



(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)



1-0029444

(51)⁸ A61K 35/747

(13) B

(21) 1-2017-05235

(22) 29/06/2016

(86) PCT/EP2016/065074 29/06/2016

(87) WO/2017/001440 05/01/2017

(30) EP15174222.8 29/06/2015 EP

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/06/2018 363A

(73) FERRING B.V. (NL)

Polaris Avenue 144, 2132 JX Hoofddorp, Netherlands

(72) CHENOLL CUADROS, Maria, Empar (ES); CASINOS RAMO, Beatriz (ES);

SILVA ANGULO, ángela (CO); RAMON VIDAL, Daniel (ES); Genovés

MARTINEZ, Salvador (ES).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) VI KHUẨN LACTOBACILLUS RHAMNOSUS DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ VIÊM ÂM ĐẠO DO VI KHUẨN, CHẾ PHẨM ĂN KIÊNG VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA VI KHUẨN NÀY, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CHỦNG ĐỘT BIẾN CỦA VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi khuẩn axit lactic *Lactobacillus rhamnosus* thích hợp để điều trị, ví dụ, viêm âm đạo do vi khuẩn. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm ăn kiêng và dược phẩm chứa vi khuẩn này, và phương pháp tạo ra chủng đột biến của vi khuẩn này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi khuẩn axit lactic *Lactobacillus rhamnosus* thích hợp để điều trị, ví dụ, viêm âm đạo do vi khuẩn. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm ăn kiêng và dược phẩm chứa vi khuẩn này, và phương pháp tạo ra chủng đột biến của vi khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Viêm âm đạo do vi khuẩn (bacterial vaginosis: BV) là một trong số các rối loạn phổ biến nhất ở phụ nữ trong độ tuổi sinh sản. Theo trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ (US Centers for Disease Control and Prevention: CDC), các yếu tố nguy cơ mắc bệnh BV bao gồm thụt rửa và có bạn tình mới hoặc có nhiều bạn tình. BV do sự thiếu cân bằng hệ vi khuẩn có trong tự nhiên gây ra và có thể được đặc trưng về mặt vi sinh vật bởi sự thay thế hệ vi khuẩn ở âm đạo chiếm ưu thế là *Lactobacillus* bằng vi khuẩn âm đạo gây bệnh tiềm ẩn. Sự thay đổi từ hệ vi khuẩn chiếm ưu thế là *Lactobacillus* tạo ra H₂O₂ và axit lactic có lợi cho sức khỏe thành hệ vi khuẩn nhiều loài phức hợp có thể xảy ra tương đối nhanh chóng và gây ra BV.

Như được bàn luận trong Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP0257007 chẳng hạn (nộp đơn năm 1987) – đã biết từ lâu rằng viêm âm đạo do vi khuẩn (BV) do sự tăng độ pH (từ độ pH tiêu chuẩn/có lợi cho sức khỏe ở mức khoảng 4 đến độ pH cao hơn 4,5) và sự rối loạn hệ vi sinh vật đường ruột trong đó thường là hệ vi sinh vật ở âm đạo *Lactobacillus* chiếm ưu thế bị lấn át bởi sự sinh trưởng quá mức của các sinh vật kỵ khí chiếm ưu thế.

Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP2509610B1 (HSO Health Care, Vienna – nộp đơn ngày 13 tháng 09 năm 2011 và công bố/cấp bằng độc quyền sáng chế năm 2013) mô tả tóm tắt về giải pháp kỹ thuật đã biết có liên quan trong bản mô tả này.

Như được bàn luận trong Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP2509610B1 – âm đạo của người khỏe mạnh được chiếm ưu thế bởi nhiều loài vi khuẩn

Lactobacillus, đóng vai trò thiết yếu trong việc bảo vệ phụ nữ không bị nhiễm khuẩn niệu sinh dục. *Lactobacillus* có khả năng dính bám vào biểu mô âm đạo, để ngăn chặn sự dính bám và sinh trưởng của các tác nhân gây bệnh, theo cách khác làm cạn kiệt các chất dinh dưỡng khả dụng đối với các tác nhân gây bệnh và điều biến đáp ứng miễn dịch của vật chủ và vi môi trường. Quan trọng nhất là *Lactobacillus* chuyển hoá glycogen có trong tế bào của vòm âm đạo, tạo ra axit lactic là sản phẩm cuối. Do đó, trong âm đạo khoẻ mạnh, giá trị độ pH đạt mức khoảng 4,0 mà khi đó nhiều tác nhân gây bệnh không thể phát triển.

Khi được sử dụng cho phụ nữ ở dạng dược phẩm (ví dụ, viên nang đặt âm đạo để sử dụng qua đường âm đạo) – tác dụng bảo vệ của *Lactobacillus* chống lại các tác nhân gây bệnh tiềm ẩn trong âm đạo được tạo ra thông qua hoạt tính chuyển hoá của *Lactobacillus*. Vi khuẩn này sử dụng glycogen và các nguồn glucoza khác và sản sinh ra axit lactic. Độ pH thấp được tạo ra theo cách này gây hại cho vi khuẩn và nấm ít được mong muốn và do đó bảo vệ niêm mạc âm đạo kháng lại sự nhiễm khuẩn.

Do sự nhiễm khuẩn âm đạo là cơ chế quan trọng của bệnh gây sinh non, việc duy trì sự cân bằng sức khoẻ tự nhiên của hệ vi sinh vật *Lactobacillus* trong âm đạo là đặc biệt quan trọng trong thời kỳ mang thai. Sự thiếu hụt *Lactobacillus* có thể làm đảo lộn sự cân bằng vi sinh vật trong âm đạo, thường dẫn đến hội chứng viêm âm đạo do vi khuẩn, điều này có thể liên quan đến sự thay đổi về số lượng và chất lượng so với *Lactobacillus* có trong tự nhiên đến hệ vi sinh vật hỗn hợp mà vi khuẩn kỵ khí chiếm ưu thế. Theo giải pháp kỹ thuật đã biết, viêm âm đạo do vi khuẩn có thể có đặc điểm là sự mất hoàn toàn vi khuẩn *Lactobacillus* và đồng thời gia tăng các que Gram dương và Gram âm, trong số chúng chủ yếu là các loài *Gardnerella vaginalis* cũng như *Bacteroides*, *Prevotella* và *Mobiluncus*. Tuy nhiên, sự mất vi khuẩn *Lactobacillus* âm đạo cũng khiến cho phụ nữ không mang thai dễ bị nhiễm khuẩn, điều này có thể dẫn đến viêm nội mạc tử cung hoặc thậm chí bệnh viêm khung xương chậu.

Trong thời kỳ mãn kinh, xuất hiện sự thoái triển đường sinh dục nữ, điều này phản ánh khả năng tuổi thọ trung bình sinh học có thể có tương quan với trục nội tiết tuyến yên thần kinh. Sự thay đổi phổ biến chính là sự teo âm đạo. Tình trạng khô, nóng, ngứa âm đạo và chứng giao hợp đau là các triệu chứng thường xuyên cùng với chứng khó tiểu tiện, tiểu nhiều lần và sự nhiễm khuẩn tái phát. Chứng teo cơ quan sinh dục-niệu sau thời kỳ mãn kinh có liên quan đến sự suy giảm tiết estrogen do sự cạn

kiệt *Lactobacillus* và mức độ tạo khuẩn lạc bởi các vi sinh vật gây bệnh có liên quan đến viêm âm đạo do vi khuẩn và nhiễm khuẩn đường tiết niệu gia tăng. Ở phụ nữ sau mãn kinh, liệu pháp điều trị estriol âm đạo làm giảm mức độ tạo khuẩn lạc *Escherichia coli* và làm gia tăng số lượng *Lactobacillus*, với kết quả là tỷ lệ mắc các bệnh nhiễm khuẩn đường tiết niệu và đường sinh dục tái phát giảm một cách đáng kể.

Một vài loài *Lactobacillus* đã được mô tả là cư trú ở âm đạo với mức độ thay đổi. Trong thời gian nhất định, chắc chắn là hệ vi sinh vật ở phụ nữ khỏe mạnh trong độ tuổi sinh sản được chiếm ưu thế bởi *L. acidophilus* và *L. fermentum*, sau đó là *L. brevis*, *L. jensenii* và *L. casei*. Trong nghiên cứu khác về hệ vi sinh vật *Lactobacillus* ở âm đạo, các tác giả đã phát hiện được rằng các vi sinh vật ở âm đạo tham gia nhiều nhất được chiếm ưu thế bởi các loài *Lactobacillus* đơn lẻ, với sự có mặt của các loài khác có tính biến dị riêng rẽ rộng. Các loài xuất hiện thường xuyên nhất là *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, và *L. jensenii*. Trong nghiên cứu khác, các chủng *Lactobacillus* được phân lập phổ biến nhất là *L. jensenii*, *L. acidophilus*, *L. casei*, và *L. gasseri*. Trong các nghiên cứu gần đây ở Áo, các loài *Lactobacillus* chiếm ưu thế được nhận biết bởi phản ứng PCR đặc hiệu loài, cụ thể là *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* và *L. rhamnosus* được sử dụng để tạo ra các dấu vân tay ADN. *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* và *L. rhamnosus* có thể được cho là các loài chiếm ưu thế trong âm đạo.

Để khắc phục sự thiếu hụt về hệ vi sinh vật *Lactobacillus* (và do đó, khắc phục khả năng bảo vệ của hệ vi sinh vật ở âm đạo), việc sử dụng thuốc đạn đặt âm đạo chứa *Lactobacillus* là cách phổ biến nhất để thay thế *Lactobacillus*. Một số tác giả tin rằng việc sử dụng *Lactobacilli* qua đường khu trú là cách điều trị an toàn và có triển vọng để ngăn ngừa viêm âm đạo và nhiễm khuẩn đường tiết niệu tái phát.

Trong khi sản phẩm bổ sung cho âm đạo đã được chấp nhận một cách rộng rãi trên thực tế từ lâu để thay thế *Lactobacillus*, việc dùng qua đường miệng được phẩm chứa *Lactobacillus* là một khái niệm mới để tái tạo hệ vi sinh vật ở âm đạo bình thường. Các kết quả tương đối gần đây cho thấy rằng các chủng vi khuẩn có lợi *L. rhamnosus* GR-1 (ATCC 55826) và *L. reuteri* RC-14 (ATCC 55845) có thể được dùng qua đường miệng trên cơ sở hàng ngày trong hai tháng mà không có tác dụng phụ bất kỳ. Việc sử dụng này tạo ra sự cải thiện đáng kể sau đó của hệ vi sinh vật âm đạo khi tính đến sự có mặt của *Lactobacillus* gia tăng và sự có mặt của nấm men và vi khuẩn dạng coli giảm. Trong khi một nhóm tác giả đã bàn luận về hiệu quả có lợi khi tính

đến sự thay đổi về tính miễn dịch niêm mạc hoặc vi khuẩn có lợi di chuyển đến âm đạo từ vùng trực tràng, gần đây nhóm tác giả khác đã chứng minh bằng cách khuếch đại PCR đặc hiệu loài rằng *L. rhamnosus* GR-1 và *L. reuteri* RC-14 có thể được phân phối đến môi trường âm đạo khi được dùng qua đường miệng.

Theo giải pháp kỹ đã biết được trình bày trên đây-sáng chế như được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP2509610B1 đề cập đến việc sử dụng tổ hợp của các chủng được lưu trữ đặc hiệu *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *L. jensenii* và/hoặc *L. gasseri* để điều trị viêm âm đạo do vi khuẩn (BV). Trong Bảng 11 ở trang 15 đã cho thấy rằng *L. rhamnosus* đã lưu trữ (DS 22560) có khả năng, ví dụ, làm giảm độ pH tương đối tốt.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được sáng chế giải quyết là tạo ra chủng *Lactobacillus rhamnosus* mới có các đặc tính tốt, cụ thể là liên quan đến việc điều trị nhiễm khuẩn âm đạo và cơ quan sinh dục nữ và nhiễm khuẩn niệu sinh dục và/hoặc nhiễm khuẩn đường tiết niệu do sự thiếu hụt *Lactobacillus* gây ra (ví dụ như viêm âm đạo do vi khuẩn).

Như có thể thấy rõ trong các ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây của bản mô tả này, các ví dụ này mô tả chủng *L. rhamnosus* mới có số đăng ký CECT 8800 (còn được gọi ở đây là BPL005) có số lượng tốt/được cải thiện cụ thể là liên quan đến việc điều trị, ví dụ, viêm âm đạo do vi khuẩn.

Các kết quả của ví dụ thực hiện sáng chế 1 trong bản mô tả này đã chứng minh các đặc điểm có lợi liên quan của chủng CECT 8800 (=BPL005) *L. rhamnosus* được phân lập như sau:

- 1: Chủng này được phân lập *de novo* từ các thể phân lập từ âm đạo của phụ nữ khỏe mạnh-nghĩa là rõ ràng không có lý do gì để cho rằng chủng này không phải là chủng mới;
- 2: Profin ADN dạng đa hình được khuếch đại ngẫu nhiên (Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD) đã chứng minh rằng chủng này khác với các chủng khác và việc giải trình tự ARN ribosom 16S đã cho thấy rằng BPL005 là một chủng *L. rhamnosus* duy nhất;
- 3: BPL005 có khả năng làm giảm độ pH tốt nhất trong số các chủng được phân lập từ âm đạo;

- 4: Trong các thử nghiệm mà không có sự kiểm soát độ pH, BPL005 có tác dụng làm giảm độ pH nhanh chóng. Sự sản sinh ra axit lactic nhanh chóng trong trường hợp chủng BPL005 này là phù hợp với khả năng làm giảm độ pH của nó rất tốt trong thời gian ngắn. Liên quan đến sự sản sinh ra các axit còn lại, chủng BPL005 là chủng sản sinh tốt nhất trong số các chủng thử nghiệm;
- 5: Liên quan đến sự kháng lại các sản phẩm có bán trên thị trường dùng trong phụ khoa - chủng BPL005 có sự kháng lại với nồng độ cao nhất được thử nghiệm và không quan sát được sự ức chế nào;
- 6: Việc giải trình tự hệ gen của toàn bộ hệ gen của chủng BPL005 đã cho thấy rằng nó có độ tiếp cận duy nhất 3,023Mb – nghĩa là trình tự hệ gen này không phải là trình tự đã được mô tả trong các giải pháp kỹ thuật đã biết.

Như đã trình bày trên đây – đã biết từ lâu rằng viêm âm đạo do vi khuẩn (BV) là do sự gia tăng độ pH (từ độ pH tiêu chuẩn/có lợi cho sức khoẻ ở mức khoảng 4 đến độ pH cao hơn 4,5) và sự rối loạn hệ vi sinh vật đường ruột mà trong đó hệ vi sinh vật âm đạo *Lactobacillus* thường chiếm ưu thế bị lấn át bởi sự sinh trưởng quá mức của các sinh vật kỵ khí chiếm ưu thế.

Do đó, sự kiện chủng CECT 8800 (=BPL005) *L. rhamnosus* mới được mô tả trong bản mô tả này có khả năng làm giảm độ pH rất tốt là điều quan trọng liên quan đến việc sử dụng chủng này để điều trị, ví dụ, viêm âm đạo do vi khuẩn.

Nói ngắn gọn và không bị ràng buộc về mặt lý thuyết – dựa vào các đặc tính tốt được mô tả trong bản mô tả này của chủng CECT 8800 (=BPL005) *L. rhamnosus* mới được mô tả ở đây, không có lý do gì để cho rằng chủng này sẽ không hữu ích để điều trị nhiễm khuẩn âm đạo và đường sinh dục nữ và nhiễm khuẩn niệu sinh dục và/hoặc nhiễm khuẩn đường tiết niệu do sự thiếu hụt *Lactobacillus* gây ra (như ví dụ viêm âm đạo do vi khuẩn).

Các kết quả của ví dụ thực hiện sáng chế 2 trong bản mô tả này đã cho thấy rằng chủng BPL005 có mức giảm độ pH tương tự so với các vi khuẩn có lợi tốt nhất được thử nghiệm trong số các sản phẩm chứa vi khuẩn có lợi dùng trong phụ khoa có bán trên thị trường thích hợp trong bản mô tả này.

Các kết quả của ví dụ thực hiện sáng chế 3 trong bản mô tả này đã cho thấy hiệu quả tốt của chủng BPL005 trong quá trình sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm (thể tích 1 lít) và dữ liệu của bột đông khô nhanh đã cho thấy rằng chủng BPL005 thu

được có tính ổn định tốt trong khoảng thời gian 15 tháng.

Các kết quả của ví dụ thực hiện sáng chế 4 trong bản mô tả này cho thấy hiệu quả tốt của chủng BPL005 trong quá trình sản xuất ở quy mô công nghiệp (thể tích 1500 lít) và dữ liệu của bột đông khô nhanh đã cho thấy rằng chủng BPL005 thu được có tính ổn định rất tốt.

Để có thể tạo ra sản phẩm có bán trên thị trường thích hợp trong bản mô tả này, hiển nhiên là có lợi nếu chủng *Lactobacillus* có thể được tạo ra theo cách thích hợp ở quy mô công nghiệp-do đó, ví dụ thực hiện sáng chế 4 trong bản mô tả này chúng minh các đặc tính có lợi khác của chủng CECT 8800 (=BPL005) *L. rhamnosus* mới được mô tả trong bản mô tả này.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến vi khuẩn axit lactic *L. rhamnosus* có số đăng ký CECT 8800 (còn được gọi ở đây là BPL005) hoặc thể đột biến của nó, trong đó chủng đột biến thu được bằng cách sử dụng chủng lưu trữ làm làm vật liệu ban đầu và trong đó thể đột biến này giữ lại được hoặc cải thiện thêm khả năng làm giảm độ pH của CECT 8800.

Theo khía cạnh thứ hai, chế sáng chế đề cập đến chế phẩm ăn kiêng hoặc được phẩm chứa vi khuẩn theo khía cạnh thứ nhất và/hoặc phương án được mô tả bất kỳ của nó trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "ăn kiêng" theo lĩnh vực này đề cập đến chế độ ăn hoặc sự điều chỉnh về lượng hấp thu đồ ăn hoặc thức ăn. Theo đó, chế phẩm ăn kiêng là chế phẩm thích hợp để được bổ sung vào sản phẩm đồ ăn dùng cho người hoặc sản phẩm thức ăn dùng cho vật nuôi.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến chế phẩm ăn kiêng hoặc được phẩm theo khía cạnh thứ hai và/hoặc phương án được mô tả bất kỳ của nó trong bản mô tả này, để sử dụng trong điều trị rối loạn ở phụ nữ, trong đó rối loạn này là sự thiếu cân bằng của hệ vi khuẩn ở âm đạo có trong tự nhiên, sự nhiễm khuẩn âm đạo, sự nhiễm khuẩn cơ quan sinh dục nữ, sự nhiễm khuẩn niệu sinh dục hoặc sự nhiễm khuẩn đường tiết niệu.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến sản phẩm làm từ sữa, sản phẩm đồ uống, sản phẩm đồ ăn để bổ sung chất dinh dưỡng cho người và/hoặc sản phẩm thức ăn để bổ sung chất dinh dưỡng cho vật nuôi, khác biệt ở chỗ, sản phẩm này chứa chế phẩm ăn kiêng theo khía cạnh thứ hai và/hoặc phương án được mô tả bất kỳ của nó

trong bản mô tả này.

Sáng chế theo các phương án của nó sẽ được mô tả dưới đây chỉ bằng cách ví dụ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chủng *Lactobacillus rhamnosus* mới

Mẫu của chủng *Lactobacillus rhamnosus* BPL005 mới đã được lưu trữ ở CECT (Coleccion Espariola de Cultivos Tipo) với số truy cập CECT 8800, ngày lưu trữ 15 tháng 12 năm 2014. Việc lưu trữ này được thực hiện theo các điều kiện của Hiệp ước Budapest đối với Ghi nhận quốc tế về lưu trữ giống vi sinh vật nhằm mục đích thực hiện sáng chế.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chủng mới được mô tả trong bản mô tả này hoặc "thể đột biến của nó".

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng bằng cách sử dụng chủng đã lưu trữ làm vật liệu ban đầu, dựa vào kỹ thuật phát sinh đột biến hoặc kỹ thuật phân lập lại thông thường, người đọc có kỹ năng trung bình có thể tạo ra các thể đột biến khác hoặc dẫn xuất của nó theo cách thông thường mà vẫn giữ lại các đặc điểm và ưu điểm thích hợp được mô tả trong bản mô tả này. Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, thuật ngữ "thể đột biến của nó" để chỉ các chủng đột biến thu được bằng cách sử dụng chủng đã lưu trữ làm vật liệu ban đầu.

Theo cách khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra chủng đột biến của vi khuẩn axit lactic *L. rhamnosus* có số đăng ký CECT 8800, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

- (i): tạo ra thể đột biến của vi khuẩn axit lactic *L. rhamnosus* có số đăng ký CECT 8800;
- (ii): phân tích các thể đột biến đã được tạo ra trong bước (i) và nhận biết chủng đột biến giữ lại được hoặc cải thiện thêm khả năng làm giảm độ pH của CECT 8800; và
- (iii) phân lập chủng đột biến đã được nhận biết trong bước (ii) nhờ đó thu được chủng đột biến của vi khuẩn axit lactic *L. rhamnosus* có số đăng ký CECT 8800, trong đó chủng đột biến này giữ lại được hoặc cải thiện thêm khả năng làm giảm độ pH của CECT 8800.

Tốt hơn là, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến vi khuẩn axit lactic *L. rhamnosus* có số đăng ký CECT 8800 (còn được gọi ở đây là BPL005).

Bài báo (Chenoll E, Codoner FM, Martinez-Blanch JF, Ramon D, Genoves S, Menabrito M. 2016. Complete genome sequence of *Lactobacillus rhamnosus* strain BPL5 (CECT 8800), a probiotic for treatment of bacterial vaginosis. *Genome Announc* 4(2):e00292-16. doi:10.1128/genomeA.00292-16. Copyright© 2016 Chenoll et al.) được công bố tháng 4 năm 2016-nghe là sau ngày ưu tiên 29 tháng 6 năm 2015 của Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP15174222.8 của đơn hiện tại.

Bài báo này bộc lộ trình tự hệ gen đầy đủ của vi khuẩn axit lactic *L. rhamnosus* có số đăng ký CECT 8800 của sáng chế.

Rõ ràng là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ tạo ra chủng đột biến CECT 8800 theo cách thông thường, thậm chí không cần phải có kiến thức về trình tự hệ gen – với trình tự mà việc này thậm chí dễ dàng hơn.

Chế phẩm ăn kiêng hoặc được phẩm – khía cạnh thứ hai của sáng chế

Như được trình bày trên đây- theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến chế phẩm ăn kiêng hoặc được phẩm chứa vi khuẩn theo khía cạnh thứ nhất và/hoặc phương án được mô tả bất kỳ của nó trong bản mô tả này.

Nói chung, chế phẩm ăn kiêng chứa chất bổ trợ và/hoặc tá dược chấp nhận được cho ăn kiêng hoặc dinh dưỡng.

Nói chung, được phẩm chứa chất bổ trợ và/hoặc tá dược được dụng.

Thông thường, chế phẩm chứa vi khuẩn ở dạng đã được cô đặc bao gồm các dạng cô đặc được đông lạnh, làm khô hoặc đông khô nhanh thường có nồng độ tế bào sống nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^{14} đơn vị tạo khuẩn lạc (colony forming unit: cfu) trong mỗi gam chế phẩm. Có thể tốt hơn nếu khoảng này nằm trong khoảng từ 10^6 đến 10^{14} cfu trong mỗi gam chế phẩm hoặc nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^{14} cfu trong mỗi gam chế phẩm. Khoảng thích hợp cũng có thể nằm trong khoảng từ 10^6 đến 10^{13} cfu trong mỗi gam chế phẩm.

Có thể tốt hơn nếu chế phẩm chứa vi khuẩn được sấy khô ở nhiệt độ thấp (được thể hiện theo cách khác là đông khô nhanh).

Chế phẩm có thể chứa các thành phần khác như chất bảo quản đông lạnh (ví dụ maltodextrin) và/hoặc các chất phụ gia thông thường bao gồm cả các chất dinh dưỡng như dịch chiết nấm men, đường và vitamin.

Tốt hơn nếu chế phẩm chứa vi khuẩn được sấy khô ở nhiệt độ thấp có chứa chất bảo quản đông lạnh thích hợp (ví dụ, maltodextrin).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng trong bản mô tả này – theo một số phương án, chế phẩm ăn kiêng hoặc được phẩm như được mô tả trong bản mô tả này sẽ chứa nhiều chủng thuộc cùng một loài hoặc thuộc các loài khác nhau. Ví dụ điển hình về tổ hợp hữu ích của vi khuẩn axit lactic trong chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là hỗn hợp của *Leuconostoc sp.* và một hoặc nhiều vi khuẩn *Lactococcus subsp.* như *Lc. lactis subsp. lactis*, *Lc. lactis subsp. cremoris* hoặc *Lc.s lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*.

Vi khuẩn cũng có thể là, ví dụ, *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *Lactobacillus jensenii* và/hoặc *L. gasseri*.

Dạng sử dụng của chế phẩm theo sáng chế thích hợp để sử dụng qua đường miệng hoặc sử dụng khu trú qua đường âm đạo có thể được ưu tiên. Theo một ví dụ, vi khuẩn có lợi để sử dụng cho phụ nữ có thể được dùng qua đường miệng ở dạng viên nang hoặc (được nạp vào túi) được tạo huyền phù trong đồ uống hoặc ở dạng sữa lên men (sữa chua). Khi được dùng qua đường miệng, chúng được cho là còn sống khi đi qua dạ dày và tá tràng (có tính ổn định nhất định đối với axit và dịch mật) và tạo khuẩn lạc một cách tạm thời trong ruột. Từ đó, một số lượng nhỏ vi khuẩn sẽ di chuyển đến âm đạo và (một lần nữa tạm thời) tạo khuẩn lạc ở niêm mạc âm đạo. Vi khuẩn có lợi cũng có thể được sử dụng theo cách thông thường dưới dạng viên nang hoặc thuốc đạn đặt âm đạo và được sử dụng trực tiếp vào âm đạo. Tác dụng bảo vệ của *Lactobacillus* kháng lại các tác nhân gây bệnh tiềm ẩn trong âm đạo được tạo ra nhờ hoạt tính chuyển hoá của *Lactobacillus*. Vi khuẩn này sử dụng glycogen và các nguồn glucoza khác và sản sinh ra axit lactic. Độ pH thấp được tạo ra theo cách này gây hại cho vi khuẩn và nấm ít được mong muốn và do đó bảo vệ niêm mạc âm đạo kháng lại sự nhiễm khuẩn. Do đó, chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng ở dạng thuốc đạn, viên nang đặt âm đạo để dùng qua đường âm đạo hoặc viên nang được bao, viên nén, túi, viên tròn, viên hạt nhỏ, lọ nhỏ để sử dụng qua đường miệng cũng như sữa chua, đồ uống sữa chua, sữa lên men, nước ép và các đồ uống và đồ ăn lên men khác.

Sử dụng để điều trị rối loạn ở phụ nữ – khía cạnh thứ ba của sáng chế

Như được trình bày trên đây – theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến chế phẩm ăn kiêng hoặc được phẩm theo khía cạnh thứ hai và/hoặc phương án đã được mô

tả bất kỳ của nó trong bản mô tả này, để sử dụng trong điều trị rối loạn ở phụ nữ, trong đó rối loạn này là sự thiếu cân bằng của hệ vi khuẩn ở âm đạo có trong tự nhiên, sự nhiễm khuẩn âm đạo, sự nhiễm khuẩn cơ quan sinh dục nữ, sự nhiễm khuẩn niệu sinh dục hoặc sự nhiễm khuẩn đường tiết niệu.

Trong bản mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng-liên quan đến rối loạn ở phụ nữ, ví dụ, chế phẩm ăn kiêng hoặc được phẩm như được mô tả trong bản mô tả này sẽ được sử dụng nhiều lần để phục hồi và/hoặc duy trì hệ vi khuẩn ở âm đạo có lợi cho sức khoẻ.

Theo cách khác, khía cạnh thứ ba có thể được đề xuất liên quan đến phương pháp điều trị rối loạn ở phụ nữ, trong đó rối loạn là sự thiếu cân bằng của hệ vi khuẩn ở âm đạo có trong tự nhiên, sự nhiễm khuẩn âm đạo, sự nhiễm khuẩn cơ quan sinh dục nữ, sự nhiễm khuẩn niệu sinh dục hoặc sự nhiễm khuẩn đường tiết niệu, ở phụ nữ, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho phụ nữ sử dụng lượng thích hợp của chế phẩm ăn kiêng hoặc được phẩm theo khía cạnh thứ hai và/hoặc phương án đã được mô tả bất kỳ của nó trong bản mô tả này.

Trong bản mô tả này, các ví dụ về rối loạn có liên quan là nhiễm khuẩn âm đạo, viêm âm đạo, nhiễm khuẩn âm đạo mạn tính, nhiễm nấm mạn tính, nhiễm khuẩn đường tiết niệu mạn tính trong thời kỳ mãn kinh, viêm âm đạo teo, nhiễm khuẩn âm đạo hoặc viêm âm đạo do vi khuẩn.

Theo phương án được ưu tiên, rối loạn ở phụ nữ là viêm âm đạo do vi khuẩn (BV).

Ngoài ra, được phẩm theo sáng chế là đặc biệt thích hợp để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa viêm âm đạo do vi khuẩn không có triệu chứng và tái phát trong thời kỳ mang thai hoặc sinh non do viêm âm đạo do vi khuẩn gây ra.

Sản phẩm làm từ sữa, sản phẩm đồ uống, sản phẩm đồ ăn v.v – khía cạnh thứ tư của sáng chế

Như được trình bày trên đây – theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến sản phẩm làm từ sữa, sản phẩm đồ uống, sản phẩm đồ ăn để bổ sung chất dinh dưỡng cho người và/hoặc sản phẩm thức ăn để bổ sung chất dinh dưỡng cho vật nuôi khác biệt ở chỗ, sản phẩm này chứa chế phẩm ăn kiêng theo khía cạnh thứ hai và/hoặc phương án đã được mô tả bất kỳ của nó trong bản mô tả này.

Sản phẩm làm từ sữa theo sáng chế có thể bao gồm sữa, sữa chua, phó mát, các

sản phẩm được làm đồng nhất (chủ yếu tạo thành từ sữa, phó mát, trái cây), sữa lên men hoặc không được lên men (bao gồm sữa bột, sữa không chứa lactoza, sữa khuấy) chứa vi khuẩn có lợi. Phó mát dùng cho điều trị có thể thu được bằng cách bổ sung các sinh vật là vi khuẩn có lợi thích hợp ở dạng khô cô đặc trong pha xử lý phó mát nhất định để đảm bảo việc cung cấp liều vi sinh vật cần thiết cho cơ thể. Các đồ uống có thể là đồ uống tức thời hoặc nước chứa chế phẩm của sáng chế.

Các sản phẩm kết hợp, sản phẩm làm từ sữa và sản phẩm đồ ăn nêu trên là thích hợp để sử dụng trong điều trị chính các rối loạn ở phụ nữ như được trình bày trên đây - nghĩa là để sử dụng trong điều trị rối loạn ở phụ nữ, trong đó rối loạn này là sự thiếu cân bằng của hệ vi khuẩn ở âm đạo có trong tự nhiên, sự nhiễm khuẩn âm đạo, sự nhiễm khuẩn cơ quan sinh dục nữ, sự nhiễm khuẩn niệu sinh dục hoặc sự nhiễm khuẩn đường tiết niệu.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất đồ ăn lên men hoặc sản phẩm thức ăn lên men, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung vi khuẩn axit lactic *Lactobacillus rhamnosus* theo khía cạnh thứ nhất vào nguyên liệu ban đầu của đồ ăn hoặc sản phẩm thức ăn và duy trì nguyên liệu ban đầu đã cấy vi khuẩn thu được trong điều kiện mà khi đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính chuyển hoá.

Các nguyên liệu ban đầu của sản phẩm đồ ăn hữu ích bao gồm nguyên liệu bất kỳ thường được đưa vào bước lên men vi khuẩn axit lactic như sữa, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thịt, nước ép trái cây, mứt, bột nhào, đậu tương và bột nhão.

Các sản phẩm lên men thu được bằng phương pháp nêu trên làm ví dụ điển hình bao gồm các sản phẩm làm từ sữa như sữa lên men, sữa chua, phó mát bao gồm cả các sản phẩm phó mát tươi hoặc phó mát mozzarella và bơ sữa.

Theo các phương án khác, nguyên liệu nền là nguyên liệu ban đầu dùng cho thức ăn chăn nuôi như cỏ ủ tươi, ví dụ, cỏ, nguyên liệu ngũ cốc, đậu Hà lan, cỏ linh lăng hoặc lá củ cải đường, trong đó môi trường nuôi cấy vi khuẩn được cấy vào cây trồng dùng làm thức ăn cần được cho vào xilô để thu được sự bảo tồn của nó hoặc trong các sản phẩm thải của vật nuôi giàu protein như nguyên liệu thải của khu giết mổ và nguyên liệu thải của cá, cũng nhằm mục đích bảo quản nguyên liệu thải này làm thức ăn chăn nuôi.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập và xác định tính chất của vi khuẩn *L.rhamnosus* BPL005 theo sáng chế

Nguyên liệu và phương pháp

1. Phân lập và chọn lọc các chủng

Để thu được các thể phân lập từ âm đạo của phụ nữ khoẻ mạnh, các mẫu được lấy từ khu vực giữa âm đạo của mười bốn phụ nữ trước thời kỳ có kinh nguyệt khoẻ mạnh trong độ tuổi từ 18 đến 45. Các tiêu chí loại trừ được đưa ra là phụ nữ đang mang thai và cho con bú, đang trong thời kỳ có kinh nguyệt ở thời điểm lấy mẫu hoặc có sử dụng liệu pháp kháng vi sinh vật đối với bệnh viêm âm đạo trước đó.

Tăm bông được phết vào các đĩa aga MRS và ủ trong điều kiện kỵ khí ở nhiệt độ 37°C. Các que không hình thành bào tử Gram dương được chọn làm *lactobacillus* giả định. Môi trường nuôi cấy tinh khiết được bảo quản trong thời gian dài (ở nhiệt độ -20°C) trong glyxerol để phân tích thêm.

2. Nhận biết phân tử

Để đảm bảo rằng các thể phân lập là duy nhất, profin ADN dạng đa hình được khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD) bằng agarosa được tạo ra và các thể phân lập kép được loại bỏ.

Việc nhận biết phân tử được thực hiện bằng cách giải trình tự gen ARN ribosom 16S theo tài liệu của Chenoll và các đồng tác giả (Novel Probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. 2011. Applied and Environmental Microbiology. 77(4): 1335-1343). Tóm lại, ADN từ môi trường nuôi cấy tinh khiết được chiết và tinh chế và ADN ribosom 16S được khuếch đại bằng công nghệ PCR. Các sản phẩm khuếch đại được tinh chế và giải trình tự. Việc xác định được thực hiện bằng cách so sánh các trình tự thu được với cơ sở dữ liệu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3. Chọn lọc chủng làm giảm độ pH tốt nhất

Để nghiên cứu khả năng làm giảm độ pH của các chủng *lactobacillus*, môi trường nuôi cấy đã được chuẩn hoá của các chủng được cho sinh trưởng trong môi trường de Man, Rogosa và Sharpe (MRS) trong 17 giờ ở nhiệt độ 37°C. Độ pH cuối được xác định với sự trợ giúp của dụng cụ đo độ pH. Các thử nghiệm được thực hiện ba lần. Khi các thử nghiệm được thực hiện riêng rẽ, tổ hợp của các chủng làm giảm độ

pH tốt nhất được thử nghiệm. Để thực hiện thử nghiệm này, cả hai chủng được đồng nuôi cấy trong môi trường MRS trong 17 giờ ở nhiệt độ 37°C và độ pH cuối được xác định với sự trợ giúp của dụng cụ đo độ pH.

4. Nhận biết profin axit hữu cơ

Để thu được profin axit hữu cơ của các chủng được lựa chọn, mỗi chủng được nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí ở nhiệt độ 37°C trong bình lên men có dung tích 1 lít (Biobundle; Applikon), trong môi trường công nghiệp được tối ưu hoá trong Biopolis đối với vi khuẩn *Lactobacillus*. Đối với mỗi chủng, hai điều kiện được thử nghiệm: có kiểm soát và không kiểm soát độ pH. Trong cả hai trường hợp, độ pH được theo dõi trong thử nghiệm này. Các mẫu được thu hoạch trong suốt quá trình thử nghiệm. Để định lượng axit hữu cơ, 0,8ml dịch nổi bề mặt không chứa tế bào được trộn lẫn bằng cách xoay tròn với 0,2ml hỗn hợp chứa axit meta-phosphoric 5%, đồng sulfat (1,56mg/ml) và axit 4-metyl valeric 50mM làm chất chuẩn nội. Sau đó, các mẫu được lọc qua cỡ lỗ 0,45µm và pha loãng theo tỷ lệ 1/2 và 1/10.

Việc đánh giá các axit hữu cơ được thực hiện bằng phương pháp sắc ký HPLC. Bơm phân phân ước của 10µl mẫu đã xử lý vào thiết bị HPLC Alliance 2695 (Waters) được trang bị cột Rezex (axit hữu cơ ROA (H⁺) 8% 300x7,8mm, 8µm [Premium]) trong các điều kiện được xác định theo nhà sản xuất. Việc phát hiện đạt được theo chỉ số của thiết bị phát hiện khúc xạ (2414 Waters). Dung môi rửa giải được loại khí bằng H₂SO₄ 2,5mM với tốc độ dòng đẳng dòng bằng 0,6ml/phút. Trong tất cả các trường hợp, các đường cong định lượng được tạo ra bằng cách bổ sung hỗn hợp đã xác định trước đó.

5. Sự kháng lại các sản phẩm có bán trên thị trường.

Để thử nghiệm sự kháng lại các sản phẩm dùng trong phụ khoa khác nhau của chủng BPL005, phân phân ước của dung dịch gốc trực tiếp của mỗi sản phẩm được hòa tan trong môi trường canh thang đến nồng độ 5120 µg/ml và lọc qua cỡ lỗ 0,22µm. Các dung dịch gốc được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Từ dung dịch pha loãng thứ nhất, các hệ pha loãng theo bậc ½ được thực hiện trong khoảng từ 512 đến 0,125 µg/ml. Các nguyên liệu cấy thu được trực tiếp từ khuẩn lạc 24 giờ, được tái tạo huyền phù trong dung dịch nước muối đến độ đục MacFarland 0,5 và được pha loãng theo tỷ lệ 1/20 trong dung dịch nước muối. Các thử nghiệm được thực hiện trong các đĩa có nhiều lỗ và ủ trong điều kiện kỵ khí ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Nồng độ ức chế tối thiểu

(MIC) được thiết lập làm nồng độ tối thiểu mà khi đó chất kháng sinh tạo ra sự ức chế rõ ràng (không có sự phát triển). Trong trường hợp các sản phẩm có độ đục cao, các thử nghiệm được bổ sung bước thứ hai trong đó 5µl dung dịch nước cái 24 giờ chứa BPL005 trong môi trường IST với sự có mặt của các sản phẩm có bán trên thị trường đã pha loãng theo bậc được nhỏ giọt vào các đĩa aga để xác nhận sự sinh trưởng của vi khuẩn có lợi.

6. Trình tự hệ gen

Để thu được toàn bộ trình tự hệ gen và phân tích hệ gen đầy đủ của chủng BPL005, việc giải trình tự hệ gen và phân tích thông tin sinh học được thực hiện.

i) Giải trình tự:

Để thu được toàn bộ hệ gen của chủng được chọn, viên vón nồng độ cao thu được từ ngân hàng tế bào chủ và ADN có độ tinh khiết ở mức cao được chiết bằng phương pháp thủ công theo tài liệu của Pitcher và các đồng tác giả (Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. 1989. Letters in Applied Microbiology. 8 (4): 151-156). Việc giải trình tự được thực hiện với sự trợ giúp của thiết bị Pacific Biosciences platform (PacBio).

ii) Phân tích thông tin sinh học:

Các trình tự thô thu được từ việc giải trình tự toàn bộ hệ gen được lắp ráp bằng cách tạo cấu trúc khung cần được sử dụng để diễn giải hệ gen. Các ARN vận chuyển, ARN ribosom và các khung đọc mở (ORF) sẽ được dự đoán. Chức năng của các ORF sẽ được diễn giải bằng cách so sánh mỗi ORF với cơ sở dữ liệu chứa tất cả các trình tự từ giới vi khuẩn. Khi chức năng gen kết hợp với mỗi ORF, các gen kháng độc lực và kháng sinh sẽ được tìm kiếm và được liệt kê.

Kết quả

1. Phân lập và chọn lọc các chủng

Tổng số thu được mười bốn mẫu và phết vào các đĩa aga MRS để thu được các thể phân lập. Mười bốn chủng thu được trong số 100 thể phân lập được thu hoạch. Tất cả trong số chúng thu được từ các mẫu lấy từ âm đạo. Khi được thu hoạch, các chủng được bảo quản trong thời gian dài (ở nhiệt độ -20°C) trong glyxerol để phân tích thêm. Các thể phân lập thu được được phân loại trên cơ sở nhuộm Gram và hình thái học tế bào. Mười bốn que Gram dương không hình thành bào tử được phân loại làm

Lactobacillus giả định và do đó được chọn lọc để xác định tiếp.

2. Xác định phân tử

Khi các thể phân lập được thu hoạch, profin RAPD agarosa được thực hiện để loại bỏ các thể phân lập kép. Trên cơ sở profin RAPD, mười bốn thể phân lập được ghép nhóm trong sáu chủng khác nhau. Các chủng được xác định bằng cách giải trình tự ARN ribosom 16S (Bảng 1) và các chủng *Lactobacillus* được chọn lọc để nghiên cứu thêm (Bảng 2). Ngoài ra, các chủng thu hoạch *L. crispatus* CECT 4840 và *L. iners* DSM 13335 được đưa vào nghiên cứu này.

Bảng 1. Các nhóm thu được bằng profin RAPD và giải trình tự ARN ribosom 16S

Giống	Thể phân lập (chủng)
<i>Lactobacillus</i>	14 (6)
Tác nhân gây bệnh	10 (5)
“Vi khuẩn không nuôi cấy”	6 (6)
Các giống khác	14 (14)

Bảng 2. Các chủng *Lactobacillus* thu được

Xác định	Chủng
<i>Lactobacillus casei</i>	BPL013
	BPL016
	BPL017
<i>L. jensenii</i>	BPL035
	BPL044
<i>L. rhamnosus</i>	BPL005

3. Lựa chọn chủng làm giảm độ pH tốt nhất

Khả năng làm giảm độ pH của các chủng được nghiên cứu. Bảng 3 thể hiện tóm tắt các kết quả thu được. Trong các thử nghiệm được thực hiện chỉ với một chủng, độ pH được giảm đi trong tất cả các trường hợp. Thu được mức giảm độ pH cao nhất trong trường hợp chủng *L. rhamnosus* BPL005, độ pH cuối bằng 3,82.

Bảng 3. Độ pH thu được trong các môi trường sinh trưởng của chủng *lactobacillus* (thử nghiệm với môi trường nuôi cấy tinh khiết)

Chủng	Độ pH
Đôi chứng (môi trường không nuôi cấy)	6,1
<i>L. crispatus</i> CECT4840	4,55
<i>L. iners</i> DSM13335	4,52
<i>L. casei</i> BPL013	4,30
<i>L. jensenii</i> BPL016	4,46
<i>L. jensenii</i> BPL017	4,30
<i>L. jensenii</i> BPL035	4,34
<i>L. jensenii</i> BPL044	4,61
<i>L. rhamnosus</i> BPL005	3,82

Dựa trên kết quả về mức giảm độ pH, chủng *L. rhamnosus* BPL005 và *L. casei* BPL013 được lựa chọn để nghiên cứu thêm.

4. Xác định profin axit hữu cơ

Các axit hữu cơ được mô tả làm các chất chuyển hoá ức chế và cũng làm hợp chất có hiệu quả đối với các vi khuẩn có lợi. Trong trường hợp này, các chủng BPL005 và BPL013 được phân tích trên cơ sở khả năng sản sinh ra axit hữu cơ của nó trong bình lên men có dung tích 1 lít. Liên quan đến sự giảm độ pH trong các thử nghiệm mà không cần kiểm soát độ pH-trong trường hợp chủng BPL005, độ pH ban đầu giảm rất nhanh. Ở thời điểm 5 giờ lên men, độ pH bằng 3,7 và ở thời điểm 10 giờ lên men, độ pH đạt đến giá trị tối thiểu của nó (độ pH=3,0). Trong trường hợp chủng BPL013, độ pH giảm dần, với độ pH thấp nhất ở thời điểm 30 giờ lên men.

Bảng 4 và Bảng 5 thể hiện mức độ tạo ra các axit hữu cơ. Trong trường hợp lên men có sự kiểm soát độ pH, các mẫu được thu hoạch khi kết thúc quá trình lên men. Trong tất cả các trường hợp, thu được nồng độ cao nhất đối với axit lactic, với nồng độ cao nhất bằng 22,53g/l trong trường hợp BPL013 và 19,90g/l đối với chủng BPL005, trong quá trình lên men có độ pH được kiểm soát. Việc tạo ra axit lactic nhanh chóng trong trường hợp chủng BPL005 là phù hợp với khả năng làm giảm độ pH ở mức cao của nó trong thời gian ngắn. Sự tạo ra axit lactic làm giảm độ pH sau đó đối với cả hai chủng là rõ ràng hơn nhiều trong trường hợp chủng BPL005.

Liên quan đến sự tạo ra các axit còn lại, chủng BPL005 là chủng sản sinh ra axit tốt nhất trong tất cả các trường hợp. Đã có thông báo rằng các axit hữu cơ này có

thể ức chế tác nhân gây bệnh là vi khuẩn và nấm men (Juarez et al. Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal *Lactobacillus* strains to be considered as probiotic candidates. 2011. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 159: 399-406). Trong trường hợp axit lactic, nồng độ thu được cao hơn so với nồng độ đã được mô tả trước đó trong tài liệu tham khảo của Juarez và các đồng tác giả đã nêu trên đây.

Bảng 4. Nồng độ axit hữu cơ (g/l) thu được trong quá trình lên men chủng BPL005

	Nồng độ axit hữu cơ (g/l)			
	Không kiểm soát độ pH			Kiểm soát độ pH
	5 giờ	22 giờ	45 giờ	22 giờ
Axit lactic	3,172 ± 0,066	12,168 ± 0,223	15,635 ± 0,158	19,731 ± 0,232
Axit axetic	0,105 ± 0,050	0,123 ± 0,058	0,143 ± 0,058	0,145 ± 0,049
Axit propionic	0,740 ± 0,029	0,155 ± 0,029	0,210 ± 0,026	0,134 ± 0,013
Axit butyric	0,074 ± 0,041	0,074 ± 0,041	0,072 ± 0,039	0,082 ± 0,041
Axit suxinic	0,114 ± 0,025	0,112 ± 0,042	0,157 ± 0,033	0,175 ± 0,008

Bảng 5. Nồng độ axit hữu cơ (g/L) thu được trong quá trình lên men chủng BPL013

	Nồng độ axit hữu cơ (g/l)			
	Không kiểm soát độ pH			Kiểm soát độ pH
	5 giờ	30 giờ	42 giờ	42 giờ
Axit lactic	0,479 ± 0,090	1,387 ± 0,096	10,093 ± 0,088	22,814 ± 0,397
Axit axetic	0,060 ± 0,051	0,065 ± 0,051	0,084 ± 0,054	0,109 ± 0,064
Axit propionic	0,058 ± 0,041	0,045 ± 0,030	0,058 ± 0,027	0,058 ± 0,023
Axit butyric	ND	ND	ND	ND
Axit suxinic	0,092 ± 0,001	0,11 ± 0,002	0,104 ± 0,023	0,133 ± 0,032

ND: không được phát hiện.

5. Sự kháng lại các thử nghiệm sản phẩm có bán trên thị trường.

Các kết quả thu được với các sản phẩm có bán trên thị trường dùng trong phụ khoa được thể hiện tóm tắt trong Bảng 6. Trong tất cả các trường hợp, chủng BPL005 kháng lại nồng độ cao nhất được thử nghiệm và không quan sát được sự ức chế nào, thậm chí ở nồng độ cao nhất trong các sản phẩm trong nền gel và kem.

Bảng 6. Các trị số MIC thu được đối với sản phẩm trên cơ sở progesteron.

Sản phẩm	MIC (mg/ml)
Ultrogestan	>20mg/ml
Progeffik	>20mg/ml
Prolutex	>20mg/ml
Crinone	>22mg/ml
Darstin	>2,22mg/ml*

*Không thể thử nghiệm nồng độ cao hơn do nồng độ ban đầu của nó.

6. Trình tự hệ gen

Toàn bộ hệ gen của chủng BPL005 được giải trình tự. Việc chiết toàn bộ hệ gen được thực hiện; việc xác định chủng được chứng minh và việc giải trình tự được sử dụng. Việc lắp ráp tạo ra độ tiếp cận duy nhất bằng 3,023Mb. Không có trình tự nào được dự đoán là plasmit.

Kết luận

Kết quả của ví dụ này đã chứng minh các đặc điểm có lợi liên quan sau đây của chủng BPL005 *L. rhamnosus* được phân lập:

- 1: Chủng này được phân lập *de novo* từ các thể phân lập từ âm đạo phụ nữ khoẻ mạnh - nghĩa là rõ ràng không có lý do gì để cho rằng chủng này không phải là chủng mới;
- 2: Profin ADN dạng đa hình được khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD) đã chứng minh rằng chủng này khác với các chủng khác và việc giải trình tự ARN ribosom 16S đã cho thấy rằng BPL005 là một chủng *L. rhamnosus* duy nhất;
- 3: BPL005 có khả năng làm giảm độ pH cao nhất trong số các chủng được phân lập từ âm đạo;
- 4: Trong các thử nghiệm mà không có sự kiểm soát độ pH, BPL005 có tác dụng làm giảm độ pH nhanh chóng. Sự tạo ra axit lactic nhanh chóng trong trường hợp chủng BPL005 là phù hợp với khả năng cao làm giảm độ pH trong thời gian ngắn của nó. Liên quan đến sự tạo ra các axit còn lại, chủng BPL005 là chủng sản sinh ra axit tốt nhất trong số các chủng thử nghiệm;
- 5: Liên quan đến sự kháng lại các sản phẩm có bán trên thị trường dùng trong phụ khoa - chủng BPL005 có sự kháng lại với nồng độ cao nhất được thử nghiệm và không quan sát được sự ức chế nào;

6: Việc giải trình tự hệ gen của toàn bộ hệ gen của chủng BPL005 đã cho thấy rằng nó có độ tiếp cận duy nhất 3,023Mb – nghĩa là trình tự hệ gen không phải là trình tự đã được mô tả trong các giải pháp kỹ thuật đã biết.

Ví dụ 2: So sánh BPL005 với các sản phẩm chứa vi khuẩn có lợi có bán trên thị trường dùng trong phụ khoa

Nguyên liệu và phương pháp

Tế bào sống trong sản phẩm.

Để nghiên cứu chuyên sâu về các sản phẩm chứa vi khuẩn có lợi khác nhau hiện có bán trên thị trường, phân tích nhóm gồm 18 sản phẩm trên cơ sở các vi khuẩn có lợi. Các sản phẩm thử nghiệm được thể hiện tóm tắt trong Bảng 7. Đối với mỗi sản phẩm, nồng độ thu được theo số đếm trong các đĩa MRS và thử nghiệm chức năng của các chủng. Để nghiên cứu chức năng, các chủng vi khuẩn có lợi được phân lập, xác định bằng cách giải trình tự ADN ribosom 16S và khả năng làm giảm độ pH của nó được thử nghiệm.

Bảng 7. Các sản phẩm có bán trên thị trường được phân tích

Sản phẩm có bán trên thị trường	Loại sản phẩm
Ginegea Candida stick	Bột
HydralinFlora	Viên nang
mediGYNE	Viên nang
GynOphilus LP	Viên nang
GynOphilus	Viên nang
FLORGYNAL TAMPON	Băng vệ sinh
Symbiovag	Viên nang
SYMBIO Vag	Viên nang cứng để đặt âm đạo
Muvagyn probiótico	Băng vệ sinh
Muvagyn Probiótico	Viên nang
Isadin α barcilus ISDIN	Viên nang mềm để đặt âm đạo
NORMOGIN 40mg	Viên nang
Lactonorm	Viên nang
ACIDIF CV	Viên nang

Vaginol	Viên nang cứng để đặt âm đạo
Gyno-caneflor	Viên nang
Floragyn	Viên nang cứng để đặt âm đạo
Lactoflorene Gyn	Viên nang cứng để đặt âm đạo

Các chủng vi khuẩn có lợi được phân lập từ các sản phẩm có bán trên thị trường và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C . Việc xác định ở cấp độ loài được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN ribosom 16S. Đối với mỗi chủng, các thử nghiệm làm giảm độ pH được thực hiện như đã giải thích trên đây. Chủng BPL005 được đưa vào làm đối chứng.

Kết quả

Tế bào sống trong sản phẩm

Để nghiên cứu chuyên sâu các sản phẩm vi khuẩn có lợi khác nhau hiện có bán trên thị trường, phân tích nhóm gồm 18 sản phẩm trên cơ sở vi khuẩn có lợi. Các sản phẩm thử nghiệm được thể hiện tóm tắt trong Bảng 8. Đối với mỗi sản phẩm, nồng độ thu được theo số đếm trong các đĩa MRS và thử nghiệm chức năng của các chủng này. Để nghiên cứu chức năng, phân lập các chủng vi khuẩn có lợi, được xác định bằng cách giải trình tự ADN ribosom 16S và khả năng làm giảm độ pH của nó được thử nghiệm.

Bảng 8. Phân tích so sánh các sản phẩm có bán trên thị trường

Sản phẩm có bán trên thị trường	Loại sản phẩm	Vi khuẩn sống (CFU/g)	Lượng (g)	Tổng số vi khuẩn sống (CFU)	Vi khuẩn sống theo lý thuyết (CFU)
Ginegea Candida stick	Bột	5,70E+09	2	1,14E+10	1,00E+09
HydralinFlora	Viên nang	2,77E+10	0,20	5,53E+09	1,00E+08
mediGYNE	Viên nang	1,30E+09	0,20	2,60E+08	1,00E+08
GynOphilus LP ¹	Viên nang	1,78E+09	0,88	1,56E+09	877mg ¹
GynOphilus ¹	Viên nang	4,00E+09	0,34	1,36E+09	341 mg ¹
FLORGYNAL TAMPON	Băng vệ sinh	1,18E+09	1,60	1,88E+09	-
SYMBIO Vag	Viên nang cứng để	9,00E+08	2	1,80E+09	1,00E+09

	đặt âm đạo				
Muvagyn probiótico	Băng vệ sinh	2,20E+07	3,10	6,83E+07	1,00E+08
Muvagyn Probiótico	Viên nang	1,80E+09	0,41	7,33E+08	1,00E+08
Isadin α barcilus	Viên nang mềm để	7,70E+08	2,82	2,17E+09	1,00E+08
ISDIN	đặt âm đạo				
NORMOGIN 40mg ¹	Viên nang	3,20E+06	1,00	3,20E+06	40 mg ¹
Lactonorm	Viên nang	6,40E+08	0,42	2,70E+08	1,00E+11 ²
ACIDIF CV	Viên nang	1,40E+08	1,05	1,47E+08	5,00E+08
Vaginol ³	Viên nang cứng để	-	-	-	-
	đặt âm đạo				
Gyno-canesflor	Viên nang	2,20E+10	0,34	7,41E+09	1,00E+08
Floragyn ⁴	Viên nang cứng để	5,90E+04	2,00	1,18E+05	-
	đặt âm đạo				
Lactoflorene Gyn	Viên nang cứng để	2,34E+05	0,62	1,44E+05	1,20E+06
	đặt âm đạo				

¹Các liều được tính theo mg, không phải theo CFU; ²Khả năng sống theo thời gian bao nang; ³Không có vi khuẩn có lợi trong sản phẩm; ⁴Vi khuẩn có lợi được làm tan

Như được thể hiện trong Bảng 8, các kết quả rất khác nhau. Một số kết quả trong số chúng cho thấy số lượng tế bào sống thấp hơn so với tiêu chuẩn.

Khả năng làm giảm độ pH

Các chủng vi khuẩn có lợi từ các sản phẩm có bán trên thị trường được phân lập và khả năng làm giảm độ pH của chúng được thử nghiệm. Bảng 9 thể hiện kết quả so sánh thu được của chúng.

Bảng 9. Kết quả làm giảm độ pH thu được đối với các vi khuẩn có lợi có bán trên thị trường

Sản phẩm	Vi khuẩn có lợi được phân lập	Độ pH cuối
MediGYNE	<i>L. gasseri</i>	4,33
	<i>L. rhamnosus</i>	3,55
HydralinFlora	<i>L. plantarum</i>	3,55
GynOphilus LP	<i>L. casei rhamnosus</i> Döderlein	4,20
FLORGYNAL tampon	<i>L. rhamnosus</i>	4,25

	<i>L. fermentum</i>	4,10
	<i>L. gasserii</i> LN40	4,21
Muvagyn	<i>L. fermentum</i> LN99	4,23
	<i>L. rhamnosus</i> LN113	4,24
Isadin α barcilus ISDIN	<i>L. plantarum</i>	3,93
GynOphilus	<i>L. casei rhamnosus</i> Döderlein	4,17
Lactonorm	<i>L. acidophilus</i>	4,23
BPL005 (đối chứng)	<i>L. rhamnosus</i>	3,73

Các kết quả thu được cho thấy chủng BPL005 có mức giảm độ pH tương tự như các vi khuẩn có lợi tốt nhất được thử nghiệm.

Kết luận

Các kết quả của ví dụ này cho thấy rằng chủng BPL005 có tác dụng làm giảm độ pH tương tự với vi khuẩn có lợi tốt nhất được thử nghiệm của các sản phẩm vi khuẩn có lợi có bán trên thị trường dùng trong phụ khoa có liên quan trong bản mô tả này.

Ví dụ 3: Đánh giá năng suất của chủng *Lactobacillus* BPL005 trong quá trình sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm (thể tích 1 lít)

Nguyên liệu và phương pháp

Để đánh giá năng suất, ngân hàng tế bào chủ và ngân hàng tế bào làm việc ở nhiệt độ -80°C được tạo cấu trúc.

Quá trình sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm được thực hiện trong bình lên men có dung tích 1 lít (Biobundle; Applikon), trong môi trường công nghiệp được tối ưu hoá đối với vi khuẩn *lactobacillus*. Môi trường nuôi cấy thu được trong các điều kiện tiêu chuẩn (Bảng 10) và các tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm. Sau khi được thu hoạch, các viên vón được tái tạo huyền phù trong dung dịch chất mang trên cơ sở maltodextrin và được làm đông lạnh ở nhiệt độ -80°C và được đông khô nhanh.

Bảng 10. Các điều kiện lên men

Thông số	Trị số
Bình lên men OD thời gian 0 giờ	0,1
Nhiệt độ	37°C

Lắc	100 vòng/phút
Môi trường	Ky khí
Độ pH	6,3
Môi trường nuôi cấy	BRFS

Để đánh giá tính khả năng chịu được các quá trình đông lạnh và đông khô nhanh của các chủng vi khuẩn, khả năng sống của tế bào được kiểm tra trên các đĩa aga MRS trước khi được thu hoạch và sau khi đông khô nhanh.

Nghiên cứu tính ổn định của sản phẩm đông khô nhanh

Bột đông khô nhanh được bao gói trong chân không và bảo quản ở nhiệt độ 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). Tính ổn định của sản phẩm được kiểm tra theo số đếm trong MRS trong 15 tháng.

Kết quả

Để thu được kết quả đánh giá về hiệu quả của chủng BPL005, quá trình sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm được thực hiện. Các kết quả thu được được thể hiện tóm tắt trong Bảng 11. Các kết quả thu được cho thấy hiệu quả tốt của chủng BPL005 trong quá trình sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm.

Bảng 11. Các kết quả thu được sau khi lên men ở quy mô 1 lít

Thông số	Trị số
Thời gian thu hoạch	20 giờ
OD cuối	8,1
CFU/ml cuối trong bình lên men	9×10^9 CFU/ml
CFU/g cuối trong bột được đông khô nhanh	$2,7 \times 10^{12}$ CFU/g

Bột đông khô nhanh được bao gói trong chân không và bảo quản ở nhiệt độ 5°C. Tính ổn định của sản phẩm được kiểm tra theo số đếm trong MRS. Chủng BPL005 thu được có tính ổn định tốt trong khoảng thời gian 15 tháng.

Kết luận

Các kết quả của ví dụ này cho thấy hiệu quả tốt của chủng BPL005 trong quá trình sản xuất trên quy mô phòng thí nghiệm (thể tích 1 lít) và dữ liệu của bột đông khô nhanh thu được cho thấy rằng chủng BPL005 thu được có tính ổn định tốt trong khoảng thời gian 15 tháng.

Ví dụ 4: Sản xuất chủng *Lactobacillus* BPL005 trên quy mô công nghiệp (thể tích 1500 lít)

Nguyên liệu và phương pháp

Sản xuất trên quy mô công nghiệp

Quá trình sản xuất trên quy mô công nghiệp được thực hiện trong bể lên men dung tích 1500 lít. Quá trình sinh trưởng được thực hiện trong môi trường công nghiệp được tối ưu hoá đối với *Lactobacillus*. Môi trường nuôi cấy thu được trong các điều kiện tiêu chuẩn (kỵ khí, có kiểm soát độ pH và nhiệt độ) và các tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm trong máy ly tâm công nghiệp.

Tối ưu hoá quá trình đông khô nhanh

Viên vón thu được được tái tạo huyền phù trong dung dịch chất mang (trên cơ sở maltodextrin) và được đông khô nhanh trong thiết bị làm đông khô nhanh trên quy mô công nghiệp. Để thu được khả năng chịu được quá trình đông khô nhanh của chủng này, khả năng sống được kiểm tra trên các đĩa aga MRS ngay sau quá trình lên men và sau quá trình sấy khô ở nhiệt độ thấp trên quy mô công nghiệp. Độ tinh khiết của môi trường nuôi cấy và sản phẩm đông khô nhanh được kiểm tra bằng profin ADN dạng đa hình được khếch đại ngẫu nhiên (RAPD) bằng cách điện di của các khuẩn lạc đã được chọn ngẫu nhiên.

Đánh giá thời hạn sử dụng của bột rời.

Thời hạn sử dụng của bột rời được đánh giá. Phần phân ước chứa bột rời được bảo quản ở nhiệt độ 5°C và 25°C. Việc đánh giá sẽ được thực hiện theo định kỳ theo số đếm trên aga MRS.

Kết quả

Sản xuất trên quy mô công nghiệp

Quá trình sản xuất trên quy mô công nghiệp được thực hiện trong bể lên men có dung tích 1500 lít theo các điều kiện tiêu chuẩn. Môi trường nuôi cấy *Lactobacillus rhamnosus* BPL005 tạo ra $6,55 \times 10^9$ CFU/ml. Kết quả này phù hợp với các kết quả thu được với quy mô 1 lít và chấp nhận được khi tính đến hiệu quả của quá trình.

Tối ưu hoá quá trình đông khô nhanh

Số đếm thu được được thể hiện tóm tắt trong Bảng 12. Các kết quả thu được

cho thấy hiệu quả tốt của chủng BPL005 đối với quá trình sản xuất ở quy mô 1500 lít.

Bảng 12. Các kết quả thu được sau khi lên men ở quy mô 1500 lít

Thời gian thu hoạch	17 giờ
CFU/ml cuối trong bể lên men	$6,55 \times 10^9$ CFU/ml
CFU/g cuối trong thiết bị đông khô nhanh	$5,53 \times 10^{11}$ CFU/g

Đánh giá thời hạn sử dụng của bột rời.

Tính ổn định thu được trong quá trình sản xuất với quy mô 1500 lít ở nhiệt độ 5°C và 25°C của chủng BPL005 đông khô nhanh được bao gói trong chân không cho thấy rằng sản phẩm này rất ổn định ở nhiệt độ 5°C. Các kết quả thu được ở nhiệt độ 25°C cho thấy số lượng giảm ở mức thấp chấp nhận được.

Kết luận

Các kết quả của ví dụ này cho thấy hiệu quả tốt của chủng BPL005 trong quá trình sản xuất trên quy mô công nghiệp (thể tích 1500 lít) và dữ liệu của bột đông khô nhanh thu được cho thấy rằng chủng BPL005 thu được có tính ổn định rất tốt.

Tài liệu tham khảo

- 1: Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP0257007 (nộp đơn năm 1987)
- 2: Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP2509610B1 (HSO Health Care, Vienna – nộp đơn ngày 13 tháng 09 năm 2011 và được công bố/cấp bằng độc quyền sáng chế năm 2013)
- 3: Chenoll E, Codoner FM, Martinez-Blanch JF, Ramon D, Genoves S, Menabrito M. 2016. Complete genome sequence of *Lactobacillus rhamnosus* strain BPL5 (CECT 8800), a probiotic for treatment of bacterial vaginosis. *Genome Announc* 4(2):e00292-16. doi:10.1128/genomeA.00292-16. Copy-right© 2016 Chenoll et al. – được công bố tháng 4 năm 2016

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi khuẩn axit lactic *Lactobacillus rhamnosus* có số đăng ký CECT 8800.
2. Chế phẩm ăn kiêng chứa vi khuẩn theo điểm 1.
3. Chế phẩm ăn kiêng theo điểm 2, trong đó chế phẩm này có nồng độ tế bào sống nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^{14} đơn vị tạo khuẩn lạc (colony forming unit: cfu) trong mỗi gam chế phẩm, tốt hơn là trong đó nồng độ tế bào sống nằm trong khoảng từ 10^6 đến 10^{13} cfu trong mỗi gam chế phẩm.
4. Chế phẩm ăn kiêng theo điểm 2 hoặc 3, trong đó chế phẩm này chứa vi khuẩn ở dạng đông lạnh, dạng khô hoặc dạng sấy khô ở nhiệt độ thấp.
5. Chế phẩm ăn kiêng theo điểm 4, trong đó chế phẩm này chứa vi khuẩn ở dạng sấy khô ở nhiệt độ thấp và chế phẩm này còn chứa chất bảo quản đông lạnh thích hợp (ví dụ, maltodextrin).
6. Chế phẩm ăn kiêng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó chế phẩm này thích hợp để sử dụng qua đường miệng.
7. Chế phẩm ăn kiêng theo điểm 6, trong đó chế phẩm này ở dạng viên nang được bao, viên nén, túi, viên tròn, viên hạt nhỏ, lọ nhỏ để sử dụng qua đường miệng, sữa chua, đồ uống sữa chua, sữa lên men, nước ép và các đồ uống và thực phẩm lên men khác.
8. Dược phẩm chứa vi khuẩn theo điểm 1.
9. Dược phẩm theo điểm 8, trong đó dược phẩm này có nồng độ tế bào sống nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^{14} cfu trong mỗi gam dược phẩm, tốt hơn là trong đó nồng độ tế bào sống nằm trong khoảng từ 10^6 đến 10^{13} cfu trong mỗi gam dược phẩm.
10. Dược phẩm theo điểm 8 hoặc 9, trong đó dược phẩm này chứa vi khuẩn ở dạng đông lạnh, dạng khô hoặc dạng sấy khô ở nhiệt độ thấp.
11. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó dược phẩm này chứa vi khuẩn ở dạng sấy khô ở nhiệt độ thấp và dược phẩm này còn chứa chất bảo quản đông lạnh thích hợp (ví

dụ, maltodextrin).

12. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 11, trong đó dược phẩm này thích hợp để sử dụng qua đường miệng hoặc sử dụng qua đường âm đạo.
13. Dược phẩm theo điểm 12, trong đó dược phẩm này ở dạng thuốc đạn, viên nang đặt âm đạo để sử dụng qua đường âm đạo hoặc ở dạng viên nang được bao, viên nén, túi, viên tròn, viên hạt nhỏ, lọ nhỏ để sử dụng qua đường miệng
14. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 13, trong đó dược phẩm này còn chứa chất bổ trợ và/hoặc tá dược được dụng.
15. Sản phẩm làm từ sữa để bổ sung chất dinh dưỡng cho người, khác biệt ở chỗ, sản phẩm này chứa chế phẩm ăn kiêng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 7.
16. Sản phẩm đồ uống để bổ sung chất dinh dưỡng cho người, khác biệt ở chỗ, sản phẩm này chứa chế phẩm ăn kiêng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 7.
17. Sản phẩm đồ ăn để bổ sung chất dinh dưỡng cho người, khác biệt ở chỗ, sản phẩm này chứa chế phẩm ăn kiêng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 7.
18. Sản phẩm thức ăn để bổ sung chất dinh dưỡng cho vật nuôi, khác biệt ở chỗ, sản phẩm này chứa chế phẩm ăn kiêng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 7.
19. Phương pháp sản xuất sản phẩm đồ ăn lên men hoặc sản phẩm thức ăn lên men, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung vi khuẩn axit lactic *Lactobacillus rhamnosus* theo điểm 1 vào nguyên liệu ban đầu của sản phẩm đồ ăn hoặc sản phẩm thức ăn và duy trì nguyên liệu ban đầu đã cấy vi khuẩn thu được trong điều kiện mà khi đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính chuyển hoá.
20. Phương pháp tạo ra chủng đột biến của vi khuẩn axit lactic *Lactobacillus rhamnosus* có số đăng ký CECT 8800, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:
 - (i): tạo ra thể đột biến của vi khuẩn axit lactic *Lactobacillus rhamnosus* có số đăng ký CECT 8800;
 - (ii): phân tích thể đột biến đã được tạo ra trong bước (i) và xác định chủng đột biến giữ lại được hoặc cải thiện thêm khả năng làm giảm độ pH của CECT

8800; và

(iii): phân lập chủng đột biến đã được xác định trong bước (ii) để nhờ đó thu được chủng đột biến của vi khuẩn axit lactic *Lactobacillus rhamnosus* có số đăng ký CECT 8800, trong đó chủng đột biến này giữ lại được hoặc cải thiện thêm khả năng làm giảm độ pH của CECT 8800.