chủng BfH được phân lập từ phân trẻ sơ sinh 2 tuần tuổi, bú mẹ hoàn toàn và khỏe mạnh. Chủng được phân lập từ ống thạch bán lỏng có thành phần môi trường là BFM nhờ chứa các chất kháng sinh ức chế các loại vi khuẩn lactic khác thường có mặt trong hệ đường ruột của người và động vật. Để tạo ra lượng sinh khối lớn cho các nghiên cứu khác, chủng BfH thuần khiết được nuôi trong môi trường MRS dịch thể kỵ khí.

Ví dụ 2: Xác định vị trí phân loại của chủng *B. animalis* BfH dựa trên trình tự gen

A. Tách ADN hệ gen của chủng BfH

Sử dụng phương pháp do Marmur (1961) mô tả, gồm các bước như sau:

- 1 ml dịch tế bào được ly tâm với tốc độ 5000 - 10000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó rửa với 1 ml đệm TE (độ pH = 8) rồi hòa tế bào trong 0,5 ml 5 mM EDTA (độ pH = 8).
- Thêm 50 µl lysozym (40 mg/ml), trộn đều, ủ trong bể ổn nhiệt ở 37°C trong 1 giờ.
- Thêm 50 µl SDS (20%) và 50 µl proteinaza K (4 mg/ml), trộn đều và ủ trong bể ổn nhiệt ở 55°C trong 1 giờ.
- Thêm 400 µl PCI, trộn đều trong 1- 3 phút, ly tâm với tốc độ 13000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút. Lặp lại bước vừa rồi thêm 1 lần.
- Chuyển lớp dịch trong ở trên sang ống eppendorf mới. Thêm 1/10 thể tích dung dịch 3M Na-acetat (độ pH = 5,2) và 2 lần thể tích dung dịch 2-propanol (đề lạnh -20°C), trộn đều và giữ ở -20°C trong vòng 15 phút đến 1 giờ.

- Ly tâm với tốc độ 13000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút, chất phần dịch trên để thu kết tủa ADN.

- Rửa ADN trong etanol 70% (đề lạnh -20°C) trong 1 phút, ly tâm với tốc độ 13000 vòng/phút, đổ cặn, làm khô ADN ở nhiệt độ phòng.

- Hòa tan ADN trong 50 µl MQ vô trùng (hoặc đệm TE) và bảo quản ở -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

B. Khuếch đại các đoạn gen trong phản ứng PCR

ADN hệ gen sau đó được sử dụng làm khuôn để khuếch đại các đoạn gen dùng cho việc xác định vị trí phân loại của chủng, gồm có 16S rADN, đoạn gen *xfp* mã hóa cho enzym fructoza-6-phosphoketolaza (F-6-PPK) và đoạn gen *groEL*. Các cặp mồi đặc hiệu cho từng đoạn gen đã sử dụng được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5: Các cặp mồi sử dụng để khuếch đại các đoạn gen cho mục đích xác định vị trí phân loại của chủng BfH

Tên gen	Tên mồi	Trình tự mồi	Sản phẩm PCR	Tài liệu tham khảo
16SrADN	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3'	khoảng 1500 bp	Edward <i>et al.</i> , 1989
	1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'		
<i>xfp</i>	U1R	5'-ACCTGCCCCGAAGTACATCGAC-3'	khoảng 530 bp	Yin <i>et al.</i> , 2015
	U2L	5'-GAGCTCCAGATGCCGTGACG-3'		
<i>groEL</i>	gro-1	5'- GACCATCACCAACGATG - 3'	khoảng 850 bp	Masco <i>et al.</i> 2004
	gro-2	5'- GCTCCGGCTTGTTGGC - 3'		

Điều kiện chu trình nhiệt của phản ứng PCR cho mỗi gen được trình bày trong Bảng 6. Các sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng PCR purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) rồi tiến hành phản ứng đọc trình tự với ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit và đọc trình tự trên máy tự động 3110 Avant Applied Biosystems.

Bảng 6: Chu trình nhiệt của các phản ứng PCR cho các đoạn gen nghiên cứu

Tên gen	Chu trình nhiệt	Sản phẩm PCR	Tài liệu tham khảo
16SrADN	94°C 3 phút, (94°C 30 giây, 55°C 45 giây, 72°C 1,5 phút) × 35 chu kỳ, 72°C 7 phút, kết thúc 4°C.	khoảng 1500 bp	Weisburg <i>et al.</i> , 1991

<i>xfp</i>	94°C 4 phút, (94°C 30 giây, 60°C 30 giây, 72°C 1 phút) × 35 chu kỳ, 72°C 10 phút, kết thúc 4°C.	khoảng 530 bp	Yin <i>et al.</i> , 2005
<i>groEL</i>	95°C 3 phút, (95°C 30 giây, 50°C 30 giây, 72°C 2 phút) × 30 chu kỳ, 72°C 10 phút, kết thúc 4°C.	khoảng 850 bp	Masco <i>et al.</i> 2004

Hình ảnh điện di kết quả chạy PCR được thể hiện trên Hình 3. Sản phẩm PCR của các gen/đoạn gen được sử dụng để xác định vị trí phân loại của chủng BfH chính xác tới mức độ dưới loài. Kết quả cho thấy đã thu được đoạn 16S rADN (1320 bp), đoạn gen *xfp* (525 bp) mã hóa cho enzyme F6-PPK và đoạn gen *groEL* (852 bp). Các sản phẩm PCR này được tinh sạch và giải trình tự.

Trình tự gen sau đó được phân tích, so sánh với trình tự 16S rADN của các loài có liên quan hiện đã công bố trên ngân hàng dữ liệu GenBank sử dụng phần mềm BLAST Search. Cây phân loại được dựng theo phương pháp neighbour-joining (Saitou, Nei, 1987), trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều (Felsenstein, 1985). Kết quả so sánh độ tương đồng về trình tự các đoạn gen phân tích với ngân hàng dữ liệu GenBank được trình bày trong Bảng 7 và vị trí phân loại của chủng BfH được minh họa tại Hình 4. Dựa trên các kết quả có được, chủng BfH được định tên khoa học là *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BfH.

Bảng 7: Độ tương đồng về trình tự 16S rADN, đoạn gen *xfp* và *groEL* của chủng BfH so với các loài gần gũi nhất

Gen	Độ dài	Loài gần gũi nhất	Độ tương đồng
16S rADN	1320 bp	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	99%
<i>xfp</i>	525 bp	<i>Bifidobacterium animalis</i>	100%
<i>groEL</i>	852 bp	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	100%

So sánh cả hai trình tự gen đều cho thấy chủng BfH gần gũi nhất với *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* với độ tương đồng khi so sánh trình tự gần đủ của 16S rADN (1320 bp) là 99%, độ tương đồng về đoạn gen *xfp* (525 bp) mã hóa cho enzyme F-6-PPK và đoạn gen *groEL* (852 bp) đều là 100%. Gen *xfp* là gen chức năng đặc hiệu cho chi *Bifidobacterium* (Lauer, Kandler, 1976), trong khi đó gen *groEL* được sử dụng để phân biệt hai nhóm dưới loài của *B. animalis* là *B.*

animalis subsp. *lactis* và *B. animalis* subsp. *animalis* (Ventura *et al.*, 2004; Masco *et al.* 2004; Junick, Blaut, 2012). Dựa trên các phân tích về trình tự gen, chủng BfH được định danh khoa học là *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BfH. Đoạn 16S rADN đã giải trình tự được đăng ký tại ngân hàng gen DDBJ với mã số LC179021.

Ví dụ 3: Nghiên cứu hình thái và các đặc tính sinh học của chủng *B. animalis* subsp. *lactis* BfH

A. Quan sát hình thái tế bào

Hình thái tế bào của chủng BfH được quan sát trên kính hiển vi phản pha Axiostar Plus (Zeiss) (Hình 2A) và kính hiển vi điện tử quét (Hitachi) (Hình 2B).

Quan sát tế bào trên kính hiển vi phản pha: Lấy 1 ml dịch nuôi vi khuẩn thu ở pha log của chu kỳ sinh trưởng, ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút tại 4°C. Sinh khối tế bào sau đó được hòa trong 100 µl nước muối sinh lý vô trùng, đã được đuổi oxy bằng sục khí nitơ. Lấy 20 - 30 µl dịch tế bào đưa lên lam kính phủ thạch (2%) và chụp ảnh trên kính hiển vi phản pha (Axiostar Plus, Zeiss) vật kính 40× bằng camera chuyên dụng (Axiocam ICc3, Zeiss).

Quan sát tế bào trên kính hiển vi điện tử quét: tế bào được thu từ dịch nuôi bằng ly tâm, rửa trong dung dịch cacodylat 100 mM trong 2 - 3 lần, sau đó xử lý trong dung dịch chứa 2,5% glutaraldehyt, 100 mM cacodylat trong ≥1 giờ. Sau khi xử lý, mẫu được rửa 2 - 3 lần trong dung dịch cacodylat 100 mM, sau đó cố định trong dung dịch chứa 1% OsO₄ và 100 mM cacodylat trong 1 giờ tại nhiệt độ phòng. Sau khi cố định, mẫu được rửa trong dung dịch 100 mM cacodylat 2 lần, sau đó loại nước trong dung dịch cồn ở các nồng độ 50, 70, 80, 90 và 100%. Tế bào vi khuẩn sau quy trình xử lý được hòa trong 100% etanol tới mật độ phù hợp, đưa lên để gắn mẫu có bọc màng nhôm và phủ màng Pt-Pd. Sau cùng mẫu được phân tích trên kính hiển vi điện tử quét (Hitachi, Nhật Bản)

Chủng *B. animalis* subsp. *lactis* BfH gồm những tế bào hình que không điển hình, thường có mấu lồi ở giữa, kích thước tế bào 1 - 2 µm × 4 - 10 µm (thay đổi trong quá trình sinh trưởng). Trong môi trường dịch thể, tế bào hầu như không chuyển động, kích thước tế bào thay đổi trong quá trình sinh trưởng. Hình ảnh SEM cũng cho thấy tế bào của chủng BfH không có roi hay tiêm mao để thực hiện chức năng di chuyển.

B. Các đặc tính sinh lý

Các đặc tính sinh lý của chủng BfH gồm có điều kiện sinh trưởng tối ưu về độ mặn của môi trường, nguồn cacbon và nitơ thích hợp nhất, đã được nghiên cứu chi

tiết. Trong các nghiên cứu này, chủng BfH được nuôi trong môi trường MRS dịch thể kỵ khí (lập lại trong 3 ống nuôi) có bổ sung các thành phần cần nghiên cứu theo tỷ lệ cần thiết, cụ thể như sau:

- Nguồn cacbon và nitơ thích hợp: Thành phần pepton trong môi trường MRS được thay bằng cao thịt bò hoặc cao nấm men với tỷ lệ tương đương. Thành phần glucoza được thay bằng maltoza hoặc lactoza theo tỷ lệ tương đương. Sự sinh trưởng của vi khuẩn trong môi trường nghiên cứu được đánh giá thông qua mật độ quang OD₆₀₀ và mức giảm độ pH trong môi trường do axit hữu cơ sinh ra.

- Điều kiện nhiệt độ sinh trưởng tối ưu: vi khuẩn được nuôi trong ống nghiệm chứa môi trường MRS kỵ khí, đặt trong tủ ấm ở các điều kiện nhiệt độ 10, 15, 20, 28, 32, 37, 42, 45°C. Sự sinh trưởng của vi khuẩn được đánh giá dựa trên thay đổi độ pH trong dịch nuôi và mật độ tế bào dựa trên giá trị OD₆₀₀ sau thời gian nuôi là 48 giờ.

- Khả năng lên men lactoza: chủng BfH được nuôi trong ống nghiệm chứa môi trường MRS kỵ khí với cơ chất lactoza (10 g/l), nuôi tĩnh ở 37°C và xác định mức sinh trưởng (thay đổi độ pH môi trường) sau 48 giờ.

C. Hoạt tính probiotic

Các đặc tính có giá trị trong việc sử dụng làm probiotic như khả năng tạo axit, khả năng chống chịu trong điều kiện độ pH thấp và hàm lượng muối mật cao được nghiên cứu chi tiết.

- Khả năng sinh axit: chủng BfH sau khi hoạt hóa được chuyển vào các môi trường nuôi cấy kỵ khí là MRS, BFM và BIM25 (độ pH = 6) và nuôi tại 37°C, theo dõi biến động của độ pH trong môi trường hàng ngày trong thời gian 3 ngày.

- Khả năng chịu độ pH thấp: độ pH trong dạ dày ở mức ~1 khi đói, tăng lên tới ~ 4,5 sau khi ăn và thời gian tiêu hóa thức ăn là ~ 3 h (Osmanagaoglu *et al.*, 2010). Theo đó, chủng BfH được nuôi trong ống nghiệm chứa môi trường MRS kỵ khí được chỉnh độ pH bằng dung dịch HCl trong khoảng 1 - 4, môi trường ở độ pH = 6 là đối chứng dương. Thời gian tiếp xúc của tế bào với mỗi độ pH là 60, 120, 180 và 240 phút. Mức độ sống sót của vi khuẩn được đánh giá thông qua phương pháp MPN sử dụng môi trường MRS dịch thể kỵ khí có độ pH = 6.

- Khả năng chịu muối mật: nồng độ muối mật trong ruột được xác định ở mức ~ 0,3% và thời gian lưu của thức ăn trong đường ruột nằm trong khoảng 1 – 4 giờ (Osmanagaoglu *et al.*, 2010), trên cơ sở đó chủng BfH sau khi được hoạt hóa trong môi trường MRS kỵ khí được chuyển vào môi trường có bổ sung muối mật ở nồng

độ từ 0,3%, 0,5% và 1%. Mật độ tế bào đưa vào ban đầu là khoảng 10^9 tế bào/ml, thời gian tiếp xúc là 60, 120, 180 và 240 phút. Khả năng chịu muối mật được đánh giá thông qua mức độ sống sót của vi khuẩn bằng phương pháp MPN sử dụng môi trường MRS kỵ khí.

Bảng 8: Các đặc tính sinh học của chủng *B. animalis* subsp. *lactis* BfH

TT	Đặc tính sinh học	Mô tả
1	Đặc điểm hình thái	Tế bào hình que có mấu, kích thước $1 - 2 \mu\text{m} \times 4 - 10 \mu\text{m}$, gram (+), không chuyển động, không sinh bào tử.
2	Catalaza	Âm tính
3	Cytochrome C peroxidaza	Âm tính
4	Lên men glucoza	Không tạo CO_2 (không sinh khí)
5	Lên men hexoza	Nhờ enzym fructoza-6-phosphoketolaza (F-6-PPK), sinh axit lactic và axit acetic.
6	Nhiệt độ sinh trưởng	Sinh trưởng tại $28 - 42^\circ\text{C}$, tối ưu tại $35 - 37^\circ\text{C}$
7	Nguồn cacbon tối ưu	Glucoza, maltoza, lactoza.
8	Nguồn nitơ tối ưu	Tốt nhất là cao thịt bò; kém hơn là cao thịt và pepton
9	Khả năng lên men lactoza	Có khả năng sinh trưởng tạo axit với lactoza
10	Khả năng sinh axit	Chủng BfH giảm độ pH tốt nhất trong môi trường MRS (đạt độ pH = 4,5 sau 48 giờ), trong môi trường BFM và BIM25 đạt độ pH tương ứng là 4,7 và 5,5 sau 48 giờ.
11	Khả năng chịu độ pH thấp	Chủng BfH có khả năng tồn tại ở độ pH = 2 sau 4 giờ tiếp xúc
12	Khả năng chịu muối mật	Chủng BfH có khả năng bền vững ở nồng độ muối mật tới 1% sau 4 giờ tiếp xúc

Quá trình nuôi tăng sinh trong bình lên men 5 lít được tiến hành ở chế độ không thổi khí, tốc độ khuấy 50 vòng/phút trong thời gian 48 giờ. Tại thời điểm kết thúc lên men, mật độ quang của dịch nuôi OD_{600} đạt mức 4,5 - 5, độ pH đạt 4 - 4,6 và mật độ tế bào đạt khoảng 10^{11} MPN/ml. Kết quả được thể hiện trên Hình 5.

Ví dụ 4: Bảo quản chủng *B. animalis* subsp. *lactis* BfH

Chủng *B. animalis* subsp. *lactis* BfH được bảo quản trong phòng thí nghiệm theo hai phương pháp (i) trong glycerol (25%) tại -20°C (Hình 6A) và (ii) đông khô

rồi giữ tại -20°C (Hình 6B). Dụng cụ bảo quản ở đây là các ống thủy tinh có nắp cao su kín khí, môi trường bảo quản được loại oxy hoàn toàn trước đó.

Ở mỗi điều kiện bảo quản, mức độ sống sót của chủng BfH được đánh giá theo thời gian bảo quản bằng phương pháp MPN sử dụng môi trường MRS dịch thể kỵ khí. Từ kết quả thu được cho thấy phương pháp glycerol trong lạnh sâu cho phép bảo quản chủng trong thời gian 12 tháng, trong khi đó phương pháp đông khô rồi giữ trong lạnh sâu cho phép bảo quản chủng trong thời gian lớn hơn 24 tháng.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Nhu cầu thực tế về lợi khuẩn đường ruột *Bifidobacterium* hiện nay là rất lớn, tuy nhiên nguồn vi khuẩn này ở trong nước còn chưa có. Chủng *B. animalis* subsp. *lactis* BfH là vi khuẩn bản địa, phân lập từ đường ruột trẻ sơ sinh khỏe mạnh ở Việt Nam, là nguồn lợi khuẩn tiềm năng cho sản xuất dược phẩm và thực phẩm chức năng cho cộng đồng người Việt Nam. Chủng BfH đã được nghiên cứu chi tiết về các đặc tính sinh lý, các đặc tính probiotic cũng như được xác định về vị trí phân loại, khẳng định tính an toàn và hiệu quả của chủng trong việc sử dụng làm probiotic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL (1992) Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl Environ Microbiol* 59: 4121 - 4128.
2. Biavati B, Mattarelli P (2006) The Family *Bifidobacteriaceae*. In Dworkin M, Falkow S, Rozanberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (ed) *The Prokaryotes* 3rd Ed: A Handbook on the Biology of Bacteria: Archaea, Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Vol. 3, p. 322 - 382.
3. Bomba A, Nemcova R, Mudronova D, Guba P (2002) The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends Food Sci Technol* 13: 121 – 126.
4. Cai Y, Matsumoto M, Benno Y (2000) *Bifidobacterium lactis* Meile *et al.*, 1997 is a subjective synonym of *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka, 1969) Scardovi and Trovattelli 1974. *Microbiol Immunol* 44: 815 - 820.
5. Decamp O, Moriarty DJW (2006) Probiotics as alternative to antimicrobials: Limitationa and potential. *World Aquaculture* 37: 60 - 62.
6. Dekker J, Collett M, Prasad J, Gopal P (2007) Functionality of probiotics. Potential for product development. In: Nutrigenomics Opportunities in Asia, vol 60. Tai ES, Gillies PJ (Eds) Karger, Bazal, Switzerland, pp. 196 - 208.
7. Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nuc Acids Res* 17: 7843-7853.
8. Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE (1983) Normal indigenous intestinal flora. In “*Human intestinal microflora in health and diseaza*” Hentges DJ (Ed), Academic Press, NY, USA. Pp. 3 - 31.
9. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
10. Food and Agriculture Orgaization/World Health Organization (FAO/WHO), Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Report of a Joiint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada (2002) (<http://ftp.fao.org/es/esn/food/wreport2.pdf>)
11. Gismondo MR, Drago L, Lombardi A (1999) Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int J Antimicrob Agents* 12: 287 - 292.

12. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S (1992) Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 37: 121 - 128.
13. Gomes AMP, Malcata FX (1999) *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci Technol* 10: 139 – 157.
14. Guarner F, Malagelada JR (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* 361: 512 – 519.
15. Guerra NP, Bernardez PF, Mendez J, Cachaldora P, Castro LP (2007) Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Anim Feed Sci Technol* 134: 89 – 107.
16. Havenaar R, Brink BT, Huis JHJ (1992) Selection of strains for probiotic use. In *Probiotics: The Scientific Basis*, Fuller R. (Ed). Chapman & Hall, London, UK, pp. 151 – 170.
17. Isolauri E, Arvola T, Suetas Y, Moilanen E, Salminen S (2000) Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 30: 1604 - 1610.
18. Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen JE, Stuer-Lauridsen B, Eskesen D (2014) The science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®. *Microorganisms* 2: 92 - 110.
19. Junick J, Blaut M (2012) Quantification of human fecal *Bifidobacterium* species by use of quantitative real-time PCR analysis targeting the groEL gene. *Appl Environ Microbiol* 78:2613 - 2622.
20. Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L (2008) Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274: 1 - 14.
21. Koenen ME, van der Hulst R, Leering M, Jeurisen SH, Boersma WJ (2004) Development and validation of a new *in vitro* assay for selection of probiotic bacteria that express immune-stimulating properties in chickens *in vivo*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40: 119 - 127.
22. Kullen MJ, Amann MM, O'Shaughnessy MJ, O'Sullivan DJ, Busta FF, Brady LJ (1997) Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by ADN fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. *J Nutr* 127: 89 - 94.

23. Lacroix C, Yildirim S (2007) Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Curr Opin Biotechnol* 18: 176 - 183.
24. Lauer E, Kandler O. 1976. Mechanism of the variation of the acetate/lactate/ratio during glucose fermentation by *Bifidobacteria*. *Arch. Microbiol.* 110:271 - 277.
25. Lee JW, Shin JG, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY et al., Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *J Vet. Sci* 5: 41 - 48.
26. Lourens-Hattigh A, Viljoen BC (2001) Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J* 1: 1-17.
27. Masco L, Ventura M, Zink R, Huys G, Swings J (2004) Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1137 - 1143.
28. Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y (2007) Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: Relevance to probiotic selection and clinical application. *Clin Exp Immunol* 150: 531 - 538.
29. Mengheri E, Nobili F, Vignolini F, Pesenti M, Brandi G, Biavati B (1999) *Bifidobacterium animalis* protects intestine from damage induced by zinc deficiency in rats. *J Nutr.* 129(12): 2251 - 2257.
30. Modesto M, D'Aimmo MR, Stefanini I, Trevisi P, De Filippi S, Casini L et al. (2009) A novel strategy to select *Bifidobacterium* strains and prebiotics as natural growth promoters in newly weaned pigs. *Livestock Sci* 122: 248 - 258.
31. Munoa FJ, Pares R (1988) Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol* 54: 1715 - 1718.
32. Nebra Y, Blanch AR (1999) A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol* 65(11): 5173 - 5176.
33. Osmanagaoglu O, Kiran F, Ataoglu H (2010) Evaluation of in vitro probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF isolated from human breast milk. *Probiotics & Antimicrob. Prot.* 2(3): 162 - 174.

34. Ostlie H, Helland MH, Narvhus J (2003) Growth and metabolism of probiotics in fermented milk. *Int J Food Microbiol* 87: 17 - 27.
35. Ouwehand AC, Phillipp S (2004) *Bifidobacterium lactis* HN019; The good taste of health. *Agro food Ind Hi-Tech* 15: 10 - 12.
36. Ouwehand AC, Lahtinen S, Nurminen P (2009) *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019. In: Handbook of probiotics and prebiotics. Lee YK, Salminen S (Eds), John Wiley & Sons, Hoboken NJ, USA, pp. 473 - 477.
37. Patterson JA, Burkholder KM (2003) Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Sci* 82:627 - 631.
38. Piano MD, Morelli L, Strozzi GP, Allesina S, Barba M, Deidda F (2006) Probiotics: from research to consumer. *Dig Liv Dis* (Suppl 2) 38: 248 - 255.
39. Saarela M, Mogerisen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T (2000) Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 84: 197 - 215.
40. Shah NP (2004) Probiotics and prebiotics. *Agro Food Ind Hitech* 15: 13 - 16.
41. Sanders ME (2006) Summary of probiotic activities of *Bifidobacterium lactis* HN019. *J Clin Gastroenterol* 40: 776 - 783.
42. Santini C, Baffoni L, Gaggia F, Granata M, Gasbarri R, Di Gioia D, Biavati B (2010) Characterization of probiotic strains: An application as feed and additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *Int J Food Microbiol* (Suppl 1) 141: 98 - 108.
43. Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
44. Shirakawa T, Takata T, Gotoh A, Kano Y, Kawabata M (2006) Genetically engineered *Bifidobacterium animalis* expressing Salmonella flagellan gene for the mucosal immunization in mouse model. *Molecular Therapy* 13:424.
45. Shortt C (1999) The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci Technol* 10: 411 - 417.
46. Tamime AY, Saarela M, Sondergaard AK, Mistry VV, Shah NP (2005) Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. In *Probiotic Dairy Products*, Tamime AY (Ed) Blackwell Publishing, Oxford UK, 44 - 51.

47. Ventura M, Canchaya C, Zink R, Fitzgerald GF, van Sinceren D (2004) Characterization of the *groEL* and *groES* loci in *Bifidobacterium breve* UCC 2003: genetic, transcriptional, and phylogenetic analyses. *Appl Environ Microbiol* 70:6197–6209.
48. Verchuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Vestraete W (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microb Mol Biol Rev* 64: 655 – 671.
49. Yin X, Chambers JR, Barlow K, Park AS, Wheatcroft R (2005) The gene encoding xyluloza-5-phosphate/fructoza-6-phosphate phosphoketolaza (*xfp*) is conserved among *Bifidobacterium* species within a more variable region of the genome and both are useful for strain identification. *FEMS Microbiol Let* 246: 251–257.
50. Yoruk MA, Gul M, Hayirli A, Macit M (2004) The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. *Poultry Sci* 83: 84 – 88.
51. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal ADN amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697–703.
52. Weizman Z, Asli G, Alsheikh A (2005) Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: Comparison of two probiotic agents. *Pediatrics* 115: 5 – 9.
53. Widdel F, Bak F (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 3352-3378.

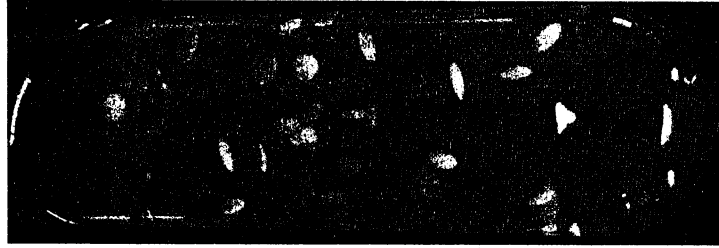
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng vi khuẩn *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BfH thuần khiết về mặt sinh học để sử dụng làm probiotic phân lập được từ chất thải đường ruột trẻ sơ sinh dưới một tháng tuổi có trình tự 16S rADN được đăng ký tại ngân hàng gen DDBJ với số hiệu LC179021 và có các đặc tính như sau:

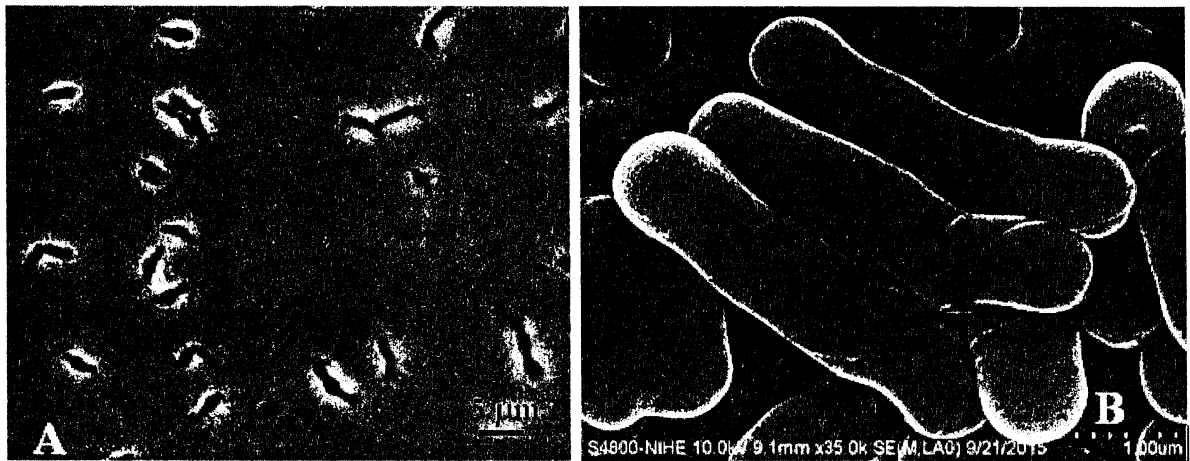
(i) có khả năng lên men đường glucoza và lactoza sinh axit lactic và axetic, làm giảm độ pH trong môi trường MRS kỵ khí tới mức 4,5 sau 48 giờ nuôi;

(ii) có khả năng chống chịu và sống sót trong điều kiện cực trị của dịch dạ dày mô phỏng là độ pH = 2 và nồng độ muối mật 1% sau 4 giờ tiếp xúc; và

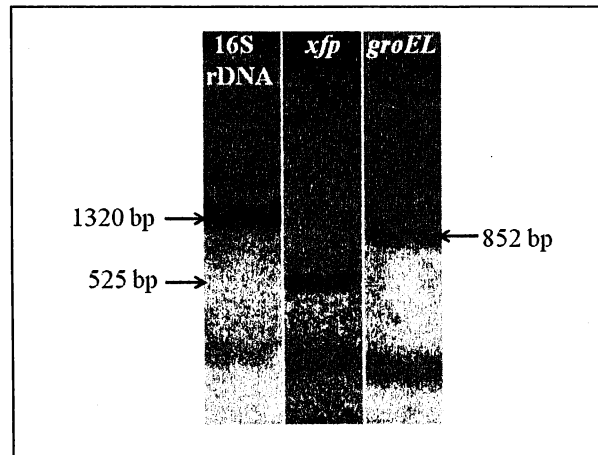
(iii) có khả năng đạt mật độ tế bào 10^{11} MPN/ml khi nuôi trong môi trường MRS trên thiết bị lên men 10 lít ở điều kiện kỵ khí hoàn toàn.



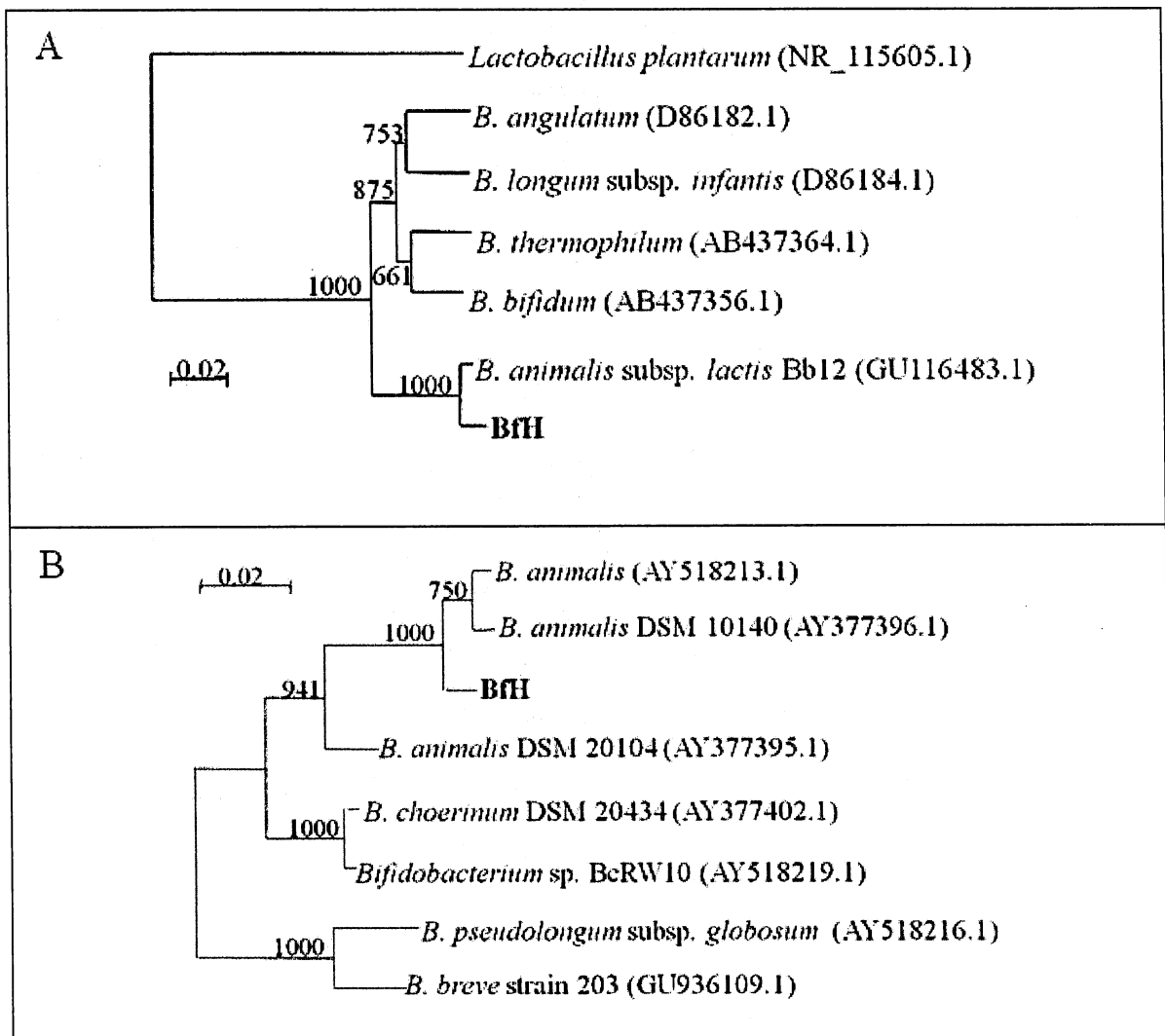
Hình 1



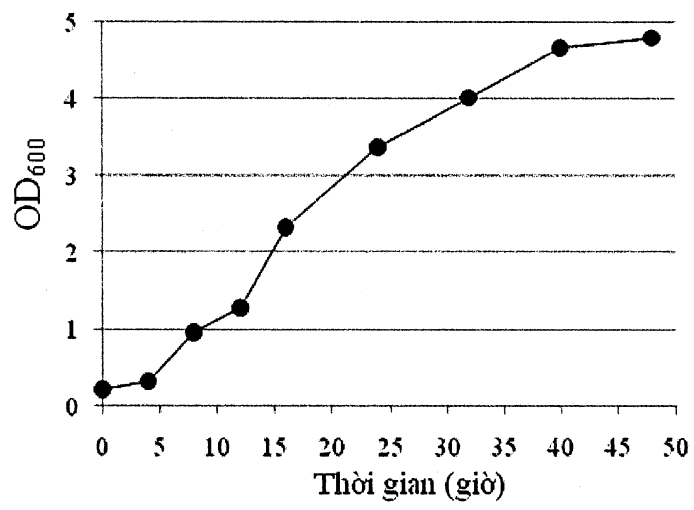
Hình 2



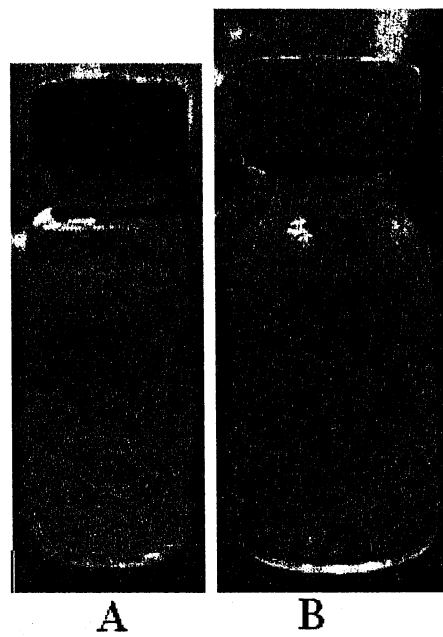
Hình 3



Hình 4



Hình 5



Hình 6