



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

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

(11)



1-0037022

(51)¹⁹ C12N 1/20; A23L 33/135; A61K 35/747; (13) B
C12R 1/25; A61P 31/12; A23K 10/16;
A61K 8/99

(21) 1-2019-06999

(22) 12/07/2019

(86) PCT/KR2019/008676 12/07/2019

(87) WO 2020/013669 A1 16/01/2020

(30) 10-2018-0081845 13/07/2018 KR

(45) 25/09/2023 426

(43) 25/09/2020 390A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

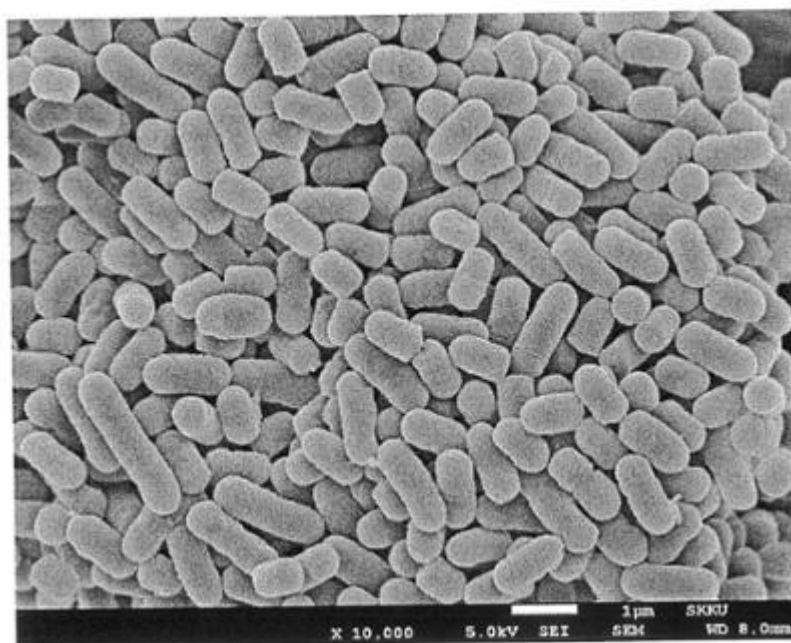
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) KIM, Min-Jeong (KR); KIM, Hee-Yeon (KR); MOON, Ho Jin (KR); WOO, Seo Hyung (KR); LEE, Kyung Min (KR); JANG, Yoon Tack (KR); KIM, Bong Joon (KR); KIM, Sung Hun (KR).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) CHỦNG LACTOBACILLUS PLANTARUM CJLP475, CHẾ PHẨM CHỨA CHỦNG NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM PROBIOTIC

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 có hoạt tính chịu axit, chịu dịch mật và tăng cường miễn dịch, chế phẩm chứa chủng này, và phương pháp điều chế chế phẩm probiotic.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 có hoạt tính chịu axit, chịu dịch mật và tăng cường miễn dịch, cụ thể hơn là đề cập đến chế phẩm, phụ gia chăn nuôi, thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và môi trường nuôi cấy chủng này, và phương pháp điều chế chế phẩm probiotic.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong ngành chăn nuôi hiện nay, vật nuôi bị chết do các bệnh truyền nhiễm gây ra bởi virus rất cao, và điều này thường dẫn đến thiệt hại kinh tế cho các trang trại. Đặc biệt, trong ngành chăn nuôi lợn, các bệnh truyền nhiễm do virus và vi trùng gây ra như bệnh hô hấp phức hợp trên lợn, hội chứng còi cọc sau cai sữa lợn con, hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn, bệnh tiêu chảy cấp trên lợn là bốn loại bệnh gây hại chủ yếu, đã gây ra thiệt hại lớn về kinh tế.

Trong số các bệnh nêu trên, bệnh tiêu chảy cấp trên lợn là bệnh đường tiêu hóa trên lợn gây ra bởi virus gây bệnh tiêu chảy cấp trên lợn (porcine epidemic diarrhea virus: PEDV) là chi thuộc họ virus corona. Virus sinh sản trong các nhung mao của ruột non và ruột già và gây viêm ruột cấp tính, nôn mửa, và tiêu chảy nước ở lợn thuộc mọi lứa tuổi, đặc biệt là lợn con. Cụ thể là, thiệt hại nặng chủ yếu vào mùa đông từ tháng mười một đến tháng tư, và được biến đến có tỷ lệ tử vong của lợn con trước cai sữa trong vòng 1 tuần tuổi là khoảng 50%, và trong trường hợp nghiêm trọng, tỷ lệ tử vong có thể đạt gần như 100% do mất nước trầm trọng.

Virus PED được xác nhận lần đầu tiên ở châu Âu vào năm 1971, và PEDV CV777 thuộc nhóm G1a đã được xác định và phân lập tại Bỉ năm 1976. Virus đã lan rộng khắp châu Âu trong những năm 1980, và bùng phát dịch ở các nước Đông Á bao gồm Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản và Đài Loan trong những năm 1990. Hơn nữa, PEDV thuộc nhóm G2b có độc tính cao hơn nhóm G1a, xuất hiện lần đầu ở Trung Quốc vào năm 2010. PEDV nhóm mới đã lan rộng tới Bắc Mỹ (Hoa Kỳ và Canada) và còn tới cả Đông Nam Á và châu Âu, gây ra thiệt hại nghiêm trọng. Trong năm 2013, thiệt hại ước tính

khoảng 2,2 nghìn tỷ won do mất năng suất trong công nghiệp chăn nuôi lợn ở Hoa Kỳ. Ở Hàn Quốc, đã có báo cáo rằng đợt bùng phát của PEDV hàng năm xảy ra ở 20% đến 40% các trang trại lợn, làm chết 6% tổng đàn lợn. Cũng có các báo cáo khác cho thấy tỷ lệ lây nhiễm bệnh qua các phương tiện giao thông ra vào các lò mổ đến khoảng 60% (Hiệp hội bác sĩ thú y cho lợn Hàn Quốc, Viện kinh tế nông thôn Hàn Quốc).

Cho đến nay, cách thức duy nhất để ngăn chặn virus PED thuộc nhóm G2b là bằng cách khử trùng kỹ lưỡng. Nhiều trang trại sử dụng phương pháp lây nhiễm nhân tạo hoặc vắc xin PEDV nhóm G1a đã có để ngăn ngừa thiệt hại gây ra bởi bệnh dịch do virus, nhưng bị giới hạn trong việc ngăn ngừa lây nhiễm PEDV nhóm G2b. Để khắc phục các vấn đề này, sự phát triển các tác nhân ngăn ngừa và điều trị virus PED (vắc xin, v.v.) và điều trị (IgY, tinh dầu, axit hữu cơ, probiotic, v.v.) được tích cực thực hiện. Đặc biệt là, phương pháp tăng cường khả năng miễn dịch sử dụng vật liệu chức năng để kích thích hệ thống miễn dịch trong cơ thể trong khi có tác dụng kháng virus đã được nghiên cứu gần đây.

Miễn dịch thường được chia thành miễn dịch tự nhiên và miễn dịch thích ứng. Miễn dịch tự nhiên là hệ thống để bảo vệ ngay lập tức sự lây nhiễm mầm bệnh từ tuyến đầu tiên, tác động trực tiếp lên những đối tượng xâm nhập (kháng nguyên) hoặc gây miễn dịch thích ứng. Miễn dịch thích ứng là hệ thống phức tạp và chính xác hơn để xác nhận và loại bỏ những đối tượng xâm nhập, hoặc hoạt động như bộ nhớ cho những đối tượng xâm nhập tương ứng, nhờ đó cung cấp các chức năng miễn dịch vĩnh viễn hơn so với miễn dịch tự nhiên. Các tế bào tua (Dendritic cell: DC), đại thực bào và tế bào tiêu diệt tự nhiên là các tế bào trình diện kháng nguyên liên quan đến miễn dịch tự nhiên, trực tiếp đảm nhiệm các chức năng miễn dịch tự nhiên và các thụ thể tiếp quản để hỗ trợ hoạt hóa các loại tế bào T khác nhau, nhờ đó tiết ra các cytokin. Miễn dịch thích ứng là hệ thống phòng thủ thứ cấp chống lại các kháng nguyên đã xâm nhập vào cơ thể, và là đáp ứng miễn dịch đặc hiệu được thực hiện bởi các tế bào lympho B và tế bào lympho T. Các đáp ứng miễn dịch được kiểm soát bởi các tế bào T kích hoạt kháng nguyên bao gồm đáp ứng tế bào T độc tính và đáp ứng tế bào T hỗ trợ. Các tế bào tua, đại thực bào và tế bào tiêu diệt tự nhiên liên quan đến khả năng miễn dịch tự nhiên cũng nhận ra các chất xâm nhập từ bên ngoài và tiết ra các loại cytokin khác nhau như IL-12 và IL-4 để tạo ra đáp ứng thay đổi thích hợp khả năng miễn dịch của động vật chủ, và do đó có thể cung cấp cơ chế bảo vệ miễn dịch theo hướng phù hợp. Các tế bào T CD4 non hoạt động

như các gốc của các tế bào T được phân biệt bởi các cytokin chính. Ví dụ, nếu IL-12 (interleukin-12) có nồng độ cao, các tế bào T CD4 thúc đẩy quá trình biệt hóa của các tế bào Th1 (T hỗ trợ 1), từ đó tạo ra đáp ứng CTL (tế bào lympho T độc tính) để tiêu diệt các mầm bệnh nội bào, trong khi, nếu IL-4 (interleukin-4) có nồng độ cao, chúng sẽ gây ra đáp ứng để tiêu diệt mầm bệnh ngoại bào đặc hiệu (bài tiết kháng thể của tế bào B). Ngoài ra, các tế bào miễn dịch được liệt kê bên trên đáp ứng theo cách thích hợp với những đối tượng xâm nhập đã đi vào cơ thể thông qua quá trình phức tạp và tinh vi, bằng cách tiết ra TGF-beta (biến đổi yếu tố tăng trưởng beta) và IL-10 để ngăn chặn các đáp ứng miễn dịch quá mức như phản ứng viêm, tiết ra TGF-beta để ức chế đáp ứng miễn dịch quá mức và do đó kích hoạt các tế bào T kiểm soát, kích thích sản xuất kháng thể bằng cách biến đổi tế bào B thành tế bào plasma để đáp ứng với việc tiết TGF-beta và IL-6 (interleukin-6), hoặc gây ra đáp ứng miễn dịch (Th17) để loại bỏ khả năng tự miễn dịch lỗi và mầm bệnh ngoại bào. Tuy nhiên, các đáp ứng miễn dịch như vậy đôi khi đòi hỏi chất tăng cường miễn dịch bổ sung và thích hợp do phản ứng miễn dịch mất cân bằng hoặc kém.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã hoàn thành sáng chế bằng cách phân lập và xác định vi sinh vật mới có khả năng kích hoạt hệ thống miễn dịch trong khi thể hiện hoạt tính ức chế chống lại virus nói trên và xác nhận hoạt tính của nó.

Mục đích của sáng chế là cung cấp chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó hoặc dạng sấy khô của nó.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất thức ăn chăn nuôi hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó hoặc dạng sấy khô của nó.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất thực phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó hoặc dạng sấy khô của nó.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất mỹ phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó hoặc dạng sấy khô của nó.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó hoặc dạng sấy khô của nó.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 theo sáng chế có khả năng chịu axit và chịu dịch mật và do đó có thể được cung cấp như probiotic. Chủng kích hoạt các tế bào miễn dịch trong cơ thể và do đó điều chỉnh các chức năng miễn dịch, và đặc biệt thể hiện hoạt tính ức chế rất tốt chống lại nhiễm virus gây bệnh tiêu chảy cấp trên lợn (PEDV). Ngoài ra, khi chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 của sáng chế được sử dụng bằng đường uống cho vật nuôi, nó thể hiện tác dụng điều hòa miễn dịch. Theo đó, sáng chế có thể cung cấp chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 mới có hoạt tính kháng virus chống lại virus PED và hoạt tính tăng cường miễn dịch, do đó, chủng này có thể được sử dụng một cách hiệu quả như thành phần thức ăn chăn nuôi, thành phần thực phẩm, thành phần mỹ phẩm hoặc thành phần dược phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện hình ảnh quan sát dưới kính hiển vi điện tử của chủng CJLP475;

Fig.2 thể hiện đĩa thạch máu xác nhận không có hoạt tính tan máu của chủng;

Fig.3 là đồ thị xác nhận không có độc tính tế bào của chủng;

Fig.4 là đồ thị thể hiện các kết quả đo sự bài tiết IL-12 sau khi nuôi cấy các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), tế bào đơn nhân lách (Spln), và tế bào lympho trong các hạch màng treo ruột (mLN) của lợn;

Fig.5 là đồ thị thể hiện các kết quả đo sự bài tiết IL-10 sau khi nuôi cấy các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), tế bào đơn nhân lách (Spln), và tế bào lympho trong các hạch màng treo ruột (mLN) của lợn;

Fig.6 là hình ảnh dưới kính hiển vi minh họa hoạt tính ức chế chống lại virus PED bởi chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475;

Fig.7 là đồ thị thể hiện các kết quả đo chất bài tiết IL-10 và TGF-beta sau khi sử dụng qua đường miệng chủng CJLP475, sau đó phân lập tế bào đơn nhân lách ở lợn cai sữa; và

Fig.8 là các đồ thị phân tích tổng số lượng WBC, tế bào lympho, và bạch cầu đơn nhân trong huyết thanh của lợn cai sữa sau khi sử dụng qua đường miệng chủng CJLP485.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ ở đây có thể được áp dụng cho các phần mô tả và phương án khác, tương ứng. Tức là, tất cả các sự kết hợp các yếu tố khác nhau được bộc lộ trong phần mô tả nằm trong phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể được bộc lộ dưới đây.

Một khía cạnh của sáng chế là đạt được các mục đích nêu trên, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P.

Chủng là chủng có đặc tính sinh hóa của mẫu lên men đường được thể hiện trong bảng 3 được biểu diễn bằng trình tự axit nucleotit 16s rADN SEQ ID NO: 1, và là kết quả phân tích 16S rADN, không có chủng tương tự nào được phát hiện, và do đó nó là chủng mới được xác định bởi các tác giả sáng chế.

Chủng có hoạt tính chịu axit, chịu dịch mật và tăng cường miễn dịch.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “*Lactobacillus*” là vi sinh vật *bacillus* gram dương ưa khí hoặc kỵ khí không bắt buộc được phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Các vi sinh vật thuộc chi *Lactobacillus* bao gồm *Lactobacillus plantarum*, v.v.. Sáng chế đề xuất chủng mới thuộc *Lactobacillus plantarum* đã được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P, và được định danh là “*Lactobacillus plantarum* CJLP475”. Điều này tương ứng với chủng probiotic, vô hại đối với cơ thể con người và có thể được sử dụng mà không có tác dụng phụ.

Theo sáng chế, thuật ngữ “probiotic” tham chiếu đến vi khuẩn sống xâm nhập vào cơ thể và mang lại lợi ích tốt cho sức khỏe. Hầu hết các probiotic đã được biết đến cho đến nay được tiêu thụ thông qua các sản phẩm sữa lên men được làm từ vi khuẩn axit lactic như *Lactobacillus*. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, các probiotic có sẵn trên

thị trường dưới dạng sữa lên men, hạt, bột và các loại tương tự, có chứa một số vi khuẩn như *Bifidobacterium* và *Enterococcus* ngoài *Lactobacillus*. *Lactobacillus plantarum* CJLP475 của sáng chế cũng có thể được sử dụng dưới dạng sữa lên men, hạt, bột và tương tự, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Theo sáng chế, thuật ngữ “chịu axit” đề cập đến hoạt tính chịu được tính axit cao. Nếu các probiotic có hoạt tính chịu axit, chúng có thể được ngăn chặn khỏi bị thoái biến hoặc hư hỏng ngay cả khi tiếp xúc với các điều kiện axit mạnh trong dạ dày, bằng cách tiêu thụ thông qua các đường dùng khác nhau bao gồm sử dụng qua đường uống.

Theo sáng chế, thuật ngữ “chịu dịch mật” đề cập đến sự đề kháng với các enzym tiêu hóa trong mật. Dịch mật được tạo ra từ gan và được lưu trữ trong túi mật, và là chất lỏng màu nâu xanh có tính kiềm yếu giúp tiêu hóa chất béo trong tá tràng của ruột non. Nó nhũ hóa chất béo để giúp tiêu hóa và hấp thụ. Dịch mật là một trong những nguyên nhân chính làm giảm tác dụng của việc sử dụng probiotic khi chúng tác động lên probiotic được ăn vào qua nhiều con đường khác nhau bao gồm cả sử dụng qua đường uống và tương tự.

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 theo sáng chế có khả năng chịu axit và chịu dịch mật cùng lúc, và do đó có thể được sử dụng như probiotic rất tốt.

Cụ thể là, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 thu được bằng cách phân lập nó từ nước tương (tức là, thực phẩm lên men truyền thống). Các đặc điểm hình thái của chủng theo sáng chế là chủng là *bacillus* gram dương và được biểu diễn bằng trình tự nucleotit 16s rADN SEQ ID NO: 1. Trình tự nucleotit được phân tích và được tìm thấy sự tương đồng khoảng 99% với *Lactobacillus plantarum*. Theo đó, các tác giả sáng chế đã ký gửi *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được cô lập mới tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 11 tháng 7 năm 2018, theo Hiệp ước Budapest với số đăng ký KCCM12287P.

Để duy trì ổn định chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 của sáng chế trong một thời gian dài, chủng có thể được lưu trữ bằng cách hòa tan các tế bào trong dung dịch lưu trữ được điều chế bằng cách trộn lượng glyxerol nhất định trong nước ở -70°C, hoặc có thể được làm đông khô bằng cách ngưng các tế bào trong sữa tách béo 10% đã tiệt trùng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây, và có thể được lưu trữ trong một thời gian dài bằng nhiều phương pháp đã biết khác nhau.

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 của sáng chế có thể không biểu hiện hoạt tính tán huyết chống lại các tế bào hồng cầu. Tán huyết đề cập đến sự phá hủy các tế bào hồng cầu và giải phóng huyết sắc tố ra khu vực xung quanh, và là tác động mà các tế bào hồng cầu bị ly giải bởi các enzym được sản xuất từ vi khuẩn có hại trong cơ thể. Do đó, chủng này được công nhận là vi sinh vật an toàn mà không gây tán huyết trong mạch máu ngay cả khi CJLP485 được sử dụng trong cơ thể.

Ngoài ra, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 theo sáng chế có thể có tính kháng yếu hoặc không có tính kháng các loại kháng sinh. Các loại kháng sinh cụ thể bao gồm nhưng không giới hạn ở ampicillin, clindamycin, gentamycin, kanamycin, erythromycin, ampicillin/sulbactam, chloramphenicol hoặc streptomycin. Theo đó, ngay cả khi CJLP485 được sử dụng trong dược phẩm, thực phẩm chức năng, các phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc loại tương tự, nó không có tính kháng kháng sinh, và do đó, khả năng gây ra tác dụng dược lý có liên quan hoặc các vấn đề môi trường là thấp.

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 có khả năng kích hoạt các tế bào miễn dịch để tăng tiết các cytokin, hoặc có thể được sử dụng trong cơ thể để thúc đẩy khả năng miễn dịch.

Theo sáng chế, thuật ngữ “các tế bào miễn dịch” tham chiếu đến toàn bộ các tế bào đóng vai trò trong khả năng miễn dịch trong cơ thể, và có thể được chia thành các tế bào T và các tế bào B. Các tế bào miễn dịch có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở các tế bào Th1 hoặc Th2. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 của sáng chế có thể có hoạt tính để kích thích các tế bào miễn dịch và do đó tăng tiết các cytokin như IL-12, IL-10 hoặc TGF-beta.

Trong các bệnh do virus thường có tỷ lệ tử vong cao, hoại tử tế bào hoặc mô do virus có thể dẫn đến lây nhiễm thứ cấp và nhiễm trùng máu do vi khuẩn khác gây ra, bệnh viêm do phản ứng miễn dịch kích hoạt quá mức hoặc giảm ngon miệng và mất nước. Do đó, khi hiệu quả kháng virus (liên quan đến Th1, Th2) ức chế nhiễm virus, và đáp ứng miễn dịch (kháng viêm Th2) điều chỉnh lây nhiễm thứ cấp và phản ứng viêm quá mức, đồng thời có thể đạt được hiệu quả tăng cường, ngăn ngừa hiệu quả và hiệu quả điều trị cho các bệnh do virus. Như vậy, chủng đồng thời tăng cường Th1 và Th2 liên quan đến việc cung cấp hiệu quả tăng cường miễn dịch thông qua probiotic chưa được biết đến lĩnh vực kỹ thuật, và chủng mới được phát hiện mới bởi các tác giả sáng

chế. Ngoài ra, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 của sáng chế có khả năng điều hòa miễn dịch để điều chỉnh sự mất cân bằng Th1/Th2.

Theo sáng chế, thuật ngữ “cytokin” tham chiếu đến glycoprotein được sử dụng như chất tín hiệu để kiểm soát và kích thích hệ thống phòng vệ cơ thể, và có thể là, ví dụ, IL-12, IL-10 hoặc TGF-beta, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Chúng có thể có tác dụng kích hoạt miễn dịch khi sử dụng cho đối tượng.

Theo sáng chế, thuật ngữ “đối tượng” có thể tham chiếu đến tất cả các loài động vật bao gồm cả con người trong đó khả năng miễn dịch bị suy yếu hoặc có khả năng bị suy yếu. Ví dụ, đối tượng có thể bao gồm động vật ngoại trừ con người hoặc bao gồm cả con người. Động vật có thể bao gồm không chỉ con người, mà còn tất cả các động vật cần có hiệu quả như mô tả nêu trên được bộc lộ, và cụ thể có thể là động vật có vú như bò, ngựa, cừu, lợn, dê, lạc đà, linh dương, chó, mèo và động vật tương tự, hoặc động vật khác có thể là gia súc hoặc vật nuôi.

Phương pháp sử dụng trên không có giới hạn cụ thể nào mà có thể được sử dụng thông qua các đường khác nhau bao gồm cả đường uống hoặc đường tiêm miễn là nó có thể đến được các mô đích. Ví dụ về phương pháp sử dụng có thể là sử dụng qua đường miệng.

Chúng có thể có hoạt tính kháng virus chống lại virus gây bệnh tiêu chảy cấp trên lợn (PEDV).

Theo sáng chế, thuật ngữ “kháng virus” đề cập đến đặc tính ức chế lây nhiễm virus. Probiotic không thể tự vô hiệu hóa virus, nhưng có thể làm tăng khả năng miễn dịch của đối tượng bị nhiễm virus bằng hoạt động miễn dịch, nhờ đó cho phép chống lại nhiễm virus.

Virus gây bệnh tiêu chảy cấp trên lợn là loại virus corona lây nhiễm vào các tế bào niêm mạc ruột non của lợn, gây ra bệnh tiêu chảy do lợn mà dẫn đến tiêu chảy và mất nước nghiêm trọng. Virus này có thể bao gồm bất kỳ virus nào có sự lây nhiễm có thể bị ức chế bởi chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 của sáng chế, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đây.

Khi chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó, hoặc dạng sấy khô của nó được sử dụng cho

đối tượng, hoạt động và lây nhiễm của virus PED có thể bị ức chế đáng kể. Theo đó, chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó, hoặc dạng sấy khô của nó có thể được sử dụng như chế phẩm kháng virus chống lại virus PED, hoặc được phẩm, chế phẩm thực phẩm chức năng, chế phẩm thuốc, hoặc chế phẩm thức ăn chăn nuôi để ngăn ngừa hoặc cải thiện bệnh tiêu chảy ở lợn.

Theo khía cạnh khác của sáng chế là cung cấp chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó, hoặc dạng sấy khô của nó. Thông tin chi tiết về chế phẩm có thể được tham chiếu đến phần mô tả bên trên.

Chủng mới được phân lập của sáng chế có thể được nuôi cấy bằng phương pháp thông thường để nuôi cấy chủng *Lactobacillus*. Đối với môi trường nuôi cấy, môi trường tự nhiên hoặc môi trường nhân tạo đều có thể được sử dụng. Đối với nguồn cacbon của môi trường, ví dụ, glucoza, sucroza, dextrin, glyxerol, tinh bột và loại tương tự có thể được sử dụng. Đối với nguồn nitơ, pepton, chiết xuất thịt, chiết xuất nấm men, men khô, đậu tương, muối amoni, nitrat và các hợp chất chứa nitơ hữu cơ hoặc vô cơ khác có thể được sử dụng, nhưng sáng chế không giới hạn ở các nguồn này. Đối với các muối vô cơ có trong môi trường nuôi cấy, magie, mangan, canxi, sắt, kali và loại tương tự có thể được sử dụng, nhưng sáng chế không giới hạn ở các nguồn này. Axit amin, vitamin, axit nucleic và các hợp chất liên quan có thể được bổ sung vào môi trường ngoài nguồn cacbon, nguồn nitơ và các thành phần của muối vô cơ. Chủng mới được phân lập của sáng chế có thể được nuôi cấy trong 12 giờ đến 4 ngày trong phạm vi nhiệt độ từ 20°C đến 40°C.

Cụ thể, canh nuôi cấy của chủng mới phân lập có thể là môi trường nuôi cấy chứa các tế bào, và cũng có thể là các tế bào mà từ dịch nổi nuôi cấy được loại bỏ, hoặc cô đặc của chúng. Thành phần của canh nuôi cấy có thể không chỉ chứa các thành phần cần thiết cho nuôi cấy *Lactobacillus* thông thường, mà còn chứa cả các thành phần có tác dụng hiệp đồng cho sự phát triển của *Lactobacillus*, và các thành phần của chúng có thể được lựa chọn bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Ngoài ra, chủng có thể ở trạng thái lỏng hoặc trạng thái sấy khô, và phương pháp sấy khô có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở sấy khô bằng khí, sấy khô tự nhiên, sấy

phun và sấy đông khô.

Trong chế phẩm, nồng độ của *Lactobacillus plantarum* CJLP475 có thể là nhưng không giới hạn ở 10^3 CFU/mL đến 10^{10} CFU/mL, 10^3 CFU/mL đến 10^9 CFU/mL, 10^3 CFU/mL đến 10^8 CFU/mL, 10^3 CFU/mL đến 10^7 CFU/mL, 10^3 CFU/mL đến 10^6 CFU/mL, 10^3 CFU/mL đến 10^5 CFU/mL, 10^3 CFU/mL đến 10^4 CFU/mL, 10^4 CFU/mL đến 10^{10} CFU/mL, 10^5 CFU/mL đến 10^{10} CFU/mL, 10^6 CFU/mL đến 10^{10} CFU/mL, 10^7 CFU/mL đến 10^{10} CFU/mL, 10^8 CFU/mL đến 10^{10} CFU/mL, 10^9 CFU/mL đến 10^{10} CFU/mL, 10^4 CFU/mL đến 10^9 CFU/mL, 10^5 CFU/mL đến 10^8 CFU/mL, hoặc 10^6 CFU/mL đến 10^7 CFU/mL.

Chế phẩm có thể còn bao gồm chất bảo quản lạnh hoặc tá dược. Chất bảo quản hoặc tá dược có thể là chất xuất hiện không tự nhiên hoặc chất xuất hiện tự nhiên, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Trong phương án khác, chất bảo quản lạnh hoặc tá dược có thể là chất không tiếp xúc tự nhiên với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, hoặc chất không tự nhiên chứa đồng thời với chủng này, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Trong phương án khác nữa, chế phẩm có thể còn bao gồm ít nhất chất bảo quản lạnh được chọn từ nhóm bao gồm glyxerol, trehalos, maltodextrin, sữa bột tách kem và tinh bột; và/hoặc ít nhất một tá dược được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, đextrin và sữa tách béo. Chất bảo quản lạnh của sáng chế có thể có hàm lượng 0,01% đến 20% trọng lượng và 0,01% đến 10% trọng lượng dựa trên tổng trọng lượng của chế phẩm. Cụ thể, glyxerol có thể có hàm lượng 5% đến 20% trọng lượng, trehaloza có thể có hàm lượng 2% đến 10% trọng lượng, maltodextrin có thể có hàm lượng 2% đến 10% trọng lượng, sữa bột tách kem có thể có hàm lượng 0,5% đến 2% trọng lượng, và tinh bột có thể có hàm lượng 0,1% đến 1% trọng lượng chế phẩm. Ngoài ra, tá dược có thể có hàm lượng 75% đến 95% trọng lượng hoặc 85% đến 95% trọng lượng dựa trên tổng trọng lượng của chế phẩm.

Hơn nữa, phương pháp điều chế chế phẩm chứa *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó, hoặc sản phẩm sấy khô của chúng có thể bao gồm bổ sung chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó, hoặc sản phẩm sấy khô của chúng với chất phụ gia. Chất phụ gia có thể là chất bảo quản lạnh hoặc tá dược nêu trên.

Chế phẩm có thể được sử dụng để tăng cường miễn dịch.

Chế phẩm có thể được sử dụng để cung cấp hoạt tính kháng virus.

Chế phẩm có thể được sử dụng để làm thực phẩm, thực phẩm chức năng, thức ăn chăn nuôi, phụ gia thức ăn chăn nuôi, chế phẩm mỹ phẩm, hoặc chế phẩm dược phẩm.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm probiotic chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó, hoặc sản phẩm sấy khô của chúng như thành phần hoạt tính.

Các probiotic được cố định trên các vách của đường tiêu hóa trong ruột để ngăn chặn sự hình thành vi khuẩn có hại và ức chế sự tăng sinh của virus. Ngoài ra, các enzym tiêu hóa có lợi được sản xuất bởi các probiotic thúc đẩy tăng trưởng bằng cách tạo điều kiện cho việc hấp thụ và sử dụng các chất dinh dưỡng.

Phương pháp điều chế chế phẩm probiotic có thể bao gồm việc nuôi cấy chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P; và trộn các chủng được thu hồi với chất phụ gia.

Trong một phương án, chất phụ gia có thể là chất bảo quản lạnh, và phương pháp có thể còn bao gồm bước đông khô sau bước trộn.

Ở đây, vi khuẩn trong chế phẩm đông khô có thể ở trạng thái sống.

Trong phương án khác, phương pháp điều chế có thể bao gồm chuẩn bị lượng định trước chế phẩm vào trong bao gói sau bước trộn.

Ở đây, trong bước đóng gói, chế phẩm có thể được đưa vào trong bao gói sao cho hàm lượng tổng của chủng bao gồm chủng CJLP475 là 10^6 CFU/g hoặc nhiều hơn.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất thức ăn chăn nuôi hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó, hoặc sản phẩm sấy khô của chúng.

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được mô tả bên trên. Cụ thể, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 của sáng chế có thể được bổ sung cho phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc thức ăn chăn nuôi chứa phụ gia thức ăn chăn nuôi nhằm mục đích thúc đẩy tăng trưởng, giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy, và ức chế hoạt động của virus.

Theo sáng chế, thuật ngữ “phụ gia thức ăn chăn nuôi” tham chiếu đến chất bổ sung

cho thức ăn chăn nuôi nhằm mục đích cung cấp các hiệu quả khác nhau như bổ sung các chất dinh dưỡng và ngăn ngừa giảm cân, thúc đẩy tiêu hóa xenluloza trong thức ăn chăn nuôi, nâng cao chất lượng sữa, ngăn ngừa rối loạn sinh sản và nâng cao tỷ lệ mang thai, và ngăn ngừa căng thẳng nhiệt độ cao trong mùa hè. Phụ gia thức ăn chăn nuôi của sáng chế thuộc thức ăn bổ sung theo Luật kiểm soát thức ăn chăn nuôi cho cá và gia súc và có thể còn bao gồm các khoáng chất như natri hydro cacbonat, bentonit, magie oxit, các hợp chất khoáng, và các chất khoáng vi lượng bao gồm kẽm, đồng, coban, và selen, các vitamin như caroten, vitamin E, các vitamin A, D, E, axit nicotinic, và phức hợp vitamin B; các chất bảo vệ axit amin như methionin và lysin; các chất bảo vệ axit béo như canxi axit béo; và các vi khuẩn sống và các chế phẩm nấm men như probiotic (vi khuẩn axit lactic), dịch nuôi cấy nấm men, và sản phẩm lên men nấm.

Theo sáng chế, thuật ngữ “thức ăn chăn nuôi” đề cập đến thức ăn tự nhiên hoặc nhân tạo, thức ăn riêng, hoặc tương tự, hoặc thành phần của thức ăn riêng cho động vật ăn, nuốt và tiêu hóa hoặc thích hợp để cho ăn, nuốt và tiêu hóa. Thức ăn chăn nuôi bao gồm chế phẩm để ngăn ngừa và điều trị các bệnh chuyển hóa theo sáng chế như thành phần hoạt tính có thể được điều chế thành các dạng khác nhau của thức ăn chăn nuôi đã biết trong ngành chăn nuôi và có thể bao gồm thức ăn chăn nuôi đậm đặc, thức ăn thô và/hoặc thức ăn đặc biệt.

Các đối tượng được nuôi có thể bao gồm bất kỳ sinh vật có thể ăn thức ăn chăn nuôi của sáng chế, và có thể bao gồm lợn theo mục đích của sáng chế.

Hàm lượng của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 trong chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được điều chỉnh thích hợp theo loại và tuổi của đối tượng cần áp dụng, các dạng ứng dụng, hiệu quả mong muốn và tương tự. Ví dụ, chế phẩm có thể có hàm lượng 0,01% đến 20% trọng lượng, 0,01% đến 15% trọng lượng, 0,01% đến 10% trọng lượng, 0,01% đến 5% trọng lượng, 0,01% đến 1% trọng lượng, 1% đến 20% trọng lượng, 1% đến 15% trọng lượng, 1% đến 10% trọng lượng, 1% đến 5% trọng lượng, 5% đến 20% trọng lượng, 5% đến 15% trọng lượng, 5% đến 10% trọng lượng, 10% đến 20% trọng lượng, 10% đến 15% trọng lượng, hoặc 15% đến 20% trọng lượng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Để sử dụng, chế phẩm thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể còn bao gồm một hoặc nhiều axit hữu cơ như axit xitric, axit fumaric, axit adipic, axit lactic, và tương tự;

phosphat như kali phosphat, natri phosphat, poly phosphat, và tương tự; và chất chống oxy hóa tự nhiên như polyphenol, catechin, tocopherol, vitamin C, chiết xuất trà xanh, chitosan, axit tannic, và tương tự. Nếu cần thiết, các phụ gia điển hình khác như chất chống cúm, chất đệm, tác nhân kìm hãm vi khuẩn, và tương tự có thể được bổ sung. Hơn nữa, chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất liên kết, hoặc chất bôi trơn có thể được bổ sung để tạo chế phẩm thành chế phẩm có thể tiêm như dung dịch nước, huyền phù, và tương tự, viên nang, hạt, hoặc viên.

Hơn nữa, chế phẩm thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể được sử dụng cùng với chất bổ sung chất dinh dưỡng, chất tăng tăng trưởng, chất tăng hấp thụ tiêu hóa, và tác nhân phòng bệnh, ngoài ra còn có các chất phụ gia khác như axit amin, muối vô cơ, các vitamin, chất chống oxy hóa, các tác nhân chống nấm, chất chống vi trùng, và tương tự, như các thành phần phụ gia, và các thành phần chính bao gồm các thức ăn protein thực vật như lúa mì nghiền hoặc lúa mì vỡ hạt, lúa mạch, ngô, và tương tự, các thức ăn protein động vật như bột huyết, bột thịt, bột cá, và tương tự, mỡ động vật và mỡ thực vật.

Khi chế phẩm thức ăn chăn nuôi của sáng chế được sử dụng như phụ gia thức ăn chăn nuôi, chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể được bổ sung do nó được hoặc sử dụng cùng với các chế phẩm khác, và có thể được sử dụng thích hợp theo phương pháp thông thường. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể được điều chế ở dạng sử dụng giải phóng ngay lập tức hoặc công thức giải phóng lâu dài liên tục, kết hợp với chất mang được dụng không độc. Chất mang có thể là chất xuất hiện không tự nhiên hoặc chất xuất hiện tự nhiên, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Trong phương án khác, chất mang có thể là chất không tiếp xúc tự nhiên với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, hoặc chất mà không tự nhiên chứa đồng thời với chủng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Chất mang ăn được có thể là tinh bột ngô, lactoza, sucroza, hoặc propylen glycol. Chất mang rắn có thể sử dụng ở dạng viên, bột, viên ngậm, và tương tự, và chất mang dạng lỏng có thể sử dụng ở dạng sirô, huyền phù lỏng, nhũ tương, dung dịch, và tương tự. Ngoài ra, tác nhân để uống có thể bao gồm chất bảo quản, chất bôi trơn, chất tăng hòa tan, hoặc chất ổn định, và có thể còn bao gồm các tác nhân khác để cải thiện các bệnh viêm và các chất hữu ích để ngăn ngừa virus.

Chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được trộn với thức ăn chăn nuôi với hàm lượng khoảng 10 g đến 500 g, cụ thể 10 g đến 100 g trên 1 kg, trên cơ sở trọng lượng khô của thức ăn chăn nuôi. Sau khi trộn lẫn hoàn toàn, chế phẩm thức ăn chăn

nuôi có thể được cung cấp dưới dạng nghiền, hoặc có thể còn trải qua quá trình ép viên, kéo dài, hoặc ép đùn, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất chế phẩm thực phẩm hoặc thực phẩm chức năng chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó, hoặc sản phẩm sấy khô của chúng.

Cụ thể, chế phẩm của sáng chế có thể được bổ sung cho chế phẩm thực phẩm cho mục đích thúc đẩy tăng trưởng, giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy, tăng miễn dịch, và ức chế hoạt động của virus. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được mô tả bên trên. Chế phẩm thực phẩm có thể bao gồm chất mang chấp nhận dinh dưỡng. Chất mang có thể là chất xuất hiện không tự nhiên hoặc chất xuất hiện tự nhiên, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Trong phương án khác, chất mang có thể là chất không tiếp xúc tự nhiên với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, hoặc chất không tự nhiên chứa đồng thời chủng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Chế phẩm thực phẩm của sáng chế bao gồm tất cả các dạng của thực phẩm chức năng, chất bổ sung dinh dưỡng, thực phẩm sức khỏe và phụ gia thực phẩm, và các loại chế phẩm thực phẩm có thể được điều chế ở các dạng khác nhau theo phương pháp thông thường.

Khi chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được sử dụng như phụ gia thực phẩm, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 có thể được bổ sung một mình hoặc được sử dụng ở dạng kết hợp với các thực phẩm khác hoặc thành phần thực phẩm, và có thể sử dụng thích hợp theo phương pháp thông thường. Hàm lượng của các thành phần hoạt chất được trộn có thể được xác định thích hợp tùy thuộc vào mục đích sử dụng (phòng ngừa, tăng sức khỏe, hoặc điều trị). Thông thường, tại thời điểm điều chế thực phẩm hoặc đồ uống, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được bổ sung với lượng 0,0001% đến 1% trọng lượng, tốt hơn là 0,0001% đến 0,1% trọng lượng dựa trên thành phần vật liệu thô chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475. Tuy nhiên, trong trường hợp sử dụng trong thời gian dài cho mục đích sức khỏe và vệ sinh hoặc cho mục đích kiểm soát sức khỏe, hàm lượng có thể ít hơn phạm vi nêu trên.

Sáng chế không giới hạn cụ thể ở loại thực phẩm nào. Các ví dụ về thực phẩm có thể được bổ sung chế phẩm bao gồm thịt, xúc xích, bánh mì, sôcôla, kẹo, đồ ăn nhẹ, bánh kẹo, pizza, mì ăn liền, các loại mì khác, kẹo cao su, các sản phẩm từ sữa bao gồm

kem, các loại súp, nước giải khát, trà, đồ uống, đồ uống có cồn, phức hợp vitamin, và tương tự, và tất cả các loại thực phẩm chức năng cho sức khỏe theo nghĩa thông thường.

Chế phẩm đồ uống cho sức khỏe của sáng chế có thể còn chứa các thành phần bổ sung, các chất tạo hương vị khác nhau hoặc cacbohyđrat tự nhiên, như trong đồ uống thông thường. Các cacbohyđrat tự nhiên có thể bao gồm các monosacarit như glucoza, fructoza, và tương tự; các đisacarit như maltoza, sucroza và các loại tương tự; polysacarit như dextrin, xyclodextrin, và tương tự; và rượu đường như xylitol, sorbitol, erythritol, và tương tự. Các chất tạo ngọt tự nhiên như thaumatin, chiết xuất stevia, và tương tự; và các chất tạo ngọt tổng hợp như saccharin, aspartam, và tương tự có thể được sử dụng làm chất tạo ngọt. Tỷ lệ của các thành phần bổ sung có thể nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,04 phần trọng lượng, cụ thể là 0,02 đến 0,03 phần trọng lượng dựa trên 100 phần trọng lượng của chế phẩm của sáng chế.

Ngoài các thành phần nêu trên, chế phẩm của sáng chế có thể còn chứa các chất bổ sung dinh dưỡng khác, các vitamin, các chất điện giải, chất tạo hương, chất tạo màu, axit pectic và muối của chúng, axit alginic và muối của chúng, axit hữu cơ, chất làm đặc keo bảo vệ, chất điều chỉnh độ pH, chất ổn định, chất bảo quản, glycerin, rượu, chất có ga được sử dụng trong đồ uống có ga và tương tự. Tỷ lệ của các chất phụ gia không quan trọng, nhưng thường được chọn trong khoảng từ 0,01 đến 0,1 phần trọng lượng, dựa trên 100 phần trọng lượng của chế phẩm của sáng chế. Hơn nữa, chế phẩm của sáng chế có thể bao gồm thịt quả để điều chế nước ép trái cây tự nhiên, đồ uống trái cây hoặc đồ uống thực vật. Tỷ lệ thịt quả không quan trọng, nhưng thường được chọn trong khoảng từ 0,01 đến 10 phần trọng lượng, dựa trên 100 phần trọng lượng của chế phẩm của sáng chế. Các thành phần có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất mỹ phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó, hoặc sản phẩm sấy khô của chúng

Cụ thể, chế phẩm của sáng chế có tác dụng kháng viêm và tác dụng ức chế-hoạt tính kháng virus thông qua kích thích miễn dịch, và do đó có thể được sử dụng như mỹ phẩm. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được mô tả bên trên.

Khi chế phẩm theo sáng chế được sử dụng như mỹ phẩm, chế phẩm có thể được điều chế thành các loại mỹ phẩm khác nhau theo công thức thông thường đã biết trong

lĩnh vực mỹ phẩm. Sau khi điều chế thành từng chế phẩm công thức, có thể được điều chế bằng cách bổ sung chất mang hoặc tá dược được chấp nhận và cần thiết trong sản xuất các mỹ phẩm theo từng chế phẩm công thức. Chất mang có thể là chất xuất hiện không tự nhiên hoặc chất xuất hiện tự nhiên, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Trong phương án khác, chất mang có thể là chất không tiếp xúc tự nhiên với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, hoặc chất không tự nhiên chứa đồng thời chủng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất được phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó, hoặc sản phẩm sấy khô của chúng.

Khi chế phẩm theo sáng chế được sử dụng như dược phẩm, chế phẩm có thể được điều chế thành các công thức được thông thường đã biết trong lĩnh vực dược phẩm. Dược phẩm có thể được điều chế đặc biệt thành các chế phẩm công thức dùng qua đường miệng như chất lỏng, huyền phù, bột, hạt, viên nén, viên nang, thuốc viên hoặc chiết xuất. Sau khi điều chế thành từng chế phẩm công thức, có thể được điều chế bằng cách bổ sung chất mang hoặc tá dược được chấp nhận và cần thiết trong sản xuất các dược phẩm cho từng chế phẩm công thức. Chất mang có thể là chất xuất hiện không tự nhiên hoặc chất xuất hiện tự nhiên, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Trong phương án khác, chất mang có thể là chất không tiếp xúc tự nhiên với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, hoặc chất không tự nhiên chứa đồng thời chủng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Thông thường, khi chế phẩm được điều chế thành chế phẩm công thức dùng qua đường miệng, ít nhất một chất mang được chọn từ nhóm từ chất pha loãng, chất bôi trơn, chất kết dính, chất làm tan, chất tạo ngọt, chất ổn định và chất bảo quản có thể được sử dụng, và ít nhất một phụ gia được chọn từ chất tạo hương vị, vitamin và chất chống oxy hóa có thể được sử dụng. Bất kỳ tá dược hoặc chất phụ gia được dùng có thể được sử dụng. Cụ thể, có thể sử dụng lactoza, tinh bột ngô, dầu đậu tương, xenluloza vi tinh thể, hoặc mannitol làm chất pha loãng; magie stearat hoặc talc làm chất bôi trơn; và polyvinyl pyrrolidon hoặc hydroxypropyl xenluloza làm chất kết dính. Ngoài ra, có thể sử dụng canxi cacboxymetylxenluloza, natri tinh bột glycolat, kali polacrilin, hoặc crospovidon làm chất phân rã; đường trắng, fructoza, sorbitol, hoặc aspartam làm chất tạo ngọt; natri cacboxymetylxenluloza, β -cyclodextrin, sáp trắng, hoặc gôm xanthan làm chất ổn định; và methyl paraoxybenzoat, propyl paraoxybenzoat,

hoặc kali sorbat làm chất bảo quản.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất bước sử dụng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 hoặc chế phẩm của sáng chế cho đối tượng. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, chế phẩm, và đối tượng được mô tả bên trên.

Liều lượng sử dụng có thể là nhưng không giới hạn ở 10^6 CFU/ngày hoặc nhiều hơn, 10^7 CFU/ngày hoặc nhiều hơn, 10^8 CFU/ngày hoặc nhiều hơn, 10^9 CFU/ngày hoặc nhiều hơn, 10^{10} CFU/ngày hoặc nhiều hơn hoặc 10^{11} CFU/ngày hoặc nhiều hơn dựa trên chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất phương pháp tăng cường miễn dịch cho đối tượng bao gồm sử dụng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 hoặc chế phẩm của sáng chế cho đối tượng cần dùng. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, chế phẩm, và đối tượng được mô tả bên trên.

Như sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “sử dụng” nghĩa là đưa chủng hoặc chế phẩm của sáng chế cho đối tượng bằng bất kỳ phương pháp phù hợp nào, và đường sử dụng có thể bao gồm các đường khác nhau như sử dụng qua đường miệng hoặc tiêm miễn là có thể đến được mô mục tiêu.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm virút cho đối tượng, bao gồm sử dụng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 hoặc chế phẩm của sáng chế cho đối tượng cần dùng. Chủng *Lactobacillus plantarum* được mô tả bên trên.

Theo sáng chế, thuật ngữ “ngăn ngừa” hoặc “việc ngăn ngừa” nghĩa là tất cả các tác động nhằm ức chế, chặn, hoặc làm chậm bệnh nhiễm virut bằng cách sử dụng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 hoặc chế phẩm của sáng chế. Ngoài ra, theo sáng chế, thuật ngữ “điều trị” hoặc “việc điều trị” nghĩa là tất cả các tác động nhằm cải thiện hoặc thay đổi theo hướng tích cực triệu chứng của bệnh nhiễm virut bằng cách sử dụng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 hoặc chế phẩm của sáng chế.

Các ví dụ của sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Phân lập và lựa chọn các chủng

Ví dụ 1-1: Thu mẫu và phân lập chủng

Lactobacillus plantarum CJLP475, chủng của sáng chế là chủng mới *Lactobacillus plantarum* được phân lập và xác định từ nước tương (tức là, thực phẩm lên men truyền thống). Các mẫu đã được thu thập lần lượt được pha loãng, cấy trải trên môi trường MRS đặc và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Các chủng được phân lập từ mỗi mẫu được phân lập hoàn toàn bằng cách chuyển chúng sang môi trường mới, và các chủng đã được phân lập được lưu giữ trong môi trường dinh dưỡng được bổ sung với 20% glyxerol ở nhiệt độ -70°C hoặc thấp hơn. Các chủng có hoạt tính kháng virus tốt được lựa chọn thông qua các ví dụ dưới đây.

Ví dụ 1-2: Đánh giá hoạt tính chịu axit và chịu dịch mật của các chủng

Để lựa chọn các chủng có thể được sử dụng như các probiotic, hoạt tính chịu axit và chịu dịch mật của các chủng thu được sẽ được đánh giá.

Môi trường dịch vị nhân tạo được điều chế để đánh giá tính chịu axit. Cụ thể hơn là, môi trường dịch vị nhân tạo được điều chế bằng cách bổ sung pepsin vào môi trường MRS lỏng để điều chỉnh độ pH đến 2,5, sau đó khử trùng.

Các chủng trên ví dụ 1-1 được nuôi cấy tĩnh trong môi trường MRS lỏng ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ sau nuôi cấy thứ cấp lần hai. 1% các chủng đã ủ trước được cấy vào môi trường dịch vị nhân tạo và được nuôi cấy tĩnh ở 37°C, và canh nuôi cấy được lấy mẫu lúc 0 giờ và 3 giờ. Canh nuôi cấy đã được lấy mẫu lần lượt được pha loãng và được cấy trải trên môi trường MRS rắn, và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ để đo số lượng tế bào sống.

Môi trường dịch mật nhân tạo được điều chế để đánh giá tính chịu dịch mật. Cụ thể hơn là, môi trường dịch mật nhân tạo được điều chế bằng cách bổ sung 0,5% mật bò (dịch mật bò) vào môi trường MRS lỏng, sau đó khử trùng.

Các chủng trong ví dụ 1-1 được nuôi cấy tĩnh trong môi trường MRS lỏng ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ sau nuôi cấy thứ cấp lần hai. 1% các chủng đã ủ trước được cấy vào môi trường dịch mật nhân tạo và được nuôi cấy tĩnh ở nhiệt độ 37°C, và canh nuôi cấy được lấy mẫu lúc 0 giờ và 24 giờ. Canh nuôi cấy đã được lấy mẫu lần lượt được pha loãng và được cấy trải trên môi trường MRS rắn, và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 48

giờ để đo số lượng tế bào sống.

Thông qua các các đánh giá nêu trên, chủng có khả năng chịu axit và chịu dịch mật cao nhất được lựa chọn và được định danh là *Lactobacillus plantarum* CJLP475. Các chủng được lựa chọn được xác định là *Lactobacillus plantarum* được xác nhận bởi các ví dụ sau. Để so sánh khả năng chịu axit và chịu dịch mật của chủng CJLP475 với các chủng thông thường đã biết, tính chịu axit và chịu dịch mật của chủng mẫu *Lactobacillus plantarum* (KCCM12116) lấy từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc được đánh giá theo cách thức tương tự như phương pháp nêu trên.

Bảng 1

Đánh giá tính chịu axit (đơn vị: CFU/mL)

	0 giờ	3 giờ
<i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP475 (KCCM12287P)	$4,0 \times 10^6$	$3,25 \times 10^6$
<i>Lactobacillus plantarum</i> (KCCM12116)	$2,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$

Bảng 2

Đánh giá tính chịu dịch mật (đơn vị: CFU/mL)

	0 giờ	24 giờ
<i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP475 (KCCM12287P)	$5,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$
<i>Lactobacillus plantarum</i> (KCCM12116)	$2,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^6$

Theo các bảng 1 và 2, số lượng tế bào trong chủng mẫu *Lactobacillus plantarum* (KCCM12116) trong môi trường dịch vị nhân tạo và môi trường dịch mật nhân tạo bị giảm xuống. Kết quả là, có thể thấy rằng không phải tất cả các *Lactobacillus plantarum* thông thường đã biết có tính chịu axit và chịu dịch mật.

Ngược lại, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 có số lượng tế bào giảm sút ít hơn so với chủng mẫu *Lactobacillus plantarum* (KCCM12116) khi đánh giá tính chịu axit, và số lượng tế bào tăng hơn khi đánh giá tính chịu dịch mật. Các kết quả này chỉ ra rằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 có khả năng chịu axit và chịu dịch mật rất tốt.

Ví dụ 1-3: Nghiên cứu các đặc điểm hình thái và sinh hóa của chủng

Để xác định chủng CJLP475, các đặc điểm hình thái và sinh hóa được nghiên cứu sơ bộ. Do các đặc điểm hình thái, chủng là gram dương như kết quả của việc nhuộm

gram, và được phát hiện là *bacillus* được xác nhận bằng kính hiển vi điện tử (như thể hiện trên Fig.1). Để phân tích các đặc điểm sinh hóa, các mẫu lên men đường của chủng được phân tích bằng hệ thống API 50CHL (Biomérieux Vitek, Inc., France) (như thể hiện trên bảng 3).

Bảng 3

Phân tích các mẫu lên men đường của chủng được phân lập

Tên chủng	CJLP475	Tên chủng	CJLP475
Đôi chướng	-	Esculin	+
Glyxerol	-	Salixin	+
Erythritol	-	Cellobioza	+
D-Arabinosa	-	Maltoza	+
L-Arabinosa	+	Lactoza	+
Riboza	+	Melibioza	+
D-Xyloza	-	Saccharoza	+
L-Xyloza	-	Trehaloza	+
Adonitol	-	Inulin	-
β Metyl-xylosit	-	Melezitoza	+
Galactoza	+	D-Raffinoza	+
D-Glucoza	+	Amidon	-
D-Fructoza	+	Glycogen	-
D-Mannoza	+	Xylitol	-
L-sorboza	-	β Gentiobioza	+
Rhamnoza	+	D-Turanoza	+
Đulxitol	-	D-Lyxoza	-
Inositol	-	D-Tagatoza	-
Mannitol	+	D-Fucoza	-
Sorbitol	+	L-Fucoza	-
α Metyl-D-mannosit	+	D-Arabitol	-
α Metyl-D-glucosit	-	L-Arabitol	-
N Axetyl glucosamin	+	Gluconat	+
Amygdalin	+	2 ceto-gluconat	-
Arbutin	+	5 ceto-gluconat	-

+: Dương, -: Âm

Ví dụ 1-4: Định danh các chủng

Để xác định chính xác hơn các chủng, phương pháp hình thái học dựa trên trình tự DNA đã được thực hiện. Phân tích trình tự được thực hiện như sau: gen 16s rADN được khuếch đại sử dụng PCR premix (Bioneer, Korea) và cặp mồi thông dụng 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3', SEQ ID NO: 2) và 1492R (5' GGTACCTTGTACGACTT 3', SEQ ID NO: 3). Để khuếch đại gen, tổng thể tích của dung dịch phản ứng được điều chỉnh thành 20 μ L, và phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ 94°C trong 1 phút, tại nhiệt độ 56°C trong 1 phút, và tại nhiệt độ 72°C trong 1 phút, và chu kỳ này được lặp lại tổng số 30 lần để phân tích trình tự DNA đã khuếch đại. Trình tự nucleotit 16s rADN đã khuếch đại của chủng đã phân lập được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1.

Theo kết quả phân tích, CJLP475 được xác định là vi sinh vật có tỷ lệ tương đồng 99% với *Lactobacillus plantarum*. Do đó, chủng đã phân lập được định danh “*Lactobacillus plantarum* CJLP475”, và vi sinh vật đã được định danh mới được ký gửi tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM), cơ quan lưu chủng quốc tế theo Hiệp ước Budapest vào ngày 11 tháng 7 năm 2018, với số đăng ký KCCM12287P.

Ví dụ 2: Đánh giá chủng an toàn

Ví dụ 2-1: Xác nhận hoạt tính tán huyết của các chủng

Tan máu β (β -Hemolysis) là hiện tượng trong đó các phospholipit được cấp bởi các tế bào hồng cầu bị thủy phân bởi các enzym phospholipit được sản xuất bởi các vi khuẩn có hại, dẫn đến tán huyết của các tế bào hồng cầu. Để xác định hoạt tính tán huyết của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, các đĩa thạch máu (thạch máu cừu 5%, Hanilkomed, Korea) được sử dụng. Chủng được cấy ria vào trong các đĩa thạch máu đã được chuẩn bị và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ để xác nhận sự tán huyết.

Kết quả như được thể hiện trên Fig.2, xác nhận rằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 không thể hiện sự tán huyết. Những kết quả này cho thấy không hoạt động như vi khuẩn có hại trong cơ thể.

Ví dụ 2-2: Đánh giá tính nhạy cảm kháng sinh

Chủng CJLP475 được cấy vào môi trường MRS lỏng và được nuôi cấy tĩnh ở 37°C trong 24 giờ. Vi khuẩn được nuôi cấy này được thấm vào các tấm bông đã tiệt trùng và được cấy trải trên môi trường Mueller Hinton II rắn (Difco), và sau đó các đĩa kháng

sinh được đặt trong môi trường và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Các đĩa ampicillin, clindamycin, gentamycin, kanamycin, erythromycin, ampicillin/sulbactam, chloramphenicol, và streptomycin (Oxoid, UK) được sử dụng như các đĩa kháng sinh để xét nghiệm kháng sinh.

Kết quả xét nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, chủng CJLP475 không kháng với các kháng sinh nêu trên (như thể hiện trong bảng 4). Do đó, có thể thấy rằng ngay cả khi chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được sử dụng trong dược phẩm, thực phẩm chức năng sức khỏe, phụ gia thức ăn chăn nuôi, v.v., các vấn đề có thể phát sinh liên quan đến các vấn đề sức đề kháng và môi trường ít xảy ra, xem xét rằng chúng không có tính kháng kháng sinh.

Bảng 4

Ức chế sinh trưởng vi khuẩn theo kháng sinh

Kháng sinh	Bán kính vùng ức chế sinh trưởng tập trung quanh các kháng sinh (mm)
	CJLP475
Amp10 (Ampicillin)	7
C30 (Clindamycin)	8
CN120 (Gentamycin)	9
K30 (Kanamycin)	1,5
E15 (Erythromycin)	9
SAM20 (Ampicillin/Sulbactam)	8
S10 (Chloramphenicol)	3
DA2 (Streptomycin)	4

Ví dụ 3: Đánh giá độc tính tế bào

Để đánh giá ảnh hưởng của chúng đến sự sống của các tế bào, xét nghiệm MTS được thực hiện sử dụng (3-(4,5-đimetyl-2-yl)-5-(3-cacboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, (promega, USA) để đánh giá mức độ độc tính tế bào trên các tế bào IPEC-J2 (các tế bào biểu mô ruột lợn). Mỗi tế bào được ủ đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ và được xử lý với CJLP475 ở các nồng độ khác nhau từ 10^3 CFU/mL đến 10^8 CFU/mL trong 2 giờ. Sau 24 giờ, dung dịch MTS được bổ sung vào canh nuôi cấy tế bào, và các tế bào được ủ trong 2 giờ, và tỷ lệ tế bào sống (%) được tính toán bằng cách đo độ hấp thụ tại bước sóng 490 nm bằng đầu đọc vi đĩa.

Kết quả là, như thể hiện trên Fig.3, khi các tế bào được xử lý ở sáu nồng độ khác nhau, có thể xác nhận rằng số lượng tế bào chết (5×10^4 tế bào/lỗ) hầu như không quan sát được ở nồng độ 10^8 CFU/mL hoặc thấp hơn.

Ví dụ 4: Đánh giá hoạt tính tăng cường miễn dịch

Để xác nhận tác dụng tăng cường miễn dịch của chủng CJLP475, các tế bào IPEC-J2 được ủ trong môi trường DMEM/F-12 (Hỗn hợp dinh dưỡng F-12 của Dulbecco's Modified Eagle Medium). Ngoài ra, các tế bào lympho trong các hạch bạch huyết màng treo ruột (mLN), các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), các tế bào trong màng nhầy dịch vị đặc trưng của ruột (Peyer's patches), và tế bào đơn nhân lách (Spln) được thu thập từ lợn cai sữa 21 ngày tuổi, và các tế bào miễn dịch được lấy từ từng mô và huyết thanh bằng phương pháp sau.

Để lấy được các tế bào miễn dịch từ lá lách (Spln) và các hạch bạch huyết màng treo ruột (mLN), các mô đã cắt nhỏ được nghiền nhỏ bằng pit tông của ống tiêm và bộ lọc tế bào 70 μ m (BD Falcon), và sau đó các tế bào được rửa sạch sử dụng môi trường RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Các tế bào hồng cầu còn lại (các tế bào hồng cầu) được loại bỏ bằng cách sử dụng đệm ly giải RBC (eBioscience, USA) trước bước rửa cuối cùng. Các tế bào miễn dịch thu thập được sau bước rửa cuối cùng được nhuộm màu xanh da trời Trypan và được tính bằng máy đo huyết sắc tố được sử dụng.

Để thu được các tế bào trong màng nhầy dịch vị đặc trưng của ruột (Peyer's patches), các mô tương ứng được phân lập từ ruột non, và sau đó được cắt nhỏ và nghiền thành bột sử dụng kéo phẫu thuật. Sau đó, các tế bào được phản ứng trong môi trường RPMI-1640 (độ pH 7,2) có chứa Dnase I (Roche, Germany), Dispase II (Sigma aldrich, USA), các kháng sinh, FBS, 15 mM 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazineethanesulfonic axit (HEPES) trong 1 giờ để thu được các tế bào đơn lẻ. Tiếp theo, các tế bào miễn dịch thu được theo cách tương tự như mô tả bên trên.

Máu thu thập được trộn với PBS với tỷ lệ 1:1 và ly tâm trên Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, NJ, USA) để tách lớp kết tụ WBC (tế bào máu trắng), và các tế bào đơn nhân máu ngoại vi thu được từ lớp đã phân tách.

Để đánh giá hiệu quả tăng cường miễn dịch, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được trộn với từng loại tế bào miễn dịch với tỷ lệ 10:1, và hỗn hợp được ủ ở

nhệt độ 37°C trong tủ ủ tế bào chứa 5% CO₂ trong 20 giờ. Sau khi hoàn thành bước ủ, các tế bào được ly tâm, và hiệu quả kích hoạt miễn dịch của thể nổi nuôi cấy được đánh giá sử dụng cytokin ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Cụ thể hơn là, ELISA (R&D Systems, USA) được thực hiện cho IL-12 (interleukin-12), kích hoạt cơ chế miễn dịch liên quan đến Th1 (T helper 1) để bảo vệ chống lại các yếu tố xâm nhập bên ngoài (mầm bệnh), và IL-10 (interleukin-10), để điều chỉnh phản ứng viêm thông qua Th2 (T helper 2) và cho thấy khả năng miễn dịch thu được.

Các đồ thị thể hiện các kết quả đo cho IL-12 và IL-10 lần lượt được thể hiện trên các Fig.4 và Fig.5. Trên mỗi đồ thị, đối chứng được sử dụng như đối chứng âm không có xử lý chủng.

Kết quả như được thể hiện trên Fig.4 và Fig.5, đã xác nhận rằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 thể hiện hoạt tính tăng tiết IL-12 và IL-10 bằng cách kích thích các tế bào miễn dịch. Do đó, có thể thấy rằng chủng CJLP475 biểu hiện hiệu quả cân bằng các phản ứng miễn dịch Th1/Th2 bằng cách tăng cường đồng thời cơ chế miễn dịch Th1 và cơ chế miễn dịch Th2.

Ví dụ 5: Hiệu quả ức chế chống nhiễm virus

Để đo hiệu quả ức chế của chủng CJLP475 chống lại nhiễm virus, virus gây bệnh tiêu chảy cấp trên lợn (PEDV, SM98 hoặc chủng KPEDV9) được chuẩn bị. Cụ thể, virus đã được tăng sinh trong các tế bào Vero (CCL-81, các tế bào biểu mô thận được chiết xuất từ *Chlorocebus*), và MEM (Môi trường chủ yếu tối thiểu để cấy tế bào của Eagle, Gibco BRL, USA), 10% FBS bất hoạt (huyết thanh thai bò, v/v) và 1% (v/v) penicillin/streptomycin là môi trường để nuôi cấy các tế bào Vero. Các tế bào Vero được ủ như lớp đơn nhất, rửa hai lần bằng môi trường, và sau đó toàn bộ các dung dịch được loại bỏ. Virus được trộn ở mức 0,1 MOI (bội nhiễm) trong MEM không có FBS chứa trypsin được xử lý với 5 µg/ml TPCK (N-tosyl-L-phenylalanin clometyl keton), được xử lý với thể tích tối thiểu của các tế bào nuôi cấy đã chuẩn bị, và sau đó ủ trong tủ ủ tế bào tại nhiệt độ 37°C chứa 5% CO₂ trong 2 đến 3 ngày.

Nhiễm virus được xác định bởi sự hình thành hợp bào virus. Khi hợp bào virus được hình thành, canh nuôi cấy virus được thu trong vòng 3 đến 6 giờ, và các tế bào được loại bỏ bằng cách sử dụng máy ly tâm và lưu trữ ở -80°C. Để tính toán mức độ lây nhiễm của virus, các tế bào Vero được ủ trong đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ ở mật độ 2×10^4

tế bào/0,1mL, và các tế bào được rửa sạch với PBS. Sau đó, các tế bào được bổ sung với canh nuôi cấy, trong đó virus được pha loãng tuần tự 2 lần, và được ủ trong 24 đến 48 giờ để xác nhận nhiễm virus, và mức độ virus được tính toán bằng phương pháp Reed & Muench.

Để đo hiệu quả ức chế của chủng CJLP475 chống lại nhiễm virus, chủng CJLP475 và bốn loại tế bào miễn dịch được chiết xuất trong ví dụ 4 được phản ứng trong 20 đến 24 giờ để thu được canh nuôi cấy. Sau đó, canh nuôi cấy được xử lý độc lập trên đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ, trong đó IPEC-J2 được ủ, và được ủ trong tủ ủ tế bào tại nhiệt độ 37°C chứa 5% CO₂ trong 2 đến 4 giờ. Virus PED (SM98 hoặc KPEDV9) với liều 100 TCID₅₀/ml (50% liều gây nhiễm tế bào mô) được phân ra từng đĩa và được ủ trong 48 giờ. Để xác nhận nhiễm virus, đĩa nuôi cấy tế bào được cố định với metanol sau khi hoàn thành nuôi cấy, nhuộm màu tím tinh thể, và sau đó các lỗ trong đó các tế bào bị biến tính, được kiểm tra bằng kính hiển vi, từ đó xác nhận nhiễm virus.

Bảng 5

Hiệu quả ức chế chống lại nhiễm virus PED (chủng SM98/KPEDV9) của *Lactobacillus plantarum* CJLP475 bằng cách kích hoạt các tế bào miễn dịch

	mLN		Peyer's patches		PBMC		Spln	
	SM98	KPED V9	SM98	KPED V9	SM98	KPED V9	SM98	KPED V9
Đối chứng âm	-	-	-	-	-	-	-	-
CJLP475	++	++	+	++	++	++	++	++

++: Ức chế hoàn toàn, +: Ức chế một phần, -: lây nhiễm

Như kết quả được thể hiện trên bảng 5 và Fig.6, xác nhận rằng khi các tế bào miễn dịch của lợn và *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được xử lý cùng nhau, các tế bào miễn dịch được kích hoạt bởi chủng, và sự lây nhiễm virus bị ức chế đáng kể. Do đó, khi các tế bào miễn dịch được xử lý kết hợp với CJLP475, nó cho thấy hoạt tính kháng virus rất tốt chống lại virus PED.

Ví dụ 6: Xác nhận ảnh hưởng đến miễn dịch của vật nuôi

Để xác nhận ảnh hưởng của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 đến miễn dịch của vật nuôi, thí nghiệm được thực hiện như sau:

Mười sáu lợn cai sữa 21 ngày tuổi được mua và nuôi lớn ở trang trại trong 3 tuần. Thức ăn chăn nuôi được cho ở dạng thức ăn vụn thông thường không có kháng sinh. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được sản xuất ở dạng bột đông khô và được trữ trong tủ lạnh, và được trộn kỹ vào thức ăn vụn để dùng qua đường miệng để mỗi con lợn có thể ăn thức ăn chăn nuôi với lượng 10^{10} CFU mỗi ngày. Sau 3 tuần cho dùng qua đường miệng, bốn con lợn con trên mỗi nhóm xử lý được khám nghiệm để thu mẫu máu và mô để xác định ảnh hưởng của chủng đến miễn dịch của lợn con. Để đánh giá hiệu quả tăng cường miễn dịch, các tế bào miễn dịch được thu thập từ lá lách và nuôi cấy, và xét nghiệm ELISA được thực hiện theo cách tương tự như mô tả trên ví dụ 5.

Trong khi đó, các tế bào miễn dịch thu được từ lợn cai sữa không được cho ăn chủng được sử dụng làm nhóm đối chứng. Cụ thể, hoạt tính tăng cường miễn dịch của dịch nổi nuôi cấy, trong đó các tế bào miễn dịch thu được từ các con lợn cai sữa được nuôi mà không có chủng CJLP475 đã nuôi cấy được đánh giá.

Fig.7 là biểu đồ thể hiện các kết quả đo của IL-10 và TGF-beta. Ngoài ra, Fig.8 thể hiện các kết quả phân tích huyết thanh.

Như các kết quả thể hiện trên Fig.7, xác nhận rằng việc tiết IL-10 và TGF-beta đã tăng lên trong tế bào đơn nhân lách của lợn con được cho ăn bằng thức ăn chăn nuôi chứa CJLP475. Do đó, có thể thấy rằng CJLP475 tăng cường cơ chế miễn dịch Th2 và do đó thể hiện hiệu quả chống viêm. Ngoài ra, như thể hiện trên Fig.8, xác nhận rằng tổng số WBC (tế bào bạch cầu) tăng lên trong huyết thanh của lợn cai sữa được cho ăn bằng thức ăn chăn nuôi chứa CJLP475. Trong số này, có thể thấy rằng CJLP475 thể hiện tác dụng kích hoạt miễn dịch thông qua việc tăng số lượng tế bào lympho (các tế bào T và các tế bào B) và bạch cầu nhân đơn.

Ví dụ 7: Điều chế Probiotic chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475

Probiotic chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được định danh trong ví dụ 1 được sản xuất trên quy mô lớn và được đông khô để sản xuất probiotic phù hợp để sử dụng như nguyên liệu thô trong dược phẩm, thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, các phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc mỹ phẩm.

Để sản xuất chủng, chủng được ủ trong môi trường MRS lỏng (Difco) tại nhiệt độ 37°C trong 18 giờ trong khi điều chỉnh độ pH đến 6,0 với dung dịch NaOH 25%, sau đó thu hoạch các tế bào bằng máy ly tâm. Các tế bào thu được được đông lại ở -40°C với

5% dextrin và 10% sữa tách béo làm chất bảo quản lạnh, sấy khô ở nhiệt độ 37°C và nghiền thành bột sử dụng máy trộn. Số lượng vi khuẩn được điều chỉnh đến mức độ mong muốn. Tiếp theo, vi khuẩn được trộn với lượng phù hợp tá dược như glucoza, lactoza và sữa tách béo, và được đóng gói trong túi nhôm có thể bịt kín.

Probiotic có thể được sử dụng trong các lĩnh vực khác nhau theo phương pháp thông thường trong cùng lĩnh vực như dược phẩm, thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm và tương tự. Ví dụ, các probiotic đã điều chế có thể được trộn với bột ngũ cốc sử dụng như nguyên liệu thô cho thức ăn chăn nuôi cần sử dụng làm probiotic cho thức ăn chăn nuôi, có thể được trộn với tá dược hoặc phụ gia cần sử dụng làm probiotic cho dược phẩm ở dạng viên nén, viên nang và cho thực phẩm, hoặc có thể được trộn với lượng định trước các nguyên liệu thô cho mỹ phẩm cần sử dụng làm probiotic cho mỹ phẩm.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả dựa trên các phương án minh họa cụ thể, cần hiểu rằng người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế có thể thực hiện theo các hình thức cụ thể khác mà không tách rời khỏi nguyên lý kỹ thuật hoặc đặc điểm cơ bản của sáng chế. Do đó, các phương án được mô tả bên trên được coi là minh họa toàn bộ các khía cạnh và không nhằm giới hạn sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ hơn là mô tả chi tiết, và cần hiểu rằng toàn bộ các cải biến hoặc thay đổi xuất phát từ nguyên lý kỹ thuật và phạm vi của sáng chế và các tương đương của nó đều nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P.
2. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 theo điểm 1, trong đó chủng có hoạt tính chịu axit, chịu dịch mật, và tăng cường miễn dịch, trong đó hoạt tính tăng cường miễn dịch khác biệt ở chỗ tăng cường tiết cytokin bằng cách thúc đẩy kích hoạt các tế bào miễn dịch, và cytokin là IL-10, IL-12, và TGF-beta.
3. Chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 theo điểm 1, sản phẩm phân giải của nó, dịch nuôi cấy của nó, sản phẩm cô đặc của nó hoặc dạng sấy khô của nó.
4. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chế phẩm còn chứa chất bảo quản lạnh hoặc tá dược.
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó chất bảo quản lạnh có ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm glyxerol, trehaloza, maltodextrin, sữa bột tách kem và tinh bột, và tá dược có ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, dextrin và sữa tách béo.
6. Phương pháp điều chế chế phẩm probiotic, trong đó phương pháp này bao gồm:

nuôi cấy chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P; và

trộn chủng được thu hồi với chất phụ gia.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó chất phụ gia là chất bảo quản lạnh, và phương pháp còn bao gồm bước đông khô sau bước trộn.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó chủng trong chế phẩm đông khô ở trạng thái sống.
9. Phương pháp theo điểm 6, trong đó phương pháp này còn bao gồm chuẩn bị lượng định trước chế phẩm vào bao gói sau bước trộn.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó trong bước đóng gói, chế phẩm được chuẩn bị cho vào bao gói sao cho tổng số lượng chủng chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 là 10^6 CFU/g hoặc nhiều hơn.

DANH MỤC TRÌNH TỰ GEN

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> CHỦNG LACTOBACILLUS PLANTARUM CJLP475, CHẾ PHẨM CHỨA CHỦNG NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM PROBIOTIC

<130> OPA19036

<150> KR 10-2018-0081845

<151> 2018-07-13

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1520

<212> ADN

<213> không xác định

<220>

<223> Lactobacillus plantarum CJLP475

<400> 1

ttgggggaccc tgctcaggac gaacgctggc ggcgtgccta atacatgcaa gtcgaacgaa	60
ctctgggtatt gattgggtgct tgcacatga tttacatttg agtgagtggc gaactgggtga	120
gtaacacgtg ggaaacctgc ccagaagcgg gggataacac ctggaaacag atgctaatac	180
cgcataacaa cttggaccgc atggtccgag ttgaaagat ggcttcggct atcacttttg	240
gatggtcccc cggcgtatta gctagatggt ggggtaacgg ctcaccatgg caatgatacg	300
tagccgacct gagagggtaa tcggccacat tgggactgag acacggccca aactcctacg	360
ggaggcagca gtagggaatc ttccacaatg gacgaaagtc tgatggagca acgccgcgtg	420
agtgaagaag ggtttcggct cgtaaaactc tgttggttaa gaagaacata tctgagagta	480
actgttcagg tattgacggt atttaaccag aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc	540
gcggtataac gtaggtggca agcgttgtcc ggatttattg ggcgtaaagc gagcgcaggc	600
ggttttttta gtctgatgtg aaagccttcg gctcaaccga agaagtgcac cggaaactgg	660
gaaacttgag tgcagaagag gacagtggaa ctccatgtgt agcggtgaaa tgcgtagata	720
tatggaagaa caccagtggc gaaggcggct gtctgggtctg taactgacgc tgaggctcga	780
aagtatgggt agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc ataccgtaaa cgatgaatgc	840
taagtgttgg agggtttccg cccttcagtg ctgcagctaa cgcattaagc attccgcctg	900
gggagtacgg ccgcaaggct gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgc caagcgggtgg	960
agcatgtggt ttaattcgaa gctacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac atactatgca	1020
aatctaagag attagacgtt cccttcgggg acatggatac aggtggtgca tggttgtcgt	1080

cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tattatcagt 1140
 tgccagcatt aagttgggca ctctggtgag actgccggtg acaaaccgga ggaagggtggg 1200
 gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta caatggatgg 1260
 tacaacgagt tgcgaactcg cgagagtaag ctaatctctt aaagccattc tcagttcgga 1320
 ttgtaggctg caactcgcct acatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcg atcagcatgc 1380
 cgcggtgaat acgttcccgg gccttgtaaca caccgcccgt cacaccatga gagtttgtaa 1440
 cacccaaagt cgggtggggta accttttagg aaccagccgc ctaagggtggg acagatgatt 1500
 aggggtgaagt cgtacaaggg 1520

<210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi thông dụng 27F

<400> 2
 agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi thông dụng 1492R

<400> 3
 gggttaccttg ttacgactt 19

37022

FIG.1

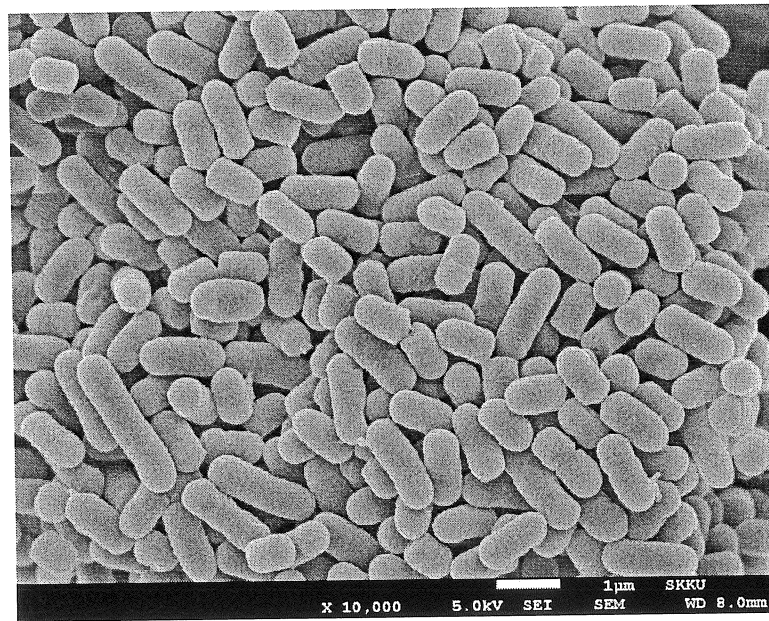


FIG.2



FIG.3

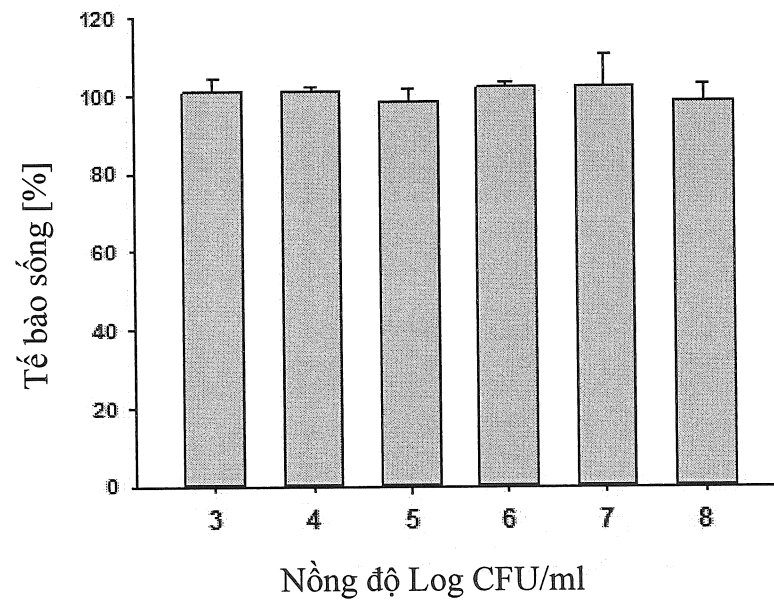


FIG.4

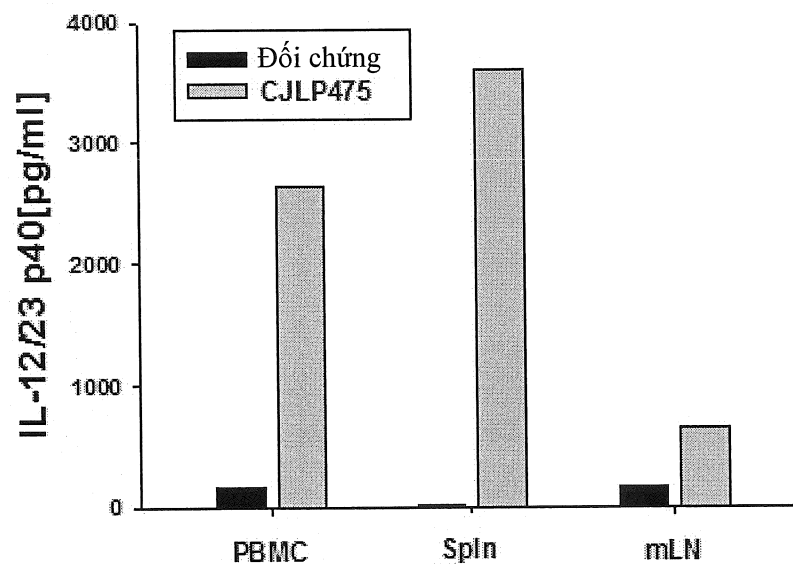


FIG.5

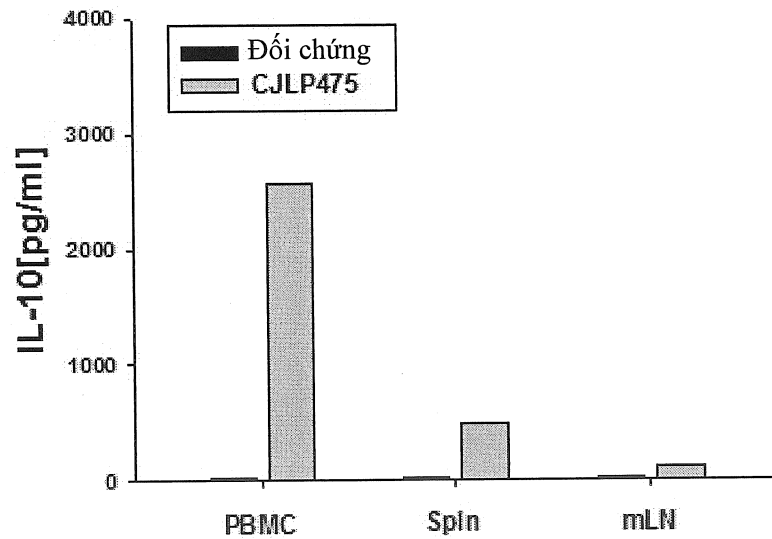
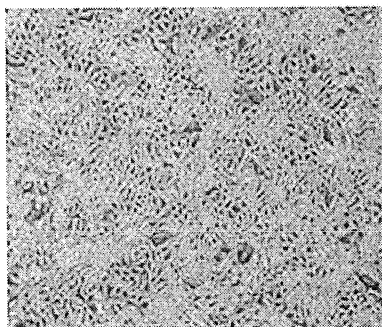
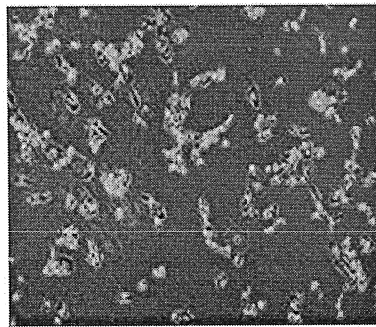


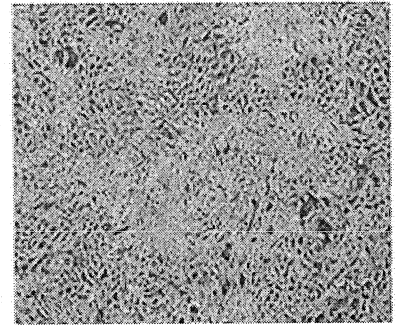
FIG.6



Các tế bào IPEC-J2



Các tế bào IPEC-J2 cấy truyền virus



Các tế bào IPEC-J2 cấy truyền virus sau khi xử lý với canh nuôi cấy chứa CJLP475/các tế bào miễn dịch

FIG.7

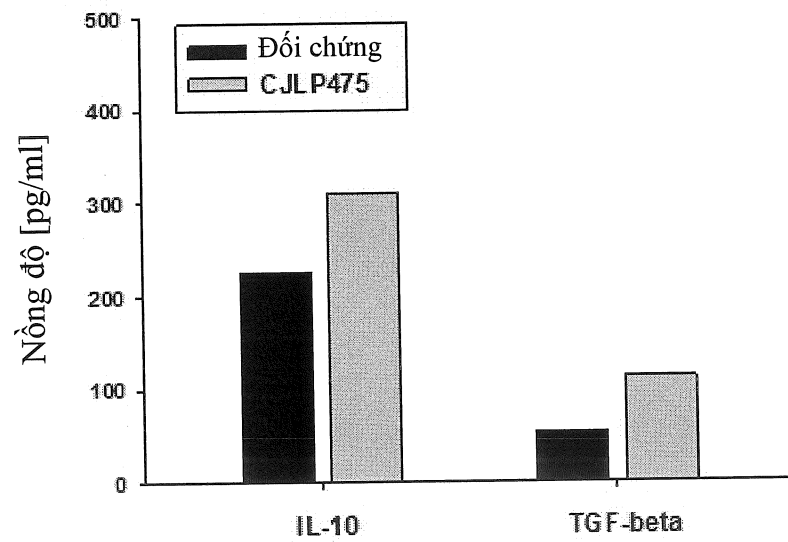


FIG.8

