



(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)



1-0036180

(51)⁷ C12N 1/20; A61K 35/745; C12R 1/24; (13) B
C12R 1/225; A23L 33/135; A61K
35/747

(21) 1-2018-01553

(22) 06/09/2016

(86) PCT/KR2016/009961 06/09/2016

(87) WO 2017/047962 23/03/2017

(30) 10-2015-0130124 15/09/2015 KR; 10-2016-0001312 06/01/2016 KR

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/07/2018 364A

(73) UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE
UNIVERSITY (KR)

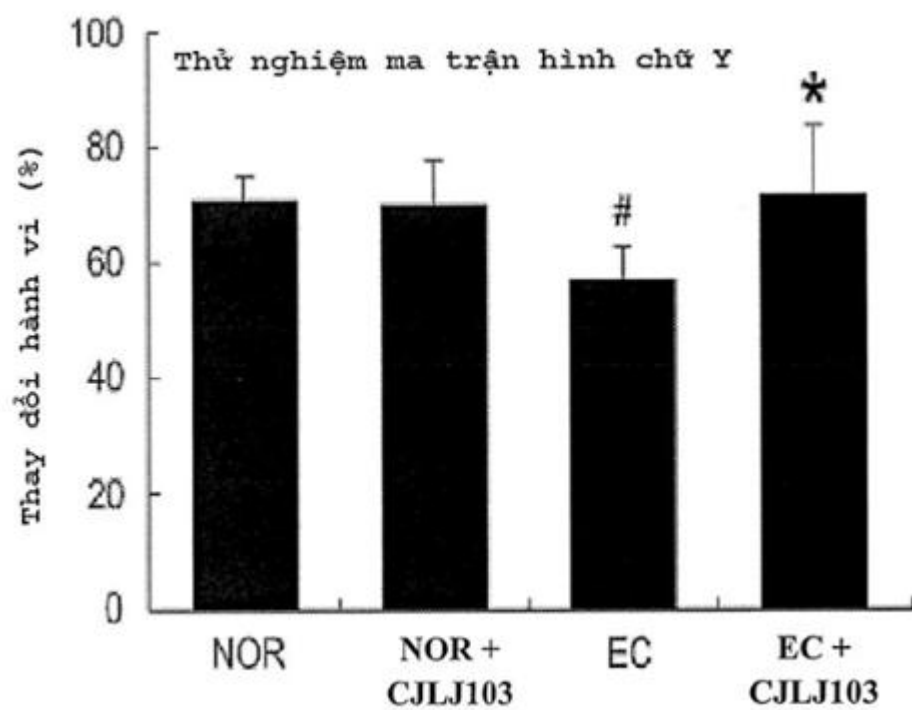
(Seocheon-dong, Kyung Hee University Global Campus) 1732 Deogyong-daero,
Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 17104, Republic of Korea

(72) KIM, Dong Hyun (KR); HAN, Myung Joo (KR).

(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) VI KHUẨN LACTOBACILLUS, DƯỢC PHẨM VÀ THỰC PHẨM CHỨA VI
KHUẨN NÀY DÙNG ĐỂ PHÒNG, CẢI THIỆN HOẶC ĐIỀU TRỊ RỐI LOẠN
CHỨC NĂNG NHẬN THỨC

(57) Sáng chế đề xuất vi khuẩn *lactobacillus johnsonii* CJLJ103 (số truy cập: KCCM 11763P), dược phẩm và thực phẩm chứa vi khuẩn này, vi khuẩn *lactobacillus* theo sáng chế được phân lập từ kim chi và do đó có độ an toàn cao, và có nhiều hoạt tính sinh lý khác nhau như hoạt tính cải thiện trí nhớ, hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt, hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS), và hoạt tính ức chế β -glucuronidaza. Vi khuẩn *lactobacillus* theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng thực phẩm chức năng hoặc dược liệu dùng để phòng, cải thiện, hoặc điều trị rối loạn chức năng nhận thức.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi khuẩn lactic, cụ thể hơn là vi khuẩn lactic được phân lập từ kim chi có nhiều hoạt tính sinh lý khác nhau, như hoạt tính cải thiện trí nhớ, hoạt tính cảm ứng biểu hiện của protein liên kết vòng bịt, hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS) hoặc hoạt tính ức chế β -glucuronidaza, sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm và thực phẩm chứa chứa vi khuẩn lactic này để phòng, làm giảm nhẹ hoặc điều trị các rối loạn chức năng nhận thức.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Với tình trạng xã hội ngày càng bị già hóa, số lượng các bệnh nhân bị các bệnh thoái hóa não, như bệnh mất trí nhớ Alzheimer, bệnh rối loạn vận động Parkinson và chứng sa sút trí tuệ đang gia tăng nhanh chóng. Bệnh Alzheimer, là bệnh thoái hóa não phổ biến nhất gây ra chứng sa sút trí tuệ, bệnh tiến triển chậm và làm giảm dần các chức năng nhận thức bao gồm cả trí nhớ. Trong khi nguyên nhân chính xác của bệnh Alzheimer chưa được tìm thấy, thì nó được cho rằng có liên quan chặt chẽ tới sự lão hóa và đang gia tăng cùng với sự gia tăng dân số già.

Bệnh Parkinson là bệnh thoái hoá tiến triển mạn tính của hệ thống thần kinh gây ra bởi sự thiếu hụt các tế bào thần kinh dopamin, biểu hiện ở các triệu chứng chuột rút, vận động chậm và mất ổn định tư thế. Các bệnh nhân bị bệnh Alzheimer có biểu hiện của hội chứng sa sút trí tuệ, chẳng hạn như suy giảm khả năng nói và giảm chức năng điều hành của não, trong khi đó, các bệnh nhân bị bệnh Parkinson có biểu hiện của hội chứng sa sút trí tuệ, chẳng hạn như mất khả năng tập trung và khả năng phán đoán về không gian/thị giác, rối loạn chức năng điều hành của não và suy nghĩ chậm.

Chứng sa sút trí tuệ có thể được định nghĩa là tình trạng mà người ổn định về thể chất bị tổn hại đến chức năng não do nhiều nguyên nhân khác nhau và dần dần suy giảm khả năng nhận thức tổng thể, ảnh hưởng lớn đến các hoạt động trong đời sống hằng ngày. Khả năng nhận thức ở đây có nghĩa là các năng lực trí tuệ khác nhau, chẳng hạn như trí nhớ, khả năng nói, khả năng thị giác - không gian, phán đoán và tư duy trừu tượng. Mỗi khả năng nhận thức có liên quan mật thiết với một phần nhất định của não. Khoảng 50% chứng sa sút trí tuệ là của người mắc bệnh Alzheimer, 20 đến 30% chứng sa sút trí tuệ não mạch và có các loại chứng sa sút trí tuệ khác, như chứng sa sút trí tuệ do rượu, chứng sa sút trí tuệ thể Lewy, chứng sa sút trí tuệ do tổn thương thùy trán – thái dương và chứng sa sút trí tuệ do bệnh Parkinson. Gần đây, đã có những nghiên cứu cho thấy nhiều bệnh thoái hóa não bao gồm cả chứng sa sút trí tuệ có liên quan đến hội chứng thấm qua ruột hoặc rối loạn hệ vi khuẩn ở ruột.

Hội chứng thấm qua ruột và chứng sa sút trí tuệ

Ống dạ dày ruột của cơ thể người có chứa dịch nhầy và lông nhung để hấp thu hiệu quả các chất dinh dưỡng và cũng ngăn chặn sự hấp phụ các vi sinh vật gây bệnh có trọng lượng phân tử cao hoặc các chất độc do các vi sinh vật đó sinh ra. Ngoài ra, cơ thể người còn có hệ thống miễn dịch có khả năng bảo vệ cơ thể khỏi sự xâm nhập của kháng nguyên bên ngoài có trọng lượng phân tử cao. Tuy nhiên, do nhiễm các vi sinh vật gây bệnh hoặc nhiễm độc tố, sự căng thẳng quá mức, chế độ ăn với các loại thực phẩm nhiều chất béo vốn có khả năng làm tăng nhanh vi khuẩn có hại trong ống dạ dày ruột, uống rượu quá mức, lạm dụng thuốc (ví dụ thuốc kháng sinh) và các thói quen tiêu cực khác, nên hệ vi khuẩn ở ruột bị xáo trộn, gây ra sự bất thường trong hệ thống miễn dịch của ống dạ dày ruột, và gây ức chế sự biểu hiện của các protein liên kết vòng bọt. Nếu sự biểu hiện của protein liên kết vòng bọt bị ức chế, thì sự liên kết chặt của các tế bào niêm mạc bị lỏng lẻo, và sự xâm nhập của các phân tử cỡ lớn vào cơ thể có thể thông qua khe liên kết lỏng lẻo này và gây ra những bất thường trong hệ thống miễn dịch. Hội chứng thấm qua ruột còn được gọi là hội chứng rò rỉ ruột, đề cập đến tình trạng trong đó các yếu tố bên ngoài như các loại thức ăn khó tiêu, vi sinh vật gây bệnh, chất độc hoặc tương tự

liên tục được đưa vào máu, do hệ thống rào chắn liên kết vòng bít của các tế bào biểu mô cấu tạo nên ống dạ dày ruột không hoạt động trơn tru. Khi hội chứng thấm qua ruột xảy ra, các kháng nguyên bên ngoài mà bình thường không được hấp thu vào cơ thể sẽ đi vào cơ thể, do đó gây ra viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, tổn thương gan, rối loạn chức năng gan, các bệnh dị ứng (bao gồm cả hen suyễn), bệnh dị ứng có tính di truyền, các bệnh tự miễn, chứng phân mỡ, rối loạn hấp thu ở ruột, mụn nhọt, sự tăng tốc độ lão hóa, nhiễm nội độc tố máu, nhiễm trùng đường ruột, hội chứng ruột kích thích, hội chứng mệt mỏi mạn tính, bệnh vảy nến, viêm khớp dạng thấp, thiếu năng tụy, các bệnh viêm khớp hoặc các bệnh tương tự. Gần đây, đã có những nghiên cứu cho rằng hội chứng thấm thấu qua ruột có liên quan đến chứng sa sút trí tuệ do bệnh Parkinson hay chứng lão hóa gây ra.

Rối loạn hệ vi khuẩn ở ruột và chứng sa sút trí tuệ

Có rất nhiều vi khuẩn sống trong đường tiêu hóa của cơ thể người. Cơ thể con người có khoảng 10 nghìn tỷ tế bào, nhưng có khoảng 100 nghìn tỷ vi khuẩn có kích thước gấp 10 lần tế bào bình thường. Những vi khuẩn này có thể được chia thành nhóm các vi khuẩn đường ruột có lợi cho sức khỏe và các vi khuẩn có hại cho sức khỏe con người. Sức khỏe của con người có thể được duy trì khi các vi khuẩn có lợi như *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* và các loại tương tự chiếm ưu thế hơn trong đường tiêu hóa so với các vi khuẩn có hại. Nếu không sẽ có thể gây ra các bệnh như béo phì, hội chứng rò rỉ ruột, các bệnh về gan, lão hóa nhanh, viêm ruột non, chứng sa sút trí tuệ và những bệnh tương tự. Sự gia tăng các vi sinh vật gây hại trong hệ vi khuẩn ở ruột (cụ thể là: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, vv) làm tăng hoạt động của NF-kB trong các tế bào ruột, yếu tố này có thể làm tăng đáng kể tình trạng của các bệnh thoái hóa não, như bệnh Alzheimer và bệnh Parkinson, và chứng sa sút trí tuệ.

Probiotics là tập hợp các vi sinh vật sống nhằm cải thiện môi trường vi sinh vật của người chủ trong hệ tiêu hóa của động vật, bao gồm cả con người, và có tác dụng có lợi cho sức khỏe của vật chủ. Để có hiệu quả probiotic, thì điều cần thiết là cần có khả năng chịu axit tuyệt tốt, chịu được dịch mật và bám được trên các tế bào

biểu mô bởi hầu hết các probiotic này phải đến ruột non khi được dùng bằng đường uống và phải được bán dính chặt với bề mặt ruột. Các chủng vi khuẩn lactic được sử dụng làm probiotic vì chúng đóng vai trò phân hủy các protein phức tạp và protein sợi để tạo ra các chất dinh dưỡng quan trọng trong khi sống trong hệ thống tiêu hóa của cơ thể người. Các chủng vi khuẩn lactic đã được báo cáo là có tác dụng như duy trì hệ vi khuẩn bình thường ở ruột, cải thiện hệ vi khuẩn ở ruột, có hiệu quả chống bệnh tiêu đường và chống tăng nhiễm mỡ máu, ức chế sự gây ung thư, ức chế bệnh viêm đại tràng, và hoạt động không đặc hiệu của hệ miễn dịch vật chủ. Trong số các chủng vi khuẩn lactic này, chủng *Lactobacillus* sp. là chủng chính của các hệ vi khuẩn thông thường sống trong ruột của cơ thể người và từ lâu đã được biết đến là quan trọng trong việc duy trì hệ thống tiêu hóa khỏe mạnh và duy trì môi trường âm đạo. Hiện tại, theo hướng dẫn của Sở Y tế Công cộng Hoa Kỳ, tất cả các chủng *Lactobacillus* được lưu giữ trong Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC) được xếp loại 'An toàn sinh học cấp 1', được biết là không có nguy cơ gây ra bệnh ở người hay động vật. Trong khi đó, các chủng vi khuẩn lactic kim chi có liên quan đến quá trình lên men kim chi đã được báo cáo là có tác dụng tăng cường miễn dịch, hiệu quả kháng khuẩn, hiệu quả chống oxy hóa, tác dụng chống ung thư, tác dụng chống béo phì, có tác dụng dự phòng cao huyết áp hoặc hiệu quả phòng táo bón [Hivak P, Odrska J, Ferencik M, Ebringer L, Jahnova E, Mikes Z.: Một năm áp dụng Probiotic chủng *Enterococcus faecium* M-74 làm giảm mức cholesterol trong huyết thanh: Bratisl lek Listy 2005; 106(2); 67-72; Agerholm-Larsen L. Bell ML. Grunwald GK. Astrup A. : Hiệu quả của sản phẩm sữa probiotic đối với cholesterol huyết tương: các nghiên cứu phân tích tổng hợp trong thời gian ngắn; Eur J Clin Nutr. 2000; 54 (11) 856-860; Jaroslava Helper, Jian Zhang, Stephen J Lewis and Wani O Li; Ảnh hưởng của dịch nổi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* tới trọng lượng cơ thể và sự biểu hiện leptin ở chuột; Tạp chí BMC complementary and alternative medicine. 2008; 8(5)1-8].

Do nhiều hoạt tính sinh học của các chủng vi khuẩn lactic được biết đến, nên gần đây đã có một số lượng lớn các nghiên cứu được tiến hành với dự định phát triển các chủng vi khuẩn lactic ở ruột có chức năng và sự an toàn cao đối với cơ thể con người và đưa nó vào làm thành phần của các sản phẩm dược phẩm hoặc các

thực phẩm chức năng. Cụ thể như, Công báo sáng chế Hàn Quốc cho đơn số 10-1476236 bộc lộ được phẩm dùng để phòng hoặc điều trị chứng sa sút trí tuệ, bao gồm hệ vi khuẩn *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 KCCM11291P là thành phần hoạt tính. Công báo sáng chế Hàn Quốc cho đơn số 10-1087972 bộc lộ phương pháp bào chế men vi khuẩn lactic có hiệu quả trong việc phòng và điều trị chứng sa sút trí tuệ, bao gồm (a) giai đoạn cấy truyền nguyên liệu, nuôi cấy và lên men các chủng vi khuẩn lactic được chọn từ *Lactobacillus* sp. *Enterococcus* sp. và *Bifidobacterium* sp. trong môi trường chứa sữa; (b) giai đoạn loại các chủng vi khuẩn lactic khỏi sản phẩm lên men ở trên; và (c) giai đoạn làm lắng các thành phần hoạt tính riêng biệt để kết tủa các thành phần hoạt tính riêng biệt, bổ sung vào dung môi được chọn từ nhóm bao gồm axeton và rượu có 1 đến 6 nguyên tử cacbon vào sản phẩm lên men để loại bỏ các chủng vi khuẩn lactic. Ngoài ra, Công báo sáng chế Hàn Quốc cho đơn số 10-1424547 bộc lộ được phẩm dùng để phòng và điều trị các bệnh thoái hóa não có chứa các sản phẩm lên men của các vi khuẩn lactic thuộc chủng *Lactobacillus fermentum* KFRI 164 của Sibjeondaebotang, là một thành phần hoạt tính. Ngoài ra, Công báo sáng chế Hàn Quốc cho sáng chế có số công bố 10-2015-0047687 bộc lộ chế phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc cải thiện tính hay quên hoặc cải thiện trí nhớ, có chứa dịch chiết thực vật được lên men bằng cách bổ sung 0,1 đến 10% theo trọng lượng glucoza và 0,1 đến 5% theo trọng lượng cao nấm men vào dịch chiết thực vật, dịch chiết được chiết từ cây viễn chí, bạch phục linh, và thạch xương bồ, và sau đó cấy truyền *Lactobacillus plantarum* đã được nuôi cấy vào.

Tuy nhiên, các chủng vi khuẩn lactic được bộc lộ trong các kỹ thuật đã biết hoặc sản phẩm được lên men theo các cách đó không đủ để được ứng dụng làm sản phẩm điều trị thương mại vì nó không có hiệu quả cao trong điều trị các bệnh thoái hóa não bao gồm chứng sa sút trí tuệ. Do đó, cần sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic nhất định mà hiệu quả điều trị cho các bệnh của não ở mức tương đương đối với so với các sản phẩm điều trị thương mại và cải thiện sự rối loạn hệ vi khuẩn ở ruột và hội chứng thấm qua ruột, qua đó phát triển các sản phẩm được phẩm hoặc thực phẩm chức năng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế được thực hiện dựa trên tình trạng kỹ thuật đã được đề cập ở trên, và sáng chế đề xuất vi khuẩn lactic có các hoạt tính sinh lý khác nhau hoặc các chức năng cần thiết cho các probiotic.

Ngoài ra, mục tiêu của sáng chế là đề xuất chế phẩm chứa vi khuẩn lactic hoặc sản phẩm lên men của nó và có thể được sử dụng để làm giảm nhẹ, phòng hoặc điều trị các bệnh thoái hóa não.

Để đạt được các mục tiêu nêu trên, phương án thực hiện của sáng chế là chủng *Lactobacillus johnsonii* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2, phương án thực hiện tạo ra các chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính cải thiện trí nhớ, hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện của protein liên kết vòng bịt, hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính ức chế sự sản xuất lipopolysaccarit (LPS) hoặc hoạt tính ức chế β -glucuronidaza.

Để đạt được các mục tiêu trên, theo một phương án thực hiện, sáng chế đề xuất được phẩm dùng để phòng hoặc điều trị các bệnh thoái hóa não hoặc rối loạn chức năng nhận thức bao gồm vi khuẩn lactic tương ứng với *Lactobacillus johnsonii* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2, sản phẩm nuôi cấy của vi khuẩn lactic, sản phẩm ly giải của vi khuẩn lactic, hoặc dịch chiết của vi khuẩn lactic làm thành phần hoạt tính. Theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề xuất thực phẩm dùng để phòng hoặc làm giảm nhẹ các bệnh thoái hóa não hoặc rối loạn chức năng nhận thức bao gồm vi khuẩn lactic tương ứng với *Lactobacillus johnsonii* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2, sản phẩm nuôi cấy của vi khuẩn lactic, sản phẩm ly giải của vi khuẩn lactic, hoặc dịch chiết của vi khuẩn lactic làm thành phần hoạt tính. Theo một phương án thực hiện khác nữa, sáng chế đề xuất thực phẩm dùng để cải thiện trí nhớ hoặc khả năng học tập bao gồm vi khuẩn lactic tương ứng với *Lactobacillus johnsonii* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2, sản phẩm nuôi cấy của vi khuẩn lactic, sản phẩm ly giải của vi khuẩn lactic, hoặc dịch chiết của vi khuẩn lactic làm thành phần hoạt tính.

Để đạt được các mục tiêu nêu trên, theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề xuất được phẩm dùng để phòng hoặc điều trị các bệnh thoái hóa não hoặc rối loạn nhận thức, bao gồm sản phẩm lên men đậu đỏ hoặc dịch chiết của sản phẩm lên men đậu đỏ làm thành phần hoạt tính. Ngoài ra, theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề xuất thực phẩm dùng để phòng hoặc làm giảm nhẹ các bệnh thoái hóa não hoặc rối loạn chức năng nhận thức, bao gồm sản phẩm lên men đậu đỏ hoặc dịch chiết từ sản phẩm lên men đậu đỏ. Ngoài ra, theo một phương án thực hiện khác nữa, sáng chế đề xuất thực phẩm dùng để cải thiện trí nhớ hoặc khả năng học tập, bao gồm sản phẩm lên men đậu đỏ hoặc dịch chiết từ sản phẩm lên men đậu đỏ. Trong chế phẩm theo một phương án thực hiện khác của sáng chế, sản phẩm lên men đậu đỏ nêu trên là sản phẩm đậu đỏ được lên men bằng chủng vi khuẩn lactic có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 và tương ứng với *Lactobacillus johnsonii*.

Chủng *Lactobacillus* sp. xác định theo sáng chế được phân lập từ kim chi, và do đó có độ an toàn cao, và có nhiều hoạt tính sinh lý khác nhau như hoạt tính cải thiện trí nhớ, hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện của protein liên kết vòng bít, hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS) hoặc hoạt tính ức chế β -glucuronidaza. Theo đó, chủng *Lactobacillus* sp. xác định theo sáng chế có thể được sử dụng làm thành phần trong sản phẩm dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng dùng để phòng, làm giảm nhẹ hoặc điều trị các bệnh khác nhau thông qua sự kết hợp của hiệu quả thứ nhất của chủng mà làm giảm nhẹ tính thấm qua ruột và hiệu quả thứ hai là cải thiện khả năng học tập hoặc trí nhớ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ minh họa ảnh hưởng của việc sử dụng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 trong thử nghiệm mê cung hình chữ Y trên các động vật mô hình bị suy giảm trí nhớ do *Escherichia coli* K20 gây ra.

Fig.2 là biểu đồ minh họa ảnh hưởng của việc sử dụng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 trong thử nghiệm tránh thụ động trên các động vật mô hình bị suy giảm trí nhớ do *Escherichia coli* K20 gây ra.

Fig.3 là hình minh họa ảnh hưởng của việc sử dụng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 đối với mức độ biểu hiện của yếu tố điều hòa tăng trưởng thần kinh ở các động vật mô hình bị suy giảm trí nhớ do *Escherichia coli* K20 gây ra.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các thuật ngữ được sử dụng trong sáng chế sẽ được định nghĩa rõ ràng.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "rối loạn chức năng nhận thức" dùng để chỉ hội chứng hoặc bệnh liên quan chức năng nhận thức, như là quá trình ghi nhớ, nhận thức hoặc giải quyết vấn đề không hoạt động đầy đủ, đặc biệt là bao gồm sự suy giảm trí nhớ làm việc, sự tập trung và sự tỉnh táo, việc học và ghi nhớ ngôn ngữ, việc học và ghi nhớ trực quan, lý luận và giải quyết vấn đề, cụ thể là chức năng điều hành, tốc độ xử lý hoặc nhận thức xã hội.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "bệnh về não" dùng để chỉ tất cả các loại bệnh được hình thành ở trong não gây ra bởi các tế bào thần kinh sọ bị phá hủy.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sản phẩm nuôi cấy" dùng để chỉ sản phẩm thu được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường lỏng hoặc môi trường rắn đã biết, và do đó có thể bao gồm vi sinh vật.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sản phẩm lên men" dùng để chỉ sản phẩm thu được bằng cách lên men nguyên liệu thô, đối tượng lên men, cùng với vi sinh vật, và là khái niệm bao gồm vi sinh vật.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vi khuẩn axit lactic, v.v..." dùng để chỉ các chủng vi khuẩn lactic, và sản phẩm nuôi cấy, sản phẩm ly giải hoặc dịch chiết của vi khuẩn lactic.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sản phẩm lên men đậu đỏ" dùng để chỉ sản phẩm lên men đậu đỏ hoặc dịch chiết của sản phẩm lên men.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "được dụng" và "dưỡng dụng" dùng để chỉ việc không kích thích cơ thể hoặc ức chế hoạt động sinh học và đặc tính của chất hoạt tính được sử dụng một cách đáng kể.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phòng" dùng để chỉ toàn bộ các hoạt động ức chế các triệu chứng hoặc trì hoãn sự tiến triển của bệnh cụ thể bằng cách sử dụng các chế phẩm của sáng chế.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "điều trị" dùng để chỉ toàn bộ các hoạt động làm giảm hoặc làm thay đổi theo hướng tích cực các triệu chứng của một bệnh cụ thể bằng việc sử dụng các chế phẩm của sáng chế.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "làm giảm nhẹ" dùng để chỉ toàn bộ các hoạt động mà làm giảm bớt ít nhất một thông số liên quan đến tình trạng điều trị, ví dụ như mức độ của triệu chứng.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "cho sử dụng" dùng để chỉ việc cung cấp chế phẩm của sáng chế cho một đối tượng bằng bất kỳ phương pháp thích hợp nào. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" dùng để chỉ tất cả các loài động vật, bao gồm cả con người, khỉ, chó, dê, lợn hoặc chuột mà bị một bệnh nào đó mà triệu chứng của nó có thể được làm giảm bớt bằng việc cho sử dụng chế phẩm của sáng chế.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "lượng có hiệu quả dược lý" dùng để chỉ một lượng đủ để điều trị bệnh, với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý áp dụng cho bất kỳ việc điều trị bằng thuốc nào. Lượng có hiệu quả dược lý có thể được xác định tùy thuộc vào các yếu tố, bao gồm loại bệnh của chủ thể, mức độ nghiêm trọng của bệnh, hoạt động của thuốc, độ nhạy của thuốc, thời điểm điều trị, lộ trình điều trị, tỷ lệ bài tiết, thời gian điều trị và việc thuốc có được sử dụng kết hợp với thành phần, và các yếu tố khác đã biết trong lĩnh vực y tế không.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất các chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính sinh lý khác nhau.

Vi khuẩn lactic theo một phương án thực hiện của sáng chế là chủng *Lactobacillus johnsonii* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2, có hoạt tính cải thiện trí nhớ, hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện của protein liên kết vòng bít, hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính ức chế sự sản xuất lipopolysaccharit (LPS) hoặc hoạt tính ức chế β -glucuronidaza. Chủng *Lactobacillus johnsonii* là vi khuẩn yếm khí gram dương được phân lập từ kim chi, có khoảng nhiệt độ sinh trưởng rộng, tồn tại được ở pH thấp, và tiết ra enzym glucosidaza. Hơn nữa, *Lactobacillus johnsonii* sử dụng D-glucosa, D-fructoza, D-mannoza, N-axetyl glucosamin, maltoza, lactoza, sucroza, gentibioza và các chất tương tự làm nguồn cacbon. Ngoài ra, tốt nhất là, *Lactobacillus johnsonii* là chủng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 (số truy cập: KCCM 11763P).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm bao vi khuẩn lactic cụ thể làm thành phần hoạt tính. Vi khuẩn lactic theo một phương án thực hiện của sáng chế có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2, và cũng bao gồm chủng vi khuẩn lactic tương ứng với *Lactobacillus johnsonii*, sản phẩm nuôi cấy, sản phẩm ly giải hoặc dịch chiết của nó làm một thành phần hoạt tính. Chủng *Lactobacillus johnsonii* là vi khuẩn yếm khí gram dương được phân lập từ kim chi, và có khoảng nhiệt độ sinh trưởng rộng, tồn tại được ở pH môi trường thấp, và tiết ra enzym glucosidaza. Ngoài ra, *Lactobacillus johnsonii* sử dụng D-glucosa, D-fructoza, D-mannoza, N-axetyl glucosamin, maltoza, lactoza, sucroza, gentibioza và các chất tương tự làm nguồn cacbon. Ngoài ra, tốt nhất là, *Lactobacillus johnsonii* là chủng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 (số truy cập: KCCM 11763P).

Theo sáng chế, sản phẩm nuôi cấy của các chủng vi khuẩn lactic được sản xuất bằng cách nuôi cấy một chủng khuẩn cụ thể hoặc hỗn hợp các chủng khuẩn trong môi trường thích hợp. Môi trường có thể được chọn từ môi trường lỏng hoặc môi trường rắn đã biết, và có thể là, môi trường MRS lỏng, môi trường MRS đặc, hoặc môi trường BL đặc.

Chế phẩm theo một phương án thực hiện của sáng chế có thể được sử dụng để phòng, làm giảm nhẹ hoặc điều trị các bệnh thoái hóa não hoặc rối loạn chức năng nhận thức, do các chủng vi khuẩn lactic làm thành phần hoạt tính có nhiều loại

hoạt tính sinh lý khác nhau, cụ thể như hoạt động cải thiện trí nhớ, hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bít, hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccharit (LPS) hoặc hoạt tính ức chế β -glucuronidaza. Các bệnh thoái hóa não có thể cụ thể là bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh Huntington, hoặc là chứng sa sút trí tuệ. Ngoài ra, chứng sa sút trí tuệ có thể được chọn từ nhóm bao gồm chứng sa sút trí tuệ tuổi già, chứng sa sút trí tuệ não mạch, chứng sa sút trí tuệ thể Lewy, sa sút trí tuệ trán - thái dương, chứng sa sút trí tuệ do bệnh Alzheimer, chứng sa sút trí tuệ do bệnh Parkinson, chứng sa sút trí tuệ do bệnh Huntington, chứng sa sút trí tuệ do bệnh Creutzfeldt-Jacob, chứng sa sút trí tuệ do bệnh Pick, giãn não thất áp lực bình thường gây sa sút trí tuệ và tổn thương đầu gây sa sút trí tuệ. Ngoài ra, chế phẩm theo một phương án thực hiện của sáng chế có thể được sử dụng để cải thiện trí nhớ hoặc khả năng học tập.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm sản phẩm được lên men bởi các chủng vi khuẩn lactic làm thành phần hoạt tính. Chế phẩm theo một phương án thực hiện khác của sáng chế bao gồm sản phẩm lên men đậu đỏ hoặc dịch chiết của nó. Trong chế phẩm theo một phương án thực hiện khác của sáng chế, sản phẩm lên men đậu đỏ là sản phẩm đậu đỏ được lên men với các chủng vi khuẩn lactic tương ứng với *Lactobacillus johnsonii* và có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2. Trong chế phẩm theo một phương án thực hiện của sáng chế, các đặc tính kỹ thuật của *Lactobacillus johnsonii* đã được mô tả ở trên, và do đó việc mô tả chúng được bỏ qua.

Sản phẩm lên men đậu đỏ, là thành phần hoạt tính của chế phẩm theo một phương án thực hiện khác của sáng chế, có hoạt tính sinh lý cao hơn so với các chủng vi khuẩn lactic và có hiệu quả hơn trong khía cạnh làm thực phẩm chức năng và làm thành phần dược phẩm, do quá trình lên men bao gồm cả chất chuyển hóa thứ cấp được tạo ra bởi sự lên men đậu đỏ và các chủng vi khuẩn lactic được sử dụng trong quá trình lên men đậu đỏ. Chế phẩm theo một phương án thực hiện khác của sáng chế có thể được sử dụng để phòng, làm giảm nhẹ hoặc điều trị các bệnh thoái hóa não hoặc rối loạn chức năng nhận thức. Các bệnh thoái hóa não có thể là bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh Huntington, hoặc là chứng sa sút trí tuệ.

Ngoài ra, các chứng sa sút trí tuệ có thể được chọn từ nhóm bao gồm chứng sa sút trí tuệ tuổi già, chứng sa sút trí tuệ não mạch, chứng sa sút trí tuệ thể Lewy, sa sút trí tuệ trán - thái dương, chứng sa sút trí tuệ do bệnh Alzheimer, chứng sa sút trí tuệ do bệnh Parkinson, chứng sa sút trí tuệ do bệnh Huntington, chứng sa sút trí tuệ do bệnh Creutzfeldt-Jacob, chứng sa sút trí tuệ do bệnh Pick, giãn não thất áp lực bình thường gây sa sút trí tuệ và tổn thương đầu gây sa sút trí tuệ. Ngoài ra, chế phẩm theo một phương án thực hiện khác của sáng chế có thể được sử dụng để cải thiện trí nhớ hoặc khả năng học tập.

Theo sáng chế, chế phẩm có thể được thực hiện dưới dạng một dược phẩm, phụ gia thực phẩm, thực phẩm (cụ thể là thực phẩm chức năng), phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc dạng tương tự tùy thuộc vào mục đích hoặc khía cạnh sử dụng. Ngoài ra, lượng vi khuẩn lactic hoặc sản phẩm lên men đậu đỏ làm thành phần hoạt tính cũng có thể được điều chỉnh trong phạm vi rộng tùy thuộc loại chế phẩm cụ thể, mục đích hoặc khía cạnh sử dụng của chế phẩm.

Lượng vi khuẩn lactic hoặc sản phẩm lên men đậu đỏ làm thành phần hoạt tính trong dược phẩm theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể. Cụ thể là, hàm lượng có thể chiếm từ 0,01 đến 99% trọng lượng, tốt hơn là từ 0,5 đến 50% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 1 đến 30% trọng lượng trên tổng trọng lượng của chế phẩm. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm thêm các chất phụ gia như chất mang dược dụng, tá dược dược dụng hoặc chất pha loãng dược dụng ngoài các thành phần hoạt tính. Các chất mang, tá dược và chất pha loãng có thể có trong dược phẩm theo sáng chế bao gồm lactoza, dextroza, saccaroza, sorbitol, mannitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, gum acacia, muối alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinyl pyrrolidon, nước, metyl hydroxybenzoat, propyl hydroxylbenzoat, bột tan (talc), magie stearat và dầu khoáng. Ngoài ra, ngoài vi khuẩn lactic hoặc sản phẩm lên men đậu đỏ, dược phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm thêm một hoặc nhiều thành phần hoạt tính khác có hiệu quả trong việc phòng hoặc điều trị bệnh thoái hóa não hoặc rối loạn chức năng nhận thức. Dược phẩm theo sáng chế có thể được điều chế dưới dạng công thức để sử dụng bằng đường miệng hoặc các công thức để sử

dụng bằng đường tiêm, và các công thức có thể được điều chế sử dụng các chất pha loãng hoặc tá dược thường được sử dụng, như chất độn, chất bổ sung, chất kết dính, chất làm ướt, chất phân rã, chất hoạt động bề mặt và các chất tương tự. Các công thức dạng rắn để sử dụng qua đường miệng bao gồm thuốc viên, viên nén, thuốc bột, thuốc cốm, viên nang và các dạng tương tự, và các công thức dạng rắn này có thể được điều chế bằng cách trộn thành phần hoạt tính với ít nhất một tá dược, ví dụ như tinh bột, canxi cacbonat, saccharoza, lactoza hoặc gelatin. Ngoài các tá dược đơn giản, các chất làm trơn như magie stearat hoặc bột talc cũng có thể được sử dụng. Các công thức dạng lỏng để sử dụng qua đường miệng bao gồm huyền dịch, dung dịch, nhũ tương và xirô, và có thể chứa nhiều tá dược ngoài nước và parafin lỏng thường được sử dụng để pha loãng, ví dụ như chất làm ướt, chất tạo hương, chất thơm, chất bảo quản và các chất tương tự. Các công thức để sử dụng qua đường tiêm bao gồm các dung dịch chứa nước, các dung dịch không chứa nước, huyền dịch, nhũ tương, được khử trùng, các chế phẩm đông khô, và thuốc đạn. Propylen glycol, polyetylen glycol, các loại dầu thực vật như dầu ô liu, các este sử dụng được cho đường tiêm như etyl oleat, và các chất tương tự có thể được sử dụng là các dung môi không chứa nước hoặc các chất tạo huyền dịch. Các loại chất như witepsol, Macrogol, Tween 61, bơ cacao, laurin béo, glyxerogelatin và các chất tương tự có thể được sử dụng làm tá dược cho thuốc đạn. Hơn nữa, chế phẩm tốt hơn có thể được bào chế dựa trên từng loại bệnh hoặc thành phần của phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật hoặc phương pháp đã được bộc lộ trong Khoa học dược phẩm Remington (ấn bản mới nhất), Công ty xuất bản Mack, Easton PA. Tùy phương pháp điều trị mong muốn mà dược phẩm của sáng chế có thể được sử dụng bằng đường miệng hoặc đường tiêm cho động vật có vú, bao gồm cả con người. Con đường để sử dụng qua đường tiêm bao gồm tiêm da, tiêm màng bụng, tiêm vào trực tràng, tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm trong lồng ngực hoặc tương tự. Liều dùng của dược phẩm theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, miễn là đạt được lượng có hiệu quả dược lý. Liều dùng có thể thay đổi tùy thuộc vào cân nặng, độ tuổi, giới tính, tình trạng sức khỏe, chế độ ăn uống, thời gian dùng thuốc, chế độ điều trị, tỷ lệ bài tiết của người bệnh và mức độ nghiêm trọng của bệnh. Liều dùng hằng ngày của dược phẩm của sáng chế không giới hạn cụ thể,

nhưng tốt hơn là từ 0,1 đến 3000 mg/kg (căn cứ trên thành phần hoạt tính), tốt hơn nữa là từ 1 đến 2000 mg/kg (căn cứ trên thành phần hoạt tính) và có thể được sử dụng một hoặc vài lần trong ngày.

Hơn nữa, hàm lượng vi khuẩn lactic hoặc sản phẩm lên men đậu đỏ dưới dạng thành phần hoạt tính trong thực phẩm theo sáng chế là từ 0,01 đến 99% trọng lượng, tốt hơn là từ 0,1 đến 50% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 0,5 đến 25% trọng lượng, trên tổng trọng lượng của chế phẩm, nhưng không giới hạn. Thực phẩm của sáng chế có thể ở dạng viên, bột, hạt, tiêm truyền, viên nén, viên nang, chất lỏng, hoặc các dạng tương tự, và các ví dụ cụ thể của thực phẩm có thể bao gồm thịt, xúc xích, bánh mì, sôcôla, kẹo, đồ ăn nhẹ, đồ ngọt, pizza, ramen, mì ăn liền, gum, các sản phẩm từ sữa bao gồm kem, các loại súp, đồ uống, trà, thức uống bổ sung, đồ uống, đồ uống chứa cồn, vitamin phức hợp và các loại tương tự và có thể bao gồm tất cả các loại thực phẩm theo nghĩa chung là tốt cho sức khỏe. Thực phẩm của sáng chế ngoài các thành phần hoạt tính còn có thể bao gồm chất mang dưỡng dụng, các chất tạo hương hoặc cacbohydrat tự nhiên như là các thành phần bổ sung. Ngoài ra, thực phẩm theo sáng chế có thể chứa các chất dinh dưỡng, vitamin, chất điện giải, chất tạo hương, chất tạo màu, axit pectic và muối của nó, axit alginic và muối của nó, axit hữu cơ, chất làm dày và keo hóa an toàn, chất điều chỉnh độ pH, chất ổn định, chất bảo quản, glycerin, rượu, chất cacbonat được sử dụng cho các loại đồ uống có ga, và các loại tương tự. Ngoài ra, thực phẩm theo sáng chế có thể chứa thịt quả để chế biến nước trái cây tự nhiên, nước ép trái cây, và nước rau củ. Các thành phần này có thể được sử dụng dưới dạng độc lập hoặc dưới dạng hỗn hợp. Các cacbohydrat tự nhiên được mô tả ở trên có thể bao gồm các monosaccarit như glucoza và fructoza, các disaccarit như mantôza và saccaroza, các polysaccarit như dextrin và xyclodextrin, và cồn như xylitol, sorbitol và erythritol. Các chất tạo hương được sử dụng là chất tạo hương tự nhiên như thaumatin hoặc dịch chiết cỏ ngọt, hoặc chất tạo hương tổng hợp như sacararin hoặc aspartam.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ tham chiếu. Tuy nhiên, cần hiểu rằng các ví dụ chỉ nhằm mục đích minh họa rõ ràng các đặc tính kỹ thuật của sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

1. Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn lactic

(1) Phân lập các chủng vi khuẩn lactic từ kim chi

Kim chi cải bắp Trung Quốc, kim chi củ cải và kim chi hành tây được ép, và dịch ép được hòa thành huyền dịch trong môi trường MRS lỏng (MRS Broth, Difco, Mỹ). Tiếp theo, phần dịch nổi được thu lấy, được chuyển sang môi trường MRS thạch (Difco, USA) và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong khoảng 48 giờ, và sau đó các chủng hình thành các khuẩn lạc được phân lập.

(2) Phân lập các chủng vi khuẩn lactic từ phân người

Phân người được hòa thành huyền dịch trong môi trường GAM lỏng (GAM broth, Công ty Dược Nissui, Nhật Bản). Tiếp theo, phần dịch nổi được thu lấy, được chuyển sang môi trường BL thạch (Công ty Dược Nissui, Nhật Bản) và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong khoảng 48 giờ, và sau đó chủng *Bifidobacterium* sp. hình thành các khuẩn lạc được phân lập.

(3) Định danh các chủng vi khuẩn lactic được sàng lọc

Các đặc tính sinh lý và trình tự 16S rADN của các chủng được phân lập từ kim chi hoặc phân người đã được phân tích để định danh loài của các chủng, và đưa ra tên cho các chủng. Bảng 1 dưới đây là số tham chiếu và tên chủng của các vi khuẩn lactic được phân lập từ kim chi cải bắp Trung Quốc, kim chi củ cải, kim chi hành tây và phân người.

Bảng 1

Số tham chiếu	Tên chủng	Số tham chiếu	Tên chủng
---------------	-----------	---------------	-----------

Số tham chiếu	Tên chủng	Số tham chiếu	Tên chủng
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH1	31	<i>Lactobacillus sakei</i> CH31
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH2	32	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CJLJ103
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3	33	<i>Lactobacillus sakei</i> CH33
4	<i>Lactobacillus brevis</i> CH4	34	<i>Lactobacillus sakei</i> CH34
5	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH5	35	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH35
6	<i>Lactobacillus brevis</i> CH6	36	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> CH36
7	<i>Lactobacillus casei</i> CH7	37	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH37
8	<i>Lactobacillus planantrum</i> CH8	38	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38
9	<i>Lactobacillus sakei</i> CH9	39	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH39
10	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH10	40	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH40
11	<i>Lactobacillus sakei</i> CH11	41	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41
12	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH12	42	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH42
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH13	43	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH43
14	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH14	44	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH44
15	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH15	45	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH45
16	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH16	46	<i>Bifidobacterium breve</i> CH46

Số tham chiếu	Tên chủng	Số tham chiếu	Tên chủng
17	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH17	47	<i>Bifidobacterium breve</i> CH47
18	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH18	48	<i>Bifidobacterium breve</i> CH48
19	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH19	49	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH49
20	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH20	50	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH50
21	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21	51	<i>Bifidobacterium dentium</i> CH51
22	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH22	52	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH52
23	<i>Lactobacillus brevis</i> CH23	53	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH53
24	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH24	54	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH54
25	<i>Lactobacillus kim chi</i> CH25	55	<i>Bifidobacterium longum</i> CH55
26	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH26	56	<i>Bifidobacterium longum</i> CH56
27	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH27	57	<i>Bifidobacterium longum</i> CH57
28	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH28	58	<i>Bifidobacterium longum</i> CH58
29	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH29	59	<i>Bifidobacterium longum</i> CH59
30	<i>Lactobacillus reuteri</i> CH30	60	<i>Bifidobacterium longum</i> CH60

Trong số các chủng được trình bày trên bảng 1 ở trên, *Lactobacillus brevis* CH23 là vi khuẩn gram dương kỵ khí, không hình thành bào tử, và có thể tồn tại

ngay cả trong điều kiện hiếu khí. Hơn nữa, *Lactobacillus brevis* CH23 tồn tại ở nhiệt độ từ 10 đến 42°C và là chủng chịu được axit ở pH 2 trong vòng 2 giờ. Hơn nữa, *Lactobacillus brevis* CH23 tồn tại được ngay cả trong dung dịch natri clorua 2% và sản xuất một cách tích cực glucosidaza. Ngoài ra, để phân loại theo khía cạnh hóa học, chủng *Lactobacillus brevis* CH23, vùng 16S rADN của nó được phân tích, và kết quả là, *Lactobacillus brevis* CH23 có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 1. Trình tự nucleotit 16S rADN của *Lactobacillus brevis* CH23 đã được định danh bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), và kết quả là, không tìm thấy chủng *Lactobacillus brevis* nào có cùng trình tự nucleotit 16S rADN với *Lactobacillus brevis* CH23, và *Lactobacillus brevis* CH23 cho thấy sự tương đồng 99% với trình tự 16S rADN của chủng *Lactobacillus brevis* FJ004.

Trong số các chủng được trình bày trên bảng 1 ở trên, *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 là vi khuẩn gram dương kỵ khí, không hình thành bào tử, và có thể tồn tại ngay cả trong điều kiện hiếu khí. Hơn nữa, *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 sinh trưởng ổn định ở nhiệt độ lên đến 10-45°C, và là chủng chịu axit ổn định ở pH 2 trong 2 giờ. Hơn nữa, *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 chủ động sản xuất enzym glucosidaza, nhưng không sản xuất enzym β -glucuronidaza. Ngoài ra, để phân loại theo khía cạnh hóa học chủng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103, vùng 16S rADN của nó được phân tích, và kết quả chỉ ra rằng, *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 2. Trình tự nucleotit 16S rADN của *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 đã được định danh bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), và kết quả là, không tìm thấy chủng *Lactobacillus johnsonii* nào có cùng trình tự nucleotit 16S rADN với *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103, và *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 cho thấy sự tương đồng 99% với trình tự 16S rADN của chủng *Lactobacillus johnsonii* JCM 2012.

Trong số các chủng trình bày trên bảng 1 ở trên, *Bifidobacterium longum* CH57 là vi khuẩn gram dương kỵ khí, không hình thành bào tử, và thể hiện khả năng tồn tại thấp trong điều kiện hiếu khí. Hơn nữa, *Bifidobacterium longum* CH57

không ổn định với nhiệt. Hơn nữa, *Bifidobacterium longum* CH57 chủ động sản xuất enzym glucosidaza, nhưng không sản xuất enzym β -glucuronidaza. Ngoài ra, để phân loại theo khía cạnh hóa học chủng *Bifidobacterium longum* CH57, vùng 16S rADN của nó được phân tích, và kết quả chỉ ra rằng, *Bifidobacterium longum* CH57 có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 3. Trình tự nucleotit 16S rADN của *Bifidobacterium longum* CH57 đã được định danh bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), và kết quả là, không tìm thấy chủng *Bifidobacterium longum* nào có cùng trình tự nucleotit 16S rADN với *Bifidobacterium longum* CH57, và *Bifidobacterium longum* CH57 cho thấy sự tương đồng 99% với trình tự 16S rADN của chủng *Bifidobacterium longum* CBT-6.

Ngoài ra, trong số các đặc điểm sinh lý của *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 và *Bifidobacterium longum* CH57, việc sử dụng nguồn cacbon cũng được phân tích bằng cách sử dụng một quá trình lên men đường bằng bộ kit API (phiên bản: API 50 CHL; được sản xuất bởi BioMerieux's, Mỹ). Bảng 2 dưới đây thể hiện các kết quả phân tích việc sử dụng nguồn cacbon của *Lactobacillus brevis* CH23; Bảng 3 dưới đây thể hiện các kết quả phân tích việc sử dụng nguồn cacbon của *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103; và Bảng 4 dưới đây thể hiện kết quả phân tích việc sử dụng nguồn cacbon của *Bifidobacterium longum* CH57. Trên bảng 2, 3 và 4, "+" cho biết trường hợp sử dụng nguồn cacbon là dương tính; "-" cho biết trường hợp sử dụng nguồn cacbon là âm tính; và "±" chỉ ra trường hợp sử dụng nguồn cacbon là không xác định. Như được thể hiện trong các Bảng 2, 3 và 4 dưới đây, các chủng *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 và *Bifidobacterium longum* CH57 cho thấy sự sử dụng nguồn cacbon khác với các chủng khác cùng loài tương ứng với một số nguồn cacbon.

Bảng 2

Nguồn cacbon	Tên chủng		Nguồn cacbon	Tên chủng	
	<i>L. brevis</i> ¹⁾	<i>L. brevis</i> CH23		<i>L. brevis</i> ¹⁾	<i>L. brevis</i> CH23
glyxerol	-	-	salixin	+	+

erythritol	-	-	xenlobioza	+	-
D-arabinoza	-	-	mantoza	+	+
L-arabinoza	+	-	lactoza	+	-
D-riboza	+	+	melibioza	-	+
D-xyloza	+	+	saccaroza	+	-
L-xyloza	-	-	trehaloza	+	-
D-adonitol	-	-	inulin	+	-
metyl- β -D-xylopyranozit	-	-	melezitoza	+	-
D-galactoza	+	-	raffinoza	-	-
D-glucoza	+	+	Tinh bột	-	-
D-fructoza	+	+	Glycogen	-	-
D-mannoza	+	-	Xylitol	-	-
L-sorboza	-	-	gentiobioza	+	-
L-rhamnoza	-	-	D-turanoza	+	-
dulcitol	+	-	D-lyxoza	-	-
inositol	-	-	D-tagatoza	+	-
mannitol	+	-	D-fucoza	-	-
sorbitol	+	-	L-fucoza	-	-
α -metyl-D-mannozit	-	-	D-arabitol	-	-
α -metyl-D-glucozit	-	-	L-arabitol	-	-
N-axetyl-glucosamin	+	$\pm$	gluconat	+	$\pm$
amygdalin	+	-	2-keto-gluconat	-	-

arbutin	+	-	5-keto-gluconat	-	+
esculin	+	+			

¹⁾ Suriasih K., Aryanta WR, MahardikaG, Astawa NM. Đặc tính vi sinh và hóa học của sữa lên men Kefir được làm từ sữa gia súc ở Bali. Tạp chí Quản lý chất lượng và khoa học thực phẩm 2012;6:112-22.

Bảng 3

Nguồn cacbon	Tên chủng		Nguồn cacbon	Tên chủng	
	<i>L. johnsonii</i> ²⁾	<i>L. johnsonii</i> CJLJ103		<i>L. johnsonii</i> ²⁾	<i>L. johnsonii</i> CJLJ103
glyxerol	-	-	salixin	-	-
erythritol	-	-	xenlobioza	+	-
D-arabinoza	-	-	mantoza	-	+
L-arabinoza	-	-	lactoza	-	+
D-riboza	-	-	melibioza	+	-
D-xyloza	-	-	saccaroza	+	+
L-xyloza	-	-	trehaloza	+	-
D-adonitol	-	-	inulin	-	-
metyl-β-D-xylopyranozit	-	-	melezitoza	-	-
D-galactoza	-	-	raffinoza	+	-
D-glucoza	-	+	Tinh bột	-	-
D-fructoza	-	+	Glycogen	-	-
D-mannoza	+	+	Xylitol	-	-
L-sorboza	-	-	gentiobioza	-	+
L-rhamnoza	-	-	D-turanoza	-	-

dulcitol	-	-	D-lyxoza	-	-
inositol	-	-	D-tagatoza	-	-
mannitol	-	-	D-fucoza	-	-
sorbitol	-	-	L-fucoza	-	-
α -metyl-D-mannozit	-	-	D-arabitol	-	-
α -metyl-D-glucozit	-	-	L-arabitol	-	-
N-axetyl-glucosamin	+	+	gluconat	-	-
amygdalin	-	-	2-keto-gluconat	-	-
arbutin	-	-	5-keto-gluconat	-	-
esculin	-	-			

²⁾ Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, Pittet AC, Zwahlen MC, Rouvet M, Altermann E, Barrangou R, Mollet B, Mercenier A, Klaenhammer T, Arigoni F, Schell MA. Trình tự hệ gen của lợi khuẩn đường ruột *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Feb 24;101(8):2512-7.

Bảng 4

Nguồn cacbon	Tên chủng		Nguồn cacbon	Tên chủng	
	<i>B. longum</i> ³⁾	<i>B. longum</i> CH57		<i>B. longum</i> ³⁾	<i>B. longum</i> CH57
glyxerol	±	-	salixin	±	-
erythritol	-	-	xenlobioza	±	±
D-arabinoza	-	-	mantoza	-	-
L-arabinoza	-	-	lactoza	-	-

D-riboza	±	-	melibioza	-	-
D-xyloza	-	-	saccaroza	+	±
L-xyloza	-	-	trehaloza	±	-
D-adonitol	-	-	inulin	-	-
metyl-β-D-xylopyranozit	-	-	melezitoza	-	-
D-galactoza	+	+	raffinoza	-	-
D-glucoza	+	+	Tinh bột	-	-
D-fructoza	+	+	Glycogen	-	-
D-mannoza	-	-	Xylitol	-	-
L-sorboza	-	-	gentiobioza	-	-
L-rhamnoza	-	-	D-turanoza	-	-
dulcitol	-	-	D-lyxoza	-	-
inositol	-	-	D-tagatoza	-	-
mannitol	+	-	D-fucoza	-	-
sorbitol	-	-	L-fucoza	-	-
α-metyl-D-mannozit	-	-	D-arabitol	-	-
α-metyl-D-glucozit	-	-	L-arabitol	-	-
N-axetyl-glucosamin	±	-	gluconat	±	-
amygdalin	-	-	2-keto-gluconat	-	-
arbutin	±	-	5-keto-gluconat	-	-
esculin	-	-			

³⁾ Lukacova D, Karovucova J, Greifova M, Greif G, Sovcikova A, Kohhajdova Z. Thí nghiệm *in vitro* một số đặc tính probiotic được chọn lọc của *Lactobacillus plantarum* và *Bifidobacterium longum*. Tạp chí Nghiên cứu dinh dưỡng và thực phẩm 2006; 45: 77-83.

(4) Thông tin về việc đăng ký các chủng vi khuẩn lactic

Các tác giả sáng chế đã đăng ký chủng *Lactobacillus brevis* CH23 với Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (địa chỉ: Tòa nhà Yurim, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc), một cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế, vào ngày 01 tháng 9 năm 2015 với mã số truy cập KCCM 11762P. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã đăng ký chủng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 với Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (địa chỉ: Tòa nhà Yurim, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc), một cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế, vào ngày 01 tháng 9 năm 2015 với mã số truy cập KCCM 11763P. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã đăng ký chủng *Bifidobacterium longum* CH57 với Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (địa chỉ: Tòa nhà Yurim, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc), một cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế, vào ngày 01 tháng 9 năm 2015 với mã số truy cập KCCM 11764P.

2. Đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với việc làm giảm tổn thương ruột hoặc tính thấm qua ruột

Để đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ kim chi hoặc phân người trong việc làm giảm bớt sự hư hỏng ở ruột hoặc tính thấm qua ruột, các thông số về hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS), hoạt tính ức chế β -glucuronidaza (enzym gây hại đường ruột), hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bịt và hoạt tính cải thiện trí nhớ của các chủng vi khuẩn lactic đã được đo.

(1) Phương pháp thí nghiệm

* Hoạt tính chống oxy hoá

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) được hòa tan trong etanol tới nồng độ 0,2 mM để tạo ra dung dịch DPPH. Huyền dịch các chủng vi khuẩn lactic (1×10^8 CFU/ml) hoặc dung dịch vitamin C (1 g/ml) được bổ sung vào 0,1 ml dung dịch DPPH và được nuôi cấy ở 37°C trong 20 phút. Sản phẩm nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút (rpm) trong 5 phút, và dịch nổi được thu lấy. Tiếp theo, độ hấp thụ của dịch nổi ở bước sóng 517 nm được đo, và hoạt tính chống oxy hoá của các chủng vi khuẩn lactic được tính toán.

* Hoạt tính ức chế sản xuất Lipopolysaccarit (LPS)

Các vi khuẩn gây bệnh, như *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* và *Proteus mirabilis* được phân lập từ đối tượng là người già và được nuôi cấy. Tiếp theo, các vi khuẩn gây bệnh (tương ứng 1×10^5 CFU) và các chủng vi khuẩn lactic (1×10^5 CFU) được cấy chuyển vào 10 ml môi trường nuôi cấy kỵ khí thông thường đã được khử trùng (môi trường lỏng GAM; Công ty Dược Nissui, Nhật Bản) và được nuôi cấy kỵ khí trong 24 giờ.

Tiếp theo, sản phẩm nuôi cấy được nghiền bằng sóng siêu âm trong khoảng 1 giờ để phá vỡ màng tế bào bên ngoài của vi khuẩn, và ly tâm ở tốc độ $5000 \times g$, và thu lấy dịch nổi. Tiếp đó, hàm lượng LPS (lipopolysaccarit) (là một loại nội độc tố) trong dịch nổi được đo bằng một kit định lượng LAL (phép thử dựa vào tính chất ly giải tế bào dạng amip trong máu con sam của lipopolysaccarit) (được sản xuất bởi Cape Cod Inc., Mỹ). Ngoài ra, để đánh giá hoạt tính ức chế sự tăng sinh của *E. coli* của các chủng vi khuẩn lactic, sản phẩm nuôi cấy thu được thông qua thí nghiệm tương tự như được mô tả ở trên được pha loãng 1000 lần và 100000 lần và được nuôi cấy trong môi trường DHL, sau đó đếm số lượng tế bào *E. coli*, *Klebsiella pneumonia* và *Proteus mirabilis*.

*Hoạt tính ức chế β -glucuronidaza

0,1 ml dung dịch p-nitrophenyl- β -D-glucuronit 0,1 mM, 0,2 ml dung dịch muối đệm phosphat 50 mM và 0,1 ml huyền dịch vi khuẩn lactic (được tạo ra bằng cách hòa thành huyền dịch sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn lactic vào trong 5 ml dung dịch muối sinh lý) được đặt trong một bình phản ứng và chịu ảnh hưởng của enzym

β -glucuronidaza, và 0,5 ml dung dịch NaOH 0,1 mM đã được thêm vào để làm dừng phản ứng. Tiếp theo, dung dịch phản ứng được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút, và dịch nổi được thu lấy. Sau đó, độ hấp thụ của dịch nổi ở bước sóng 405 nm được đo.

* Hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bịt

Tế bào Caco2 được lấy từ Ngân hàng tế bào Hàn Quốc được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 trong 48 giờ, và sau đó các tế bào Caco2 đã nuôi cấy được chia vào mỗi giếng của đĩa nuôi cấy 12 giếng với mật độ 2×10^6 tế bào/giếng. Tiếp theo, mỗi giếng được xử lý với 1 μ g LPS (lipopolysaccarit) hoặc kết hợp 1 μ g LPS (lipopolysaccarit) và 1×10^4 CFU hỗn hợp vi khuẩn lactic, sau đó được ủ trong 24 giờ. Tiếp theo, thu lấy các tế bào được nuôi cấy từ mỗi giếng, và mức biểu hiện của protein liên kết vòng bịt ZO-1 trong tế bào được đo bằng phương pháp thấm miễn dịch.

* Hoạt tính cải thiện trí nhớ

Tế bào SH-SY5Y được lấy từ Ngân hàng tế bào Hàn Quốc được nuôi cấy trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh, và sau đó được chia vào mỗi giếng của đĩa nuôi cấy 12 giếng với mật độ 2×10^6 tế bào/giếng. Tiếp theo, cùng với các chủng vi khuẩn lactic (1×10^4 CFU/ml), LPS (lipopolysaccarit) được tách từ *Proteus mirabilis* được bổ sung vào mỗi giếng với nồng độ 0,2 mg/ml và được nuôi cấy, và sau đó mức độ hoạt tính ức chế NF- κ B (yếu tố nhân kappa-tăng cường gen mã hóa chuỗi nhẹ của tế bào B được hoạt hóa) và mức biểu hiện α -synuclein được đo bằng phương pháp thấm miễn dịch. NF- κ B là chất gây tổn thương mô bằng phản ứng viêm và các bệnh liên quan đến sự lão hóa như bệnh Alzheimer, trong khi đó, α -synuclein là chất gây bệnh Parkinson.

(2) Kết quả thử nghiệm

Hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS), hoạt tính ức chế β -glucuronidaza và hoạt tính cảm ứng cảm ứng sự biểu hiện của protein liên kết vòng bịt của các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ kim chi

hoặc phân người đã được đo và kết quả đo được thể hiện trên Bảng 5, 6 và 7 dưới đây. Như được thể hiện trên bảng 5, 6 và 7 dưới đây, các chủng vi khuẩn *Lactobacillus curvatus* CH5, *Lactobacillus sakei* CH11, *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CH38 và *Bifidobacterium longum* CH57 có hoạt tính chống oxy hoá tốt, hoạt tính ức chế mạnh sự sản xuất lipopolysaccarit (LPS) và β -glucuronidaza, cảm ứng mạnh sự biểu hiện của protein liên kết vòng bịt, ức chế mạnh hoạt động của NF- κ B, và ức chế mạnh sự biểu hiện của α -synuclein. Các chủng vi khuẩn lactic này có hiệu quả chống oxy hoá tốt, có hiệu quả tốt trong việc ức chế hoạt động enzym của vi khuẩn gây bệnh đường ruột có liên quan đến chứng viêm và gây ung thư, ức chế sự sản sinh nội độc tố LPS (lipopolysaccarit) được tạo ra bởi hệ vi khuẩn gây bệnh đường ruột và cảm ứng sự biểu hiện của protein liên kết vòng bịt. Vì vậy, các chủng vi khuẩn lactic này có thể cải thiện hội chứng thấm qua ruột. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn lactic có thể làm giảm nhẹ bệnh Alzheimer và bệnh Parkinson, bởi các chủng vi khuẩn lactic ức chế không chỉ sự sản xuất LPS (lipopolysaccarit), một nội độc tố của vi sinh vật đường ruột, như *K. pneumoniae*, *E. coli* và *P. mirabilis* có liên quan đến bệnh Alzheimer hoặc bệnh Parkinson, mà còn ức chế sự sản xuất hoặc hoạt động của các chất gây ra sự thoái hóa thần kinh. Cụ thể là, các chủng vi khuẩn lactic được cho là mang lại hiệu quả tăng cường lẫn nhau thông qua các chức năng khác nhau, như làm giảm hội chứng thấm qua ruột và ức chế sản xuất nội độc tố và ức chế sự hoạt động hoặc sự sản xuất các chất gây thoái hóa thần kinh.

Bảng 5

Số thứ tự	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế β -glucuronidaza	Hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện của protein liên kết vòng bịt	Tế bào SH-SY5Y		Sự ức chế sản xuất LPS		
					Sự ức chế NF- κ B	Sự ức chế α -synuclein	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>
1	<i>L. acidophilus</i> CH1	+	+	-	-	-	-	-	-

2	<i>L. acidophilus</i> CH2	+	+	-	-	-	+	+	+
3	<i>L. acidophilus</i> CH3	+	+	-	-	-	+	+	+
4	<i>L. brevis</i> CH4	+	+	-	++	+	-	+	+
5	<i>L. curvatus</i> CH5	+++	+	++	++	+	+	+	+
6	<i>L. brevis</i> CH6	+	+	-	+	-	-	-	-
7	<i>L. casei</i> CH7	+	+	-	-	-	-	-	-
8	<i>L. planantrum</i> CH8	+	+	-	+	-	+	+	+
9	<i>L. sakei</i> CH9	-	+	-	-	-	-	-	-
10	<i>L. curvatus</i> CH10	-	+	-	+	-	-	-	-
11	<i>L. sakei</i> CH11	+++	+	++	++	++	++	+	+
12	<i>L. curvatus</i> CH12	-	+	+	+	+	-	-	-
13	<i>L. plantarum</i> CH13	-	+	-	+	-	-	-	-
14	<i>L. fermentum</i> CH14	-	+	-	-	+	-	-	-
15	<i>L. fermentum</i> CH15	+++	+	-	-	-	+	+	+

16	<i>L. gasseri</i> CH16	+	+	-	-	-	+	+	+
17	<i>L. paracasei</i> CH17	+	+	-	+	-	-	-	-
18	<i>L. helveticus</i> CH18	+	+	-	-	-	-	-	-
19	<i>L. helveticus</i> CH19	+	+	-	-	-	-	-	-
20	<i>L. johnsonii</i> CH20	+	+	+	+	+	-	-	-

Bảng 6

Số thứ tự	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế β -glucuronidaza	Hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện của protein liên kết vòng bọt	Tế bào SH-SY5Y		Sự ức chế sản xuất LPS		
					Sự ức chế NF- κ B	Sự ức chế α -synuclein	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>
21	<i>L. johnsonii</i> CH21	+	+	+	+	++	+	+	+
22	<i>L. johnsonii</i> CH22	+	+	+	+	+	-	-	-
23	<i>L. brevis</i> CH23	+++	+	++	++	+	++	++	++
24	<i>L. paracasei</i> CH24	+	+	-	-	-	-	-	-

25	<i>L. kim chi</i> CH25	+	+	-	-	-	-	-	-
26	<i>L. gasseri</i> CH26	+	+	-	-	-	-	-	-
27	<i>L. paracasei</i> CH27	+	+	+	+	-	-	-	-
28	<i>L. pentosus</i> CH28	+	+	-	+	+	-	-	-
29	<i>L. pentosus</i> CH29	+	+	-	-	-	-	-	-
30	<i>L. reuteri</i> CH30	+	-	-	-	-	-	-	-
31	<i>L. sakei</i> CH31	-	+	+	+	+	-	-	-
32	<i>L. johnsonii</i> CJLJ103	+++	+	++	++	+++	++	++	+++
33	<i>L. sakei</i> CH33	+	+	+	-	+	-	-	-
34	<i>L. sakei</i> CH34	+	+	+	-	+	+	+	+
35	<i>L. plantarum</i> CH35	+	+	+	+	+	+	+	+
36	<i>L. sanfranciscensis</i> CH36	+	+	+	+	+	+	-	-
37	<i>B. pseudocatenulatum</i> CH37	-	+	+	+	+	-	-	-
38	<i>B. pseudocate</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+

	<i>nulatum</i> CH38								
39	<i>B. adolescentis</i> CH39	-	+	+	+	+	-	-	-
40	<i>B. adolescentis</i> CH40	-	+	+	+	+	+	+	+

Bảng 7

Số thứ tự	Tên chủng	Chống oxy hóa	Sự ức chế β -glucuronidaza	Cảm ứng sự biểu hiện của protein liên kết vòng bít	Tế bào SH-SY5Y		Sự ức chế sản xuất LPS		
					Sự ức chế NF- κ B	Sự ức chế α -synuclein	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>
41	<i>B. adolescentis</i> CH41	+	+	+	+	+	+	+	+
42	<i>B. animalis</i> CH42	+	+	-	+	-	-	-	-
43	<i>B. animalis</i> CH43	+	+	-	+	-	-	-	-
44	<i>B. bifidum</i> CH44	+	+	-	+	-	-	-	-
45	<i>B. bifidum</i> CH45	+	+	-	+	-	-	-	-
46	<i>B. breve</i> CH46	+	-	-	-	-	-	+	+
47	<i>B. breve</i> CH47	+	+	+	++	+	-	-	-
48	<i>B. breve</i> CH48	+	+	+	+	+	-	-	-

49	<i>B. catenulatum</i> CH49	+	+	++	+	++	-	-	-
50	<i>B. catenulatum</i> CH50	-	+	-	+	-	-	-	-
51	<i>B. dentium</i> CH51	+	-	-	-	-	-	-	-
52	<i>B. infantis</i> CH52	-	+	-	-	-	-	-	-
53	<i>B. infantis</i> CH53	-	+	-	+	-	-	-	-
54	<i>B. infantis</i> CH54	+	+	-	-	-	-	-	-
55	<i>B. longum</i> CH55	+	+	+	+	+	-	-	-
56	<i>B. longum</i> CH56	+++	+	+	+	+	++	-	-
57	<i>B. longum</i> CH57	+++	+	++	+	++	+++	+	++
58	<i>B. longum</i> CH58	+	+	+	+	+	+	+	+
59	<i>B. longum</i> CH59	+	+	+	+	+	+	+	+
60	<i>B. longum</i> CH60	+	-	+	-	+	-	-	-

* Nồng độ cuối của các chủng vi khuẩn lactic trong phép đo hoạt tính chống oxy hoá: 1×10^4 CFU/ml; nồng độ của các chủng vi khuẩn lactic được đưa vào để đo hoạt tính ức chế beta-glucuronidaza và hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS): 1×10^4 CFU/ml; nồng độ của các chủng vi khuẩn lactic trong việc đánh giá hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt: 1×10^4 CFU/ml.

* Các tiêu chuẩn trong phép đo các hoạt tính khác nhau của các chủng vi khuẩn lactic: rất mạnh (+++; > 90%); mạnh (++; >60-90%); yếu (+; >20-60%); không hoặc dưới 20% (-; <20%).

3. Đánh giá hiệu quả cải thiện khả năng nhận thức nhờ các chủng vi khuẩn lactic bằng cách sử dụng các động vật mô hình bị gây tổn thương trí nhớ

(1) Chọn lọc các chủng vi khuẩn lactic cho thử nghiệm để đánh giá hiệu quả cải thiện khả năng nhận thức

Sau đây là 13 chủng vi khuẩn lactic được chọn cho thử nghiệm để đánh giá hiệu quả cải thiện khả năng nhận thức trong tổng số 60 loại vi khuẩn lactic được phân lập từ kim chi hoặc phân người.

* *Lactobacillus acidophilus* CH3, *Lactobacillus curvatus* CH5, *Lactobacillus sakei* CH11, *Lactobacillus fermentum* CH15, *Lactobacillus johnsonii* CH21, *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103, *Lactobacillus plantarum* CH35, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CH38, *Bifidobacterium adolescentis* CH41, *Bifidobacterium longum* CH56, *Bifidobacterium longum* CH57, *Bifidobacterium longum* CH59

(2) Thử nghiệm tránh thụ động và kết quả

Trong thiết bị kiểm tra né tránh thụ động, thiết bị được chia thành gian thứ nhất và gian thứ hai, và có cửa ngăn để nối thông hai gian này. Bằng cách sử dụng ánh sáng, gian thứ nhất được chiếu sáng trong khi gian thứ hai được giữ trong tối. Trên sàn của gian thứ hai đã được giữ trong tối được đặt một lưới điện với dòng 0,5 mA, tiến hành sốc điện trong 3 giây trong trường hợp con vật di chuyển vào gian tối.

13 chủng vi khuẩn lactic được chọn được hòa thành huyền dịch trong dung dịch muối sinh lý ở nồng độ 1×10^{10} CFU/ml, và sau đó huyền dịch được cho chuột thử nghiệm sử dụng (chuột đực ICR 5 tuần tuổi được Raonbio cung cấp) với liều 0,1 ml (tương đương với 1×10^9 CFU vi khuẩn lactic) hằng ngày trong ba ngày. Ngoài ra, hằng ngày 0,1 ml dung dịch muối sinh lý được cho sử dụng bởi chuột

tương ứng ở nhóm bình thường và nhóm suy giảm trí nhớ trong vòng ba ngày. Các con chuột tương ứng với nhóm đối chứng dương hằng ngày được dùng với 5 mg/kg (trọng lượng cơ thể) của thuốc đối chứng dương - donepezil (thuốc được dùng cho việc điều trị chứng sa sút trí tuệ do bệnh Alzheimer và bệnh Alzheimer) trong vòng ba ngày. Số chuột trên mỗi nhóm thử nghiệm là 9.

Vào ngày thứ hai sau khi được cho sử dụng thuốc, các con chuột nêu trên được đặt trong gian thứ nhất được chiếu sáng, quan sát trong 20 giây, và cho phép con vật di chuyển sang gian thứ hai được giữ trong tối bằng cách mở cửa ngăn. Những con chuột không di chuyển sang gian thứ hai trong vòng 60 giây sau khi cửa được mở bị loại khỏi thử nghiệm. Khi chuột di chuyển sang gian thứ hai, cửa ngăn được đóng lại, và những con chuột này được sốc điện 0,5 mA thông qua lưới điện trên sàn trong ba giây. Những con chuột bị buộc phải nhớ sự sốc điện này.

Vào ngày thứ ba sau khi dùng thuốc, một giờ sau lần dùng chế phẩm chứa các chủng vi khuẩn lactic hoặc thuốc đối chứng dương, 1 mg/kg (trọng lượng cơ thể) thuốc scopolamin (thuốc ức chế xung động giao cảm gây rối loạn khả năng nhận thức hoặc tổn thương trí nhớ) được hòa tan trong nước cất và được cho chuột uống trong khi nhóm bình thường được cho uống nước muối sinh lý. Thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị né tránh thụ động sau 30 phút cho uống scopolamin. Với 10 giây cho mỗi lần quan sát, khi cửa ngăn được mở ra, thời gian mà chuột ở mỗi nhóm thí nghiệm đặt hoàn toàn bốn chân của nó ở gian thứ hai được đo lên đến 300 giây, và kết quả của thử nghiệm được thể hiện trên bảng 8. Kết quả trên bảng 8 cho thấy rằng thời gian trễ dài hơn có nghĩa là đặc tính trong việc học tránh thụ động tốt hơn và khôi phục trí nhớ ngắn hạn.

Bảng 8

Nhóm	Thời gian trễ (giây)
Nhóm bình thường	240,2
Nhóm tổn thương trí nhớ chỉ được cho sử dụng scopolamin	22,6

Nhóm đối chứng dương được cho sử dụng scopolamin và donepezil	66,4
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3	33,5
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus curvatus</i> CH5	57,4
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus sakei</i> CH11	45,0
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus fermentum</i> CH15	56,7
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21	22,4
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus brevis</i> CH23	61,2
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus johnsonii</i> CJLJ103	71,0
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus plantarum</i> CH35	44,6
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38	49,6
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41	35,6
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Bifidobacterium longum</i> CH56	54,9
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Bifidobacterium longum</i> CH57	62,1
Được cho sử dụng scopolamin và	48,5

<i>Bifidobacterium longum</i> CH59	
------------------------------------	--

Như được thể hiện trên bảng 8, khi động vật mô hình bị rối loạn khả năng nhận thức hoặc suy giảm trí nhớ do scopolamin gây ra, được cho sử dụng *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 hoặc *Bifidobacterium longum* CH57 thì thời gian trễ tăng lên đáng kể so với nhóm suy giảm trí nhớ chỉ được cho sử dụng scopolamin, và đặc biệt, việc sử dụng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 cho thấy hiệu quả tốt hơn so với việc sử dụng donepezil, một loại thuốc điều trị thương mại.

(3) Thử nghiệm mê cung hình chữ Y và kết quả

Thiết bị được sử dụng trong thử nghiệm mê cung hình chữ Y bao gồm 3 cánh có chiều dài 42cm, chiều rộng 3cm và chiều cao 12cm. Ba cánh được làm bằng nhựa polyvinyl resin màu đen, được đặt tạo thành góc 120 độ giữa mỗi hai cánh.

13 chủng vi khuẩn lactic được chọn được hòa thành huyền dịch trong dung dịch muối sinh lý ở nồng độ 1×10^{10} CFU/ml, và sau đó huyền dịch được cho chuột thử nghiệm sử dụng (chuột đực ICR 5 tuần tuổi được Raonbio cung cấp) với liều 0,1 ml (tương đương với 1×10^9 CFU vi khuẩn lactic) hằng ngày trong ba ngày. Ngoài ra, hằng ngày 0,1 ml dung dịch muối sinh lý được cho sử dụng bởi chuột tương ứng ở nhóm bình thường và nhóm suy giảm trí nhớ trong vòng ba ngày. Các con chuột tương ứng với nhóm đối chứng dương hằng ngày được dùng với 5 mg/kg (trọng lượng cơ thể) thuốc đối chứng dương - donepezil (thuốc được dùng cho việc điều trị chứng sa sút trí tuệ do bệnh Alzheimer và bệnh Alzheimer) trong vòng ba ngày. Số chuột trên mỗi nhóm thử nghiệm là 9.

Một giờ sau lần sử dụng các chủng vi khuẩn lactic hoặc thuốc đối chứng dương cuối cùng, 1 mg/kg (trọng lượng cơ thể) scopolamin (thuốc ức chế xung động giao cảm gây rối loạn nhận thức hoặc suy giảm trí nhớ), được hòa tan trong nước cất, và được cho uống, trong khi nhóm bình thường được cho uống nước muối sinh lý. Một giờ sau khi uống scopolamin, chuột được đặt cẩn thận vào một trong ba cánh, A, B, và C trong mê cung Y và được cho phép tự do di chuyển trong tám phút, và sau đó cánh mà con chuột đã di chuyển tới được ghi lại. Trong thí nghiệm,

cánh được ghi lại là cánh mà trong đó con vật thí nghiệm được tính là di chuyển vào chỉ khi toàn bộ cơ thể bao gồm cả đuôi nằm bên trong cánh, hoặc khi chuột di chuyển trở lại. Trong trường hợp con chuột di chuyển vào từng cánh tuần tự, một điểm (thay đổi thực tế) đã được xác định. Hành vi thay đổi được định nghĩa là trường hợp con chuột di chuyển trong cả ba cánh một cách tuần tự. Kết quả thí nghiệm được tính bằng công thức dưới đây (Sarter, M. và cộng sự, Tạp chí Psychopharmacology., 94, trang 491-495, 1998), như được thể hiện trên bảng 9 dưới đây.

$$\text{Thay đổi tự phát (\%)} = \text{thay đổi thực tế} / \text{thay đổi tối đa} \times 100$$

(thay đổi tối đa: số thay đổi tổng số của toàn bộ thử nghiệm - 2)

Bảng 9 dưới đây cho thấy rằng sự thay đổi hành vi lớn hơn (đơn vị:%) có nghĩa là có sự phục hồi tốt hơn trong việc học tập và ghi nhớ không gian.

Bảng 9

Nhóm	Thay đổi hành vi; %
Nhóm bình thường	74,5
Nhóm tổn thương trí nhớ chỉ được cho sử dụng scopolamin	49,9
Nhóm đối chứng dương được cho sử dụng scopolamin và donepezil	65,8
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3	53,7
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus curvatus</i> CH5	51,3
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus sakei</i> CH11	49,0
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus</i>	56,2

<i>fermentum</i> CH15	
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21	53,5
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus brevis</i> CH23	59,2
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus johnsonii</i> CJLJ103	63,9
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus plantarum</i> CH35	52,4
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38	52,5
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41	54,1
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Bifidobacterium longum</i> CH56	55,2
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Bifidobacterium longum</i> CH57	60,3
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Bifidobacterium longum</i> CH59	55,5

Như được thể hiện trên bảng 9, khi động vật mô hình bị rối loạn khả năng nhận thức hoặc suy giảm trí nhớ do scopolamin gây ra, được sử dụng *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 hoặc *Bifidobacterium longum* CH57 thì thời gian trễ tăng lên đáng kể so với nhóm suy giảm trí nhớ chỉ được xử lý với scopolamin, và đặc biệt, việc sử dụng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 cho thấy hiệu quả tốt hơn so với việc sử dụng donepezil, một loại thuốc điều trị thương mại.

4. Sản xuất sản phẩm lên men đậu đỏ bằng cách sử dụng các chủng vi khuẩn lactic và đánh giá hiệu quả cải thiện của sản phẩm lên men đậu đỏ đối với khả năng nhận thức

(1) Sản xuất sản phẩm lên men đậu đỏ

Lactobacillus johnsonii CJLJ103 được nuôi cấy trong môi trường TS có thể ăn được và được ly tâm ở 10.000 g trong 20 phút để thu sinh khối *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103. Sinh khối *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 thu được được rửa bằng dung dịch muối sinh lý hai lần và hòa thành huyền dịch trong 100ml dung dịch muối sinh lý để tạo thành sinh khối dạng huyền dịch của *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103. Tiếp theo, 10g hạt đậu đỏ được nghiền nhỏ được thêm vào 90ml huyền dịch sinh khối của *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103, sau đó được nuôi cấy trong 24 giờ để lên men đậu đỏ. Tiếp đó, dịch lỏng lên men đậu đỏ được đông khô để thu được sản phẩm lên men đậu đỏ.

(2) Thử nghiệm né tránh thụ động và kết quả

Ngoại trừ loại thuốc và liều sử dụng, thử nghiệm né tránh thụ động được tiến hành theo cách tương tự như đã nêu ở trên, và kết quả được thể hiện trên bảng 10 dưới đây. Như được thể hiện trên bảng 10, việc sử dụng huyền dịch đậu đỏ hoặc *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 (liều dùng hằng ngày: 2×10^8 CFU/cá thể chuột) không cải thiện đáng kể trí nhớ bị tổn thương trong khi việc sử dụng sản phẩm lên men đậu đỏ đã cải thiện đáng kể trí nhớ bị tổn thương.

Bảng 10

Nhóm	Thay đổi hành vi; %
Nhóm bình thường	232,5
Nhóm tổn thương trí nhớ chỉ được cho sử dụng scopolamin	23,8
Nhóm đối chứng dương được cho sử dụng scopolamin và donepezil	65,7
Được cho sử dụng scopolamin và huyền dịch đậu đỏ	48,5
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus</i>	48,0

<i>johnsonii</i> CJLJ103	
Được cho sử dụng scopolamin và sản phẩm lên men đậu đỏ	64,2

1) Huyền dịch đậu đỏ được tạo ra bằng cách hòa thành huyền dịch bột đậu đỏ trong dung dịch muối sinh lý, và liều dùng hằng ngày là 0,2g cho mỗi cá thể chuột dựa trên lượng bột đậu đỏ.

2) *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 được sử dụng sau khi hòa thành huyền dịch trong nước muối sinh lý, và liều dùng hằng ngày là 2×10^8 CFU cho mỗi cá thể chuột dựa trên lượng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103.

3) Sản phẩm lên men đậu đỏ được sử dụng sau khi được hòa thành huyền dịch trong dung dịch muối sinh lý, và liều dùng hằng ngày là 0,2g cho mỗi cá thể chuột dựa trên lượng sản phẩm lên men đậu đỏ. 0,2g sản phẩm lên men đậu đỏ chứa khoảng 2×10^8 CFU *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103.

(3) Thử nghiệm mê cung hình chữ Y và kết quả

Ngoại trừ loại thuốc và liều sử dụng, thử nghiệm mê cung hình chữ Y được tiến hành theo cách tương tự như đã nêu ở trên, và kết quả được thể hiện trên bảng 11 dưới đây. Như được thể hiện trên bảng 11, việc sử dụng huyền dịch đậu đỏ hoặc *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 (liều dùng hằng ngày: 2×10^8 CFU/cá thể chuột) cho chuột không cải thiện đáng kể trí nhớ bị tổn thương trong khi việc sử dụng sản phẩm lên men đậu đỏ đã cải thiện đáng kể trí nhớ bị tổn thương.

Bảng 11

Nhóm	Thay đổi hành vi; %
Nhóm bình thường	75,2
Nhóm tổn thương trí nhớ chỉ được cho sử dụng scopolamin	45,4
Nhóm đối chứng dương được cho sử dụng	63,2

scopolamin và donepezil	
Được cho sử dụng scopolamin và huyền dịch đậu đỏ	52,4
Được cho sử dụng scopolamin và <i>Lactobacillus johnsonii</i> CJLJ103	57,6
Được cho sử dụng scopolamin và sản phẩm lên men đậu đỏ	63,3

1) Huyền dịch đậu đỏ được tạo ra bằng cách hòa thành huyền dịch bột đậu đỏ trong dung dịch muối sinh lý, và liều dùng hằng ngày là 0,2g cho mỗi cá thể chuột dựa trên lượng bột đậu đỏ.

2) *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 được sử dụng sau khi hòa thành huyền dịch trong nước muối sinh lý, và liều dùng hằng ngày là 2×10^8 CFU cho mỗi cá thể chuột dựa trên lượng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103.

3) Sản phẩm lên men đậu đỏ được sử dụng sau khi được hòa thành huyền dịch trong dung dịch muối sinh lý, và liều dùng hằng ngày là 0,2g cho mỗi cá thể chuột dựa trên lượng sản phẩm lên men đậu đỏ. 0,2g sản phẩm men hạt đậu đỏ chứa khoảng 2×10^8 CFU *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103.

5. Đánh giá hiệu quả cải thiện khả năng nhận thức bằng cách cho các động vật mô hình bị gây suy giảm trí nhớ do *Escherichia coli* gây ra sử dụng vi khuẩn lactic

(1) Cải thiện sự suy giảm trí nhớ và việc sử dụng thuốc

Escherichia coli K20 được tách từ động vật bị suy giảm trí nhớ được sử dụng cho chuột thử nghiệm để gây ra sự suy giảm trí nhớ, và hiệu quả cải thiện của các chủng vi khuẩn lactic đối với khả năng nhận thức được đánh giá bằng cách thực hiện thử nghiệm ma trận hình chữ Y và thử nghiệm né tránh thụ động.

Cụ thể hơn, *Escherichia coli* K20 được sử dụng cho chuột (chuột đực ICR 5 tuần tuổi ICR do Raonbio cung cấp) bằng việc được cho ăn trong một tuần ở phòng

thí nghiệm động vật với liều 1×10^9 CFU/ngày trong năm ngày để gây ra sự suy giảm trí nhớ. Trong khi đó, nhóm bình thường được cho sử dụng dung dịch muối sinh lý thay cho *Escherichia coli* K20. Từ ngày tiếp theo của lần sử dụng *Escherichia coli* K20 cuối cùng, huyền dịch các chủng vi khuẩn lactic (các chủng vi khuẩn lactic được hòa thành huyền dịch trong dung dịch muối sinh lý với nồng độ 1×10^{10} CFU/ml) được sử dụng cho chuột bị suy giảm trí nhớ với liều 0,1 ml (tương đương với 1×10^9 CFU vi khuẩn lactic) mỗi ngày trong năm ngày. Ngoài ra, nhóm bình thường và nhóm bị suy giảm trí nhớ được cho dùng 0,1 ml dung dịch muối sinh lý mỗi ngày trong 5 ngày. Ngoài ra, huyền dịch các chủng vi khuẩn lactic (các chủng vi khuẩn lactic được hòa thành huyền dịch trong dung dịch muối sinh lý với nồng độ 1×10^{10} CFU/ml) được sử dụng cho nhóm bình thường với liều 0,1 ml (tương đương với 1×10^9 CFU vi khuẩn lactic) mỗi ngày trong năm ngày, được sử dụng làm nhóm đối chứng dương. Số chuột trên mỗi nhóm thử nghiệm là 9.

(2) Thử nghiệm mê cung hình chữ Y

Một giờ sau lần dùng thuốc cuối cùng, chuột được đặt cẩn thận vào trong một trong ba cánh, A, B, và C trong mê cung Y và được cho phép tự do di chuyển trong tám phút, và sau đó là cánh mà chuột đã đi tới được ghi lại. Trong thí nghiệm, cánh được ghi lại là cánh mà trong đó con vật thí nghiệm được tính là di chuyển vào chỉ khi toàn bộ cơ thể bao gồm cả đuôi nằm bên trong cánh, hoặc khi chuột di chuyển trở lại. Trong trường hợp con chuột di chuyển vào từng cánh tuần tự, một điểm (thay đổi thực tế) đã được xác định. Hành vi thay đổi được định nghĩa là trường hợp con chuột di chuyển trong cả ba cánh một cách tuần tự. Kết quả thí nghiệm được tính bằng công thức dưới đây (Sarter, M. và cộng sự, Tạp chí Psychopharmacology., 94, trang 491-495, 1998).

$$\text{Thay đổi tự phát (\%)} = \text{thay đổi thực tế} / \text{thay đổi tối đa} \times 100$$

(thay đổi tối đa: số thay đổi tổng số của toàn bộ thử nghiệm - 2)

(3) Thử nghiệm né tránh thụ động

Vào ngày thứ hai sau khi được cho sử dụng thuốc, các con chuột nêu trên được đặt trong gian thứ nhất được chiếu sáng, quan sát trong 20 giây, và cho phép con vật di chuyển sang gian thứ hai được giữ trong tối bằng cách mở cửa ngăn. Những con chuột không di chuyển sang gian thứ hai trong vòng 60 giây sau khi cửa được mở bị loại khỏi thử nghiệm. Khi chuột di chuyển sang gian thứ hai, cửa ngăn được đóng lại, và những con chuột này được sốc điện 0,5 mA thông qua lưới điện trên sàn trong ba giây. Những con chuột bị buộc phải nhớ sự sốc điện này.

Một giờ sau lần dùng thuốc cuối cùng, thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị né tránh thụ động. Với 10 giây cho mỗi lần quan sát, khi cửa ngăn được mở ra, thời gian mà chuột ở mỗi nhóm thí nghiệm đặt hoàn toàn bốn chân của nó ở gian thứ hai được đo lên đến 300 giây.

(3) Đánh giá mức độ biểu hiện của yếu tố điều hòa tăng trưởng thần kinh

Hai giờ sau lần dùng thuốc cuối cùng, hồi hải mã được tách ra từ chuột của mỗi nhóm thử nghiệm, và mức độ biểu hiện của BDNF (yếu tố dinh dưỡng thần kinh nguồn gốc từ não), được biết đến là một yếu tố điều hòa tăng trưởng thần kinh, và mức độ hoạt động của CREB (protein bám vào nhân tố phản ứng AMP vòng), được biết đến là yếu tố phiên mã cải thiện trí nhớ, được đo.

(4) Kết quả thử nghiệm

Fig.1 là biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của việc điều trị bằng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 trong thử nghiệm mê cung hình chữ Y trên các động vật mô hình bị suy giảm trí nhớ do *Escherichia coli* K20 gây ra. Fig.2 là biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của việc điều trị bằng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 trong thử nghiệm tránh thụ động trên các động vật mô hình bị suy giảm trí nhớ do hệ vi khuẩn *Escherichia coli* K20 gây ra. Fig.3 là hình minh họa ảnh hưởng của việc điều trị bằng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 đối với mức độ biểu hiện của yếu tố điều hòa tăng trưởng thần kinh ở các động vật mô hình bị suy giảm trí nhớ do *Escherichia coli* K20 gây ra.

Từ Fig.1 đến Fig.3, "NOR" biểu thị cho nhóm bình thường, "NOR + CJLJ103" biểu thị cho nhóm thử nghiệm được cho sử dụng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 trong nhóm bình thường, "EC" biểu thị nhóm bị suy giảm trí nhớ chỉ xử lý với *Escherichia coli* K20 và "EC + CJLJ103" biểu thị nhóm thử nghiệm bị suy giảm trí nhớ do sử dụng *Escherichia coli* K20 và sau đó dùng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 để điều trị. Như được minh họa trên các Fig.1-3, việc sử dụng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 đối với nhóm bình thường không có ý nghĩa trong khi vẫn cho thấy sự hiện hữu không đáng kể của trí nhớ. Mặt khác, việc sử dụng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 đối với những con chuột bị suy giảm trí nhớ do *Escherichia coli* K20 gây ra thì làm cải thiện đáng kể trí nhớ trong khi đó cũng cải thiện mức độ biểu hiện của BDNF ở hồi hải mã cũng như lượng hoạt động (sự phosphoryl hóa) của CREB.

6. Đánh giá hiệu quả cải thiện của các chủng vi khuẩn lactic đối với khả năng nhận thức của các động vật mô hình bị suy giảm trí nhớ do *Proteus mirabilis* gây ra

Proteus mirabilis K21 được tách từ động vật bị tổn thương trí nhớ và được sử dụng để gây suy giảm trí nhớ ở chuột thử nghiệm (các triệu chứng tương tự như bệnh Parkinson) và thử nghiệm ma trận hình chữ Y được tiến hành để đánh giá hiệu quả cải thiện khả năng nhận thức bởi các chủng vi khuẩn lactic.

Cụ thể hơn, *Proteus mirabilis* K21 được sử dụng cho chuột (chuột đực ICR 5 tuần tuổi ICR do Raonbio cung cấp) bằng cách được cho ăn trong một tuần ở phòng thí nghiệm động vật với liều 1×10^9 CFU/ngày trong năm ngày để gây suy giảm trí nhớ. Trong khi đó, nhóm bình thường được cho sử dụng dung dịch muối sinh lý thay cho *Proteus mirabilis* K21. Từ ngày tiếp theo của lần sử dụng *Proteus mirabilis* K21 cuối cùng, huyền dịch các chủng vi khuẩn lactic (các chủng vi khuẩn lactic được hòa thành huyền dịch trong dung dịch muối sinh lý với nồng độ 1×10^{10} CFU/ml) được sử dụng cho chuột bị suy giảm trí nhớ với liều 0,1 ml (tương đương với 1×10^9 CFU vi khuẩn lactic) mỗi ngày trong năm ngày. Ngoài ra, nhóm bình thường và nhóm bị suy giảm trí nhớ được cho dùng 0,1 ml dung dịch muối sinh lý mỗi ngày trong 5 ngày. Ngoài ra, donepezil (thuốc dùng để điều trị bệnh Alzheimer và bệnh sa sút trí tuệ do bệnh Alzheimer), làm thuốc đối chứng dương, được sử

dụng cho nhóm đối chứng dương với liều 5 mg/kg (trọng lượng cơ thể) mỗi ngày trong năm ngày. Số chuột trên mỗi nhóm thử nghiệm là 9.

Một giờ sau lần dùng thuốc cuối cùng, con chuột được đặt cẩn thận vào trong một trong ba cánh, A, B, và C trong mê cung Y và được cho phép tự do di chuyển trong tám phút, và sau đó là cánh mà chuột đã đi tới được ghi lại. Trong thí nghiệm, cánh được ghi lại là cánh mà trong đó con vật thí nghiệm được tính là di chuyển vào chỉ khi toàn bộ cơ thể bao gồm cả đuôi nằm bên trong cánh, hoặc khi chuột di chuyển trở lại. Trong trường hợp con chuột di chuyển vào từng cánh tuần tự, một điểm (sự thay đổi thực tế) đã được xác định. Hành vi thay đổi được định nghĩa là trường hợp con chuột di chuyển trong cả ba cánh một cách tuần tự. Kết quả thí nghiệm được tính bằng công thức dưới đây (Sarter, M. và cộng sự, Tạp chí Psychopharmacology., 94, trang 491-495, 1998), như được thể hiện trên bảng 12 dưới đây.

$$\text{Thay đổi tự phát (\%)} = \text{thay đổi thực tế} / \text{thay đổi tối đa} \times 100$$

(thay đổi tối đa: số thay đổi tổng số của toàn bộ thử nghiệm - 2)

Bảng 12 dưới đây cho thấy rằng sự thay đổi hành vi lớn hơn (đơn vị: %) có nghĩa là có sự phục hồi tốt hơn trong việc học tập và ghi nhớ không gian.

Bảng 12

Nhóm	Thay đổi hành vi; %
Nhóm bình thường	73,8
Nhóm bị tổn thương trí nhớ chỉ được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21	46,4
Nhóm đối chứng dương được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và donepezil	58,6
Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3	52,5

Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Lactobacillus curvatus</i> CH5	50,2
Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Lactobacillus sakei</i> CH11	50,7
Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Lactobacillus fermentum</i> CH15	55,5
Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21	54,7
Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Lactobacillus brevis</i> CH23	53,3
Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Lactobacillus johnsonii</i> CJLJ103	62,8
Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Lactobacillus plantarum</i> CH35	54,1
Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38	51,2
Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41	55,3
Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Bifidobacterium longum</i> CH56	54,8
Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Bifidobacterium longum</i> CH57	57,3
Được cho sử dụng <i>Proteus mirabilis</i> K21 và <i>Bifidobacterium longum</i> CH59	54,9

Như được thể hiện trên bảng 12, việc sử dụng *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 cho các động vật mô hình bị suy giảm trí nhớ do hệ vi khuẩn *Protein*

mirabilis K21 gây ra cho thấy hiệu quả tốt hơn so với việc sử dụng donepezil vốn là một loại thuốc điều trị thương mại.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả ở trên thông qua các ví dụ tham chiếu, nhưng phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này, và có thể có nhiều biến thể khác nhau mà không nằm ngoài phạm vi và ý tưởng của sáng chế. Do đó, phạm vi bảo hộ của sáng chế chỉ được xác định bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi khuẩn *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 (số truy cập: KCCM 11763P).
2. Dược phẩm dùng để phòng hoặc điều trị bệnh rối loạn chức năng nhận thức có chứa vi khuẩn *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 (số truy cập: KCCM 11763P), sản phẩm nuôi cấy của nó, sản phẩm ly giải của nó hoặc dịch chiết của nó làm thành phần hoạt tính.
3. Thực phẩm dùng để phòng hoặc làm giảm nhẹ bệnh rối loạn chức năng nhận thức có chứa *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 (số truy cập: KCCM 11763P), sản phẩm nuôi cấy của nó, sản phẩm ly giải của nó hoặc dịch chiết của nó làm thành phần hoạt tính.
4. Thực phẩm dùng để cải thiện trí nhớ hoặc khả năng học tập có chứa vi khuẩn *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 (số truy cập: KCCM 11763P), sản phẩm nuôi cấy của nó, sản phẩm ly giải của nó hoặc dịch chiết của nó làm thành phần hoạt tính.
5. Dược phẩm dùng để phòng hoặc điều trị bệnh rối loạn chức năng nhận thức có chứa sản phẩm lên men đậu đỏ hoặc dịch chiết của nó làm thành phần hoạt tính,

trong đó sản phẩm lên men đậu đỏ là sản phẩm được lên men nhờ vi khuẩn *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 (số truy cập: KCCM 11763P).
6. Thực phẩm dùng để phòng hoặc làm giảm nhẹ bệnh rối loạn chức năng nhận thức có chứa sản phẩm lên men đậu đỏ hoặc dịch chiết của nó làm thành phần hoạt tính,

trong đó sản phẩm lên men đậu đỏ là sản phẩm được lên men nhờ vi khuẩn *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 (số truy cập: KCCM 11763P).
7. Thực phẩm dùng để cải thiện trí nhớ hoặc khả năng học tập có chứa sản phẩm lên men đậu đỏ hoặc dịch chiết của nó làm thành phần hoạt tính,

trong đó sản phẩm lên men đậu đỏ là sản phẩm được lên men nhờ vi khuẩn *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103 (số truy cập: KCCM 11763P).

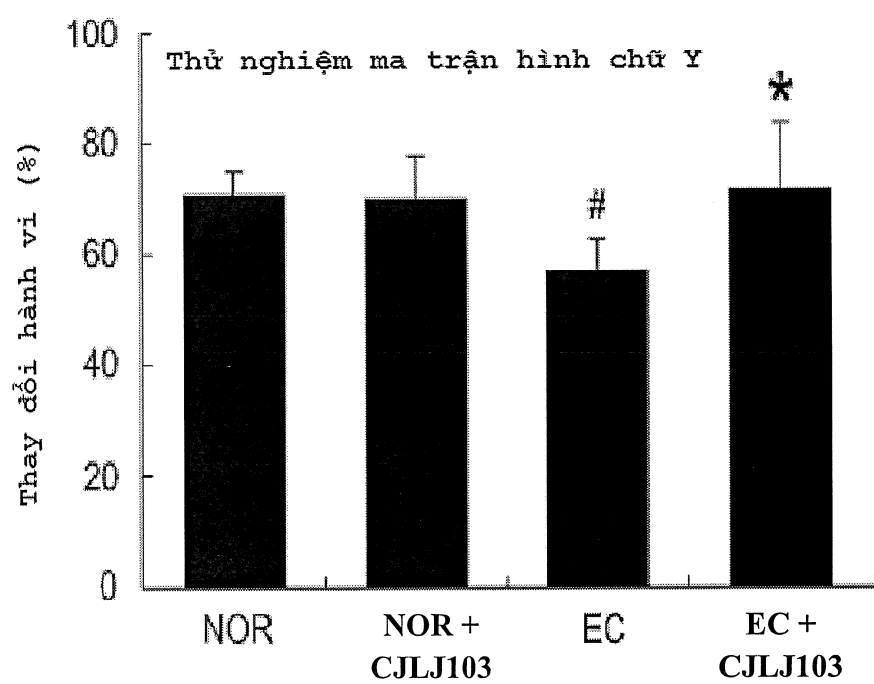


Fig.1

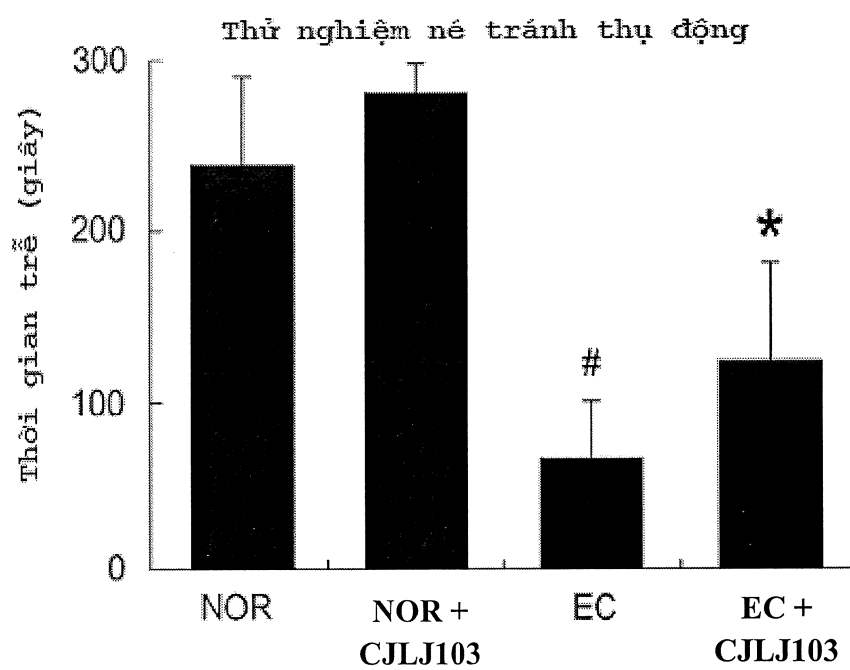


Fig.2

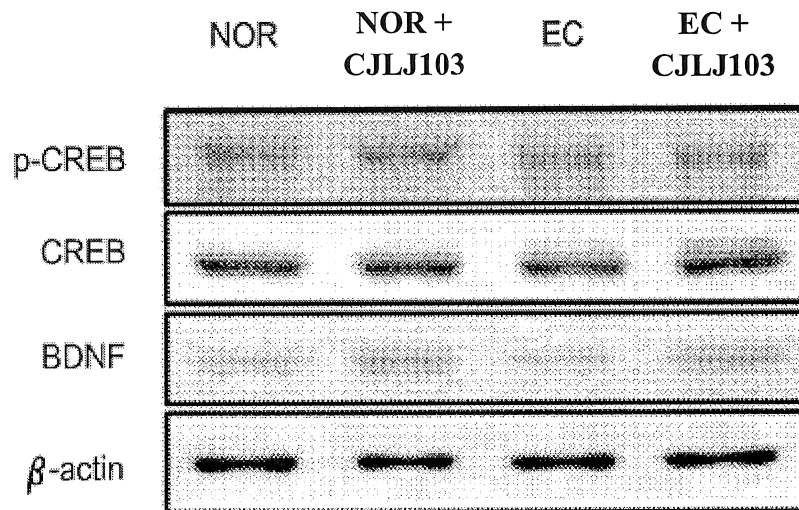


Fig.3

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
<120>	VI KHUẨN LACTOBACILLUS VÀ CHẾ PHẨM DÙNG ĐỂ PHÒNG, CẢI THIẾN HOẶC ĐIỀU TRỊ BỆNH THOÁI HÓA NÃO HOẶC CÁC RỐI LOẠN CHỨC NĂNG NHẬN THỨC
<130>	PCT-16-132
<150>	KR 10-2015-0130124
<151>	2015-09-15
<150>	KR 10-2016-0001312
<151>	2016-01-06
<160>	3
<170>	KopatentIn 2.0
<210>	1
<211>	1132
<212>	ADN
<213>	16S rADN của <i>Lactobacillus brevis</i> CH23
<400>	1

```

agggataaca cttggaacaa ggtgctaata ccgtataaca acaaaatccg catggatttt 60
gtttgaaagg tggcttcggc taccacttct ggatgatccc gcggcggtatt agttagttgg 120
tgaggtaaag gcccaccaag acgatgatac gtagccgacc tgagagggtta atcggccaca 180
ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc agtagggaat ctccacaat 240
ggacgaaagt ctgatggagc aatgccgcgt gagtgaagaa gggtttcggc tcgtaaaact 300
ctgttgtaaa agaagaacac ctttgagagt aactgttcaa gggttgacgg tatttaacca 360
gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttgtc 420
cggatttatt gggcgtaaag cgagcgcagg cggtttttta agtctgatgt gaaagccttc 480
ggcttaaccg gagaagtgca tcggaaactg ggagacttga gtgcagaaga ggacagtgga 540
actccatgtg tagcgggtgga atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc 600
tgtctagtct gtaactgacg ctgaggctcg aaagcatggg tagcgaacag gattagatac 660
cctgstagtc catgccgtaa acgatgagtg ctaagtgttg gagggtttcc gcccttcagt 720
gctgcagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtagc accgcaaggt tgaaactcaa 780
aggaattgac gggggcccgcc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agctacgcga 840

```

agaaccttac	caggtcttga	catcttctgc	caatcttaga	gataagacgt	tccttcggg	900
gacagaatga	caggtggtgc	atggtgtcg	tcagctcgtg	tcgtgagatg	ttgggttaag	960
tcccgcaacg	agcgcaaccc	ttattatcag	ttgccagcat	tcagttgggc	actctggtga	1020
gactgccggt	gacaaaccgg	aggaagggtg	ggatgacgtc	aaatcatcat	gccccttatg	1080
acctgggcta	cacacgtgct	acaatggacg	gtacaacgag	tcgcgaagtc	gt	1132

<210> 2

<211> 1258

<212> ADN

<213> 16S rADN của *Lactobacillus johnsonii* CJLJ103

<400> 2

gtaactgcc	caagagactg	ggataacacc	tggaacaga	tgctaatacc	ggataacaac	60
actagacgca	tgtctagagt	ttgaaagatg	gttctgctat	cactcttga	tggacctgcg	120
gtgcattagc	tagttggtaa	ggtaacggct	taccaaggca	atgatgcata	gccgagttga	180
gagactgac	ggccacattg	ggactgagac	acggcccaaa	ctcctacggg	aggcagcagt	240
agggaaatctt	ccacaatgga	cgaaggtctg	atggagcaac	gccgcgtgag	tgaagaagg	300
tttcggctcg	taaagctctg	ttggtagtga	agaaagatag	aggtagtaac	tggccttgat	360
ttgacggtaa	ttccccagaa	agtcacggct	aactacgtgc	cagcagccgc	ggtaatacgt	420
aggtggcaag	cgttgctcgg	atttattggg	cgtaaagcga	gtgcaggcgg	ttcaataagt	480
ctgatgtgaa	agccttcggc	tcaaccggag	aattgcatca	gaaactgttg	aacttgagtg	540
cagaagagga	gagtggaact	ccatgtgtag	cggtggaatg	cgtagatata	tggaagaaca	600
ccagtggcga	aggcggctct	ctggtctgca	actgacgctg	aggctcgaaa	gcatgggtag	660
cgaacaggat	tagataccct	ggtagtccat	gccgtaaacg	atgagtgcta	agtgttggga	720
ggtttccgcc	tctcagtgtg	gcagctaacg	cattaagcac	tccgcctggg	gagtacgacc	780
gcaaggttga	aactcaaagg	aattgacggg	ggcccgcaca	agcgggtggag	catgtggttt	840
aattcgaagc	aacgcgaaga	accttaccag	gtcttgacat	ccagtgcaaa	cctaagagat	900
taggtgttcc	cttcggggac	gctgagacag	gtggtgcatg	gctgtcgtca	gctcgtgtcg	960
tgagatgttg	ggtaaagtcc	cgcaacgagc	gcaacccttg	tcattagttg	ccatcattaa	1020
gttgggcact	ctaatgagac	tgccgggtgac	aaaccggagg	aaggtgggga	tgacgtcaag	1080
tcacatgcc	ccttatgacc	tgggctacac	acgtgttaca	atggacggta	caacgagaag	1140
cgaacctgcg	aaggcaagcg	gattctttaa	agccgttctc	agttcggact	gtaggctgca	1200

actgcctac acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgga cagtacgccg cggatgaat 1258

<210> 3

<211> 1348

<212> ADN

<213> 16S rADN của *Bifidobacterium longum* CH57

<400> 3

```

cgggctttgc ttggtggtga gagtggcgaa cgggtgagta atgcgtgacc gacctgcccc 60
atacaccgga atagctctcg gaaacgggtg gtaatgccgg atgctccagt tgatcgcatt 120
gtcttctggg aaagctttcg cggatatgga tggggtcgcg tcctatcagc ttgacggcgg 180
ggtaacggcc caccgtggct tcgacgggta gccggcctga gagggcgacc ggccacattg 240
ggactgagat acggcccaga ctctacggg aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg 300
cgcaagcctg atgcagcgac gccgcgtgag ggatggaggg ctccgggttg taaacctctt 360
ttatcgggga gcaagcgaga gtgagttac ccgttgaata agcaccggct aactacgtgc 420
cagcagccgc ggtaatacgt aggggtgcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagggc 480
tcgtaggcgg ttcgtcgctt ccgggtgtgaa agtccatcgc ttaacgggtg atccgcgccg 540
ggtagcggcg ggcttgagtg cggtagggga gactggaatt cccgggtgaa cggtggaatg 600
tgtagatatc gggaagaaca ccaatggcga aggcaggtct ctgggccgtt actgacgctg 660
aggagcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg 720
gtggatgctg gatgtggggc ccgtccacg gggtccgtgt cggagctaac gcgttaagca 780
tcccgcctgg gggagtacgg ccgcaaggct aaaactcaaa gaaattgacg ggggcccgcg 840
caagcggcgg agcatgcgga ttaattcgat gcaacgcgaa gaacctacc tgggcttcac 900
atgttcccga cggtcgtaga gatacggctt cccttcgggg cgggttcaca ggtggtgcat 960
ggtcgtcgtc agctcgtgct gtgagatgtt ggggtaagtc ccgcaacgag cgcaaccctc 1020
gccccgtgtt gccagcggat tatgccggga actcacgggg gaccgccggg gtttaactcg 1080
aggaaggtgg ggatgacgtc agatcatcat gccccttacg tccagggtt cagcgtgct 1140
acaatggccg gtacaacggg atgcgacgcg gcgacgcgga gcggatccct gaaaaccggg 1200
ctcagttcgg atcgcagtct gcaactcgac tgcgtgaagg cggagtcgct agtaatcgcg 1260
aatcagcaac gtcgcggtga atgcgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcaagtcatt 1320
gaaagtgggc agcaccgaa gccgggtgg                                     1348

```