



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

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

(11)



1-0033187

(51)<sup>7</sup> A61K 31/215; C12N 1/20; A61P 37/04; (13) B  
A61K 35/74; A61K 47/26

(21) 1-2016-04457

(22) 29/05/2015

(86) PCT/JP2015/065500 29/05/2015

(87) WO2015/182735 03/12/2015

(30) 2014-113529 30/05/2014 JP

(45) 25/09/2022 414

(43) 27/02/2017 347A

(73) KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA (JP)

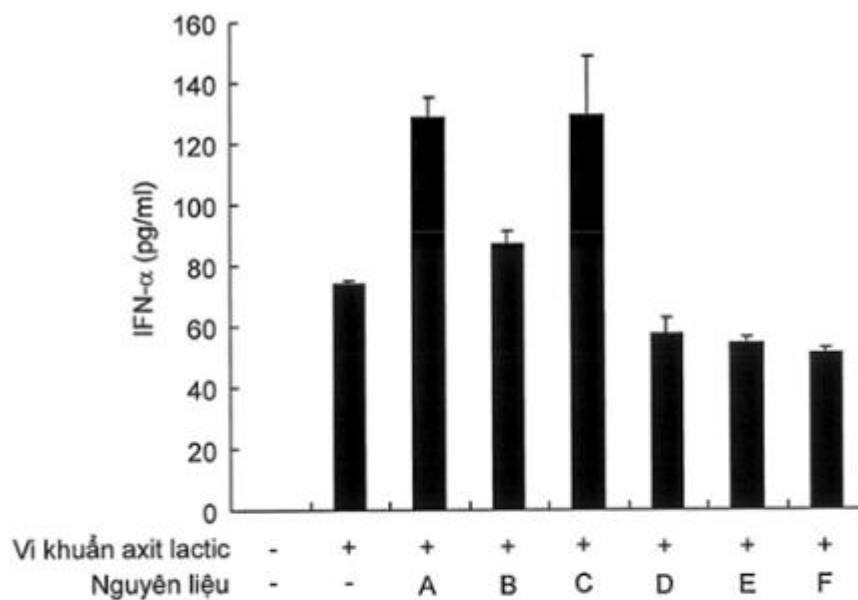
Nakano Central Park South, 10-2, Nakano 4-chome, Nakano-ku, Tokyo 164-0001,  
Japan

(72) KANAYAMA Masava (JP); TAZUMI Kyoko (JP).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM TĂNG HOẠT TÍNH TẠO TIỀM NĂNG MIỄN DỊCH CỦA VI  
KHUẨN AXIT LACTIC VÀ PHƯƠNG PHÁP TĂNG HOẠT TÍNH TẠO TIỀM  
NĂNG MIỄN DỊCH CỦA VI KHUẨN AXIT LACTIC

(57) Sáng chế là đề xuất chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic mà làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch; và phương pháp tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic sử dụng chế phẩm này; và chế phẩm chứa cả vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch và chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic, trong đó hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic được gia tăng. Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch và chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic chứa thành phần hoạt tính là hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa.



Nồng độ vi khuẩn axit lactic: 0,1% (trọng lượng/thể tích)

A: Poem TRP-97RF (chất nhũ hóa)

B: Poem BS-20 (chất nhũ hóa)

C: Ryoto Sugar Ester P1670 (chất nhũ hóa)

D: GENU pectin (chất làm đặc polysacarit)

E: Pectin AYD30T (chất làm đặc polysacarit)

F: Unipeptine AYD5110SB (chất làm đặc polysacarit)

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic, chế phẩm này làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch sử dụng chế phẩm này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa cả vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch và chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Cảm lạnh và cúm là các bệnh chủ yếu bị gây ra bởi sự nhiễm virus và dẫn đến các tình trạng cơ thể ốm yếu. Chịu sự bùng nổ của các bệnh cúm mới, con người đang tìm kiếm các đồ uống và thực phẩm có tác dụng tạo tiềm năng miễn dịch để ngăn ngừa bệnh cảm lạnh và cúm. Các chủng axit lactic như *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM5805 (xem tài liệu sáng chế 1), *Lactobacillus bulgaricus* OLL1073R-1 (xem tài liệu sáng chế 2), *Enterococcus faecalis* (xem tài liệu sáng chế 3), *Lactobacillus brevis subsp. coagulans* (xem tài liệu sáng chế 4), và *Lactococcus gasseri* (xem tài liệu sáng chế 5) đã được biết là thể hiện tác dụng tạo tiềm năng miễn dịch và được sử dụng trong nhiều đồ uống và thực phẩm. Tuy nhiên, để có tác dụng thích đáng của các vi khuẩn này cần có một lượng vi khuẩn vượt quá lượng nhất định và việc bổ sung lượng lớn vi khuẩn này vào đồ uống sẽ dẫn đến sự giảm giá trị thương mại do, ví dụ, sự tạo kết tủa và/hoặc sự giảm chất lượng hương vị. Do đó, mong muốn là có phương pháp để đạt tác dụng thích đáng của vi khuẩn axit lactic này với lượng vi khuẩn nhỏ. Các phương pháp để tăng tác dụng tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic và các sản phẩm có tác dụng miễn dịch tăng cường gần đây đã được báo cáo. Ví dụ bao gồm các đồ uống và thực phẩm để tăng tính miễn dịch, chứa kết hợp của vi khuẩn axit lactic và ngũ cốc thuộc họ Hòa thảo (Poaceae) (xem tài liệu sáng chế 5); chế phẩm chứa fucoidan hoặc sản phẩm thủy phân fucoidan và chất kích thích miễn dịch (xem tài liệu sáng chế 6); môi trường thu được bằng quá trình lên men lactic bao gồm cây vi

khuẩn axit lactic vào môi trường chứa sản phẩm măng tây được chế biến (xem tài liệu sáng chế 7); phương pháp bao gồm sử dụng kết hợp vi khuẩn axit lactic và axit ascorbic (xem tài liệu sáng chế 8); và phương pháp bao gồm sử dụng kết hợp vi khuẩn axit lactic và vitamin E (xem tài liệu sáng chế 9).

Danh sách tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Công bố đơn quốc tế số WO2012/091081

Tài liệu sáng chế 2: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2011-37888 A

Tài liệu sáng chế số 3: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 5-97689 A (1993)

Tài liệu sáng chế số 4: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 06-206826 A (1994)

Tài liệu sáng chế số 5: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2012-184261 A

Tài liệu sáng chế số 6: Công bố đơn quốc tế số WO2007/013613

Tài liệu sáng chế số 7: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2007-302628 A

Tài liệu sáng chế số 8: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2007-204488 A

Tài liệu sáng chế số 9: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2002-080364 A

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Vấn đề kỹ thuật

Tuy nhiên, ngũ cốc từ họ Hòa thảo là nguyên liệu dạng hạt và tạo kết tủa khi sử dụng trong đồ uống hoặc thực phẩm. Các phương pháp sử dụng măng tây cần lên men sản phẩm măng tây được chế biến bằng vi khuẩn axit lactic, tốn nguồn lực và chi phí, cũng như gây ra vấn đề về hương vị. Fucoidan là polysacarit trọng lượng phân tử cao với độ nhớt cao và do đó khó xử lý, và sản phẩm thủy phân fucoidan là hỗn hợp của nhiều oligosacarit và gây ra vấn đề về hương vị. Axit ascorbic dễ bị phân hủy bởi

nhật và vitamin E là hòa tan trong chất béo và khó để xử lý. Hơn nữa, phương pháp nêu trên và các phương pháp tương tự là các phương pháp để tăng khả năng sản xuất interferon  $\gamma$  và không mô tả về interferon typ I, là chất quan trọng nhất để ngăn ngừa sự nhiễm virus.

Do đó, thành phần hòa tan trong nước mà làm tăng một cách hiệp đồng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic và không có tác động lớn đến hương vị, có thể giảm lượng vi khuẩn axit lactic cần sử dụng trong khi duy trì hoạt tính của nó, và, kết quả là, tăng phạm vi khai thác các chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic. Các chế phẩm có tác dụng bảo vệ lớn chống lại sự nhiễm virus có thể được tạo ra bằng cách tập trung vào hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch đặc biệt đối với interferon typ I.

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic mà làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch, trong đó việc bổ sung lượng nhỏ chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có thể tạo ra tác dụng thích đáng của vi khuẩn axit lactic; và phương pháp tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic bằng cách sử dụng chế phẩm này; và chế phẩm chứa cả vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch và chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic, trong đó hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic được gia tăng.

#### Giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu một cách kỹ lưỡng nhằm đạt được mục đích nêu trên và đã phát hiện ra rằng, là kết quả của nghiên cứu này, các hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa có tác dụng tăng cường hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Cụ thể hơn là, sáng chế là như sau:

[1] Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch và chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic chứa thành phần hoạt tính là hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa.

[2] Chế phẩm theo [1], trong đó hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch được gia tăng.

[3] Chế phẩm theo [1] hoặc [2], trong đó chế phẩm này là đồ uống hoặc thực phẩm.

[4] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [3], trong đó polyol được chọn từ nhóm bao gồm monoglyxerol, polyglyxerol, và sucroza.

[5] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [4], trong đó axit béo bão hòa được chọn từ nhóm bao gồm axit caprylic, axit capric, axit lauric, axit myristic, axit palmitic, axit stearic và axit behenic.

[6] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], trong đó hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa không được biến đổi bằng axit hữu cơ bất kỳ.

[7] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [6], trong đó tỷ lệ giữa nồng độ của hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa và nồng độ của vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 50:1.

[8] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [7], trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch là vi khuẩn axit lactic có khả năng cảm ứng sự sản sinh interferon của tế bào sản sinh interferon.

[9] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [8], trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. hordniae*, *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus damnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus brevis subsp. coagulans*, và *Enterococcus faecalis*.

[10] Chế phẩm theo mục [8] hoặc [9], trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch là *Lactococcus lactis* JCM5805.

[11] Phương pháp tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch, bao gồm cho vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch tiếp xúc với chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic chứa thành phần hoạt tính là hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa.

[12] Phương pháp theo [11], trong đó polyol được chọn từ nhóm bao gồm monoglyxerol, polyglyxerol, và sucroza.

[13] Phương pháp theo mục [11] hoặc [12], trong đó axit béo bão hòa được chọn từ nhóm bao gồm axit caprylic, axit capric, axit lauric, axit myristic, axit palmitic, axit stearic, và axit behenic.

[14] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục [11] đến [13], trong đó hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa không được biến đổi bằng axit hữu cơ bất kỳ.

[15] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục [11] đến [14], trong đó tỷ lệ giữa nồng độ của hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa và nồng độ của vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 50:1.

[16] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục [11] đến [15], trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch là vi khuẩn axit lactic có khả năng cảm ứng sự sản sinh interferon của tế bào sản sinh interferon.

[17] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục [11] đến [16], trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. hordniae*, *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus damnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus brevis subsp. coagulans*, và *Enterococcus faecalis*.

[18] Phương pháp theo mục [16] hoặc [17], trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch là *Lactococcus lactis* JCM5805.

Phần mô tả sáng chế bao gồm các nội dung được nêu trong phần mô tả và/hoặc các hình vẽ của đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2014-113529, đơn này là đơn ưu tiên của sáng chế.

Hiệu quả của sáng chế

Các hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch. Do đó, sự tồn tại đồng thời của vi khuẩn axit lactic và hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa, ví dụ, trong môi trường nuôi cấy sẽ làm tăng tác dụng của vi khuẩn axit lactic

đối với các tế bào sản sinh interferon cảm ứng sự sản sinh interferon. Bằng cách sử dụng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic chứa thành phần hoạt tính là hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa, hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có thể được gia tăng. Hơn nữa, bằng cách bổ sung chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic vào chế phẩm như đồ uống hoặc thực phẩm chứa vi khuẩn axit lactic, hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic trong đồ uống hoặc thực phẩm có thể được gia tăng. Hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic chứa thành phần hoạt tính là hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa và do đó thậm chí chỉ lượng nhỏ vi khuẩn axit lactic có trong chế phẩm như đồ uống hoặc thực phẩm cũng có thể cung cấp tác dụng tạo tiềm năng miễn dịch rõ rệt.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1 minh họa kết quả của việc sàng lọc các chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch.

Fig.2 minh họa kết quả của thử nghiệm thu hẹp loại (gốc ưa nước) hợp chất este của polyol và axit béo.

Fig.3 minh họa kết quả của thử nghiệm thu hẹp loại (gốc kỵ nước) hợp chất este của polyol và axit béo.

Fig.4 minh họa kết quả của thử nghiệm về loại hợp chất este của polyol và axit béo.

Fig.5 minh họa kết quả của Thử nghiệm 2 về loại hợp chất este của polyol và axit béo.

Fig.6 minh họa kết quả của thử nghiệm về sự biến đổi của các hợp chất este của polyol và axit béo bằng các axit hữu cơ (nồng độ vi khuẩn axit lactic là 0,1%).

Fig.7 minh họa kết quả của thử nghiệm về sự biến đổi của các hợp chất este của polyol và axit béo bằng các axit hữu cơ (nồng độ vi khuẩn axit lactic là 0,01%).

Fig.8 minh họa kết quả của thử nghiệm về khoảng nồng độ của hợp chất este của polyol và axit béo (nồng độ vi khuẩn axit lactic là 0,1%).

Fig.9 minh họa kết quả của thử nghiệm về khoảng nồng độ của hợp chất este của polyol và axit béo (nồng độ vi khuẩn axit lactic là 0,01%).

Fig.10 minh họa kết quả của thử nghiệm về tác dụng đối với vi khuẩn axit lactic khác với chủng JCM5805 (No.1).

### Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic mà làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic. Các chế phẩm này chứa thành phần hoạt tính là hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa, trong đó hợp chất este này có cấu trúc bao gồm gốc ưa nước và gốc ưa béo trong đó gốc ưa nước được liên kết với gốc ưa béo bằng liên kết este, trong đó gốc ưa nước là polyol và gốc ưa béo là axit béo bão hòa.

Polyol trong hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa là rượu có 2 hoặc nhiều nhóm hydroxyl trong phân tử, trong đó số nhóm hydroxyl là, ví dụ, 2 đến 15, nhưng không giới hạn. Polyol có thể có nhóm aldehyt và/hoặc nhóm keton. Polyol có nhóm aldehyt và/hoặc nhóm keton là đường hoặc rượu đường.

Số nguyên tử cacbon trong polyol có trong chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế là nằm trong khoảng từ 2 đến 20 và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3 đến 20. Trọng lượng phân tử lớn hơn là được ưu tiên đối với polyol và trọng lượng phân tử này là 50 hoặc lớn hơn, tốt hơn là 60 hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là 90 hoặc lớn hơn. So sánh tác dụng làm tăng của, ví dụ, sucroza (trọng lượng phân tử 342), triglycerol (trọng lượng phân tử 240), diglycerol (trọng lượng phân tử 166), và monoglycerol (trọng lượng phân tử 92), tác dụng tăng dần theo thứ tự này.

Các ví dụ về polyol bao gồm etylen glycol ( $C_2H_6O_2$ ) và propylen glycol ( $C_3H_8O_2$ ), là các rượu dihydric; glyxerol ( $C_3H_8O_3$ ), là rượu trihydric; dietylen glycol ( $C_4H_{10}O_3$ ), là rượu tetrahydric; diglycerol ( $C_6H_{14}O_5$ ), là rượu pentahydric; triglycerol ( $C_9H_{20}O_7$ ); và polyglyxerol. Polyetylen glycol, có số lượng lớn nhóm hydroxyl, có thể cũng được sử dụng. Ví dụ về polyol là đường bao gồm sucroza ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ). Ví dụ về

polyol là rượu đường bao gồm xylitol ( $C_5H_{12}O_5$ ), sorbitol ( $C_6H_{14}O_6$ ), mannitol ( $C_6H_{14}O_6$ ), và sorbitan.

Nếu axit hữu cơ như axit succinic hoặc axit tartric được liên kết với polyol thì tác dụng tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic bị giảm. Tuy nhiên, các polyol liên kết với axit hữu cơ có tác dụng tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch có thể phát hiện được thì có thể sử dụng được. Tốt hơn là sử dụng các polyol không liên kết với axit hữu cơ.

Số nguyên tử cacbon trong axit béo bão hòa có trong chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế là nằm trong khoảng từ 8 đến 30. Cụ thể hơn là, các ví dụ bao gồm axit caprylic (axit octanoic) (C8), axit capric (axit decanoic) (C10), axit lauric (axit dodecanoic) (C12), axit myristic (axit tetradecanoic) (C14), axit pentadecylic (axit pentadecanoic) (C15), axit palmitic (axit hexadecanoic) (C16), axit margaric (axit heptadecanoic) (C17), axit stearic (axit octadecanoic) (C18), axit arachidic (axit icosanoic) (C20), axit behenic (axit docosanoic) (C22), axit lignoceric (axit tetradocosanoic) (C24), axit xerotic (axit hexadocosanoic) (C26), axit montanic (axit octadocosanoic) (C26), và axit melisic (C28). Trong số này, axit caprylic, axit capric, axit lauric, axit myristic, axit palmitic, axit stearic, và axit behenic có thể được ưu tiên sử dụng.

Chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế là chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là hợp chất este trong đó nhóm hydroxyl của polyol được liên kết với nhóm carboxyl của (các) axit béo bão hòa bằng liên kết este.

Số lượng (các) axit béo bão hòa được liên kết với 1 phân tử polyol trong hợp chất este của polyol và (các) axit béo bão hòa không bị hạn chế, và (các) axit béo bão hòa có thể được liên kết với chỉ một nhóm hydroxyl. (Các) axit béo bão hòa có thể được liên kết với nhiều nhóm hydroxyl, nhưng không phải tất cả các nhóm hydroxyl. Các ví dụ bao gồm các monoeste, trong đó 1 axit béo được liên kết với polyol, các dieste, trong đó 2 axit béo được liên kết với polyol, và các trieste, trong đó 3 axit béo được liên kết với polyol. Trong hợp chất este, trong đó nhiều axit béo bão hòa được

liên kết với một phân tử polyol, thì nhiều axit béo bão hòa có thể cùng loại hoặc khác loại có thể được liên kết.

Các chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa với lượng 45% (trọng lượng/thể tích) hoặc lớn hơn, tốt hơn là 50% (trọng lượng/thể tích) hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 60% (trọng lượng/thể tích) hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 70% (trọng lượng/thể tích) hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 80% (trọng lượng/thể tích) hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 90% (trọng lượng/thể tích) hoặc lớn hơn, và đặc biệt tốt hơn là 95% (trọng lượng/thể tích) hoặc lớn hơn và có thể với lượng 100% (trọng lượng/thể tích).

Ví dụ về hợp chất este bao gồm các este của axit béo và glyxerol (monoglyxerit), các este của axit béo và polyglyxerol như các este của axit béo và diglyxerol và các este của axit béo và triglyxerol, các este của axit béo và propylen glycol, các este của axit béo và sorbitan, và các este của axit béo và sucroza. Cụ thể hơn, ví dụ gồm glyxerol caprylat, glyxerol caprat, glyxerol laurat, glyxerol myristat, glyxerol palmitat, glyxerol stearat, glyxerol behenat, diglyxerol caprylat, diglyxerol caprat, diglyxerol laurat, diglyxerol myristat, diglyxerol palmitat, diglyxerol stearat, diglyxerol behenat, triglyxerol caprylat, triglyxerol caprat, triglyxerol laurat, triglyxerol myristat, triglyxerol palmitat, triglyxerol stearat, triglyxerol behenat, tetraglyxerol caprylat, tetraglyxerol caprat, tetraglyxerol laurat, tetraglyxerol myristat, tetraglyxerol palmitat, tetraglyxerol stearat, tetraglyxerol behenat, decaglyxerol caprylat, glyxerol caprat, glyxerol laurat, decaglyxerol myristat, decaglyxerol palmitat, decaglyxerol stearat, decaglyxerol behenat, sucroza caprylat, sucroza caprat, sucroza laurat, sucroza myristat, sucroza palmitat, sucroza stearat, và sucroza behenat.

Hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa hoặc chế phẩm chứa hợp chất este này đóng vai trò là chất hoạt động bề mặt và cũng có thể được đề cập như là chất hoạt động bề mặt không ion loại este hoặc chất hoạt động bề mặt loại polyol. Hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa hoặc chế phẩm chứa hợp chất este này đóng vai trò là chất nhũ hóa và các chất nhũ hóa có bán trên thị trường có thể được sử dụng.

Ví dụ về các chất nhũ hóa chứa hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa này bao gồm các chất dưới đây. Trong phần mô tả dưới đây, loại hợp chất este được

liệt kê trong dấu ngoặc đơn sau nhãn hiệu của chất nhũ hóa và chất nhũ hóa chứa hầu hết là hợp chất este trong dấu ngoặc đơn. Hàm lượng (trọng lượng/thể tích) của hợp chất este là 45% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 80% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 85% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là 95% hoặc lớn hơn.

Các hợp chất este của axit béo và glyxerol bao gồm các chất nhũ hóa dùng trong thực phẩm như Emulsy P-100 (monoglyxerol palmitat và monoglyxerol stearat), Poem M-100 (glyxerol monocaprylat), Poem M-200 (glyxerol monocaprat), Poem M-300 (glyxerol monolaurat), Poem V-100 (glyxerol monostearat), Rikemal B-100 (glyxerol monobehenat), Poem V-200 (glyxerol mono/distearat), Poem B-200 (glyxerol mono/dibehenat), Poem DL-100 (diglyxerol monolaurat), Poem DM-100 (diglyxerol monomyristat), Poem DS-100A (diglyxerol monostearat), Poem DP-95RF (diglyxerol palmitat), Rikemal L-71-D (diglyxerol laurat), Rikemal S-71-D (diglyxerol stearat), Poem TRP-97RF (triglyxerol monopalmitat), Poem J-4081V (tetraglyxerol stearat), Poem J-0021 (decaglyxerol laurat), và Poem J-0081HV (decaglyxerol stearat) (tất cả các chất này đều của Riken Vitamin Co., Ltd.), đây là các este của axit béo và glyxerol hoặc các este của axit béo và polyglyxerol.

Ví dụ về hợp chất este của axit béo và propylen glycol bao gồm các chất nhũ hóa dùng trong thực phẩm như Rikemal PL -100 (propylen glycol monolaurat), Rikemal PP -100 (propylen glycol monopalmitat), Rikemal PS -100 (propylen glycol monostearat), và Rikemal PB-100 (propylen glycol monobehenat) (tất cả các chất này đều của Riken Vitamin Co., Ltd.).

Các ví dụ về các hợp chất este của axit béo và sorbitan bao gồm các chất nhũ hóa dùng trong thực phẩm như Rikemal L-250A (sorbitan laurat), Rikemal P-300 (sorbitan palmitat), Poem S-60V (sorbitan stearat), Poem S-65V (sorbitan tristearat), Rikemal B-150 (sorbitan tribehenat), Rikemal C-250 (sorbitan caprat) (tất cả các chất này đều của Riken Vitamin Co., Ltd.).

Ví dụ về các hợp chất este của axit béo và sucroza bao gồm các chất nhũ hóa dùng trong thực phẩm như Ryoto (nhãn hiệu đã đăng ký) Sugar Ester S-1570, S-1670 (sucroza stearat), Ryoto (nhãn hiệu đã đăng ký) Sugar Ester P-1570, P-1670 (sucroza palmitat), Ryoto (nhãn hiệu đã đăng ký) Sugar Ester M-1695 (sucroza myristat),

Ryoto (nhãn hiệu đã đăng ký) Sugar Ester P-1695 (sucroza laurat), Ryoto (nhãn hiệu đã đăng ký) Sugar Ester B-370 (sucroza behenat) (tất cả các chất này đều của Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation).

Ví dụ về các chất nhũ hóa dùng trong thực phẩm trong đó axit hữu cơ được liên kết với polyol bao gồm Poem W-60 (axit béo diaxetyltartric monoglyxerit), Poem B-15V và Poem BS-20 (axit béo succinic monoglyxerit), và Poem K-30 (axit béo xitric monoglyxerit) (tất cả các chất này đều của Riken Vitamin Co., Ltd.).

Vi khuẩn axit lactic mà hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của chúng được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế là vi khuẩn axit lactic mà vốn có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch ngay cả khi không có chế phẩm theo sáng chế. Cụm từ "có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch" có nghĩa là vi khuẩn axit lactic có tác dụng đối với các tế bào có khả năng tạo miễn dịch là các tế bào sản sinh interferon và thúc đẩy sự sản sinh interferon của chúng *in vivo* và *in vitro*. Hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch có thể còn được gọi là hoạt tính cảm ứng sản sinh interferon. Các tế bào có khả năng tạo miễn dịch bao gồm các tế bào lách và các nguyên tủy bào. Các ví dụ cụ thể về các tế bào có khả năng tạo miễn dịch bao gồm các tế bào đuôi gai dạng tương bào (plasmacytoid dendritic cells: pDCs).

Các interferon bao gồm các interferon typ I, các interferon typ II, và các interferon typ III. Các interferon typ I là các xytokin được xem là chống nhiễm virus một cách hiệu quả và bao gồm interferon- $\alpha$  (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 21) và interferon- $\beta$ . Các interferon typ II bao gồm interferon- $\gamma$  và các interferon typ III bao gồm interferon- $\lambda$ . Cụ thể là, vi khuẩn axit lactic có khả năng cảm ứng sự sản sinh các interferon typ I và typ III và đặc biệt là có khả năng cảm ứng sự sản sinh interferon- $\alpha$ , interferon typ I, là được ưu tiên.

Hơn nữa, các vi khuẩn axit lactic nhỏ hơn là được ưu tiên trong ổ các vi khuẩn axit lactic. Ví dụ bao gồm các vi khuẩn axit lactic có đường kính tế bào 5 $\mu$ m hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 2 $\mu$ m hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là 1 $\mu$ m hoặc nhỏ hơn.

Ví dụ về vi khuẩn axit lactic có khả năng cảm ứng sự sản sinh interferon bao gồm các cầu khuẩn axit lactic thuộc giống *Lactococcus*, giống *Leuconostoc*, giống *Pediococcus*, giống *Streptococcus*, giống *Lactobacillus*, và giống *Enterococcus*.

Các vi khuẩn axit lactic này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vi khuẩn axit lactic mà có thể thúc đẩy sự sản sinh interferon từ các tế bào đuôi gai dạng tương bào (pDCs).

Ví dụ về các vi khuẩn axit lactic mà có thể hoạt hóa các tế bào đuôi gai dạng tương bào (pDCs) và thúc đẩy sự sản sinh interferon từ pDCs tốt hơn là bao gồm các cầu khuẩn axit lactic, và tốt hơn nữa là, các vi khuẩn thuộc giống *Lactococcus*, giống *Leuconostoc*, giống *Pediococcus*, và giống *Streptococcus*. Cụ thể hơn, ví dụ bao gồm *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*, *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus damnosus*, và *Streptococcus thermophilus*. Khi các tế bào đuôi gai dạng tương bào được hoạt hóa bằng vi khuẩn axit lactic, sự nhô ra tế bào, đặc trưng của các tế bào đuôi gai được hoạt hóa, xuất hiện và các tế bào này sản sinh các interferon typ I và typ III.

Ví dụ cụ thể về các chủng vi khuẩn axit lactic này bao gồm *Lactococcus garvieae* NBRC100934, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JCM16167, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NBRC100676, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* JCM1180, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* JCM11040, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC12007, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NRIC1150, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM20101, *Leuconostoc lactis* NBRC12455, *Leuconostoc lactis* NRIC1540, *Pediococcus damnosus* JCM5886, *Streptococcus thermophilus* TA-45. Trong số này, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 và *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM20101, mà có khả năng cảm ứng đặc biệt cao đối với việc sản sinh interferon- $\alpha$ , và đặc biệt là *Lactococcus lactis* JCM5805 có thể được ưu tiên sử dụng.

Ví dụ về các vi khuẩn axit lactic thuộc giống *Lactobacillus* bao gồm *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 6-206826 A (1994)) và ví dụ về chủng cụ thể bao gồm *Lactobacillus brevis*

*subsp. Coagulans* KB290. Ví dụ về các vi khuẩn axit lactic thuộc giống *Enterococcus* bao gồm *Enterococcus faecalis* và ví dụ về các chủng cụ thể bao gồm *Enterococcus faecalis* NF-1011, *Enterococcus faecalis* FK-23, và *Enterococcus faecalis* NT.

Hơn nữa, vi khuẩn axit lactic có hoạt tính cảm ứng interferon đối với cơ thể sống ngay cả khi được dùng qua đường miệng là được ưu tiên để tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch theo sáng chế. *Lactococcus lactis* JCM5805 nêu trên có thể có hoạt tính cảm ứng sản sinh INF cao đối với cơ thể sống ngay cả khi được dùng qua đường miệng.

Hơn nữa, các chủng vi khuẩn tương đương với *Lactococcus garvieae* NBRC100934, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* JCM16167, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC100676, *Lactococcus lactis subsp. hordniae* JCM1180, *Lactococcus lactis subsp. hordniae* JCM11040, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NBRC12007, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NRIC1150, *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM20101, *Leuconostoc lactis* NBRC12455, *Leuconostoc lactis* NRIC1540, *Pediococcus damnosus* JCM5886, *Streptococcus thermophilus* TA-45, *Lactobacillus brevis subsp. Coagulans* KB290, *Enterococcus faecalis* NF-1011, *Enterococcus faecalis* FK-23, *Enterococcus faecalis* NT cũng có thể được sử dụng. Thuật ngữ "các chủng tương đương" chỉ các chủng thu được từ các chủng nêu trên hoặc các chủng mà từ đó các chủng nêu trên thu được hoặc các chủng thể hệ con của chúng. Các chủng tương đương có thể được lưu trữ trong tổ chức bảo tồn chủng khác.

Hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của các vi khuẩn axit lactic nêu trên có thể được gia tăng bằng cách bổ sung chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế vào các vi khuẩn axit lactic nêu trên.

Chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế có thể được sử dụng ở nồng độ sao cho tỷ lệ giữa nồng độ của chế phẩm và nồng độ của vi khuẩn axit lactic là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 50:1. Nồng độ của vi khuẩn axit lactic có thể được biểu hiện dưới dạng trọng lượng của vi khuẩn axit lactic (trọng lượng khô)/thể tích chất lỏng chứa vi khuẩn axit lactic (trọng lượng/thể tích))

và trọng lượng của vi khuẩn axit lactic có thể được đo sau khi ly tâm huyền phù vi khuẩn axit lactic để kết tủa vi khuẩn axit lactic và làm khô phần kết tủa này. Ví dụ, vi khuẩn axit lactic với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,1% (trọng lượng/thể tích) và chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic với lượng nằm trong khoảng từ 0,005 đến 5% (trọng lượng/thể tích) có thể được trộn với nhau. Trong bước trộn này, lượng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic tốt hơn là có thể được thay đổi theo khoảng nồng độ của vi khuẩn axit lactic. Ví dụ, nếu nồng độ vi khuẩn axit lactic là 0,01% (trọng lượng/thể tích), thì chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5% (trọng lượng/thể tích) có thể được bổ sung vào vi khuẩn axit lactic với nồng độ 0,01% (trọng lượng/thể tích) (tỷ lệ giữa nồng độ của chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic và nồng độ vi khuẩn axit lactic là nằm trong khoảng từ 5 đến 50:1) và nếu nồng độ vi khuẩn axit lactic là 0,1% (trọng lượng/thể tích), thì chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5% (trọng lượng/thể tích) có thể được bổ sung vào vi khuẩn axit lactic với nồng độ 0,1% (trọng lượng/thể tích) (tỷ lệ giữa nồng độ của chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic và nồng độ vi khuẩn axit lactic là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5:1). Các tác nhân nghịch đảo hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế có thể làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic ở nồng độ vi khuẩn axit lactic thấp nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,1% (trọng lượng/thể tích) và hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch lớn hơn hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic với nồng độ 0,1% (trọng lượng/thể tích) mà không được bổ sung chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có thể đạt được bằng cách bổ sung chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5% (trọng lượng/thể tích) vào vi khuẩn axit lactic với nồng độ 0,01% (trọng lượng/thể tích).

Do đó, hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của lượng nhỏ vi khuẩn axit lactic có thể được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế. Kết quả là, tác dụng tạo tiềm năng miễn dịch tương đương có

thể đạt được với lượng vi khuẩn axit lactic nhỏ hơn, so với tác dụng tạo tiềm năng miễn dịch đạt được bằng việc sử dụng vi khuẩn axit lactic mà hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của nó không được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế.

Hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế. Hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có thể được gia tăng bằng cách cho vi khuẩn axit lactic tiếp xúc với chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế. Để cho vi khuẩn axit lactic tiếp xúc với chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic, vi khuẩn axit lactic có thể được nuôi cấy với sự có mặt của chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic hoặc chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có thể được bổ sung vào chất lỏng chứa vi khuẩn axit lactic. Cả vi khuẩn axit lactic và chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic đều có thể được chứa trong chế phẩm và có thể được bảo quản trong điều kiện này ở nhiệt độ trong phòng hoặc bằng cách làm lạnh hoặc đông lạnh.

Vi khuẩn axit lactic mà hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của nó được gia tăng tác động lên các tế bào có khả năng tạo miễn dịch là các tế bào sản sinh INF có trong các tế bào ruột, các nguyên tủy bào, hoặc các tế bào lách và thúc đẩy sự sản sinh interferon của các tế bào này. Kết quả là, sự sản sinh interferon bất kỳ trong số các interferon typ I, các interferon typ II, và các interferon typ III có thể được thúc đẩy. Cụ thể là, sự sản sinh các interferon typ I và, cụ thể hơn là, sự sản sinh interferon- $\alpha$  được thúc đẩy. Sự sản sinh các interferon typ II như interferon- $\gamma$  từ tế bào tiêu diệt tự nhiên và tế bào Th1 cũng có thể được thúc đẩy bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế. Sự thúc đẩy sản sinh interferon làm tăng hoạt tính miễn dịch trong cơ thể sống. Các chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế có thể thúc đẩy sự sản sinh đồng thời cả interferon typ I và interferon typ III, tức là, chúng có thể thúc đẩy sự sản sinh đồng thời interferon- $\alpha$ , interferon- $\beta$ , và interferon- $\lambda$ . Hơn nữa, các chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế có thể hoạt hóa các tế bào đuôi gai dạng tương bào (pDCs). Khi các tế bào đuôi gai dạng tương

bào được hoạt hóa, sự nhô ra tế bào, đặc trưng của các tế bào đuôi gai được hoạt hóa, xuất hiện và các tế bào này sản sinh các interferon typ I và typ III.

Việc liệu hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế hay không có thể được xác định bằng cách trộn vi khuẩn axit lactic và các tế bào có khả năng tạo miễn dịch là các tế bào sản sinh interferon, nuôi cấy các tế bào này với sự có mặt của chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế, và đo mức sản sinh interferon từ các tế bào có khả năng tạo miễn dịch để xác định liệu nó có được tăng lên so với mức mà không bổ sung chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic. Sự tăng mức sản sinh interferon có thể được đánh giá bằng cách đo lượng interferon trong môi trường nuôi cấy bằng ELISA. Nếu hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế, thì lượng sản sinh interferon- $\alpha$  từ các tế bào sản sinh interferon được gia tăng khoảng 10% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 20% hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 40% hoặc lớn hơn, hoặc tốt nhất là 80% hoặc lớn hơn nhờ vi khuẩn axit lactic mà hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của nó được gia tăng. Mức độ tăng có thể được thể hiện, ví dụ, bằng nồng độ của interferon- $\alpha$  trong môi trường vi khuẩn axit lactic khi lượng interferon- $\alpha$  sản sinh được được đo *in vitro*.

Vi khuẩn axit lactic mà hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của nó được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc để cảm ứng sự sản sinh của interferon và tăng hoạt tính miễn dịch trong cơ thể sống. Tức là, vi khuẩn axit lactic mà hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của nó được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có thể được sử dụng làm chất hỗ trợ miễn dịch hoặc tác nhân tạo tiềm năng miễn dịch. Thuốc này có thể được sử dụng làm tác nhân phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh ung thư bao gồm bệnh ung thư thận, bệnh đa u tủy, bệnh bạch cầu tủy sinh mạn tính, bệnh bạch cầu tế bào lông, u nguyên bào đệm, u nguyên bào tủy, u tế bào hình sao, u hắc sắc tố ác tính, u sùi dạng nấm, và bệnh bạch cầu tế bào T ở người lớn; các bệnh nhiễm virus bao gồm viêm não xơ hóa bán cấp tiến triển, bệnh tủy sống HTLV-1, bệnh viêm gan B, và bệnh viêm gan C; các bệnh nhiễm khuẩn

như Chlamydia (bệnh hoa liễu), Mycobacteria (bệnh lao), Listeria (bệnh nhiễm trùng), Staphylococcus (bệnh ngộ độc thực phẩm), và Helicobacter (bệnh viêm dạ dày); và các bệnh tự miễn bao gồm bệnh đa xơ cứng, mà đã được biết như là các bệnh thích hợp với các interferon typ I. Thuốc này đặc biệt hữu dụng làm các tác nhân ngăn ngừa và điều trị chống bệnh nhiễm virus. Thuốc này có thể được sử dụng làm tác nhân phòng ngừa hoặc điều trị chứng loãng xương vì các interferon typ I được biết là có chức năng ức chế sự biệt hóa từ các tế bào tạo xương thành các tế bào hủy xương nhờ hoạt tính của chúng.

Hơn nữa, chủng axit lactic mà hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của nó được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế có thể được sử dụng làm vắc xin bằng cách biểu hiện kháng nguyên tương ứng với bệnh nhất định lên chủng này sử dụng kỹ thuật di truyền. Chủng biểu hiện kháng nguyên ghép khác loài này là đặc biệt thích hợp làm vật chủ cho vắc xin đường uống vì thành tế bào của vi khuẩn axit lactic giúp bảo vệ kháng nguyên tránh axit dạ dày. Các vắc xin thường bao gồm các vắc xin sống, các vắc xin virus toàn bộ bất hoạt, và các vắc xin tiểu phần. Tuy nhiên, các vắc xin sống có nguy cơ chuyển hóa ngược thành các virus gây bệnh, các vắc xin virus toàn bộ bất hoạt có thể gây ra các tác dụng phụ do các tạp chất, và các vắc xin tiểu phần, là loại an toàn nhất, thì có các vấn đề về hiệu lực. Để khắc phục các vấn đề này, các vắc xin tái tổ hợp chỉ biểu hiện kháng nguyên quan tâm đã được phát triển. Sự biểu hiện của kháng nguyên trên vi khuẩn axit lactic mà hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của nó được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế sẽ tạo ra tác dụng hỗ trợ và rất hữu dụng.

Dạng vi khuẩn axit lactic mà hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của nó được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể. Ví dụ bao gồm bột, hạt, viên nén, sirô, thuốc tiêm, thuốc nhỏ giọt, thuốc dạng bột, thuốc đạn, hỗn dịch, và thuốc mỡ. Các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng hoặc có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa, như bằng cách tiêm trong tĩnh mạch, tiêm trong cơ, dùng dưới da, dùng qua trực tràng, hoặc dùng qua da, nhưng việc dùng qua đường miệng là được ưu tiên. Tác nhân cảm ứng sự sản sinh interferon nêu trên có thể chứa tá dược,

chất gây rã, chất kết dính, chất làm trơn, và/hoặc chất màu. Ví dụ về tá dược bao gồm glucoza, lactoza, tinh bột ngô, và Sorbit. Ví dụ về chất gây rã bao gồm tinh bột, natri alginat, bột gelatin, canxi cacbonat, canxi xitrat, và dextrin. Ví dụ về chất kết dính bao gồm dimetylxenluloza, rượu polyvinyl, polyvinyl ete, metylxenluloza, etyl xenluloza, gôm Arabian, gelatin, hydroxypropyl xenluloza, và polyvinylpyrrolidon. Ví dụ về các chất làm trơn bao gồm talc, magie stearat, polyetylglycol, và các dầu thực vật được hydro hóa. Liều có thể được xác định nếu thích hợp theo tuổi tác, thể trọng, giới tính của bệnh nhân sử dụng, khác biệt về bệnh tật, và mức độ của các triệu chứng và được dùng một lần mỗi ngày hoặc vài phân liều có thể được dùng mỗi ngày. Lượng môi trường tương ứng với  $1 \times 10^9$  đến  $1 \times 10^{12}$  tế bào trên liều có thể được dùng. Cách khác, 1-1000mg theo trọng lượng của các tế bào vi khuẩn axit lactic trên liều có thể được dùng.

Hơn nữa, vi khuẩn axit lactic mà hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của nó được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế có thể được dùng trong đồ uống hoặc thực phẩm. Việc đưa vi khuẩn axit lactic vào đồ uống hoặc thực phẩm cho phép sử dụng đồ uống hoặc thực phẩm dưới dạng đồ uống hoặc thực phẩm để cảm ứng sự sản sinh interferon, đồ uống hoặc thực phẩm tạo tiềm năng miễn dịch, đồ uống hoặc thực phẩm kích thích miễn dịch hoặc đồ uống hoặc thực phẩm để ngăn ngừa bệnh nhiễm virus. Ví dụ về các đồ uống và thực phẩm nhằm mục đích này bao gồm sữa và các sản phẩm từ sữa; các đồ uống, các đồ gia vị; các đồ uống có cồn; thực phẩm từ nông sản và lâm sản được chế biến; bánh kẹo và bánh mì; bột mì và mì sợi; các hải sản được chế biến; các sản phẩm chế biến từ vật nuôi; dầu và mỡ và dầu và mỡ được chế biến; thực phẩm nấu chín đông lạnh; các thực phẩm hấp chín; các thực phẩm dùng ngay, và các nguyên liệu thực phẩm. Cụ thể là, vi khuẩn axit lactic có thể được sử dụng trong các sản phẩm sữa lên men như sữa chua và pho mát và các đồ uống lên men lactic. Nếu được sử dụng trong đồ uống hoặc thực phẩm lên men, thì lượng vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch cần thiết có thể được bổ sung vào đồ uống hoặc thực phẩm lên men dưới dạng vi khuẩn chết hoặc có thể được sử dụng dưới dạng chất khởi động vi khuẩn axit lactic để tạo ra đồ uống hoặc thực phẩm lên men.

Các đồ uống và thực phẩm theo sáng chế bao gồm các đồ uống và thực phẩm bồi bổ sức khỏe, các đồ uống và thực phẩm để sử dụng cho mục đích sức khỏe cụ thể, các đồ uống và thực phẩm dinh dưỡng chức năng, và các sản phẩm bổ sung vào đồ uống hoặc thực phẩm. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "các đồ uống và thực phẩm để sử dụng cho mục đích sức khỏe cụ thể" được dùng để chỉ các đồ uống và thực phẩm mà được dùng trong chế độ ăn uống nhằm mục đích sức khỏe cụ thể và có chỉ định rằng mục đích sức khỏe này có thể đạt được bằng sự hấp thu. Các đồ uống và các thực phẩm này có thể có chỉ định, ví dụ, rằng nó làm tăng chức năng miễn dịch của cơ thể; hoạt hóa chức năng của chức năng miễn dịch của cơ thể; giảm khả năng bị cảm lạnh; giảm khả năng bị nhiễm các virus như virus cúm, norovirus, hoặc rotavirus; hoặc có tác dụng ngăn ngừa ung thư.

Hơn nữa, chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế có thể được bổ sung vào đồ uống hoặc thực phẩm chứa vi khuẩn axit lactic. Hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có trong đồ uống hoặc thực phẩm được gia tăng bằng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic và chức năng của đồ uống hoặc thực phẩm được cải thiện hơn nữa.

Sáng chế gồm chế phẩm chứa cả vi khuẩn axit lactic và chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế. Chế phẩm này bao gồm các đồ uống và thực phẩm và các dược phẩm.

Chế phẩm chứa cả vi khuẩn axit lactic và chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có thể ở mức sao cho tỷ lệ giữa nồng độ của vi khuẩn axit lactic và nồng độ của chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 50:1. Ví dụ, vi khuẩn axit lactic với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,1% (trọng lượng/thể tích) và chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5% (trọng lượng/thể tích) có thể được trộn với nhau. Trong bước trộn này, lượng chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic tốt hơn là có thể được thay đổi theo khoảng nồng độ của vi khuẩn axit lactic. Ví dụ, nếu nồng độ vi khuẩn axit lactic là 0,01% (trọng lượng/thể tích), thì chế phẩm tăng hoạt

tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5% (trọng lượng/thể tích) có thể được bổ sung vào vi khuẩn axit lactic với nồng độ 0,01% (trọng lượng/thể tích) (tỷ lệ giữa nồng độ của chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic và nồng độ vi khuẩn axit lactic là nằm trong khoảng từ 5 đến 50:1) và nếu nồng độ vi khuẩn axit lactic là 0,1% (trọng lượng/thể tích), thì chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5% (trọng lượng/thể tích) có thể được bổ sung vào vi khuẩn axit lactic với nồng độ 0,1% (trọng lượng/thể tích) (tỷ lệ giữa nồng độ của chế phẩm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic và nồng độ vi khuẩn axit lactic là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5:1).

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn bằng các ví dụ dưới đây, nhưng phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1: Sàng lọc tác nhân làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch

#### **<Phương pháp>**

Các tế bào lách được thu gom từ các con chuột nhắt cái 129/SV theo phương pháp thông thường và các hồng cầu được loại bỏ. Các tế bào lách thu được được tạo huyền phù ở nồng độ  $4 \times 10^6$  tế bào/ml trong môi trường RPMI (Sigma-Aldrich Co. LLC) chứa 10% FBS và 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol. Bổ sung 5  $\mu$ l hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic (chủng JCM5805) và một trong số các mẫu (nguyên liệu) được nêu trên Fig.1 vào 500  $\mu$ l huyền phù tế bào thu được. Các hỗn hợp thu được được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong máy áp CO<sub>2</sub>. Các hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic và một trong số các mẫu được nêu trên fig này chứa vi khuẩn axit lactic với lượng 0,1% (trọng lượng/thể tích) và một trong số các mẫu với lượng 0,25% (trọng lượng/thể tích). Các phần nổi của môi trường nuôi cấy được thu gom 24 giờ sau đó và nồng độ của interferon- $\alpha$  được đo bằng kit thử nghiệm interferon- $\alpha$  (Pestka Biomedical Laboratories, Inc).

#### **<Kết quả>**

Kết quả được minh họa trên Fig.1. JCM5805 một mình biểu thị hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  và hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  được tăng một cách hiệp đồng bằng Poem TRP-97RF (triglyxerol monopalmitat), Ryoto Sugar Ester P1670 (sucroza palmitat), và Poem BS-20 (các este của axit béo và axit succinic và monoglyxerit), đây là các chế phẩm chứa hợp chất este của polyol và axit béo được sử dụng làm chất nhũ hóa, trong khi các polysacarit (GENU pectin, Pectin AYD30T, Unipectine AYD5110SB) không làm tăng hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$ . Kết quả này đã chứng minh rằng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của chủng JCM5805 được gia tăng bằng các hợp chất este của polyol và axit béo mà được sử dụng làm chất nhũ hóa.

Ví dụ 2: Thử nghiệm thu hẹp loại (gốc ưa nước của) hợp chất este của polyol và axit béo

Các hợp chất este của polyol và axit béo là các chất mà giúp đồng nhất hóa các chất mà không trộn lẫn, như nước và dầu, trên bề mặt chung giữa các chất và gồm gốc ưa nước và gốc kỵ nước. Các sản phẩm được biến đổi bằng axit hữu cơ có thể được sử dụng tùy thuộc vào ứng dụng. Để thu hẹp phạm vi các hợp chất este của polyol và axit béo mà làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic, thử nghiệm về polyol, gốc ưa nước, được thực hiện đầu tiên.

#### <Phương pháp>

Bổ sung 5  $\mu$ l hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic (chủng JCM5805) và một trong số các mẫu được nêu trên fig.2 vào 500  $\mu$ l huyền phù tế bào được điều chế bằng phương pháp nêu ở ví dụ 1. Các hỗn hợp thu được được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong máy áp CO<sub>2</sub>. Các hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic và một trong số các mẫu được nêu trên fig này chứa vi khuẩn axit lactic với lượng 0,1% (trọng lượng/thể tích) và một trong số các mẫu với lượng 0,25% (trọng lượng/thể tích). Các mẫu bao gồm mẫu chỉ có vi khuẩn axit lactic, mẫu Emulsy P-100 (chủ yếu chứa hợp chất este của monoglyxerol và axit béo bão hòa) (A) (Riken Vitamin Co., Ltd.), mẫu Poem DP-95RF (chủ yếu chứa hợp chất este của diglyxerol và axit béo bão hòa) (B) (Riken Vitamin Co., Ltd.), mẫu Poem TRP-97RF (chủ yếu chứa hợp chất este của triglyxerol và axit béo bão hòa) (C) (Riken Vitamin Co., Ltd.), và mẫu Ryoto Sugar Ester P-1670 (chủ yếu chứa hợp chất este của sucroza và axit béo bão hòa) (D) (Mitsubishi-Kagaku

Foods Corporation). Các phần nổi của môi trường nuôi cấy được thu gom 24 giờ sau đó và nồng độ của interferon- $\alpha$  được đo bằng kit thử nghiệm interferon- $\alpha$  (Pestka Biomedical Laboratories, Inc). Do đó, axit béo, gốc ưa nước, được thử nghiệm bằng cách sử dụng các hợp chất este chứa axit béo bão hòa làm gốc kỵ nước thông nhất và nhiều loại polyol: monoglyxerol, diglyxerol, triglyxerol, và sucroza làm gốc ưa nước.

#### <Kết quả>

Kết quả được minh họa trên Fig.2. JCM5805 0,1% một mình biểu thị hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  và hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  được tăng thêm bằng cả hai loại hợp chất este. Do đó, đã phát hiện ra rằng nhiều loại polyol có thể sử dụng được làm gốc ưa nước của hợp chất este để tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic.

Hơn nữa, các polyol có trọng lượng phân tử cao hơn có tác dụng cao hơn.

Ví dụ 3: Thử nghiệm thu hẹp loại (gốc kỵ nước của) hợp chất este của polyol và axit béo

Các polyol được phát hiện là khả dụng làm gốc ưa nước trong hợp chất este để tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic. Do đó, thử nghiệm về gốc kỵ nước được thực hiện tiếp theo.

#### <Phương pháp>

Bổ sung 5  $\mu$ l hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic (chủng JCM5805) và một trong số các mẫu được nêu trên fig.3 vào 500  $\mu$ l huyền phù tế bào được điều chế bằng phương pháp nêu ở ví dụ 1. Các hỗn hợp thu được được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong máy áp CO<sub>2</sub>. Các hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic và một trong số các mẫu được nêu trên fig này chứa vi khuẩn axit lactic với lượng 0,1% (trọng lượng/thể tích) và một trong số các mẫu với lượng 0,25% (trọng lượng/thể tích). Các mẫu bao gồm mẫu chỉ có vi khuẩn axit lactic, mẫu Ryoto Sugar Ester P-1570 (chủ yếu chứa sucroza palmitat) (PA1) (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation), mẫu Ryoto Sugar Ester P-1670 (chủ yếu chứa sucroza palmitat) (PA2) (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation), mẫu Ryoto Sugar Ester S-1570 (chủ yếu chứa sucroza stearat) (SA1) (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation), mẫu Ryoto Sugar Ester S-1670 (chủ yếu chứa sucroza

stearat) (SA2) (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation), và mẫu Ryoto Sugar Ester O-1570 (chủ yếu chứa sucroza oleat) (OA) (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation). Các phần nổi của môi trường nuôi cấy được thu gom 24 giờ sau đó và nồng độ của interferon- $\alpha$  được đo bằng kit thử nghiệm interferon- $\alpha$  (Pestka Biomedical Laboratories, Inc). Do đó, thử nghiệm gốc kỵ nước được thực hiện bằng cách sử dụng các hợp chất este chứa sucroza làm gốc ưa nước thông nhất và các loại axit béo: axit palmitic (axit béo bão hòa), axit stearic (axit béo bão hòa), và axit oleic (axit béo không bão hòa) làm gốc kỵ nước.

#### <Kết quả>

Kết quả được minh họa trên Fig.3. JCM5805 0,1% một mình biểu thị hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  và hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  được gia tăng bằng các hợp chất este chứa axit béo bão hòa, axit stearic hoặc axit palmitic làm gốc kỵ nước và hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  bị suy yếu bởi hợp chất este chứa axit béo không bão hòa, axit oleic. Do đó, axit béo bão hòa đã được chỉ ra rằng là thích hợp làm gốc kỵ nước trong hợp chất este để tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic.

#### Ví dụ 4: Thử nghiệm về loại hợp chất este của polyol và axit béo

Để thử nghiệm chi tiết đối với các hợp chất este làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic, đánh giá các hợp chất este của axit béo và polyol được thực hiện bằng cách sử dụng các thành phần duy nhất, monoglycerol myristat, monoglycerol palmitat, và monoglycerol stearat.

#### <Phương pháp>

Bổ sung 5  $\mu$ l hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic (chủng JCM5805) và một trong số các mẫu được nêu trên fig.4 vào 500  $\mu$ l huyền phù tế bào được điều chế bằng phương pháp nêu ở ví dụ 1. Các hỗn hợp thu được được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong máy áp CO<sub>2</sub>. Các hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic và một trong số các mẫu được nêu trên fig này chứa vi khuẩn axit lactic với lượng 0,1% (trọng lượng/thể tích) và một trong số các este của axit béo và monoglycerol với lượng 0,25% (trọng lượng/thể tích). Các mẫu bao gồm mẫu chỉ có vi khuẩn axit lactic, mẫu monoglycerol myristat,

mẫu monoglycerol palmitat, và mẫu monoglycerol stearat. Các phần nổi của môi trường nuôi cấy được thu gom 24 giờ sau đó và nồng độ của interferon- $\alpha$  được đo bằng kit thử nghiệm interferon- $\alpha$  (Pestka Biomedical Laboratories, Inc). Do đó, thử nghiệm về các thành phần este duy nhất có glyxerol làm gốc ưa nước và axit myristic, axit palmitic, và axit stearic làm gốc kỵ nước được thực hiện.

#### <Kết quả>

Kết quả được minh họa trên Fig.4. JCM5805 0,1% một mình biểu thị hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  và hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  được gia tăng bằng các este của axit béo và monoglycerol chứa axit myristic, axit palmitic, và axit stearic trong gốc kỵ nước. Do đó, thấy rằng là thậm chí các thành phần hợp chất este duy nhất có glyxerol làm gốc ưa nước và axit béo bão hòa làm gốc kỵ nước cũng làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic.

Ví dụ 5: Thử nghiệm 2 về loại hợp chất este của polyol và axit béo

Để thử nghiệm chi tiết đối với các hợp chất este làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic, đánh giá các hợp chất este của axit béo và polyol được thực hiện bằng cách sử dụng thành phần duy nhất, sucroza palmitat.

#### <Phương pháp>

Các nguyên tủy bào được thu gom từ các con chuột nhắt cái 129/SV theo phương pháp thông thường và các hồng cầu được loại bỏ. Các nguyên tủy bào thu được được tạo huyền phù ở nồng độ  $5 \times 10^5$  tế bào/ml trong môi trường RPMI (Sigma-Aldrich Co. LLC) chứa 10% FBS, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol, và 100ng/ml Flt-3L. Môi trường được cấy bằng 1ml huyền phù tế bào thu được và môi trường nuôi cấy này được ủ ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong máy ấp CO<sub>2</sub> trong 1 tuần để cảm ứng các tế bào đuôi gai. Sau 1 tuần nuôi cấy, 10 $\mu$ l hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic (chủng JCM5805) và một trong số các mẫu được nêu trên fig.5 được bổ sung vào 1ml môi trường tế bào nuôi cấy. Các hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic và một trong số các mẫu được nêu trên fig.5 chứa vi khuẩn axit lactic với lượng 0,1% (trọng lượng/thể tích) và một trong số các mẫu với lượng 0,25% (trọng lượng/thể tích). Các mẫu bao gồm mẫu chỉ có vi khuẩn axit lactic, mẫu sucroza palmitat, và mẫu Ryoto Sugar Ester P1670 (chủ yếu

chứa sucroza palmitat) (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation). Các phần nổi của môi trường nuôi cấy được thu gom 24 giờ sau đó và nồng độ của interferon- $\alpha$  được đo bằng kit thử nghiệm interferon- $\alpha$  (Pestka Biomedical Laboratories, Inc).

#### <Kết quả>

Kết quả được minh họa trên Fig.5. JCM5805 0,1% một mình biểu thị hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  và hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  được gia tăng bằng sucroza palmitat đến mức tương tự như mức tăng bởi Ryoto Sugar Ester P1670. Do đó, thấy rằng là thậm chí thành phần hợp chất este duy nhất có sucroza làm gốc ưa nước và axit béo bão hòa làm gốc kỵ nước cũng làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic.

Ví dụ 6: Thử nghiệm về sự biến đổi axit hữu cơ của hợp chất este của polyol và axit béo

Đã xác nhận rằng polyol là thích hợp làm gốc ưa nước và axit béo bão hòa là thích hợp làm gốc kỵ nước trong hợp chất este làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic. Do đó, thử nghiệm về tác dụng của sự có hoặc không có biến đổi axit hữu cơ trong gốc polyol của hợp chất este được thực hiện tiếp theo.

(1) Khi nồng độ vi khuẩn axit lactic là 0,1%

#### <Phương pháp>

Bổ sung 5  $\mu$ l hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic (chủng JCM5805) và một trong số các mẫu được nêu trên fig.6 vào 500  $\mu$ l huyền phù tế bào được điều chế bằng phương pháp nêu ở ví dụ 1. Các hỗn hợp thu được được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong máy áp CO<sub>2</sub>. Các hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic và một trong số các mẫu được nêu trên fig này chứa vi khuẩn axit lactic với lượng 0,1% (trọng lượng/thể tích) và một trong số các mẫu với lượng 0,25% (trọng lượng/thể tích). Các mẫu bao gồm mẫu chỉ có vi khuẩn axit lactic, mẫu Emulsy P-100 (chủ yếu chứa hợp chất este của monoglyxerol và axit béo bão hòa) (A) (Riken Vitamin Co., Ltd.), mẫu Poem W-60 (chủ yếu chứa hợp chất este của diaxetyltartric monoglyxerit và axit béo bão hòa) (B) (Riken Vitamin Co., Ltd.), mẫu Poem B-15V (chủ yếu chứa hợp chất este của succinic monoglaxerit và axit béo bão hòa) (C) (Riken Vitamin Co., Ltd.), và mẫu

Poem BS-20 (chủ yếu chứa hợp chất este của succinic monoglyxerit và axit béo bão hòa) (D) (Riken Vitamin Co., Ltd.). Các phần nổi của môi trường nuôi cấy được thu gom 24 giờ sau đó và nồng độ của interferon- $\alpha$  được đo bằng kit thử nghiệm interferon- $\alpha$  (Pestka Biomedical Laboratories, Inc). Do đó, thử nghiệm về sự biến đổi axit hữu cơ được thực hiện bằng cách sử dụng các hợp chất este có monoglyxerol làm gốc ưa nước thông nhất và axit béo bão hòa làm gốc kỵ nước thông nhất mà axit tartric hoặc axit succinic được liên kết với chúng như là sự biến đổi axit hữu cơ.

#### <Kết quả>

Kết quả được minh họa trên Fig.6. JCM5805 0,1% một mình biểu thị hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  và hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  được gia tăng bằng chất nhũ hóa mà không có sự biến đổi axit hữu cơ, nhưng hoạt tính cảm ứng IFN- $\alpha$  không được gia tăng bằng các hợp chất este được biến đổi bằng axit tartric và axit succinic. Do đó, đã chỉ ra rằng axit béo bão hòa mà không được biến đổi bằng axit hữu cơ là thích hợp làm gốc kỵ nước trong hợp chất este làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic, khi nồng độ vi khuẩn axit lactic là tương đối cao.

(2) Khi nồng độ vi khuẩn axit lactic là 0,01%

#### <Phương pháp>

Bổ sung 5  $\mu$ l hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic (chủng JCM5805) và một trong số các mẫu được nêu trên fig.7 vào 500  $\mu$ l huyền phù tế bào được điều chế bằng phương pháp nêu ở ví dụ 1. Các hỗn hợp thu được được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong máy áp CO<sub>2</sub>. Các hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic và một trong số các mẫu được nêu trên fig này chứa vi khuẩn axit lactic với lượng 0,01% (trọng lượng/thể tích) và một trong số các mẫu với lượng 0,25% (trọng lượng/thể tích). Các mẫu bao gồm mẫu chỉ có vi khuẩn axit lactic, mẫu Emulsy P-100 (chủ yếu chứa hợp chất este của monoglyxerol và axit béo bão hòa) (A) (Riken Vitamin Co., Ltd.), mẫu Poem W-60 (chủ yếu chứa hợp chất este của diaxetyltartric monoglyxerit và axit béo bão hòa) (B) (Riken Vitamin Co., Ltd.), mẫu Poem B-15V (chủ yếu chứa hợp chất este của succinic monoglyxerit và axit béo bão hòa) (C) (Riken Vitamin Co., Ltd.), và mẫu Poem BS-20 (chủ yếu chứa hợp chất este của succinic monoglyxerit và axit béo bão hòa) (D) (Riken Vitamin Co., Ltd.). Các phần nổi của môi trường nuôi cấy được thu

gom 24 giờ sau đó và nồng độ của interferon- $\alpha$  được đo bằng kit thử nghiệm interferon- $\alpha$  (Pestka Biomedical Laboratories, Inc). Do đó, thử nghiệm về sự biến đổi axit hữu cơ được thực hiện bằng cách sử dụng các hợp chất este có monoglycerol làm gốc ưa nước thông nhất và axit béo bão hòa làm gốc kỵ nước thông nhất mà axit tartric hoặc axit succinic được liên kết với chúng như là sự biến đổi axit hữu cơ.

#### <Kết quả>

Kết quả được minh họa trên Fig.7. JCM5805 0,01% một mình biểu thị hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  và hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  được gia tăng bằng chất nhũ hóa không có sự biến đổi axit hữu cơ. Mức tăng hoạt tính cảm ứng là nhỏ hơn với các hợp chất este được biến đổi bằng axit tartric và axit succinic, nhưng mức tăng nhỏ về hoạt tính vẫn được thấy. Do đó, đã chỉ ra rằng axit béo bão hòa là thích hợp làm gốc kỵ nước trong hợp chất este làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic và hợp chất este này là hữu hiệu có hoặc không có sự biến đổi axit hữu cơ, khi nồng độ vi khuẩn axit lactic là thấp.

Ví dụ 7: Thử nghiệm 1 về khoảng nồng độ hợp chất este của polyol và axit béo

#### <Phương pháp>

Bổ sung 5  $\mu$ l hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic (chủng JCM5805) và mẫu được nêu trên fig.8 vào 500  $\mu$ l huyền phù tế bào được điều chế bằng phương pháp nêu ở ví dụ 1. Các hỗn hợp thu được được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong máy áp CO<sub>2</sub>. Các hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic và mẫu được nêu trên fig này chứa vi khuẩn axit lactic với lượng 0,1% (trọng lượng/thể tích) và mẫu với lượng từ 0 đến 1% (trọng lượng/thể tích). Ryoto Sugar Ester P1670 (chủ yếu chứa sucroza palmitat) (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation) được sử dụng làm mẫu. Các phần nổi của môi trường nuôi cấy được thu gom 24 giờ sau đó và nồng độ của interferon- $\alpha$  được đo bằng kit thử nghiệm interferon- $\alpha$  (Pestka Biomedical Laboratories, Inc). Do đó, thử nghiệm về sự phụ thuộc nồng độ của Ryoto Sugar Ester P1670, là hợp chất este, trong khoảng từ 0,05% (trọng lượng/thể tích) đến 1% (trọng lượng/thể tích) được thực hiện với nồng độ JCM5805 cố định là 0,1% (trọng lượng/thể tích).

#### <Kết quả>

Kết quả được minh họa trên Fig.8. JCM5805 0,1% (trọng lượng/thể tích) một mình biểu thị hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  và hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  được gia tăng một cách hiệp đồng theo cách thức phụ thuộc nồng độ vào nồng độ của Ryoto Sugar Ester P1670 trong khoảng từ 0,05% (trọng lượng/thể tích) đến 0,5% (trọng lượng/thể tích). Do đó, hợp chất este trong khoảng nồng độ 0,5 đến 5 so với nồng độ JCM5805, được xác định là 1, biểu thị tác dụng hiệp đồng. Lý do thiếu tác dụng hiệp đồng ở nồng độ hợp chất este 1% (trọng lượng/thể tích) được xem là do nồng độ cao của hợp chất este đã làm tổn thương đến các tế bào.

Ví dụ 8: Thử nghiệm 2 về khoảng nồng độ hợp chất este của polyol và axit béo

#### <Phương pháp>

Bổ sung 5  $\mu$ l hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic (chủng JCM5805) và mẫu được nêu trên fig.9 vào 500  $\mu$ l huyền phù tế bào được điều chế bằng phương pháp nêu ở ví dụ 1. Các hỗn hợp thu được được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong máy áp CO<sub>2</sub>. Các hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic và mẫu được nêu trên fig này chứa vi khuẩn axit lactic với lượng 0,01% (trọng lượng/thể tích) và mẫu với lượng từ 0 đến 0,5% (trọng lượng/thể tích). Ryoto Sugar Ester P1670 (chủ yếu chứa sucroza palmitat) (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation) được sử dụng làm mẫu. Các phần nổi của môi trường nuôi cấy được thu gom 24 giờ sau đó và nồng độ của interferon- $\alpha$  được đo bằng kit thử nghiệm interferon- $\alpha$  (Pestka Biomedical Laboratories, Inc). Do đó, thử nghiệm về sự phụ thuộc nồng độ của Ryoto Sugar Ester P1670, là hợp chất este, trong khoảng từ 0,05% (trọng lượng/thể tích) đến 0,5% (trọng lượng/thể tích) được thực hiện với nồng độ JCM5805 cố định là 0,01% (trọng lượng/thể tích).

#### <Kết quả>

Kết quả được minh họa trên Fig.9. CM5805 0,01% một mình biểu thị hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  và Ryoto Sugar Ester P1670 làm tăng một cách hiệp đồng hoạt tính cảm ứng interferon- $\alpha$  theo cách thức phụ thuộc nồng độ. Tác dụng hiệp đồng được thấy ở khoảng nồng độ hợp chất este từ 0,05 đến 0,5% (trọng lượng/thể tích) và tác dụng hiệp đồng được thấy ở khoảng nồng độ hợp chất este từ 5 đến 50 so với nồng độ JCM5805, được xác định là 1.

Ví dụ 9: Thử nghiệm tác dụng đối với vi khuẩn axit lactic không phải là chủng JCM5805

#### <Phương pháp>

Bổ sung 5 µl hỗn hợp của vi khuẩn axit lactic và mẫu được nêu trên fig.10 vào 500 µl huyền phù tế bào được điều chế bằng phương pháp nêu ở ví dụ 1. Các hỗn hợp thu được được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong máy ấp CO<sub>2</sub>. Các phần nổi của môi trường nuôi cấy được thu gom 24 giờ sau đó và nồng độ của interferon-α được đo bằng kit thử nghiệm interferon-α (Pestka Biomedical Laboratories, Inc). Do đó, tác dụng của hợp chất este (Ryoto Sugar Ester P-1670 (sucroza palmitat) (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation)) đối với vi khuẩn axit lactic *Enterococcus faecalis* và *Lactobacillus brevis subsp. coagulans* được thử nghiệm.

#### <Kết quả>

Kết quả được minh họa trên Fig.10. *Enterococcus faecalis* hoặc *Lactobacillus brevis subsp. coagulans* một mình biểu thị hoạt tính cảm ứng interferon-α (D và B trên Fig.10) và hoạt tính cảm ứng interferon-α được gia tăng bằng Ryoto Sugar Ester P-1670 (E và C trên Fig.10). Điều này chỉ ra rằng vi khuẩn axit lactic mà hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của nó được gia tăng bằng hợp chất este của polyol và axit béo là không chỉ giới hạn ở chủng JCM5805.

#### Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Các tác nhân làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic mà là các hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa theo sáng chế làm tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong các thuốc và các đồ uống và thực phẩm.

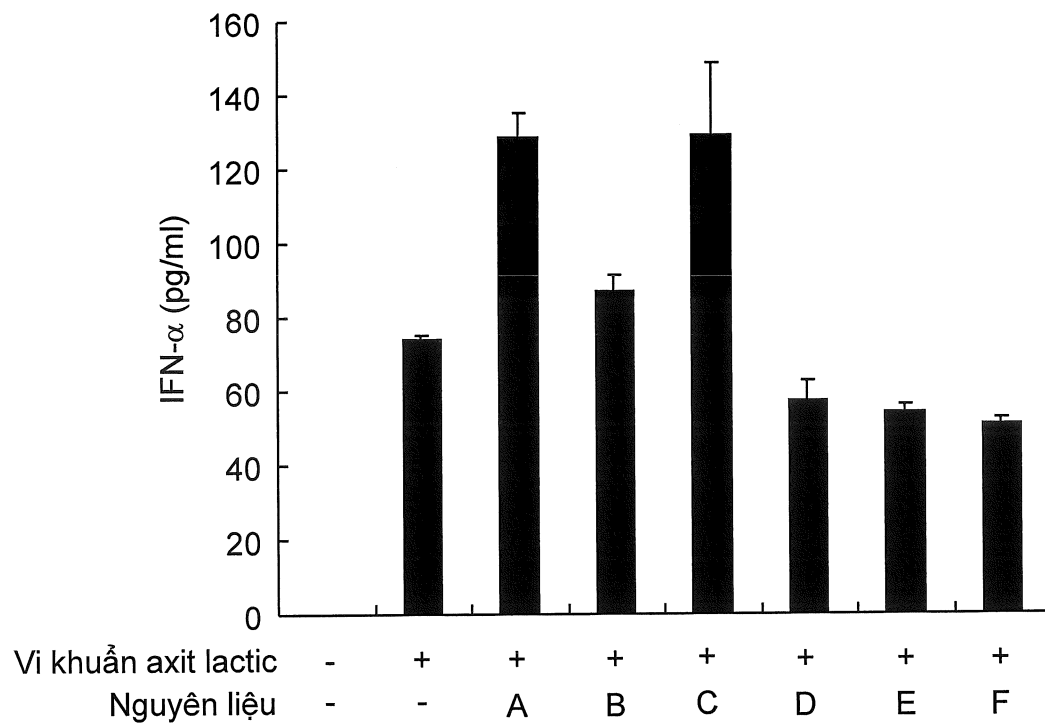
## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch và hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa, trong đó tỷ lệ giữa nồng độ của hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa với nồng độ của vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch nằm trong khoảng từ 0,5 đến 50:1 và nồng độ của hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5% (ngoại trừ chế phẩm trong đó hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa là pentaglycerin monomyristat).
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này là đồ uống hoặc thực phẩm.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này là đồ uống hoặc thực phẩm để tạo tiềm năng miễn dịch.
4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 3, trong đó polyol được chọn từ nhóm bao gồm monoglycerol, polyglycerol, và sucroza.
5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 4, trong đó axit béo bão hòa được chọn từ nhóm bao gồm axit caprylic, axit capric, axit lauric, axit myristic, axit palmitic, axit stearic, và axit behenic.
6. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 5, trong đó hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa không được biến đổi bằng axit hữu cơ bất kỳ.
7. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 6, trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch là vi khuẩn axit lactic có khả năng cảm ứng sự sản sinh interferon của tế bào sản sinh interferon.
8. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 7, trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. hordniae*, *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus damnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus brevis subsp. coagulans*, và *Enterococcus faecalis*.

9. Chế phẩm theo điểm 7 hoặc 8, trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch là *Lactococcus lactis* JCM5805.
10. Phương pháp tăng hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch của vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch, bao gồm cho vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch tiếp xúc với hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa, trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch được cho tiếp xúc với hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa với tỷ lệ giữa nồng độ của hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa với nồng độ của vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch nằm trong khoảng từ 0,5 đến 50:1 và nồng độ của hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5%.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó polyol được chọn từ nhóm bao gồm monoglyxerol, polyglyxerol, và sucroza.
12. Phương pháp theo điểm 10 hoặc 11, trong đó axit béo bão hòa được chọn từ nhóm bao gồm axit caprylic, axit capric, axit lauric, axit myristic, axit palmitic, axit stearic và axit behenic.
13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 10 đến 12, trong đó hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa không được biến đổi bằng axit hữu cơ bất kỳ.
14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 10 đến 13, trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch là vi khuẩn axit lactic có khả năng cảm ứng sự sản sinh interferon của tế bào sản sinh interferon.
15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 10 đến 14, trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*, *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus damnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans*, và *Enterococcus faecalis*.
16. Phương pháp theo điểm 14 hoặc 15, trong đó vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch là *Lactococcus lactis* JCM5805.

17. Chế phẩm chứa vi khuẩn axit lactic và hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa, trong đó tỷ lệ giữa nồng độ của hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa với nồng độ của vi khuẩn axit lactic có hoạt tính tạo tiềm năng miễn dịch nằm trong khoảng từ 0,5 đến 50:1 và nồng độ của hợp chất este của polyol và axit béo bão hòa nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5%.

Fig.1



Nồng độ vi khuẩn axit lactic: 0,1% (trọng lượng/thể tích)

A: Poem TRP-97RF (chất nhũ hóa)

B: Poem BS-20 (chất nhũ hóa)

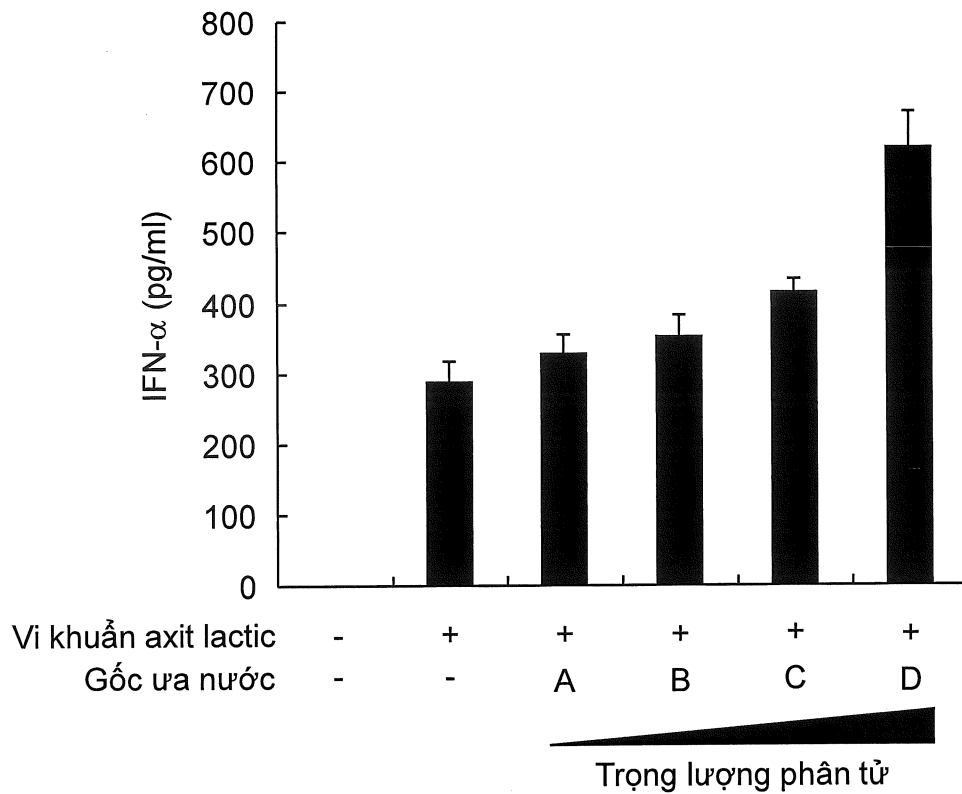
C: Ryoto Sugar Ester P1670 (chất nhũ hóa)

D: GENU pectin (chất làm đặc polysacarit)

E: Pectin AYD30T (chất làm đặc polysacarit)

F: Unipeptine AYD5110SB (chất làm đặc polysacarit)

Fig.2



Nồng độ vi khuẩn axit lactic: 0,1% (trọng lượng/thể tích)

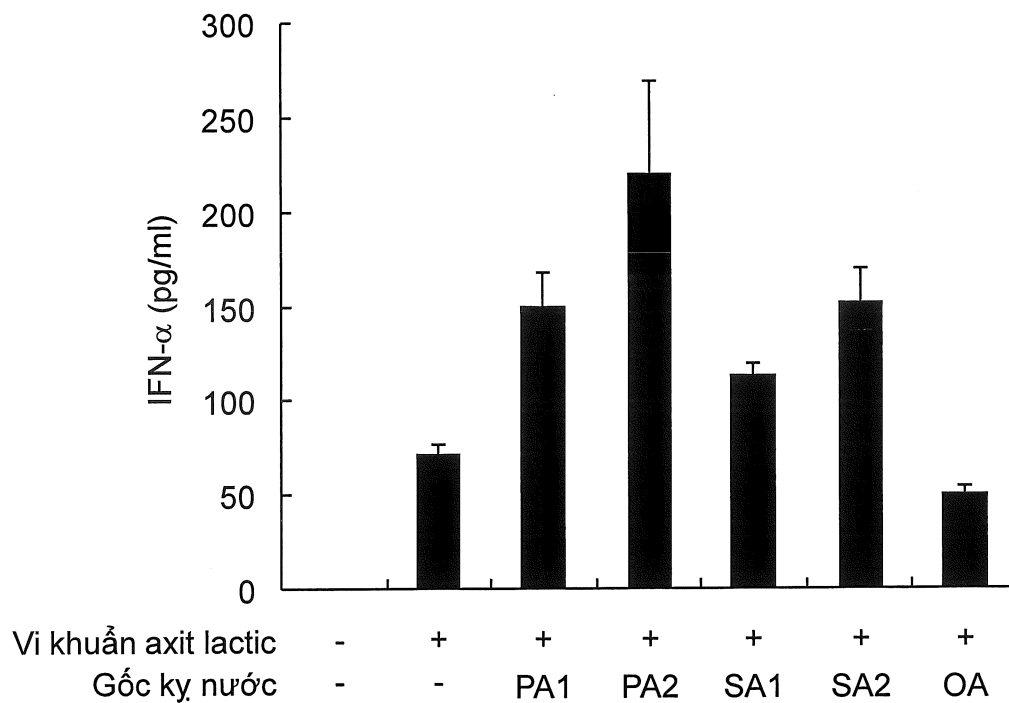
A: Monoglycerol (Emulsy P-100)

B: Diglycerol (Poem DP-95RF)

C: Triglycerol (Poem TRP-97RF)

D: Sucroza (Ryoto Sugar Ester P1670)

Fig.3



Nồng độ vi khuẩn axit lactic: 0,1% (trọng lượng/thể tích)

PA1: Axit palmitic (Ryoto Sugar Ester P1570)

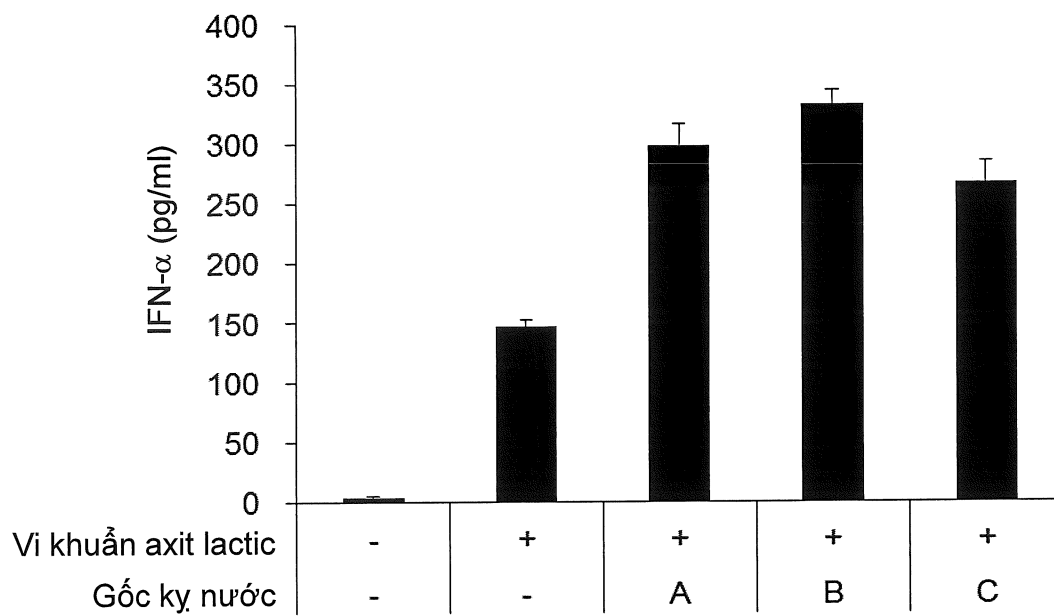
PA2: Axit palmitic (Ryoto Sugar Ester P1670)

SA1: Axit stearic (Ryoto Sugar Ester S1570)

SA2: Axit stearic (Ryoto Sugar Ester S1670)

OA: Axit oleic (Ryoto Sugar Ester O1570)

Fig.4



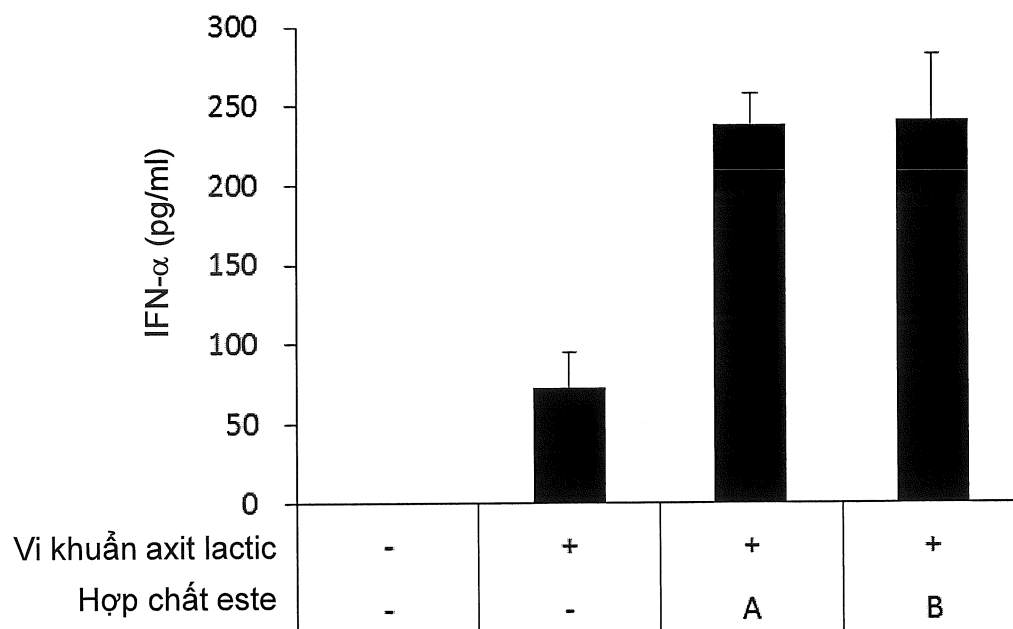
Nồng độ vi khuẩn axit lactic: 0,1% (trọng lượng/thể tích)

A: Monoglyxerol myristat

B: Monoglyxerol palmitat

C: Monoglyxerol stearat

Fig.5

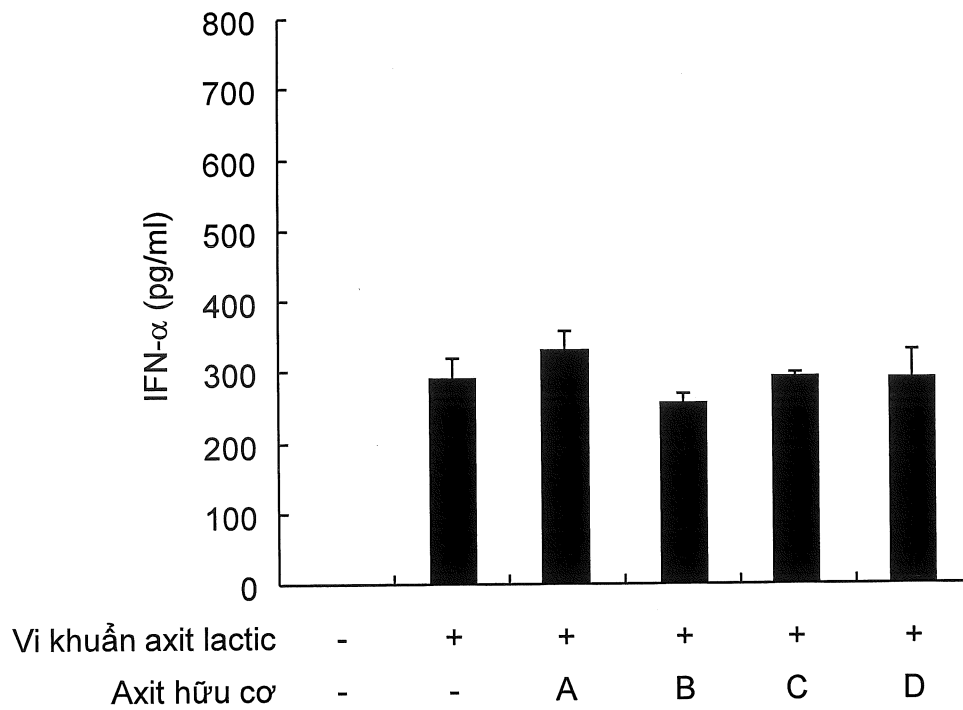


Nồng độ vi khuẩn axit lactic: 0,1% (trọng lượng/thể tích)

A: Sucroza palmitat

B: Ryoto Sugar Ester P1670

Fig.6



Nồng độ vi khuẩn axit lactic: 0,1% (trọng lượng/thể tích)

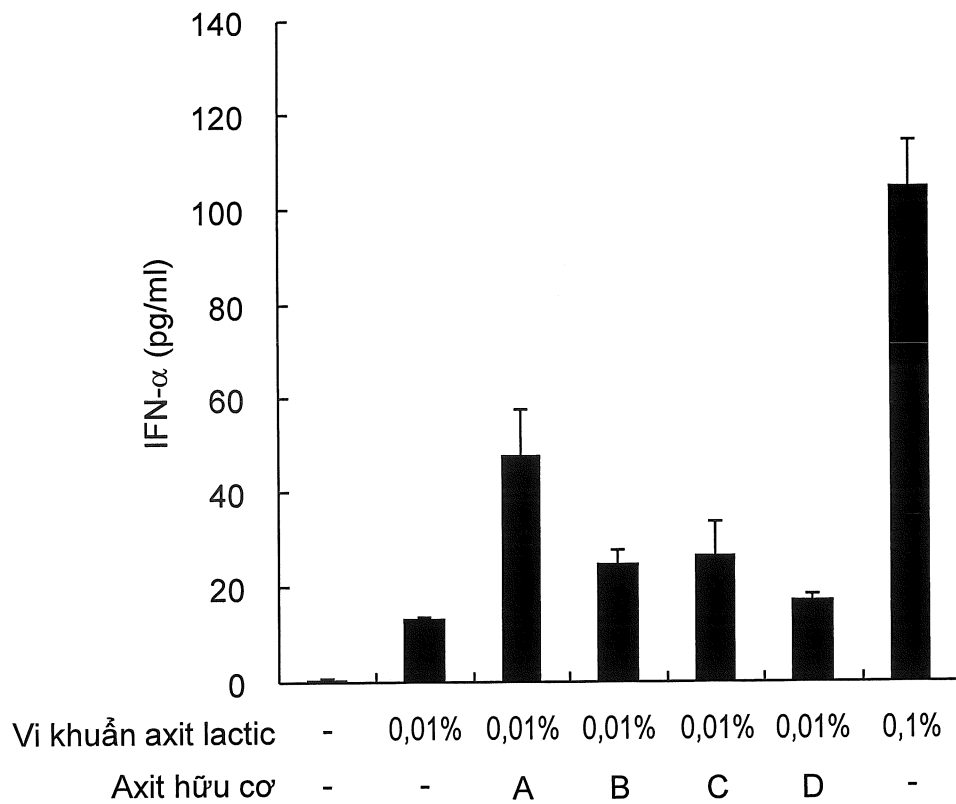
A: Không có biến đổi (Emulsy P-100)

B: Axit tartric (Poem W-60)

C: Axit succinic (Poem B-15V)

D: Axit succinic (Poem BS-20)

Fig.7



Nồng độ vi khuẩn axit lactic: 0,01% (trọng lượng/thể tích)

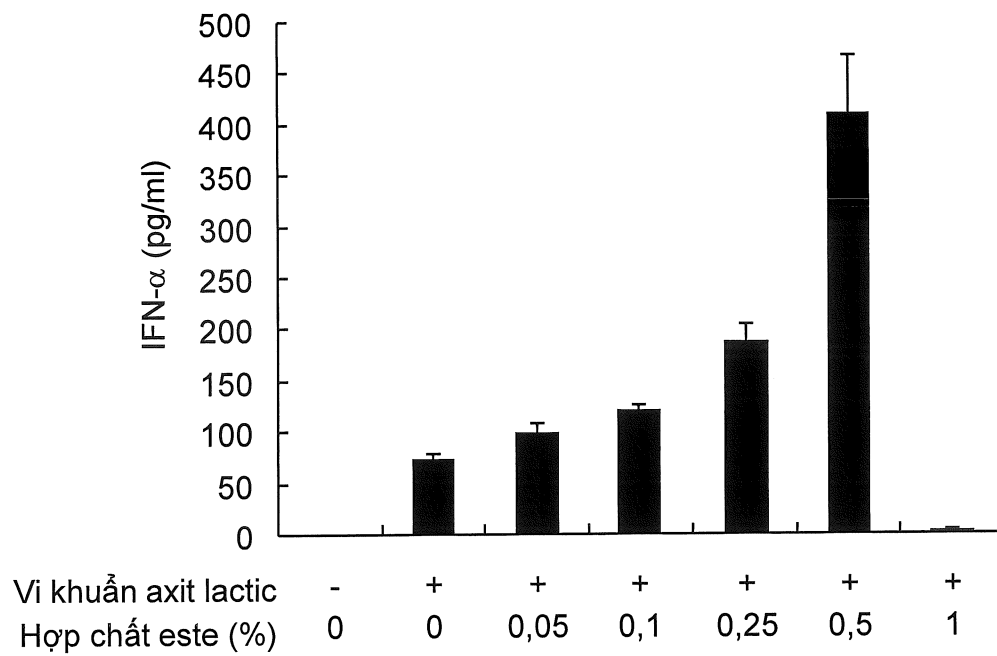
A: Không có biến đổi (Emulsy P-100)

B: Axit tartaric (Poem W-60)

C: Axit succinic (Poem B-15V)

D: Axit succinic (Poem BS-20)

Fig.8



Nồng độ vi khuẩn axit lactic: 0,1% (trọng lượng/thể tích)  
 Hợp chất este: Ryoto Sugar Ester P1670

Fig.9

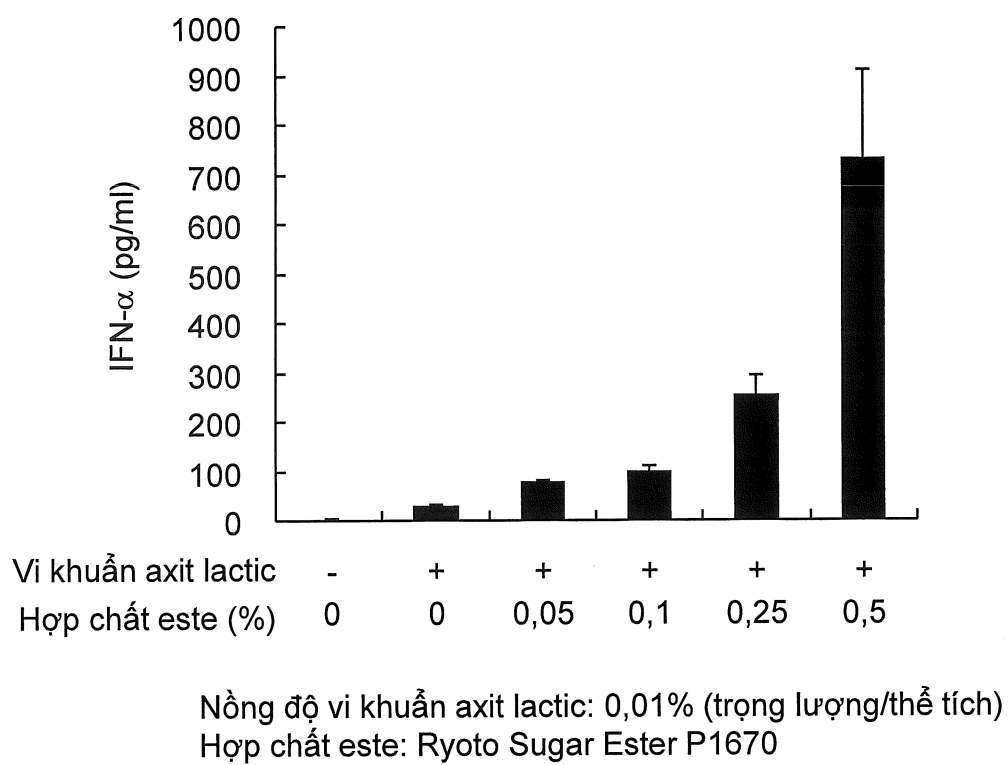


Fig.10

