



(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)



1-0029254

(51)⁷ C12N 1/20; A23K 1/16; A61K 35/74

(13) B

(21) 1-2014-03685

(22) 04/04/2013

(86) PCT/KR2013/002828 04/04/2013

(87) WO/2013/151363 10/10/2013

(30) 10-2012-0035433 05/04/2012 KR

(45) 25/08/2021 401

(43) 25/05/2015 326A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

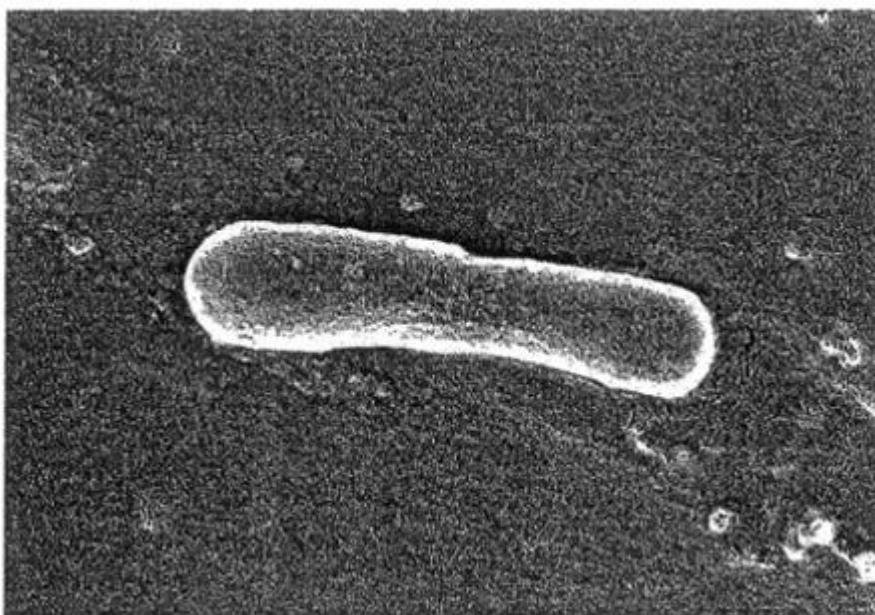
500, Namdaemunro 5-ga, Jung-gu, Seoul 100-749, Republic of Korea

(72) BACK, Seung Hee (KR); YANG, Si Yong (KR); WOO, Seo Hyung (KR); SEO, Hyo Seel (KR).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) CHỦNG BACILLUS LICHENIFORMIS ĐƯỢC PHÂN LẬP, SẢN PHẨM NUÔI CẤY CỦA CHỦNG NÀY, CHẾ PHẨM PROBIOTIC, CHẤT PHỤ GIA THỨC ĂN GIA SÚC VÀ THỨC ĂN GIA SÚC CHỨA CHỦNG NÀY, CHẤT TĂNG CƯỜNG MIỄN DỊCH, THỰC PHẨM CHỨC NĂNG VÀ TÁ DƯỢC VACCIN CHỨA CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus licheniformis* được phân lập mới và chế phẩm probiotic chứa nó.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus licheniformis* được phân lập mới và chế phẩm probiotic chứa nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Để phù hợp với sự gia tăng dân số thế giới và cải thiện tiêu chuẩn sống, nên vẫn cần gia tăng mối quan tâm về vệ sinh công cộng và sự an toàn thức ăn. Do đó, phần chất phụ gia kháng sinh của thức ăn gia súc, mà được thêm vào để thúc đẩy sự tăng trưởng của gia súc và cải thiện hiệu quả của thức ăn, và một vi khuẩn kháng lại kháng sinh vẫn liên tục được tranh cãi. Kết quả là, việc thêm kháng sinh và chất chống vi trùng vào thức ăn gia súc đã hoàn toàn bị cấm vào và sau ngày 1 tháng 7 năm 2011.

Khi việc thêm kháng sinh vào thức ăn gia súc bị cấm hoàn toàn, thì việc nghiên cứu về các nguyên liệu thay thế kháng sinh đang được thực hiện tích cực.

Trong số chúng, các probiotic được chú ý cao đến làm chất kích thích miễn dịch. Thuật ngữ “probiotic”, có ý nghĩa từ nguyên trái ngược với thuốc kháng sinh là một nguyên liệu kháng sinh, được xác định là một tác nhân vi khuẩn hoặc thành phần vi sinh vật để hỗ trợ sự cân bằng của hệ vi sinh đường ruột. Các loài được gọi là vi khuẩn axit lactic như *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, và tương tự, là điển hình. Ngoài ra, probiotic được phân loại là vi sinh vật được cấp giấy công nhận là an toàn (generally recognized as safe - GRAS) và không có gen độc lực cho con người và động vật cũng như không tạo ra nguyên liệu gây bệnh. Ngoài ra, phải được khẳng định rằng vi sinh vật có hiệu quả cải thiện năng suất của ngành chăn nuôi.

Probiotic có tác dụng gắn vào màng nhầy ruột để cạnh tranh loại bỏ gắn kết với vi

khuẩn gây bệnh gây ra bệnh đường ruột để bài tiết nó ra bên ngoài, và nhanh chóng hồi phục hệ vi sinh đường ruột bị phá vỡ bởi việc dùng kháng sinh. Ngoài ra, probiotic ngăn cản việc nhiễm vi khuẩn gây bệnh, kìm hãm sự nhân lên của vi khuẩn gây bệnh, tạo ra một môi trường tối ưu để tăng trưởng vi khuẩn có lợi đường ruột, thúc đẩy tăng trưởng của vi khuẩn có lợi đường ruột, tạo ra axit lactic hoặc axit axetic, mà là một thành phần quan trọng của các axit hữu cơ đường ruột, và làm giảm độ pH trong ruột để kìm hãm sự tăng trưởng của vi khuẩn gây bệnh có hại. Do đó, các probiotic có thể duy trì hệ vi khuẩn đường ruột bình thường và đẩy mạnh cải thiện năng suất của ngành công nghiệp chăn nuôi bằng nhiều hoạt động phức tạp khác nhau.

Phần lớn các probiotic được sử dụng là vi khuẩn axit lactic như *Lactobacillus*, *Enterococcus*, và tương tự, và *Bacillus*. *Bacillus* là bacillus gram dương, tạo thành các bào tử, và có hình dạng độc nhất trong số vi khuẩn được sử dụng làm probiotic. *Bacillus* có khả năng chịu nhiệt tuyệt vời so với *Lactobacillus* mà không tạo ra các bào tử. Ngoài ra, do *Bacillus* có thể tồn tại ở độ pH thấp trong thành dạ dày, nên hầu hết các *Bacillus* được dùng có thể đi vào ruột non (Barbosa, T.M. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2005)968-978; Spinosa, M. R. *et al.*, *Res. Microbiol.*, 151(2000) 361-368).

Tài liệu kỹ thuật có liên quan đến các probiotic được phân lập để tăng cường miễn dịch của gia súc, mà là một trong số các chức năng chính của probiotic, đề cập đến một hỗn hợp chủng mới của *Bacillus* loài CMB L1 và *Lactobacillus* loài CMB201, chế phẩm thức ăn để làm tăng miễn dịch và hoạt tính chống ung thư chứa hỗn hợp này, và một tác nhân vi khuẩn có hoạt tính kháng sinh, đã được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn quốc đang xét nghiệm số 10-2011-035554. Ngoài ra, chất tăng cường miễn dịch cho gia súc, tá dược vacxin, thuốc phụ trợ, và chất phụ gia cho thức ăn gia súc chứa dịch chiết tiêu vi khuẩn của *Zygosaccharomyces bailii* đã được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Hàn quốc số 10-0977407. Dịch chiết *Zygosaccharomyces bailii* có khả năng làm tăng các hoạt động khác nhau của bạch

cầu trung tính, mà là đại thực bào chính của động vật, và cải thiện tác dụng bảo vệ không đặc hiệu chống lại các thử thách của vi khuẩn gây bệnh. Tuy nhiên, nghiên cứu về tác dụng tăng cường miễn dịch của *Bacillus* là không đủ.

Hơn nữa, đã được biết rằng trong số các probiotic, *Lactobacillus* có đặc tính quan trọng là tạo ra axit lactic, nhưng một bài báo đã báo cáo rằng chủng *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 tạo ra axit lactic (Kim, K. M et al., J. Microbiol. Biotechnol., 19(2009) 1013-1018).

Do đó, các tác giả của sáng chế đã phân lập chủng *Bacillus* tạo ra các enzym tiêu hóa và axit lactic từ bột nhão đậu tương, mà là thức ăn lên men truyền thống của Hàn quốc, và khẳng định đặc điểm hình thái, sinh hóa, và tính chất di truyền của nó. Kết quả là, các tác giả của sáng chế đã khẳng định rằng chủng *Bacillus* là các probiotic có khả năng chịu nhiệt tuyệt vời, có tác dụng tăng sinh tế bào tủy xương tuyệt vời trong chuột được ghép tủy xương, có tác dụng tăng cường miễn dịch làm tăng sinh các tế bào lá lách và các tế bào tủy xương của chuột được gây miễn dịch và có tác dụng hỗ trợ cho vacxin làm tăng sản xuất kháng thể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 mới tạo ra các enzym tiêu hóa và axit lactic, và có hoạt tính tăng cường miễn dịch.

Ngoài ra, theo một phương án, sáng chế đề cập đến sản phẩm nuôi cấy bao gồm dung dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ nó.

Hơn nữa, theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm probiotic chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó.

Hơn nữa, theo một phương án, sáng chế đề cập đến chất phụ gia thức ăn gia súc chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361, sản phẩm nuôi cấy của nó, hoặc chế phẩm probiotic.

Hơn nữa, theo một phương án, sáng chế đề cập đến thức ăn gia súc chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361, sản phẩm nuôi cấy của nó, chế phẩm probiotic, hoặc chất phụ gia thức ăn gia súc.

Ngoài ra, theo một phương án, sáng chế đề cập đến chất tăng cường miễn dịch hoặc tá dược vacxin chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361, sản phẩm nuôi cấy, dung dịch cô đặc của nó, vật liệu khô từ đó, hoặc chế phẩm probiotic.

Ngoài ra, theo một phương án, sáng chế đề cập đến thực phẩm chức năng dành cho sức khỏe để tăng cường hệ miễn dịch chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361, sản phẩm nuôi cấy của nó, dung dịch cô đặc của nó, vật liệu khô từ đó, hoặc chế phẩm probiotic.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là ảnh hiển vi điện tử mô tả chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế.

FIG. 2 là hình vẽ mô tả sự tiêu máu hoặc không tiêu máu của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế.

FIG. 3 là đồ thị mô tả đáp ứng tăng sinh của tế bào lympho của chuột theo phần trọng lượng phân tử của chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế.

FIG. 4 là đồ thị mô tả đáp ứng tăng sinh của tế bào lá lách (tế bào lympho), tế bào tủy xương, và tế bào tủy ức của chuột theo phần trọng lượng phân tử của chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế.

FIG. 5 là đồ thị biểu diễn đáp ứng tăng sinh của tế bào B lá lách của chuột trong các điều kiện *in vitro* theo phần trọng lượng phân tử của chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế.

Các FIG. từ 6A đến 6E thể hiện kết quả của máy phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (fluorescence activated cell sorter - FACS) biểu diễn đáp ứng tăng sinh

in vivo của tế bào lympho của chuột ở thời điểm dùng phần chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy (1000 kDa hoặc nhiều hơn) của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế vào khoang bụng của chuột. FIG. 6A thể hiện kết quả FACS của nhóm đối chứng isotyp, và các FIG. từ 6B đến 6E thể hiện kết quả FACS trong các trường hợp dùng chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy (1000 kDa hoặc nhiều hơn), tương ứng với liều 0,67mg, 1,35mg, 2,7mg, và 5,4mg.

FIG. 7 là đồ thị biểu diễn kết quả thu được bằng cách đánh giá tác dụng hỗ trợ sản xuất kháng thể ở thời điểm dùng phần chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy (1000 kDa hoặc nhiều hơn) của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế cùng với kháng nguyên.

Các FIG. 8A và 8B là các đồ thị biểu diễn tỷ lệ tử vong thu được bằng cách đánh giá hiệu quả của phần chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy (1000 kDa hoặc nhiều hơn) của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế trên sự tăng sinh tế bào sau khi cấy ghép tủy xương ở chuột được chiếu xạ. FIG. 8A là đồ thị biểu diễn kết quả được đánh giá ở chuột được chiếu xạ với 7,5 Gy, và FIG. 8B là đồ thị biểu diễn kết quả được đánh giá ở chuột được chiếu xạ với 9 Gy.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 mới tạo ra các enzym tiêu hóa và axit lactic.

Cụ thể, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế được phân lập từ bột nhão đậu tương, mà là thực phẩm truyền thống của Hàn quốc. Các đặc tính hình thái học của chủng theo sáng chế là, chủng này là bacillus gram dương và có trình tự nucleotit 16s rADN được nêu trong SEQ ID No: 1. Kết quả của việc phân tích trình tự nucleotit, thì chủng này có mức độ tương đồng 99% so với chủng *Bacillus licheniformis*. Do đó, các tác giả sáng chế đã lưu giữ chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 được phân lập mới tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn quốc (Korea Culture Center of Microorganisms) (361-221, Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul)

với số truy cập KCCM11269P vào ngày 22 tháng 3 năm 2012.

Cụ thể, chủng từ bột nhão đậu tương sau 70 đến 80 ngày mà là thực phẩm truyền thống của Hàn quốc, được phân lập trong môi trường thạch truyền tim não (brain heart infusion - BHI). Chủng phân lập được có hoạt tính enzym tiêu hóa tuyệt vời như amylaza, xenlulaza, mananaza, và xylanaza và tạo ra axit lactic khi được nuôi cấy trong 24 giờ hoặc nhiều hơn trong điều kiện kỵ khí tùy ý hoặc kỵ khí. Khi chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng này làm tăng hoạt tính của tế bào không phải T trong lá lách chuột, tủy xương chuột, và máu ngoại vi của người, thì chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy có tác dụng tăng cường hệ miễn dịch mạnh đặc hiệu với các tế bào B chuột. Trong trường hợp tiêm một phần chất nổi trên bề mặt của dịch nuôi cấy có trọng lượng phân tử là 1000 kDa hoặc nhiều hơn cùng với kháng nguyên, thì chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy có tác dụng hỗ trợ trong việc tạo ra kháng thể chống lại kháng nguyên.

Ngoài ra, khi phần chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng này có trọng lượng phân tử là 1000 kDa hoặc nhiều hơn được dùng cho chuột được chiếu xạ sau khi ghép tủy xương, thì phần đó có tác dụng làm tăng đáp ứng lan truyền của các tế bào tủy xương được cấy ghép để làm tăng tỷ lệ sống của chuột.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất sản phẩm nuôi cấy bao gồm dung dịch nuôi cấy của chủng được phân lập mới theo sáng chế, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ đó.

Chủng được phân lập mới theo sáng chế có thể được nuôi cấy bằng phương pháp chung cho các chủng Bacillus. Để làm môi trường, có thể sử dụng môi trường tự nhiên hoặc môi trường tổng hợp. Nguồn cacbon của môi trường, ví dụ, có thể sử dụng glucoza, sucroza, dextrin, glyxerol, tinh bột, hoặc tương tự, và để làm nguồn nitơ, có thể sử dụng pepton, dịch chiết thịt, dịch chiết nấm men, men khô, đậu tương, muối amoni, nitrat, hợp chất chứa nitơ hữu cơ hoặc vô cơ khác. Tuy nhiên, các nguồn của sáng chế không bị giới hạn ở đó. Để làm muối vô cơ được chứa trong môi trường, có

thể sử dụng magie, mangan, canxi, sắt, kali, hoặc tương tự, nhưng muối vô cơ không bị giới hạn ở đó. Ngoài nguồn cacbon, nguồn nitơ, và muối vô cơ, thì có thể thêm axit amin, vitamin, axit nucleic, và các hợp chất có liên quan đến chúng, vào môi trường. Chúng được phân lập mới theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong khoảng nhiệt độ từ 20 đến 40° trong khoảng thời gian gian từ 12 giờ đến 4 ngày.

Cụ thể, dung dịch nuôi cấy của chúng được phân lập mới có thể là dung dịch nuôi cấy chứa tế bào vi khuẩn, hoặc các tế bào vi khuẩn thu được bằng cách loại bỏ chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy hoặc cô đặc dung dịch nuôi cấy. Chế phẩm dung dịch nuôi cấy có thể còn chứa thêm các thành phần có tác dụng hiệp đồng lên sự sinh trưởng *Bacillus* cũng như các thành phần cần thiết để nuôi cấy *Bacillus* thông thường, và chế phẩm này có thể dễ dàng được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực tạo ra.

Ngoài ra, chủng này có thể ở trạng thái lỏng hoặc khô. Phương pháp làm khô có thể là phương pháp sấy khí, phương pháp sấy tự nhiên, phương pháp sấy phun, và phương pháp sấy đông lạnh, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm probiotic chứa chủng được phân lập mới theo sáng chế hoặc sản phẩm nuôi cấy của nó.

Probiotic ở trong thành đường tiêu hóa ruột để ngăn cản vi khuẩn có hại ở đó và kìm hãm sự lan truyền của vi khuẩn gây bệnh. Ngoài ra, các enzym tiêu hóa có lợi được tạo ra bởi probiotic hỗ trợ sự hấp thụ và sử dụng chất dinh dưỡng, do đó cải thiện hiệu quả của thức ăn gia súc.

Chế phẩm probiotic theo sáng chế chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 với lượng nằm trong khoảng từ 5×10^4 CFU/ml đến 5×10^{10} CFU/ml, cụ thể là nằm trong khoảng từ 1×10^6 CFU/ml đến 1×10^9 CFU/ml.

Chế phẩm probiotic theo sáng chế có thể chứa thêm chất mang được dụng và được bào chế cùng với chất mang, do đó được cung cấp như thực phẩm và chất phụ gia thức ăn gia súc.

Thuật ngữ “chất mang được dụng” được sử dụng ở đây có nghĩa là chất mang hoặc chất pha loãng mà không kích thích sinh vật sống, cũng không ức chế các hoạt tính sinh học và các đặc tính của hợp chất được sử dụng.

Để làm chất mang được dụng, mà được tiết trùng hoặc thích hợp cho cơ thể sống, trong chế phẩm probiotic lỏng, thì có thể sử dụng dung dịch muối đẳng trương, nước vô trùng, nước muối đậm, dung dịch tiêm albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, và hỗn hợp của ít nhất một chất trong số đó. Hơn nữa, nếu cần, các chất phụ gia nói chung khác như chất chống oxi hóa, dung dịch đậm, chất kháng khuẩn, hoặc tương tự, có thể được thêm vào. Ngoài ra, chất pha loãng, chất gây phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất dính, và chất bôi trơn được bổ sung thêm vào đó, để chế phẩm probiotic có thể được bào chế thành thuốc tiêm như dung dịch nước, hỗn dịch, nhũ tương, hoặc tương tự, viên tròn, viên nang, hạt, hoặc viên nén. Hơn nữa, chất dính, chất nhũ hóa, chất bảo quản, và tương tự, có thể được thêm vào để vẫn giữ chất lượng của chế phẩm probiotic. Có thể thêm axit amin, vitamin, enzym, chất tạo hương vị, hợp chất nitơ không phải là protein, silicat, chất đậm, chất dễ chiết, oligosacarit, và tương tự, vào để làm tăng hiệu quả của chế phẩm probiotic. Ngoài ra, chế phẩm probiotic có thể còn chứa hỗn hợp thức ăn gia súc, hoặc tương tự, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ về được phẩm dùng qua miệng, chứa chế phẩm probiotic làm hoạt chất, bao gồm viên nén, viên ngậm dẹt, viên ngậm hình thoi, hỗn dịch nước hoặc dầu, bột đã được bào chế hoặc hạt, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, hoặc sirô, và cồn thuốc. Để bào chế probiotic thành viên nén, viên nang, hoặc tương tự, chế phẩm probiotic có thể còn chứa chất dính như lactoza, sacaroza, sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza, hoặc gelatin, tá dược như đicanxi phosphat, chất làm tan rã như tinh bột ngô hoặc tinh bột khoai lang, chất bôi trơn như magie stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat, hoặc sáp polyetylen glycol. Trong trường hợp chế phẩm ở dạng viên nang, chế phẩm có thể chứa thêm chất mang lỏng như dầu béo.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất phụ gia thức ăn gia súc, chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361, sản phẩm nuôi cấy của nó hoặc chế phẩm probiotic làm hoạt chất.

Nói chung, các loài *Bacillus* tạo thành nội bào tử có một tính chất chống lại nhiệt ổn định đáng kể. Do đó, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 được phân lập mới có thể được bào chế ở dạng chất phụ gia thức ăn gia súc và sau đó trộn với thức ăn gia súc, hoặc được thêm trực tiếp vào thức ăn gia súc. Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 chứa trong thức ăn gia súc theo sáng chế có thể ở trạng thái lỏng hoặc khô, và cụ thể là, ở dạng bột khô. Phương pháp sấy có thể là phương pháp sấy khí, phương pháp làm khô tự nhiên, phương pháp sấy phun, và phương pháp sấy đông lạnh, nhưng không bị giới hạn ở đó. Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế có thể được trộn vào dạng bột với tỷ lệ hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05% trọng lượng đến 10% trọng lượng, cụ thể nằm trong khoảng từ 0,1 % trọng lượng đến 1% trọng lượng trên trọng lượng của thức ăn gia súc. Ngoài ra, thức ăn gia súc có thể còn chứa các chất phụ gia nói chung có khả năng cải thiện sự bảo quản thức ăn gia súc.

Chất phụ gia thức ăn gia súc theo sáng chế có thể được tạo ra ở dạng được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch cô đặc, bột, và hạt. Dung dịch cô đặc có thể chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế, dung dịch nuôi cấy nó, vật liệu khô từ nó, hoặc chế phẩm probiotic với hàm lượng nằm trong khoảng từ 20% trọng lượng đến 90% trọng lượng trên tổng trọng lượng của chất phụ gia thức ăn gia súc.

Chất phụ gia thức ăn gia súc theo sáng chế có thể được ngâm, phun, hoặc trộn thêm vào thức ăn gia súc cho động vật, và sau đó được sử dụng.

Ví dụ về động vật mà được cho ăn chứa chất phụ gia thức ăn gia súc theo sáng chế có thể là gia súc như lợn, bò, cừu, dê, ngựa, thỏ, chó, mèo, và tương tự, và gia cầm như gà, vịt, ngỗng, gà tây, chim cút, hoặc tương tự, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Trong phương pháp trộn thức ăn gia súc cho động vật chứa chất phụ gia thức ăn gia súc theo sáng chế, thì chất phụ gia thức ăn gia súc có thể được trộn với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05% trọng lượng đến 0,5% trọng lượng trên trọng lượng khô của thức ăn gia súc cho động vật. Thuật ngữ “%” được sử dụng ở đây có nghĩa là % trọng lượng (% trọng lượng) trừ khi được chỉ ra khác.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất thức ăn gia súc chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361, sản phẩm nuôi cấy, chế phẩm probiotic hoặc chất phụ gia thức ăn gia súc theo sáng chế.

Trong sáng chế, ví dụ về thức ăn gia súc chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế có thể bao gồm thức ăn gia súc thực vật như ngũ cốc, rễ cây và trái cây, sản phẩm phụ từ chế biến thực phẩm, tảo, chất xơ, chất béo, tinh bột, loại bầu bí, các phụ phẩm ngũ cốc, hoặc tương tự, và thức ăn gia súc cho động vật như protein, nguyên liệu vô cơ, chất béo, chất khoáng, protein tế bào đơn, động vật phù du, bột cá, hoặc tương tự, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất tăng cường miễn dịch hoặc tá dược vacxin chứa chủng mới nêu trên, dung dịch nuôi cấy của nó, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ nó làm hoạt chất.

Dung dịch nuôi cấy *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (số truy cập KCCM11269P), dung dịch cô đặc nó, hoặc vật liệu khô từ nó chứa phần trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 100 kDa đến 300 kDa hoặc 1000 kDa hoặc nhiều hơn, có hoạt tính tăng cường miễn dịch.

Theo một phương án cụ thể, sau khi chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 được tách ra bằng trọng lượng phân tử, hoạt tính tăng sinh tế bào lympho đã được đo. Kết quả là, trong phần có trọng lượng phân tử là 1000 kDa hoặc nhiều hơn và nằm trong khoảng từ 100 đến 300 kDa, thì sự tăng sinh tế bào lá lách của chuột là tuyệt vời (FIG. 3). Đặc biệt, đáp ứng tăng sinh của các tế bào B phụ thuộc vào nồng độ chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy đã được quan sát,

và đáp ứng tăng sinh của các tế bào không phải T và các tế bào không phải B cũng như các tế bào B đã tăng lên. Tác dụng tăng sinh của chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy có trọng lượng phân tử 1000 kDa hoặc nhiều hơn là cao hơn (các FIG. 5 và 6). Đặc biệt, đã khẳng định rằng chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy có trọng lượng phân tử là 1000 kDa hoặc nhiều hơn có hiệu quả hỗ trợ trong việc tạo ra kháng thể chống lại kháng nguyên.

Hơn nữa, trong số các chuột được chiếu xạ với 7,5 Gy, một nhóm được điều trị bằng các tế bào tủy xương và chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy (1000 kDa hoặc nhiều hơn) đã cho thấy tỷ lệ sống sót là 100% (FIG. 8A). Trong các chuột được chiếu xạ với 9 Gy, một nhóm được điều trị bằng tế bào tủy xương và chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy (1000 kDa hoặc nhiều hơn) đã cho thấy tỷ lệ sống sót là 66% (FIG. 8B). Lý do của các kết quả như được nêu ở trên có thể là do phần chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy (1000 kDa hoặc nhiều hơn) làm tăng sinh tế bào tủy xương được cấy ghép để làm tăng tỷ lệ sống sót của chuột được chiếu xạ. Do đó, chất tăng cường miễn dịch hoặc tá dược vacxin theo sáng chế có thể được sử dụng để kích thích phản ứng tăng sinh của tế bào tủy xương được cấy ghép ở các bệnh nhân bị bệnh bạch cầu.

Chất tăng cường miễn dịch hoặc tá dược vacxin theo sáng chế có thể chứa chủng nêu trên, dung dịch nuôi cấy của nó, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ nó với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1% trọng lượng đến 50% trọng lượng dựa trên tổng trọng lượng của chế phẩm.

Chất tăng cường miễn dịch theo sáng chế có thể được sử dụng làm tá dược để ngăn cản hoặc điều trị bệnh suy giảm miễn dịch xảy ra ở động vật hoặc con người. Ngoài ra, tá dược vacxin theo sáng chế có thể được sử dụng làm tá dược để tạo ra đáp ứng miễn dịch hệ thống chống lại kháng nguyên bằng cách dùng kháng nguyên trong cơ thể động vật. Để làm kháng nguyên, một hoặc hỗn hợp của hai kháng nguyên hoặc nhiều hơn được chọn từ nhóm bao gồm nấm, xạ khuẩn, vi khuẩn, virus, động vật nguyên sinh, và thành phần, cơ quan, thành phần tế bào, protein kháng nguyên và

peptit kháng nguyên của các vi khuẩn này có thể được sử dụng.

Khi bào chế được phẩm chứa chất tăng cường miễn dịch và tá dược vaccin chứa chủng theo sáng chế, dung dịch nuôi cấy nó, dung dịch cô đặc nó, hoặc vật liệu khô từ nó, thì có thể còn chứa chất mang thích hợp, tá dược thích hợp, và chất pha loãng thích hợp mà thường được sử dụng.

Chất tăng cường miễn dịch hoặc tá dược vaccin theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng dùng qua đường miệng, tương ứng, là bột, hạt, viên nén, viên nang, hỗn dịch, nhũ tương, sirô, soil khí, hoặc tương tự, dạng bào chế để dùng bên ngoài, thuốc đạn, và dung dịch tiêm vô khuẩn bằng phương pháp chung. Chất mang, tá dược, và chất pha loãng cho được phẩm có thể bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, cao su acaxia, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, nước, và dầu khoáng. Trong trường hợp được phẩm được bào chế, thì có thể sử dụng các chất pha loãng hoặc tá dược thường được sử dụng như chất độn, chất kéo dài, chất dính, chất làm ướt, chất gây phân rã, chất hoạt động bề mặt, hoặc tương tự. Được phẩm rắn để dùng qua đường miệng bao gồm viên nén, viên tròn, bột, hạt, viên nang, và tương tự, và các được phẩm rắn này được bào chế bằng cách trộn ít nhất một tá dược vào dung dịch nuôi cấy nó, dung dịch cô đặc nó, hoặc vật liệu khô từ đó. Được phẩm lỏng để dùng qua đường miệng bao gồm hỗn dịch, dung dịch, nhũ tương, sirô, và tương tự, và các được phẩm lỏng này có thể chứa nhiều tá dược khác nhau cũng như nước, chất lỏng và parafin mà thường được sử dụng làm chất pha loãng đơn giản. Được phẩm để dùng ngoài đường ruột bao gồm dung dịch nước vô khuẩn, dung môi không chứa nước, hỗn dịch, nhũ tương, và được phẩm đông khô. Để làm dung môi không chứa nước hoặc hỗn dịch, thì có thể sử dụng propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu oliu, este tiêm được như etyl oleat, hoặc tương tự. Để làm bazơ cho thuốc đạn, thì có thể sử dụng witepsol, macrogol, Tween 61, bơ cacao, sebum laurinum, glyxerogelatin, hoặc tương tự.

Liều dùng thích hợp của chất tăng cường miễn dịch và tá dược vacxin theo sáng chế phụ thuộc vào thể trạng và trọng lượng của bệnh nhân, mức độ bệnh, dạng bào chế, đường dùng, và khoảng cách dùng liều, nhưng được lựa chọn thích hợp bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Tuy nhiên, để thu được hiệu quả thích hợp hơn, thì chất tăng cường miễn dịch và tá dược vacxin theo sáng chế có thể được dùng với liều hàng ngày nằm trong khoảng từ 0,001mg/kg đến 100mg/kg, cụ thể nằm trong khoảng từ 0,001mg/kg đến 10mg/kg. Việc dùng có thể là một lần một ngày, hoặc được chia thành nhiều lần. Phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở liều dùng này.

Chất tăng cường miễn dịch và tá dược vacxin theo sáng chế có thể được dùng cho gia súc, gia cầm, người, hoặc động vật có vú qua nhiều đường dùng khác nhau. Chất tăng cường miễn dịch và tá dược vacxin theo sáng chế có thể được dùng bằng đường dùng qua đường miệng hoặc tiêm trong cơ, tiêm dưới da, hoặc tiêm tĩnh mạch.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất thực phẩm chức năng dành cho sức khỏe chứa chủng mới theo sáng chế để tăng cường hệ miễn dịch, chế phẩm probiotic, hoặc chất tăng cường miễn dịch làm hoạt chất.

Thức ăn mà chứa chế phẩm probiotic hoặc chất tăng cường miễn dịch theo sáng chế có thể ở nhiều dạng khác nhau như thức ăn, đồ uống, kẹo cao su, trà, hoặc thực phẩm chức năng dành cho sức khỏe.

Trong trường hợp này, chủng mới theo sáng chế, chất probiotic, hoặc chất tăng cường miễn dịch theo sáng chế có thể được thêm vào thức ăn với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% trọng lượng đến 50% trọng lượng trên tổng trọng lượng của thức ăn, và được thêm vào nước uống với lượng nằm trong khoảng từ 0,05% trọng lượng đến 5% trọng lượng trong 100ml chế phẩm đồ uống dành cho sức khỏe. Dạng thực phẩm chức năng dành cho sức khỏe theo sáng chế có thể bao gồm viên nén, viên nang, dung dịch, hoặc tương tự.

Chế phẩm đồ uống dành cho sức khỏe theo sáng chế có thể có các thành phần

khác mà không bị giới hạn cụ thể ngoại trừ chủng mới theo sáng chế, chất probiotic, hoặc chất tăng cường miễn dịch theo sáng chế có thể được chứa với lượng nằm trong khoảng được nêu trên làm thành phần thiết yếu. Hơn nữa, nhiều chất tạo hương vị khác nhau hoặc các hydrat cacbon có thể được chứa vào làm các thành phần bổ sung, giống như đồ uống thông thường. Hydrat cacbon tự nhiên nghĩa là các đường thông thường như glucoza, fructoza, maltoza, sucroza, dextrin, xyclodextrin, và tương tự, và rượu đường như xylitol, sorbitol, erythritol, và tương tự. Ngoài ra, để làm chất tạo hương vị, thì có thể sử dụng chất tạo hương vị tự nhiên như taurin, dịch chiết stevia, và tương tự, và chất tạo hương vị tổng hợp như sacarin, aspartam, và tương tự.

Ngoài các thành phần được nêu ở trên, thực phẩm chức năng dành cho sức khỏe chứa chế phẩm probiotic hoặc chất tăng cường miễn dịch theo sáng chế có thể chứa nhiều chất dinh dưỡng khác nhau, vitamin, khoáng chất (chất điện phân), chất tạo hương vị, chất màu và các chất tăng cường (phô mai, sô cô la, hoặc tương tự), axit pectic và muối của nó, axit alginic và muối của nó, axit hữu cơ, chất cô đặc keo bảo vệ, chất điều chỉnh độ pH, chất làm ổn định, chất bảo quản, glyxerin, rượu, chất tạo cacbon được sử dụng trong đồ uống được cacbonat hóa, hoặc tương tự. Ngoài ra, chế phẩm đồ uống cho sức khỏe theo sáng chế có thể chứa thịt trái cây hoặc nước ép trái cây tự nhiên để làm đồ uống trái cây, hoặc đồ uống rau. Các thành phần này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp với nhau.

Lợi ích của sáng chế

Theo sáng chế, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 được phân lập mới có thể có tác dụng tuyệt vời tạo ra các enzym tiêu hóa như amylaza, xenlulaza, mananaza, và xylanaza và axit lactic, tác dụng tăng cường miễn dịch tuyệt vời trong động vật, tác dụng tuyệt vời hỗ trợ sản xuất kháng thể, và tác dụng tạo ra đáp ứng tăng sinh của tế bào tủy xương được cấy ghép ở bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu.

Do đó, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 được phân lập mới có thể được sử dụng làm chất tăng cường miễn dịch cho động vật và tá được vacxin cũng

như làm probiotic.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phương pháp tốt nhất

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể thông qua các Ví dụ. Tuy nhiên, các Ví dụ này chỉ nhằm minh họa sáng chế, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các Ví dụ này.

Ví dụ 1: Phân lập và xác định chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361

(1) Chuẩn bị mẫu và phân lập chủng

Sau khi mẫu được tạo ra từ bột nhão đậu tương, mà là thức ăn truyền thống của Hàn quốc, sau từ 70 đến 80 ngày được bào chế, và các mẫu đã bào chế này được pha loãng từng bước, rải vào môi trường thạch truyền vào tim não (brain heart infusion - BHI) (Difco, Mỹ) chứa 3% natri clorua, và được nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, các chủng chiếm ưu thế được lựa chọn từ các mẫu. Khuẩn lạc được lựa chọn được phân lập lại bằng phương pháp truyền và nuôi cấy khuẩn lạc được lựa chọn trong môi trường mới ba lần, và các chủng được nuôi cấy hoàn toàn được đặt vào môi trường chứa 20% glyxerol và được bảo quản ở -70°C hoặc nhỏ hơn.

(2) Nghiên cứu đặc tính hình thái và hóa sinh

Thực hiện nghiên cứu hình thái học và hóa sinh để xác định chủng được phân lập. Các đặc tính hình thái học như sau. Chủng là bacillus Gram dương, và đã khẳng định được rằng chủng là bacillus từ ảnh hiển vi điện tử (FIG. 1). Để phân tích các đặc tính hóa sinh, mô hình lên men đường của chủng được phân tích bằng cách sử dụng hệ thống API 50 CHB (Biomérieux, Pháp) (Bảng 1). Đã khẳng định được từ kết quả được thể hiện trong Bảng 1 rằng chủng phân lập có mức độ tương đồng 99% với *Bacillus licheniformis* theo hệ API 50 CHB

[Bảng 1]

Đối chứng	-	Esculin	+
Glyxerol	+	Salixin	+
Erythritol	-	Xenlobioza	+
D-Arabinoza	-	Maltoza	+
L-Arabinoza	+	Lactoza	+
Riboza	+	Melibioza	-
D-Xyloza	+	Sacaroza	+
L-Xyloza	-	Trehaloza	+
Adonitol	-	Inulin	+
β -Metyl-xylosit	-	Melezitoza	-
Galactoza	+	D-Rafinoza	+
D-Glucoza	+	Amidon	+
D-Fructoza	+	Glycogen	+
D-Manoza	+	Xylitol	-
L-Sorboza	-	β -Gentiobioza	+
Rhamnoza	+	D-Turanoza	+
Dulxitol	-	D-Lyxoza	-

Inositol	-	D-Tagatoza	+
Manitol	+	D-Fucoza	-
Sorbitol	+	L-Fucoza	-
α Metyl-Dmanosit	-	D-Arabitol	-
α Metyl- glucosit	+	L-Arabitol	-
N Axetyl glucosamin	-	Gluconat	-
Amygdalin	+	2 xeto-gluconat	-
Arbutin	+	5 xeto-gluconat	-

+: dương, -: âm

(3) Xác định chủng

Thực hiện phương pháp phát sinh loài phân tử sử dụng trình tự ADN nucleotit để nhận biết chính xác chủng. Để phân tích trình tự nucleotit, khuếch đại gen 16s rADN bằng cách sử dụng bộ trộn sẵn PCR (Bioneer, Hàn quốc) và các gen môi chung 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3': SEQ ID No: 2) và 1492R (5'GGYTACCTTGTTACGACTT3': SEQ ID No: 3). Tổng lượng dung dịch phản ứng được đặt ở 20 μ l. Phản ứng chuỗi polymeraza (Polymerase chain phản ứng - PCR) được thực hiện trong 30 vòng ở 94 $^{\circ}$ C trong 1 phút, 56 $^{\circ}$ C trong 1 phút, và 72 $^{\circ}$ C trong 1 phút. Sau đó, phân tích trình tự ADN nucleotit được khuếch đại. Trình tự 16s rADN nucleotit đã phân tích của chủng phân lập được nêu bằng trình tự SEQ ID No: 1. Kết quả của phân tích là, chủng có mức độ tương đồng 99% với *Bacillus licheniformis*. Do đó, chủng phân lập được gọi là *Bacillus licheniformis* CJMPB361 và chủng mới theo sáng chế được lưu giữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật của Hàn quốc (số truy cập KCCM11269P) vào ngày 22 tháng 3 năm 2012.

Ví dụ 2: Phân tích các đặc tính probiotic của *Bacillus licheniformis* CJMPB361

(1) Hoạt tính enzym tiêu hóa của chủng phân lập

1) Chiết dung dịch enzym thô

Sau khi nuôi cấy chủng phân lập trong môi trường lỏng BHI trong 24 giờ, phân tích mức độ phân hủy cơ chất bằng cách sử dụng dung dịch nuôi cấy làm dung dịch enzym thô và môi trường chứa mỗi cơ chất tương ứng với mỗi enzym.

2) Hoạt tính xenlulaza

Môi trường nấm mốc (Yeast Mold - YM) chứa cơ chất carboxyl methyl xenluloza (CMC) 1% được bào chế. Sau khi hiện đếm 2 μ l dung dịch enzym thô được chiết trên môi trường cơ chất, phản ứng được thực hiện ở 37°C trong 15 giờ. Sau đó, chất phản ứng được nhuộm màu bằng cách sử dụng dung dịch nước đỏ Congo 0,2% trong 30 phút, và sau đó làm mất màu bằng cách sử dụng dung dịch nước NaCl 1M. Đo hoạt tính enzym bằng mức độ hình thành một khu vực rõ ràng được tạo ra bằng cách phân hủy cơ chất xung quanh enzym thô.

3) Hoạt tính amylaza

Môi trường YM chứa cơ chất tinh bột hòa tan 1% được bào chế. Sau khi hiện đếm 2 μ l dung dịch enzym thô được chiết trên môi trường cơ chất, thực hiện phản ứng ở 37°C trong 15 giờ. Chất phản ứng được nhuộm bằng cách sử dụng dung dịch nước chứa I₂ 0,1% và KI 2%, và sau đó đo hoạt tính enzym bằng mức độ hình thành một khu vực rõ ràng được tạo ra bằng cách phân hủy cơ chất xung quanh enzym thô.

4) Hoạt tính xylanaza

Môi trường YM chứa 1% xylan được bào chế. Sau khi hiện đếm 2 μ l dung dịch nuôi cấy trên môi trường cơ chất, thực hiện phản ứng ở 37°C trong 15 giờ. Sau đó, chất phản ứng được nhuộm bằng cách sử dụng dung dịch nước đỏ Congo 0,2% trong 30 phút, và sau đó làm mất màu bằng cách sử dụng dung dịch nước NaCl 1M. Đo hoạt tính enzym bằng mức độ hình thành một khu vực rõ ràng.

5) Hoạt tính mananaza

Môi trường cơ chất (dịch chiết nấm men 3g/l, Pepton 5g/l, KH₂PO₄ 1g/l, Thạch 20g/l, pH 5) chứa 1% manan (gôm hạt bồ kết ba gai, Sigma, Mỹ) được bào chế. Sau khi hiện đếm 2 μ l dung dịch nuôi cấy trên môi trường cơ chất, thực hiện phản ứng

ở 37°C trong 15 giờ. Sau đó, đo hoạt tính enzym bằng mức độ hình thành một khu vực rõ ràng.

Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 được phân lập mới có các hoạt tính enzym tiêu hóa đối với xenlulaza, amylaza, xylanaza, và mananaza như được trình bày trong Bảng 2. Đặc biệt, hoạt tính đối với xylanaza và mananaza là cao.

[Bảng 2]

	Xenlulaza	Amylaza	Xylanaza	Mananaza
CJMPB361	+	+	+++	+++

-: không có hoạt tính, +: có hoạt tính, ++: hoạt tính tuyệt vời, +++: hoạt tính cực kỳ tuyệt vời

(2) Năng suất axit lactic

Để đánh giá năng suất axit lactic của chủng phân lập, chủng phân lập (1%) đã được cấy vào 100ml môi trường lỏng PYG (polypepton 10g/L, dịch chiết nấm men 10g/L, glucoza 20g/L, kali phosphat đibazơ 35g/L) trong bình 250ml với nút chai và được nuôi cấy ở 37°C và 200 vòng/phút trong 24 giờ. Sau khi kết thúc nuôi cấy, lượng axit lactic sản xuất trong chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy được định lượng bằng cách sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (high pressure liquid chromatography - HPLC). Tỷ lệ chuyển hóa axit lactic được tính như sau.

Tỷ lệ chuyển hóa axit lactic = (tỷ lệ sản xuất axit lactic/nồng độ đường ban đầu) x 100

Tỷ lệ chuyển hóa axit lactic của chủng là 93,5%. Đã được báo cáo là tỷ lệ chuyển hóa axit lactic của *Bacillus polyfermenticus* tạo ra axit lactic là 60,7% (Kim, K. M et al., J. Microbiol. Biotechnol., 19(2009) 1013-1018). Đã được xác định là trong trường hợp của *Bacillus licheniformis* CJMPB361, một lượng axit lactic lớn hơn đã được chuyển hóa. Do đó, đã được đánh giá cao rằng chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361, mà là chủng được phân lập mới theo sáng chế, tạo ra axit lactic.

(3) Khả năng tạo thành nội bào tử

Bacillus tạo thành các nội bào tử để tồn tại dưới các tình trạng khắc nghiệt như cạn kiệt một hoặc nhiều chất dinh dưỡng cần thiết, hoặc tương tự. Khi các nội bào tử có tính kháng chống lại các tình trạng khắc nghiệt như sấy bằng tia cực tím, nhiệt độ cao, nhiệt độ thấp và áp suất cao, hoặc tương tự, thì sự tạo thành các nội bào tử là quan trọng để duy trì tỷ lệ tồn tại của bacillus. Do đó, *Bacillus licheniformis* CJMPB361 được nuôi cấy trong một khoảng thời gian dài, và khả năng tạo thành nội bào tử của nó đã được xác nhận.

Chủng (0,1%) được cấy vào môi trường lỏng BHI và được nuôi cấy ở 37⁰ và 200 vòng/phút trong 24 và 48 giờ. Dung dịch nuôi cấy ở mỗi thời điểm được bôi trên môi trường rắn BHI, và đếm tổng số tế bào. Ngoài ra, dung dịch nuôi cấy được xử lý bằng nhiệt ở 95⁰ trong 10 phút được rải trên môi trường rắn BHI, và đếm số lượng các nội bào tử.

Như được trình bày trong Bảng 3, có thể được đánh giá cao rằng khi *Bacillus licheniformis* CJMPB361 được nuôi cấy trong 24 giờ, thì tỷ lệ hình thành nội bào tử là khoảng 0,3%, và khi chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 được nuôi cấy trong 48 giờ, tỷ lệ hình thành nội bào tử là 78%. Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 theo sáng chế có khả năng hình thành nội bào tử tuyệt vời khi được nuôi cấy trong 48 giờ hoặc nhiều hơn, để chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 làm probiotic có thể giữ tỷ lệ sống cao.

[Bảng 3]

Thời gian nuôi cấy	Tổng số tế bào (CFU/ml)	Số nội bào tử (CFU/ml)	Tỷ lệ tạo thành nội bào tử (%)
24h	1,2x10 ⁸	4,0x10 ⁵	0,3%
48h	1,1x10 ⁹	8,6x10 ⁸	78,2%

(4) Sự tan máu β

Sự tan máu β là hoạt động ly giải hồng cầu trong máu bằng cách tạo ra phospholipaza trong vi khuẩn có hại để thủy phân các phospholipit được cung cấp bởi các tế bào hồng cầu.

Để khẳng định sự tan máu bởi chủng phân lập, bào chế thạch đậu nành tryptic (TSA, Difco, Mỹ) chứa 5% máu cừu (Kisan Biotech, Hàn quốc) được bào chế. Chủng được tạo thành vệt trên môi trường thạch máu đã được bào chế và sau đó được nuôi cấy ở 37⁰ trong 24 giờ. Sau đó, kết quả của việc xác định có hoặc không có sự tan máu, đã xác nhận rằng sự tan máu không xảy ra như được thể hiện trong FIG. 2.

Ví dụ 3: Hoạt tính tăng cường miễn dịch của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361

(1) Thử nghiệm đáp ứng tăng sinh tế bào lympho

Sau khi chuột BALB/c (từ 6 đến 7 tuần tuổi, Orient Corp., Hàn quốc) bị chết bởi một thiết bị gây mê bằng đường xông, lá lách được lấy và ấn nhẹ bằng cách sử dụng hai tấm kính trượt tiệt trùng, do đó tách ra tế bào lympho. Tế bào lympho được phân lập được rửa bằng RPMI 1640 (Invitrogen, Mỹ), mà là môi trường nuôi cấy tế bào, ba lần. Ngoài ra, sau khi loại bỏ các tế bào hồng cầu trong hỗn dịch tế bào, thì tạo huyền phù chất thu được ở nồng độ 2×10^6 tế bào/ml trong môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 chứa 10% huyết thanh bào thai bò. Chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy *Bacillus licheniformis* CJMPB361, mà là mẫu thử nghiệm, trong 24 giờ chủ yếu được pha loãng ở tỷ lệ 1:20 sử dụng môi trường RPMI 1640, và sau đó, thực hiện sự pha loãng theo từng dãy hai lần.

Sau khi hiện đếm 100 μ l huyền phù tế bào lympho trên mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ, thêm 100 μ l mẫu đã bào chế vào đó. Sau khi đĩa được nuôi cấy ở 37⁰ trong lò ủ có 5% CO₂ trong 2 ngày, thêm 10 μ l thymidin được chuẩn độ (3H TdR)(New England Nuclear, Boston) vào mỗi lỗ và nuôi cấy thêm trong 6 giờ. Sau khi các tế bào đã nuôi cấy được hấp thụ bằng cách sử dụng bộ lọc sợi thủy tinh và làm khô ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ, tờ nháp nháy Melt-on (MeltLexTM A, Wallac) đã được đặt trên filtermat và được làm tan trong lò nhiệt độ không đổi trong từ 1 đến 4 phút. Kết quả của việc đo lường 3H TdR hấp thụ trong các tế bào bằng cách sử dụng máy đếm nháy nháy lỏng (Microbeta 1450, Tailux), đã khẳng định rằng giống *Bacillus licheniformis* CJMPB361 làm tăng sinh tế bào lympho. Do đó, sau khi tách chất nổi trên bề mặt dịch

nuôi cấy của chủng bằng trọng lượng phân tử, hoạt tính tăng sinh tế bào lympho đo được bằng phương pháp tương tự như được mô tả ở trên. Kết quả là, trong các phân trọng lượng phân tử là 1000 kDa hoặc nhiều hơn và 100 kDa đến 300 kDa, sự tăng sinh tế bào lá lách chuột là tuyệt vời như được thể hiện trong FIG. 3.

(2) Tế bào tủy xương và đáp ứng tăng sinh tế bào lympho tuyến ức

Khi phân lập tế bào tủy xương, cả hai đầu của xương đùi của chuột BALB/c được cắt bằng kéo, và một cây kim của ống tiêm 10ml được đổ đầy môi trường RPMI 1640 được đưa vào đầu bị cắt, do đó tách ra tế bào tủy xương. Ngoài ra, việc phân lập tế bào tuyến ức được thực hiện bằng phương pháp tương tự như trong việc phân lập tế bào lá lách, do đó tách ra tế bào tuyến ức từ tuyến ức. Đáp ứng tăng sinh của tế bào tủy xương và tế bào tuyến ức được thực hiện bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong thử nghiệm đáp ứng tăng sinh của tế bào lá lách.

Kết quả là, các phân chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 có trọng lượng phân tử là 1000 kDa hoặc nhiều hơn và từ 100 kDa đến 300 kDa làm tăng sinh tế bào lympho lá lách và tế bào tủy xương, và đáp ứng tăng sinh không quan sát được trong tế bào tuyến ức. Do đó, đã khẳng định rằng các phân không ảnh hưởng đến sự tăng sinh các tế bào T (FIG. 4).

(3) Tác dụng *in-vitro* trên tế bào lá lách của chuột

Để xác định rằng phần nguyên liệu nào có khả năng tạo ra đáp ứng tăng sinh của tế bào lá lách trong số các phân chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 được tách bởi trọng lượng phân tử, thì các tế bào B và các tế bào không phải B được tách khỏi tế bào lympho lá lách của chuột. Tỷ lệ chung giữa các tế bào T, tế bào B, các tế bào không phải T, và các tế bào không phải B trong tế bào lá lách của chuột bình thường được phân tích và nghiên cứu, và kết quả được trình bày trong Bảng 4. Các tế bào B được phân lập từ tế bào lympho lá lách bằng cách sử dụng phương pháp chọn lọc tế bào từ tính và phân tích bằng cách sử dụng FACS. Kết quả là, tỷ lệ của tế bào T, tế bào B, và tế bào không phải B và không

phải T tương ứng là 0,1%, 94,6%, và 4,7%, để các tế bào B phân lập có độ tinh khiết cao đáng kể. Ngoài ra, tỷ lệ của tế bào T, tế bào B, tế bào không phải B và không phải T trong các tế bào không phải B khác thu được bằng cách tách các tế bào B từ tế bào lympho lá lách tương ứng là 46,8%, 22,3%, và 27% (Bảng 4).

[Bảng 4]

	Trước khi phân lập (%)	Tế bào B được phân lập (%)	Tế bào không phải B được phân lập (%)
Tế bào T	23,2	0,1	46,8
Tế bào T & B	2,7	0,6	4
Tế bào B	58,8	94,6	22,3
Tế bào không phải T & B	15,3	4,7	27

Thêm ba phần chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 có các trọng lượng phân tử khác nhau vào các tế bào B và các tế bào không phải B được phân lập, và được nuôi cấy bằng phương pháp tương tự như trong đáp ứng tăng sinh của tế bào lá lách. Kết quả là, trong các phần có trọng lượng phân tử là 1000 kDa hoặc nhiều hơn và nằm trong từ 100 kDa đến 300 kDa, đáp ứng tăng sinh của các tế bào B được quan sát như được trình bày trong FIG. 5. Ngoài ra, đáp ứng tăng sinh của các tế bào không phải T và không phải B đã tăng lên. Tác dụng tăng sinh cao hơn với phần trọng lượng phân tử là 1000 kDa hoặc nhiều hơn (FIG. 5).

(4) Hiệu quả *in-vivo* trên tế bào B lá lách của chuột

Để xác định hiệu quả *in-vivo* của vật liệu tăng cường miễn dịch trên sự tăng sinh tế bào lympho và tế bào tủy xương của chuột, và đáp ứng miễn dịch, một phần chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 có trọng lượng phân tử là 1000 kDa hoặc nhiều hơn được dùng vào khoang bụng của chuột. Sau khi dùng 2 và 3 ngày, chuột bị giết và sau đó lá lách được tách ra. Đo trọng lượng của lá lách được phân lập, và đo sự thay đổi số lượng tế bào lympho lá lách bằng cách sử dụng FACS. Trong trường hợp dùng 0,67mg, 1,35 mg, 2,7 mg, và 5,4

mg vật liệu tăng cường miễn dịch vào khoang bụng của chuột, kích thước của lá lách đã tăng lên tương ứng 15%, 20%, 98%, và 51%. Trong phân tích FACS của tế bào lympho lá lách, thì trong nhóm dùng 0,67mg không có sự thay đổi tỷ lệ của các tế bào B. Tuy nhiên, trong nhóm dùng 1,35mg, tỷ lệ của các tế bào B tăng từ 41% đến 45,3%, trong nhóm dùng 2,7mg, tỷ lệ của các tế bào B tăng đến 47,6%, và trong nhóm dùng 5,4mg, tỷ lệ của các tế bào B được tăng lên đến 49,7%. Do đó, các tế bào B đã tăng sinh phụ thuộc vào nồng độ của phân có trọng lượng phân tử là 1000 kDa hoặc nhiều hơn (FIG. 6).

(5) Hiệu quả hỗ trợ tăng sản xuất kháng thể

Đã được nghiên cứu rằng liệu có hay không phần chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (1000 kDa hoặc nhiều hơn) có chức năng như chất phụ tạo ra kháng thể chống lại kháng nguyên. Các chuột BALB/c được chia thành ba nhóm, và ovalbumin (OVA) và phần chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (1000 kDa hoặc nhiều hơn) được dùng như sau. Trong nhóm A, nước muối sinh lý tự nhiên được tiêm dưới da, trong nhóm B, 100µg OVA được tiêm vào dưới da lưng của các chuột, và trong nhóm C, sau khi tiêm dưới da 100µg OVA và lưng của các chuột, phần chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (1000 kDa hoặc nhiều hơn) được tiêm vào khoang bụng mỗi ngày tiếp theo. 100µg (1mg/ml) OVA, là kháng nguyên trong đáp ứng miễn dịch, được tiêm dưới da vào các chuột và 100µl (2,7mg) phần chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng (1000 kDa hoặc nhiều hơn) được tiêm vào khoang bụng. Để đo kháng thể, sau khi kết thúc tiêm 3 ngày, máu được lấy từ tĩnh mạch chủ dưới của các chuột và huyết thanh được phân lập, và đo kháng thể đặc hiệu với OVA bằng phương pháp thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA). Đầu tiên, OVA được pha loãng ở nồng độ là 2µg/ml trong dung dịch đệm bao (0,03M Na₂CO₃, 0,068M NaHCO₃, pH9,4~9,8), được thêm vào đĩa 96 lỗ với lượng 100µl, và được cho phản ứng ở 4°C

trong 15 giờ. Đĩa được rửa bằng nước muối đệm phosphat (dung dịch đệm rửa) chứa Tween 20 0,1% ba lần. Đĩa đã rửa được cho phản ứng trong 1 giờ bằng cách sử dụng dung dịch chứa albumin huyết thanh bò 1% để ngăn cản liên kết không đặc hiệu. Sau khi rửa đĩa bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa 5 lần, huyết thanh đã được bào chế của chuột được pha loãng hàng loạt và thêm vào đó, và tiếp theo bằng phản ứng trong 2 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, đĩa được rửa bằng dung dịch đệm rửa 5 lần. Sau đó, kháng thể thứ hai (dạng liên hợp peroxidaza của globulin miễn dịch đa hóa trị kháng chuột dê) được pha loãng và thêm vào, tiếp theo bằng phản ứng trong 1 giờ. Đĩa được rửa 5 lần và cơ chất TMB được thêm vào đó. Sau khi tạo màu trong 30 phút, dung dịch H_2SO_4 0,12M được đặt vào đó để dừng phản ứng, và đo độ hấp thụ ở bước sóng 450nm.

Như được thể hiện trong FIG. 7, trong mẫu chứng được xử lý chỉ với dung dịch muối đẳng trương, thì không đo được kháng thể đặc hiệu với OVA, và nhóm được xử lý với OVA, thì tạo ra kháng thể đặc hiệu với IBA, nhưng độ chuẩn kháng thể thấp. Đã xác nhận rằng trong nhóm được điều trị bằng cả OVA và phân chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng (1000 kDa hoặc nhiều hơn), thì độ chuẩn kháng thể tăng đáng kể so với nhóm được xử lý chỉ với OVA. Do đó, có nghĩa là phân chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng phân lập (1000 kDa hoặc nhiều hơn) theo sáng chế có hiệu quả hỗ trợ trên việc sản xuất kháng thể chống lại kháng nguyên.

(6) Hiệu quả tăng sinh tế bào sau khi cấy ghép tủy xương

Dựa vào thực tế là phân chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (1000 kDa hoặc nhiều hơn) làm tăng đáp ứng tăng sinh của tế bào tủy xương và các tế bào không phải T và không phải B lá lách cũng như các tế bào B, đã đánh giá được liệu có hay không sự tăng sinh tế bào tủy xương được cấy ghép trong chuột bị chiếu tia xạ bởi vật liệu miễn dịch này. Để làm hỏng tế bào tủy xương của chuột, chuột được chiếu xạ. Để nghiên cứu liều chiếu xạ gama coban tối thiểu có khả năng giết chuột bình thường trong 10 ngày, thì sau đó các chuột được

chiếu xạ với liều chiếu xạ là 7,5, 9, 10, và 12 Gy, và so sánh tỷ lệ sống sót. Đã thể hiện rằng trong trường hợp chiếu xạ với 7,5 Gy, cuộc đời trung bình nằm trong khoảng từ 9 đến 10 ngày, trong trường hợp chiếu xạ với 9 Gy, cuộc đời trung bình nằm trong khoảng từ 8 đến 9 ngày, trong trường hợp chiếu xạ với 10 Gy, cuộc đời trung bình là 7 ngày, và trong trường hợp chiếu xạ với 12 Gy, cuộc đời trung bình là 6 ngày. Dựa vào kết quả nêu trên, tế bào tủy xương gây dị ứng được cấy ghép vào chuột được chiếu xạ, và phân chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng phân lập (1000 kDa hoặc nhiều hơn) được dùng hoặc không được dùng tại đó. Sau đó, so sánh tỷ lệ sống sót. Các chuột BALB/c được chiếu xạ với 7,5 Gy hoặc 9 Gy, và chuột được chiếu xạ được chia thành ba nhóm. Trong Nhóm 1, dung dịch muối đẳng trương được dùng, và trong Nhóm 2, tế bào tủy xương gây dị ứng (1×10^7 tế bào/chuột) thu được từ chuột bình thường được cấy ghép. Trong Nhóm 3, tế bào tủy xương gây dị ứng được cấy ghép bằng phương pháp tương tự, và 2,7mg phân chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng (1000 kDa hoặc nhiều hơn) được dùng vào khoang bụng. Cả dung dịch muối đẳng trương và tế bào tủy xương được dùng vào tĩnh mạch đuôi chuột, và phân chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng (1000 kDa hoặc nhiều hơn) được dùng vào khoang bụng. Việc dùng như nêu trên hoàn toàn được thực hiện trong vòng 2 giờ sau khi chiếu xạ. Tỷ lệ sống sót của các chuột sau khi thí nghiệm đã được quan sát trong 30 ngày. Như được thể hiện trong FIG. 8A, trong số các chuột được chiếu xạ với 7,5 Gy, trong nhóm trong đó dung dịch muối đẳng trương được dùng, tất cả các chuột chết trong vòng từ 8 đến 11 ngày. Trong nhóm trong đó chỉ tế bào tủy xương được cấy ghép, tỷ lệ sống sót là 66%. Ngược lại, nhóm được điều trị bằng cả tế bào tủy xương và phân chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng (1000 kDa hoặc nhiều hơn), tỷ lệ sống sót là 100% (FIG. 8A). Trong khi đó, trong trường hợp trong đó liều chiếu xạ được tăng lên đến 9 Gy, trong nhóm trong đó chỉ dùng dung dịch muối đẳng trương, thì tất cả các chuột chết trong vòng từ 6 đến 9 ngày, và trong nhóm trong đó chỉ tế bào tủy xương được cấy ghép, tỷ lệ sống sót là 33%. Tuy nhiên, trong nhóm trong đó phân

chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng (1000 kDa hoặc nhiều hơn) được dùng với tế bào tủy xương được cấy ghép, tỷ lệ sống sót là 66% (FIG. 8B). Trong trường hợp các chuột sống sót cho đến 13 ngày sau đó, tất cả chúng còn sống trong 30 ngày, và mất khoảng 12 ngày để đạt đến trọng lượng bình thường. Lý do của kết quả như được nêu trên đó là phần chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của chủng phân lập (1000 kDa hoặc nhiều hơn) làm tăng sinh tế bào tủy xương được cấy ghép để làm tăng tỷ lệ sống sót của chuột được chiếu xạ. Do đó, tác nhân tăng cường miễn dịch hoặc tá được vacxin theo sáng chế có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng tăng sinh tế bào tủy xương được cấy ghép ở bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu.

Theo sáng chế, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 mới có thể có hiệu quả tuyệt vời tạo ra các enzym tiêu hóa như amylaza, xenlulaza, mananaza, và xylanaza và axit lactic, hiệu quả tăng cường miễn dịch tuyệt vời, hiệu quả hỗ trợ tuyệt vời để đẩy mạnh sản xuất kháng thể ở động vật, và hiệu quả cảm ứng để tăng cường đáp ứng tăng sinh tế bào tủy xương được cấy ghép ở bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu. Do đó, chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 được phân lập mới có thể được sử dụng như tác nhân tăng cường miễn dịch cho động vật và tá được vacxin cũng như chế phẩm probiotic.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 tạo ra một hoặc nhiều enzym tiêu hóa trong số xenluloza, amylaza, xylaza và manaza và axit lactic, và có hoạt tính tăng cường miễn dịch, được lưu giữ bởi số truy cập KCCM11269P.
2. Sản phẩm nuôi cấy của chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 là một trong nhiều sản phẩm được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch nuôi cấy chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (số truy cập KCCM11269P), dung dịch cô đặc của nó, và vật liệu khô từ đó.
3. Chế phẩm probiotic chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (số truy cập KCCM11269P) theo điểm 1 hoặc sản phẩm nuôi cấy theo điểm 2.
4. Chất phụ gia thức ăn gia súc chứa chế phẩm probiotic theo điểm 3.
5. Chất phụ gia thức ăn gia súc theo điểm 4, trong đó chất này ở dạng được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch được cô đặc cao (từ 20 đến 90%), bột, và hạt.
6. Thức ăn gia súc chứa chất phụ gia thức ăn gia súc theo điểm 4.
7. Tá dược để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh suy giảm miễn dịch chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (số truy cập KCCM11269P), dung dịch nuôi cấy nó, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ đó, hoặc chứa chế phẩm probiotic chứa *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (số truy cập KCCM11269P), dung dịch nuôi cấy nó, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ đó làm hoạt chất.

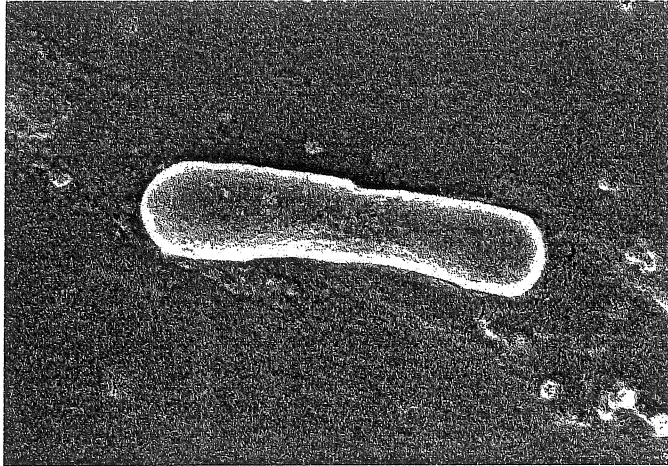
8. Tá dược để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh suy giảm miễn dịch theo điểm 7, trong đó chứa *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (số truy nhập KCCM11269P), dung dịch nuôi cấy nó, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ nó chứa phần có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 100 đến 300 kDa hoặc 1000 kDa hoặc nhiều hơn, có hoạt tính tăng cường miễn dịch.

9. Thực phẩm chức năng dành cho sức khỏe để tăng cường hệ miễn dịch chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (số truy nhập KCCM11269P), dung dịch nuôi cấy của nó, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ đó, hoặc chứa chế phẩm probiotic chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (số truy nhập KCCM11269P), dung dịch nuôi cấy của nó, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ nó.

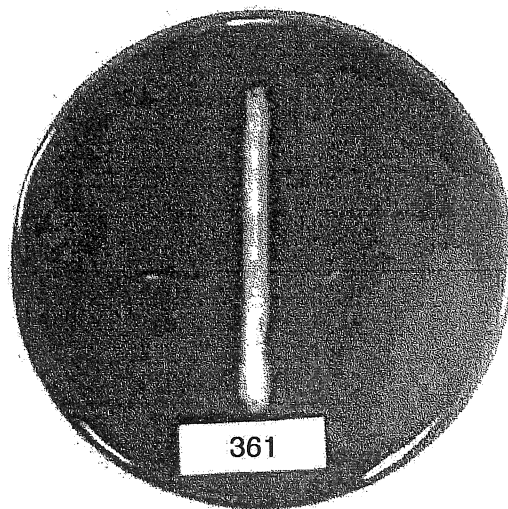
10. Thực phẩm chức năng dành cho sức khỏe theo điểm 9, trong đó thực phẩm này ở dạng được chọn từ nhóm bao gồm bột, hạt, viên nén, viên nang, và đồ uống.

11. Tá dược vacxin chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (số truy nhập KCCM11269P), dung dịch nuôi cấy của nó, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ đó, hoặc chứa chế phẩm probiotic chứa chủng *Bacillus licheniformis* CJMPB361 (số truy nhập KCCM11269P), dung dịch nuôi cấy của nó, dung dịch cô đặc của nó, hoặc vật liệu khô từ đó làm hoạt chất.

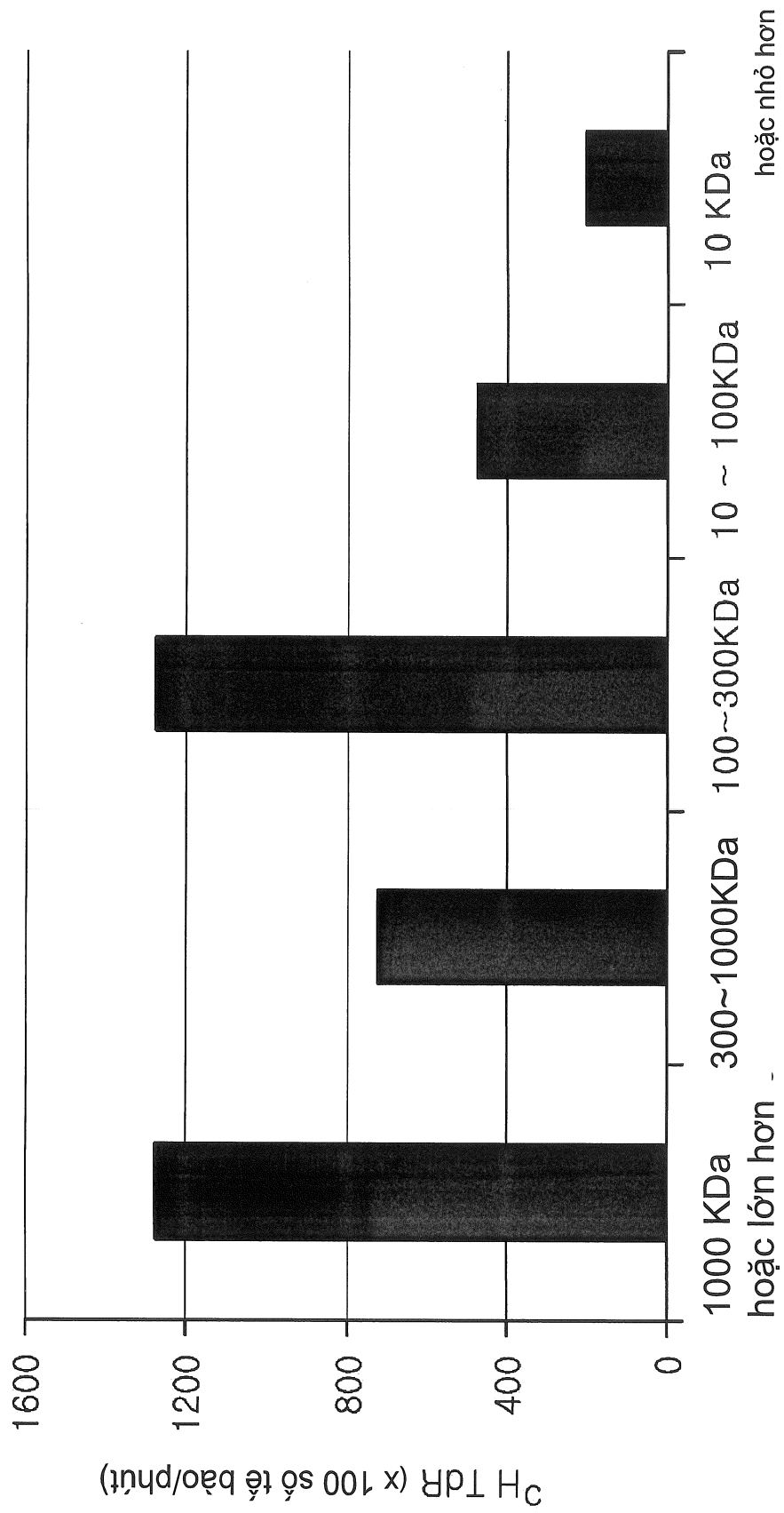
[FIG. 1]



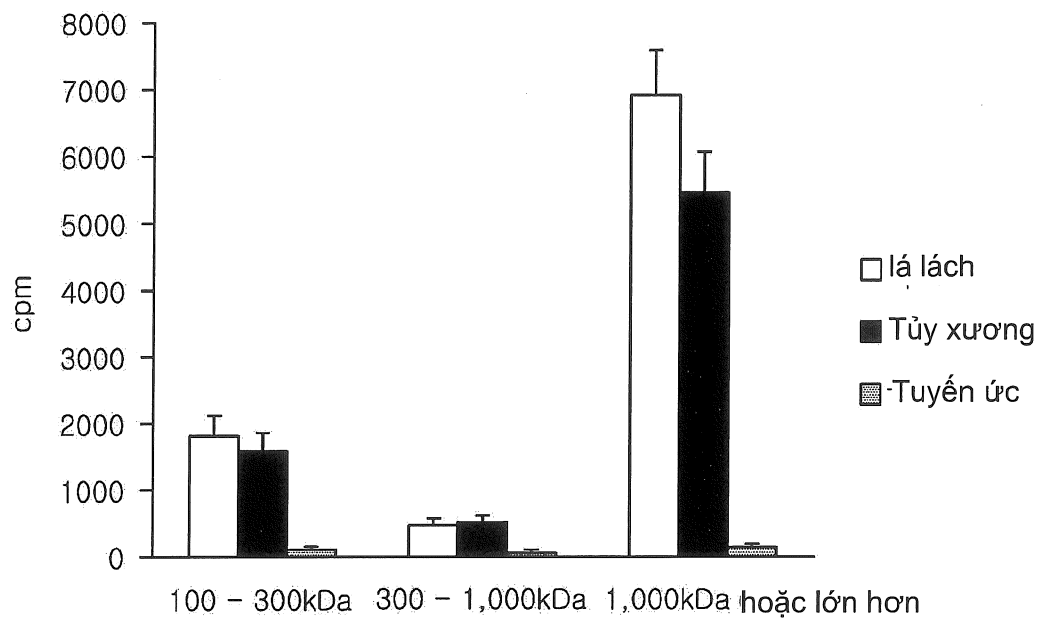
[FIG. 2]



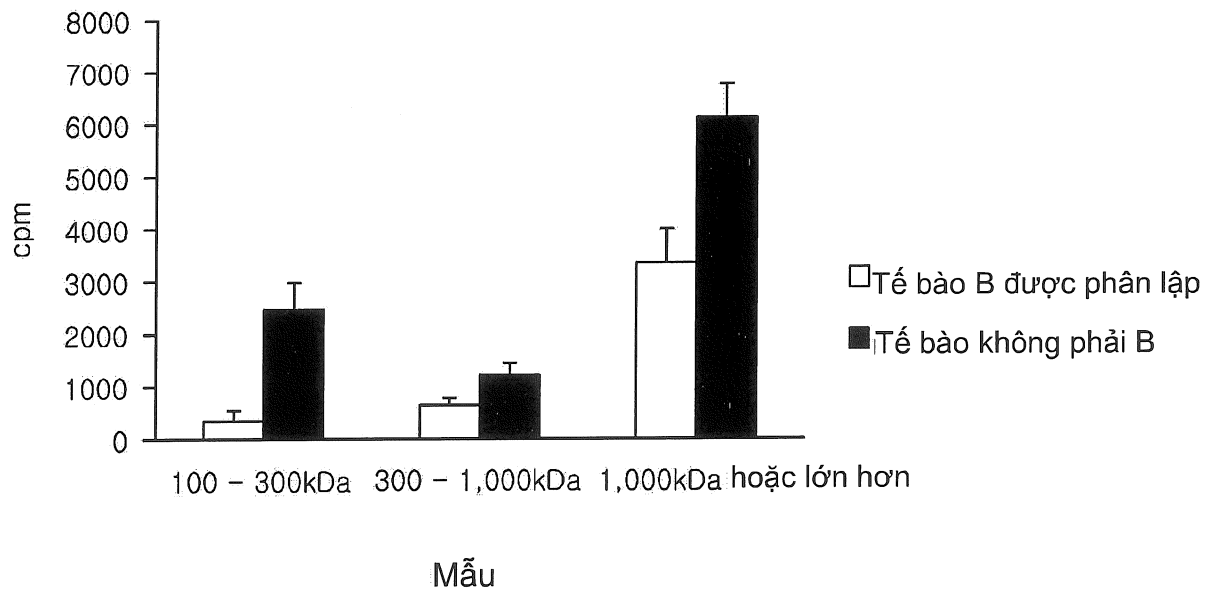
[FIG. 3]



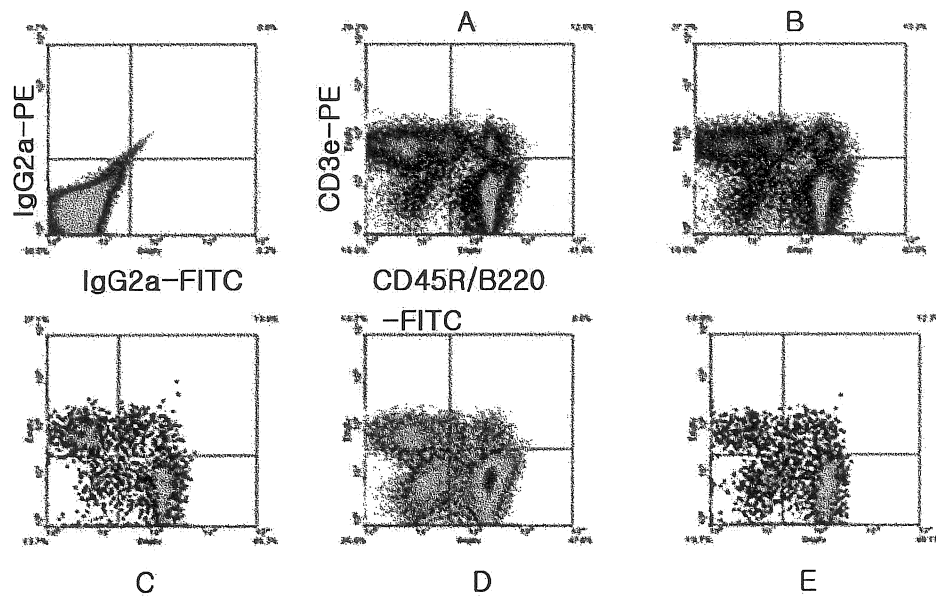
[FIG. 4]



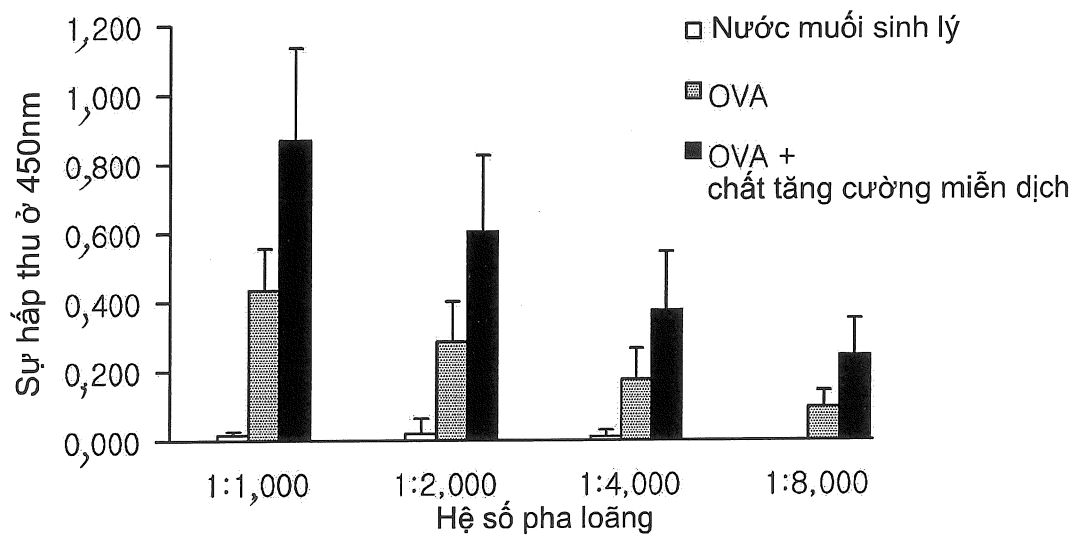
[FIG. 5]



[FIG. 6]



[FIG. 7]



[FIG.8]

