



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0038941

(51)¹⁹ C12N 1/20; A61K 35/747; A61K 47/26; (13) B
C12R 1/25; A61P 31/14; C12N 1/04;
A23K 10/16; A61K 47/36

(21) 1-2019-07215

(22) 12/07/2019

(86) PCT/KR2019/008677 12/07/2019

(87) WO 2020/013670 16/01/2020

(30) 10-2018-0081909 13/07/2018 KR

(45) 26/02/2024 431

(43) 25/09/2020 390

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

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

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

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

(54) CHẾ PHẨM CHỨA CHỦNG LACTOBACILLUS PLANTARUM CJLP475 VÀ CHỦNG LACTOBACILLUS PLANTARUM CJLP17, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM PROBIOTIC

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12249P, và phương pháp điều chế chế phẩm probiotic.



Tế bào IPEC-J2 không bị nhiễm

PEDv trên tế bào IPEC-J2

CJLP 17/475 và PEDv trên tế bào IPEC-J2

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 có hoạt tính chịu axit, chịu dịch mật, và kháng và tăng cường miễn dịch, 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 biết 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 loại G2b là 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 các bệnh do virus, nhưng bị hạn chế trong việc ngăn ngừa lây nhiễm PEDV loại G2b. Ngoài ra, vắc xin PEDV nhóm G2b bất hoạt mới được phát triển cũng đang được sử dụng. Tuy nhiên, một số vấn đề đã được đặt ra liên quan đến các biện pháp phòng ngừa PEDV, như thể hiện sự hạn chế trong phòng ngừa các bệnh về tiêu hóa của vắc xin bất hoạt vì vắc xin bất hoạt chỉ được sử dụng thay vì phát triển vắc xin sống. Để khắc phục các vấn đề này, sự phát triển các tác nhân phòng 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 chống 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 xytokin 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 ở 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 các vi sinh vật 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 các hoạt tính của nó.

Mục đích của sáng chế cung cấp chế phẩm chứa:

(a) chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P; và

(b) chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12249P.

Theo một phương án của sáng chế, các chủng (a) và (b) có thể ở dạng nguyên chủng, sản phẩm phân giải của chúng, môi trường nuôi cấy của chúng, sản phẩm cô đặc của chúng hoặc dạng sấy khô của chúng.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất thức ăn chăn nuôi hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm được đề cập bên trên.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất thực phẩm chứa chế phẩm được đề cập bên trên.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất mỹ phẩm chứa chế phẩm được đề cập bên trên.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa chế phẩm được đề cập bên trên.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm theo sáng chế có hoạt tính chịu axit và chịu dịch mật cao và do đó có thể được cung cấp như probiotic. Chế phẩm 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, có thể thấy rằng khi chế phẩm theo sáng chế được sử dụng bằng đường uống cho lợn nái và lợn con được sinh ra từ lợn nái bị thử thách với virus PED, tỷ lệ tử vong của lợn con có thể giảm đáng kể. Theo đó, sáng chế có thể cung cấp chế phẩm có hoạt tính kháng virus chống lại virus PED, hoạt tính tăng cường miễn dịch và tác dụng cải thiện tăng trọng và giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy ở vật nuôi, và do đó, chế phẩm này có thể được sử dụng một cách hiệu quả như chế phẩm thức ăn chăn nuôi hoặc chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi, chế phẩm thực phẩm, chế phẩm mỹ phẩm hoặc chế phẩm dược phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện hình ảnh của đĩa thạch máu xác nhận không có hoạt tính tán huyết của các chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và *Lactobacillus plantarum* CJLP17 strain;

Fig.2 là biểu đồ thể hiện không có độc tính tế bào của chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17;

Fig.3 là hình ảnh dưới kính hiển vi thể hiện tác dụng ức chế chống nhiễm virus PED bằng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17;

Fig.4 là biểu đồ thể hiện tốc độ tăng kháng thể vacxin đặc hiệu IgG trong huyết thanh của lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17;

Fig.5 là biểu đồ thể hiện tốc độ tăng kháng thể vaccin đặc hiệu IgA trong huyết thanh của lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17;

Fig.6 là biểu đồ thể hiện hiệu hàm lượng kháng thể trung hòa trong sữa non của lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17;

Fig.7 là biểu đồ thể hiện hàm lượng kháng thể vaccin đặc hiệu IgG trong huyết thanh lợn con sau khi thử thách virus PED ở lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17;

Fig.8 là biểu đồ thể hiện hàm lượng của TGF-beta trong huyết thanh lợn con sau khi thử thách virus PED ở lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17;

Fig.9 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ V/C của hồng tràng lợn con sau khi thử thách virus PED ở lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17;

Fig.10 là biểu đồ thể hiện mật độ tế bào hình đài đế của đại tràng lợn con sau khi thử thách virus PED ở lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17;

Fig.11 là đồ thị thể hiện nhiệt độ trung bình của cơ thể lợn con trong 7 sau khi thử thách virus PED ở lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17;

Fig.12 là đồ thị thể hiện tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy trong 7 ngày sau khi thử thách virus PED ở lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17; và

Fig.12 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ sống sót trong 7 ngày sau khi thử thách virus PED ở lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm bao gồm chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Để đạt được các mục đích nêu trên, một khía cạnh của sáng chế đề xuất chế phẩm chứa:

(c) chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P; và

(d) chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12249P.

Cụ thể, chế phẩm có thể có hoạt tính kháng virus, chịu axit, chịu dịch mật và tăng cường miễn dịch.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “*Lactobacillus*” là vi sinh vật của bacillus gram dương ưa khí hoặc kỵ khí được phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Các vi sinh vật thuộc chi *Lactobacillus* bao gồm *Lactobacillus plantarum*, v.v. Các tác giả sáng chế cung cấp các chủng mới thuộc *Lactobacillus plantarum*, đã được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P và KCCM12249P, và được định danh tương ứng là “*Lactobacillus plantarum* CJLP475” và “*Lactobacillus plantarum* CJLP17”. Chúng 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.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “probiotic” đề cập đến vi khuẩn sống xâm nhập vào cơ thể và mang lại lợi ích tốt cho sức khỏe. Hầu hết các probiotic được biết đến cho đến nay đã được tiêu thụ thông qua các sản phẩm sữa lên men làm từ vi khuẩn axit lactic như *Lactobacillus*. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, 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*. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và *Lactobacillus plantarum* CJLP17 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.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “chịu axit” đề cập đến hoạt tính chịu được tính axit cao. Nếu 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.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “chịu dịch mật” đề cập đến 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 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. Mật là một trong những nguyên nhân chính làm giảm tác dụng của việc sử dụng probiotic khi chúng tác động lên probiotic ăn qua nhiều con đường khác nhau bao gồm cả sử dụng qua đường uống và tương tự.

Cụ thể, trong số các chế phẩm của sáng chế, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được phân lập từ nước tương (tức là thực phẩm lên men truyền thống), và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được phân lập từ phân và sữa non của lợn nái và lợn con trong các trang trại nơi xảy ra nhiễm virus PED. Các đặc điểm hình thái của các chủng là mỗi chủng là *bacillus* gram dương và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được biểu diễn bằng trình tự nucleotit 16s rADN SEQ ID NO: 1, và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được biểu diễn bằng trình tự nucleotit 16s rADN SEQ ID NO: 2. Từng 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 chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 mới được phân lập tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 13 tháng 4 năm 2018, Cơ quan ký gửi quốc tế, theo Hiệp ước Budapest với số đăng ký KCCM12249P và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được ký gửi tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 11 tháng 7 năm 2018, Cơ quan ký gửi quốc tế, theo Hiệp ước Budapest với số đăng ký KCCM12287P.

Để duy trì ổn định chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 của sáng chế trong một thời gian dài, các 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 trong nước ở nhiệt độ -70°C, hoặc có thể được làm đông khô bằng cách ngưng các tế bào trong sữa tách kem 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.

Các chế phẩm 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, ngay cả khi chế phẩm được sử dụng trong cơ thể, nó có thể không gây tán huyết trong mạch máu.

Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế có thể có sức đề kháng yếu hoặc không có tính kháng các loại kháng sinh. Các kháng sinh cụ thể, nhưng không giới hạn ở ampicilin, clindamixin, gentamixin, kanamixin, erythromyxin, ampicilin/sulbactam, chloramphenicol, hoặc streptomycin. Theo đó, ngay cả khi chế phẩm được sử dụng trong dược phẩm, thực phẩm chức năng, phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc tương tự, nó không có tính kháng kháng sinh, và do đó, khả năng gây ra tác dụng dược lý hoặc các vấn đề môi trường có liên quan là thấp.

Chế phẩm có khả năng kích hoạt các tế bào miễn dịch để tăng tiết các xytokin, hoặc có thể được sử dụng trong cơ thể để thúc đẩy khả năng miễn dịch.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “các tế bào miễn dịch” đề cập tới 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. Chế phẩm của sáng chế có thể có hoạt tính để kích thích các tế bào miễn dịch và do đó làm tăng bài tiết các xytokin 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, phương pháp để tăng cường đồng thời 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 phương pháp này đã được phát hiện bởi các tác

giả sáng chế. Ngoài ra, chế phẩm của sáng chế có khả năng điều hòa miễn dịch để điều chỉnh sự mất cân bằng Th1/Th2.

Theo sáng chế, thuật ngữ “xytokin” đề cập 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 hạn chế ở đây.

Chế phẩm có thể thúc đẩy sự phát triển của đối tượng hoặc giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy khi dùng cho đối tượng.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “đối tượng” đề cập 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.

Chế phẩm có thể làm tăng kháng thể trong cơ thể. Khả năng miễn dịch của đối tượng có thể được cải thiện bằng cách tăng tiết các kháng thể liên quan đến chức năng miễn dịch. Chế phẩm có thể được sử dụng cho đối tượng và phương pháp sử dụng không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể được sử dụng thông qua các đường khác nhau bao gồm cả đường uống hoặc đường tiêm miễn là có thể đến các mô đích. Ví dụ có thể sử dụng qua đường miệng. Cơ thể có thể có cơ thể với chất lỏng như máu hoặc sữa non, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây. Kháng thể có thể là IgG, IgA hoặc kháng thể trung hòa, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Chế phẩm khi được sử dụng cho đối tượng, có thể tăng cường khả năng miễn dịch ở đời con được sinh ra từ đối tượng thông qua kháng thể của mẹ. Sự tăng cường khả năng miễn dịch có thể bao gồm sự gia tăng kháng thể hoặc bài tiết xytokin, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Chế phẩm khi được sử dụng cho đối tượng, có thể làm giảm bớt các triệu chứng nhiễm virus ở đời con sinh ra từ đối tượng. Virus có thể là virus tiêu chảy trên lợn (PEDV), và có thể bao gồm nhưng không giới hạn bất kỳ virus nào, nhiễm virus có thể bị ức chế nhờ chế phẩm của sáng chế. Việc giảm bớt các triệu chứng có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở làm giảm bớt tình trạng của các cơ quan tiêu hóa, duy trì nhiệt độ cơ thể bình thường, giảm tiêu chảy và tăng tỷ lệ sống sót.

Chế phẩm có thể có hoạt tính kháng virus chống lại virus tiêu chảy cấp trên lợn (PEDV).

Như được sử dụng trong 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 chế phẩm của sáng chế, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đây.

Các chủng tương ứng với chủng (a) và (b) trong chế phẩm của sáng chế có thể ở dạng nguyên chủng, sản phẩm phân giải của chúng, môi trường nuôi cấy của chúng, sản phẩm cô đặc của chúng, hoặc dạng sấy khô của chúng. Khi các chủng được điều trị trên đối tượng, hoạt tính và lây nhiễm của virus PED có thể bị ức chế đáng kể. Do đó, chế phẩm này 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 trên lợn.

Theo một phương án của sáng chế, chủng (a) và (b) trong chế phẩm của sáng chế có thể ở dạng nguyên chủng, sản phẩm phân giải của chúng, môi trường nuôi cấy của chúng, sản phẩm cô đặc của chúng, hoặc dạng sấy khô của chúng. Thông tin chi tiết về chế phẩm có thể được tham chiếu đến phần mô tả bên trên.

Các chủng của sáng chế có thể được nuôi cấy bằng phương pháp thông thường để nuôi cấy các chủng *Lactobacillus*. Đối với môi trường nuôi cấy, môi trường tự nhiên hoặc môi trường tổng hợp có thể được sử dụng. Đối với nguồn cacbon của môi trường, ví dụ, glucoza, sucroza, đextrin, 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, magiê, mangan, canxi, sắt, kali và những loại tương tự có thể được sử dụng, nhưng không giới hạn ở các nguồn này. Các axit amin, vitamin, axit nucleic và các hợp chất liên quan có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ngoài nguồn cacbon, nguồn nitơ và các thành phần của muối vô cơ. Chúng 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.

Trong sáng chế, canh nuôi cấy có thể được đề cập đến chế phẩm sau khi hoàn thành nuôi cấy, và cụ thể hơn, canh nuôi cấy có thể có hoặc không bao gồm các tế bào. Do đó, canh nuôi cấy có thể bao gồm chất nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy, thành phần mà chất nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy được loại bỏ hoặc thành phần cô đặc. Thành phần của canh nuôi cấy có thể không chỉ chứa các thành phần cần thiết cho nuôi cấy *Lactobacillus* thông thường mà cả các thành phần có tác dụng hiệp đồng cho sự phát triển của *Lactobacillus* và các chế phẩm của chúng có thể dễ dàng được lựa chọn bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Ngoài ra, chúng 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 không khí, sấy khô tự nhiên, sấy phun và sấy đông khô.

Chế phẩm có thể là chế phẩm hỗn hợp chứa hai chủng, trong đó (a) chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P; và đồng thời chứa (b) chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12249P. Theo đó, chế phẩm có thể chỉ bao gồm hai chủng tương ứng (a) và (b), sản phẩm phân giải của chúng, môi trường nuôi cấy của chúng, sản phẩm cô đặc của chúng, hoặc dạng sấy khô của chúng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây. Trong trường hợp này, hai chủng tương ứng (a) và (b) ở trên có thể không nhất thiết phải ở cùng dạng trong chế phẩm và có thể là kết hợp của các dạng, nếu cần thiết, (a) có thể ở dạng nguyên chủng của nó, và (b) có thể ở dạng phân giải của chủng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Trong chế phẩm, nồng độ của hỗn hợp chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 có thể, nhưng không giới hạn ở 10⁵ CFU/mL

đến 10^{10} CFU/mL, 10^5 CFU/mL đến 10^9 CFU/mL, 10^5 CFU/mL đến 10^8 CFU/mL, 10^5 CFU/mL đến 10^7 CFU/mL, 10^5 CFU/mL đến 10^6 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, 10^6 CFU/mL đến 10^9 CFU/mL, 10^6 CFU/mL đến 10^8 CFU/mL, 10^6 CFU/mL đến 10^7 CFU/mL, 10^7 CFU/mL đến 10^9 CFU/mL, 10^7 CFU/mL đến 10^8 CFU/mL, hoặc 10^8 CFU/mL đến 10^9 CFU/mL.

Chế phẩm có thể còn bao gồm chất bảo quản lạnh hoặc tá dược. Chất bảo quản lạnh hoặc tá dược có thể là chất không tự nhiên hoặc là chất xuất hiện tự nhiên, nhưng không giới hạn ở đây. 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 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17, hoặc chất không tự nhiên chứa đồng thời với chủng này, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Trong một phương án khác nữa, chế phẩm còn có thể bao gồm ít nhất chất bảo quản lạnh được chọn từ nhóm bao gồm glyxerol, trehaloza, maltodextrin, sữa bột tách kem và tinh bột, và/hoặc ít nhất một tá dược được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, dextrin và sữa tách kem. Chất bảo quản lạnh của sáng chế có thể được chứa hàm lượng từ 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 từ 5% đến 20% trọng lượng, trehaloza có thể có hàm lượng từ 2% đến 10% trọng lượng, maltodextrin có thể có hàm lượng từ 2% đến 10% trọng lượng, sữa bột tách kem có thể có hàm lượng từ 0,5% đến 2% trọng lượng, và tinh bột có thể có hàm lượng từ 0,1% đến 1% trọng lượng chế phẩm. Ngoài ra, tá dược có thể có hàm lượng từ 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 có thể bao gồm trộn các chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và *Lactobacillus plantarum* CJLP17, sản phẩm phân giải của chúng, môi trường nuôi cấy của chúng, sản phẩm cô đặc của chúng, hoặc sản phẩm sấy khô của chúng với chất phụ gia. Các chất phụ gia có thể là chất bảo quản lạnh hoặc tá dược nêu trên.

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

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.

Trong khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm probiotic chứa chế phẩm của sáng chế như là thành phần hoạt tính.

Probiotic được cố định trên 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 để điều chế chế phẩm probiotic có thể bao gồm điều chế từng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P và chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12249P; và trộn các chế phẩm chứa chủng CJLP475 và chế phẩm chứa chủng CJLP17.

Trong một phương án, phương pháp điều chế còn có thể bao gồm bổ sung chất phụ gia vào ít nhất một trong các chế phẩm bên trên, như chế phẩm chứa chủng CJLP475, chế phẩm chứa chủng CJLP17 hoặc chế phẩm probiotic.

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

Trong sáng chế, 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 cho vào trong bao gói sau bước trộn.

Trong sáng chế, trong bước đóng gói, chế phẩm có thể được chuẩn bị cho vào bao gói sao cho hàm lượng tổng của chủng bao gồm chủng CJLP475 và chủng CJLP17 tối thiểu là 10^6 CFU/g.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất thức ăn chăn nuôi hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm.

Các chế phẩm như được mô tả bên trên. Cụ thể, chế phẩm của sáng chế có thể được bổ sung cho phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc chế phẩm 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.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “phụ gia thức ăn chăn nuôi” đề cập 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, magiê 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.

Như được sử dụng trong 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 chế phẩm 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 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 riêng 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 công thức giải phóng ngay lập tức hoặc 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 là chất xuất hiện tự nhiên, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Trong phương án khác, chất mang có thể là chất không tiếp xúc tự nhiên với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17, hoặc chất không tự nhiên chứa đồng thời hai 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 thực phẩm hoặc thực phẩm chức năng chứa chế phẩm.

Cụ thể, chế phẩm của sáng chế có thể được bổ sung vào thực phẩm với mục đích thúc đẩy tăng trưởng, thúc đẩy khả năng miễn dịch, giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy và ức chế hoạt động của virus. Các thành phần như được mô tả bên trên. Thực phẩm có thể chứa 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 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17, hoặc chất không tự nhiên chứa đồng thời hai chủng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

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 chế phẩm được sử dụng làm phụ gia thực phẩm, chế phẩm có thể được bổ sung một mình hoặc được sử dụng ở dạng kết hợp với các thực phẩm hoặc thành phần thực phẩm khác và có thể được 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, chế phẩm được bổ sung vào từ 0,0001% đến 1% trọng lượng, cụ thể là 0,0001% đến 0,1% trọng lượng dựa trên thành phần vật liệu thô chứa chế phẩm. 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 loại 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 đextrin, 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 chế phẩm.

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. Các chế phẩm như 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 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 cho từng 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 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17, hoặc chất không tự nhiên chứa đồng thời hai chủng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất dược phẩm chứa chế phẩm. Cụ thể, chế phẩm của sáng chế có tác dụng chống viêm và tác dụng ức chế hoạt động kháng virut bằng cách thúc đẩy tăng trưởng, giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy và kích thích miễn dịch, do đó có thể được sử dụng làm dược phẩm. Các chế phẩm như được mô tả bên trên.

Khi chế phẩm theo sáng chế được sử dụng như dược phẩm, chế phẩm có thể được điều chế thành các công thức dược thông thường đã biết trong lĩnh vực dược phẩm. Dược phẩm có thể được điều chế đặc biệt thành các 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 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 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 một chất không tiếp xúc tự nhiên với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17, hoặc chất không tự nhiên chứa đồng thời hai chủng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Thông thường, khi chế phẩm được điều chế thành 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 nành, xenluloza vi tinh thể, hoặc mannitol làm chất pha loãng; magiê 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 -xycloclodextrin, sáp trắng, hoặc gôm xanthan làm chất ổn định; và metyl paraoxybenzoat, propyl paraoxybenzoat, hoặc kali sorbat làm chất bảo quản.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất bước sử dụng chế phẩm của sáng

chế cho đối tượng. Các chế phẩm như được mô tả bên trên.

Đối tượng có thể thể hiện tính hiệu quả của chế phẩm, tức là, hoạt tính tăng cường miễn dịch, hoạt tính kháng virus và tương tự, bằng cách sử dụng.

Liều lượng sử dụng có thể là nhưng không giới hạn ở tối thiểu 10^6 CFU/ngày, tối thiểu 10^7 CFU/ngày, tối thiểu 10^8 CFU/ngày, tối thiểu 10^9 CFU/ngày, tối thiểu 10^{10} CFU/ngày hoặc tối thiểu 10^{11} CFU/ngày dựa trên hỗn hợp của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất phương pháp để tăng cường khả năng miễn dịch cho đối tượng, bao gồm sử dụng cho đối tượng cần dùng. Chế phẩm và đối tượng như được mô tả bên trên.

Như sử dụng ở đây, 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 đích.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm virus cho đối tượng, bao gồm sử dụng chế phẩm cho đối tượng cần dùng. Chế phẩm và đối tượng như 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 virus bằng cách sử dụng chủng 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 virus bằng cách sử dụng chế phẩm của sáng chế.

Ví dụ thực hiện 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

Các chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 phân lập từ nước tương đã được cấy

trải trên môi trường MRS rắn (Difco, Hoa Kỳ) có chứa 1,5% thạch và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Các chủng phân lập từ mỗi mẫu được phân lập hoàn toàn bằng cách cấy chuyển chúng sang môi trường mới và các chủng phân lập được bảo quản trong môi trường dinh dưỡng bổ sung với 20% glyxerol ở nhiệt độ -70°C hoặc thấp hơn. Kết quả là, tổng số 1.552 chủng đã được thu thập, và các chủng có hoạt tính kháng virus tối ưu đã được chọn thông qua các ví dụ sau.

Theo kết quả phân tích giải trình tự 16S rADN, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 thể hiện tính tương đồng cao nhất (99,9%) với chủng tiêu chuẩn *Lactobacillus plantarum* (NBRC1589, Ngân hàng Gen với số đăng ký AB326351) và do đó được xác định là *Lactobacillus plantarum* và được định danh là “*Lactobacillus plantarum* CJLP475”, được ký gửi tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 11 tháng 7 năm 2018, cơ quan ký gửi quốc tế theo Hiệp ước Budapest với số đăng ký KCCM12287P. Trình tự nucleotit 16S rADN được phân tích của *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được biểu diễn bằng trình tự SEQ ID NO: 1.

Trong khi đó, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được phát hiện là gram dương như kết quả của việc nhuộm gram. Hơn nữa, để phân tích các đặc điểm sinh hóa, các mẫu lên men đường của chủng đã được phân tích bằng hệ thống API 50 CHL (biomerieux Vitek, Inc., Pháp) (Bảng 1).

Bảng 1

Phân tích các mẫu lên men đường của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475

Tên chủng	CJLP475	Tên chủng	CJLP475
Đối chứng	-	Esculin	+
Glyxerol	-	Salixin	+
Erythritol	-	Xenlobioza	+
D-Arabinoza	-	Maltoza	+
L-Arabinoza	+	Lactoza	+
Riboza	+	Melibioza	+
D-Xyloza	-	Sacaroza	+
L-Xyloza	-	Trehaloza	+
Adonitol	-	Inulin	-
β Metyl-xylosit	-	Melezitoza	+
Galactoza	+	D-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 1-2: Thu mẫu và phân lập chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP17

Các mẫu phân và sữa non của lợn nái và lợn con được thu thập từ các trang trại nơi xảy ra sự bùng phát virus PED lặp đi lặp lại. Các mẫu được thu thập lần lượt được pha loãng, được cấy trên môi trường MRS và BHI rắn, và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ. Các chủng phân lập từ mỗi mẫu được phân lập hoàn toàn bằng cách cấy chuyển chúng sang môi trường mới và các chủng phân lập được lưu trữ trong môi trường dinh dưỡng bổ sung 20% glycerol ở nhiệt độ -70°C hoặc thấp hơn. Kết quả là, tổng số 1.552 chủng đã được thu thập, và các chủng có hoạt tính kháng virus tối ưu đã được chọn thông qua các ví dụ sau. Theo kết quả phân tích giải trình tự 16S rADN, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 thể hiện tính tương đồng cao nhất (99,9%) với chủng *Lactobacillus plantarum* (NBRC15891, Ngân hàng Gen với số đăng ký AB326351) và do đó được xác định là chủng *Lactobacillus plantarum* và được định danh là “*Lactobacillus plantarum* CJLP17”, được ký gửi tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) vào ngày 13 tháng 4 năm 2018, cơ quan ký gửi quốc tế theo Hiệp ước Budapest với số đăng ký KCCM12249P. Trình tự nucleotit 16S rADN được phân tích của *Lactobacillus plantarum* KCCM12249P được biểu diễn bằng trình tự SEQ ID NO: 2.

Trong khi đó, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được phát hiện là gram

dương như kết quả của việc nhuộm gram. Hơn nữa, để phân tích các đặc điểm sinh hóa, các mẫu lên men đường của chủng đã được phân tích bằng hệ thống API 50 CHL (biomerieux Vitek, Inc., Pháp) (Bảng 2).

Bảng 2

Phân tích các mẫu lên men đường của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17

Tên chủng	CJLP17	Tên chủng	CJLP17
Đối chứng	-	Esculin	-
Glyxerol	-	Salixin	+
Erythritol	-	Xenlobioza	+
D-Arabinoza	-	Maltoza	+
L-Arabinoza	+	Lactoza	+
Riboza	+	Melibioza	+
D-Xyloza	-	Sacaroza	+
L-Xyloza	-	Trehaloza	+
Adonitol	-	Inulin	-
β Metyl-xylosit	-	Melezitoza	+
Galactoza	+	D-Raffinoza	-
D-Glucoza	+	Amidon	-
D-Fructoza	+	Glycogen	-
D-Mannoza	+	Xylitol	-
L-sorboza	-	β -Gentiobioza	+
Rhamnoza	-	D-Turanoza	+
Đulxitol	--	D-Lyxzoza	-
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 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 đã được nuôi cấy tĩnh trong môi trường MRS lỏng ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ sau khi cấy ghép lần thứ hai. 1% số chủng được ủ trước được cấy vào môi trường dịch vị nhân tạo và được nuôi cấy tĩnh ở nhiệt độ 37°C, và môi trường nuôi cấy được lấy mẫu lúc 0 giờ và 3 giờ. Môi trường nuôi cấy 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 của ví dụ 1 đã 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% số chủng được ủ trước được cấy vào môi trường 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 đánh giá nêu trên, các chủng có khả năng chịu axit và chịu dịch mật cao nhất được lựa chọn và được định danh là *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và *Lactobacillus plantarum* CJLP17. Để so sánh khả năng chịu axit và chịu dịch mật của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 với các chủng thông thường đã biết, khả năng 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 3

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

	0 giờ	3 giờ
<i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP17 (KCCM12249P)	1,1 x 10 ⁶	4,0 x 10 ⁶

<i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP475 (KCCM12287P)	1,1 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁷
<i>Lactobacillus plantarum</i> (KCCM12116)	2,3 x 10 ⁷	1,3 x 10 ⁷

Bảng 4

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

	0 giờ	24 giờ
<i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP17 (KCCM12249P)	1,3 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁷
<i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP475 (KCCM12287P)	1,3 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁷
<i>Lactobacillus plantarum</i> (KCCM12116)	2,1 x 10 ⁷	1,6 x 10 ⁶

Theo bảng 3 và bảng 4 bên trên, số lượng các tế bào của 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 *Lactobacillus plantarum* thường được biết đến đều có tính chịu axit và chịu dịch mật.

Trong khi đó, khi đánh giá tính chịu axit, số lượng các tế bào trong chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 đã tăng lên, cho thấy các chủng có khả năng chịu axit tốt.

Trong đánh giá khả năng chịu dịch mật, số lượng các tế bào trong chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 đã tăng lên, và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 có số lượng tế bào giảm ít hơn so với chủng mẫu *Lactobacillus plantarum* (KCCM12116) chỉ ra rằng cả hai chủng có khả năng chịu dịch mật tốt.

Ngoài ra, vì mỗi chủng có khả năng chịu axit và chịu dịch mật tốt, nên có thể hiểu rằng chế phẩm chứa cả hai chủng có khả năng chịu axit và chịu dịch mật tốt.

Ví dụ 3: Đánh giá chủng an toàn

Ví dụ 3-1: 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 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17, các đĩa thạch máu (thạch máu cừu 5%, Hanilkomed, Hàn Quốc) đã được sử dụng. Mỗi chủng được cấy rìa 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.1, xác nhận rằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 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 3-2: Đánh giá tính nhạy cảm kháng sinh

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được cấy vào môi trường MRS lỏng và được nuôi cấy tĩnh ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Các vi khuẩn được nuôi cấy này được thấm vào trong tấm bông đã tiệt trùng và được cấy trải trên môi trường Mueller Hinton II (Difco) rắn, sau đó các đĩa kháng sinh được đặt trong môi trường và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Các đĩa ampicilin, clindamycin, gentamixin, kanamycin, erythromycin, ampicilin/sulbactam, chloramphenicol, và streptomycin (Oxoid, UK) đã 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 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17, mỗi chủng không kháng với các kháng sinh nêu trên (Bảng 5). Do đó, có thể thấy rằng ngay cả khi chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 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 5

Ức chế sinh trưởng vi khuẩn theo kháng sinh

Các kháng sinh	Bán kính vùng ức chế sinh trưởng tập trung quanh các kháng sinh (mm)	
	CJLP475	CJLP17
Amp10 (Ampicilin)	7,5	7,5
C30 (Clindamycin)	7	7
CN120 (Gentamixin)	5	5
K30 (Kanamycin)	1,5	1,5
E15 (Erythromycin)	12	12
SAM20 (Ampicilin/Sulbactam)	7	7
S10 (Chloramphenicol)	3,5	3,5
DA2 (Streptomycin)	4,5	4,5

Ví dụ 4: Đánh giá độc tính tế bào

Để đánh giá ảnh hưởng của các chủng đối với sự sống của các tế bào, xét nghiệm MTS đã được thực hiện bằng cách 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 tế bào IPEC-J2 (tế bào biểu mô ruột lợn). Từng tế bào được ủ trên đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ và được xử lý bằng hỗn hợp chủng, trong đó *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được trộn theo tỷ lệ 1:1, ở các nồng độ khác nhau từ 10^5 CFU/mL đến 10^7 CF /mL. Sau 24 giờ, dung dịch MTS đã được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào và các tế bào được ủ trong 2 giờ, và tỷ lệ tế bào sống (%) được tính bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 490 nm bằng đầu đọc vi đĩa.

Kết quả là, như thể hiện trên Fig.2, khi các tế bào được xử lý ở ba nồng độ khác nhau, có thể xác nhận rằng số lượng tế bào chết hầu như không được quan sát ở nồng độ 10^7 CFU/mL hoặc thấp hơn. Theo đó, có thể thấy rằng chế phẩm cho thấy không có độc tính tế bào ở nồng độ 10^7 CFU/mL hoặc thấp hơn.

Ví dụ 5: Hiệu quả ức chế chống nhiễm virut

Để đo hiệu quả ức chế của chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 chống lại nhiễm virut, virut gây bệnh tiêu chảy cấp trên lợn (PEDV) đã được chuẩn bị. Cụ thể, virut đã được tăng sinh trong các tế bào Vero (CCL-81, 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, Hoa Kỳ), 10% FBS bất hoạt nhiệt (huyết thanh bào thai bò, v/v) và 1% (v/v) penixilin/streptomycin là môi trường nuôi cấy các tế bào Vero. Các tế bào Vero được ủ dưới dạng lớp đơn nhất, được rửa hai lần bằng môi trường, và sau đó tất cả các dung dịch được loại bỏ. Virut được trộn ở mức 0,1 MOI (bội nhiễm) trong MEM không có FBS có chứa trypsin được xử lý với 5 μ g/mL TPCK (N-tosyl-L-phenylalanin clormetyl keton), được xử lý với thể tích tối thiểu của các tế bào nuôi cấy đã chuẩn bị, và sau đó được ủ trong tủ ủ tế bào tại nhiệt độ 37°C chứa 5% CO₂ trong 2 đến 3 ngày.

Nhiễm virut được xác định bởi sự hình thành hợp bào virut. Khi hợp bào virut được hình thành, canh nuôi cấy virut 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/0,1 mL, 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 chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 chống lại nhiễm virus, chế phẩm và tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và tế bào lympho mạc treo được chiết xuất từ các lợn con cai sữa 21 ngày tuổi đã được phản ứng trong 20 đến 24 giờ, và sau đó được xử lý độc lập trên đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ, trong đó IPEC-J2 được ủ và ủ trong tủ ủ tế bào ở 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 chia thành từng đĩa và 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 6

Tác dụng ức chế chống nhiễm virus PED của *Lactobacillus plantarum* CJLP475, *Lactobacillus plantarum* CJLP17 và hỗn hợp của chúng bởi các tế bào miễn dịch được kích hoạt

	mLN	PBMC
	PEDV	PEDV
Đối chứng âm	-	-
CJLP475	+	++
CJLP17	+	++
CJLP17 và CJLP475	++	++

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

Như kết quả được thể hiện trên Bảng 6 và Fig.3, khi chế phẩm chứa cả chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được xử lý cùng với các tế bào miễn dịch của lợn, có thể đánh giá rằng các tế bào miễn dịch được kích hoạt bởi chế phẩm có thể ức chế nhiễm virus PED trong tế bào biểu mô ruột lợn (IPEC-J2).

Xem xét rằng tổng số chủng của từng nhóm trong ba nhóm thử nghiệm (CJLP475, CJLP17, CJLP17 và CJLP475) trong Bảng 6 là như nhau, tác dụng ức chế chống nhiễm virus PED của chế phẩm chứa cả chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 vượt trội hơn đáng kể so với tác dụng ức chế chống nhiễm virus PED của các chế phẩm bao gồm từng chủng CJLP475 và chủng CJLP17.

Ví dụ 6: Xác nhận ảnh hưởng đến khả năng miễn dịch và sữa non của lợn nái

Vì tác dụng chống virus của chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 đã được xác nhận trong ví dụ 5, thí nghiệm đã được thực hiện để xác nhận tác dụng của nó đối với miễn dịch và sữa non của lợn nái như sau: mười lăm lợn nái trong cùng thời gian sinh sản được chọn ngẫu nhiên cho từng nhóm thử nghiệm vào lúc 6 tuần trước khi sinh từ các trang trại không xảy ra virus PED. Tất cả những con lợn nái được sử dụng trong thí nghiệm đã được tiêm vaccin chống virus PED vào lúc 8 tuần và 3 tuần trước khi sinh. Thí nghiệm được thực hiện trong tổng số hai nhóm thử nghiệm, tức là nhóm đối chứng trong đó không cho ăn chủng nào và nhóm được cho ăn bằng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17. Thức ăn chăn nuôi được cho ở dạng thức ăn vụn thông thường mà không có kháng sinh, và nước được cho dùng tự do. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được sản xuất dưới dạng bột đông khô và được lưu trữ trong tủ lạnh, sau đó được bổ sung bên trên thức ăn khi cho lợn nái ăn để mỗi con lợn nái được ăn chế phẩm với lượng tối thiểu 10^{10} CFU mỗi ngày. Lợn nái được cho ăn tổng cộng 6 tuần và để xác nhận tác dụng của các chủng đối với khả năng miễn dịch và sữa non của lợn nái, tăng tỷ lệ kháng thể vaccin đặc hiệu IgG và tăng tỷ lệ kháng thể vaccin đặc hiệu IgA trong huyết thanh lợn nái, và nồng độ kháng thể trung hòa trong sữa non đã được đo, và kết quả được thể hiện trên Fig.4, Fig.5 và Fig.6, tương ứng.

Theo kết quả của thí nghiệm, các chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 đã làm tăng vaccin đặc hiệu IgG và IgA trong huyết thanh lợn nái so với nhóm đối chứng. Ngoài ra, khi sự thay đổi về nồng độ kháng thể trung hòa trong sữa non trong quá trình sinh sản theo chế độ cho ăn chế phẩm đã được kiểm tra, xác nhận rằng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 cho thấy nồng độ kháng thể trung hòa cao hơn so với nhóm đối chứng.

Ví dụ 7: Hiệu quả của việc cải thiện khả năng miễn dịch của lợn con bằng cách cho lợn nái ăn chế phẩm

Để xác nhận tác dụng của chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 đối với khả năng miễn dịch của lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn chế phẩm, thí nghiệm đã được thực hiện bằng cách sử dụng lợn nái ở ví dụ 6, và ngoài ra máu được thu thập từ lợn con được sinh ra từ lợn nái 4 ngày sau khi ăn sữa non để thực hiện phân tích miễn dịch bằng bộ IgG ELISA. Fig.7 thể hiện ảnh hưởng của việc cho ăn bằng chế phẩm đến khả năng miễn dịch của lợn con được sinh ra từ lợn nái trong tổng cộng 6 tuần.

Kết quả là, hàm lượng vacxin đặc hiệu IgG trong huyết thanh lợn con ở nhóm được cho ăn chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được thấy cao hơn so với nhóm đối chứng (như thể hiện trên Fig.7).

Kết quả chỉ ra rằng lợn con đã nhận được nhiều vacxin đặc hiệu IgG từ sữa non của lợn nái và do đó, có thể thấy rằng khả năng miễn dịch của lợn con có thể được cải thiện bằng cách cho lợn nái ăn chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17.

Ví dụ 8: Hiệu quả của thử nghiệm thử thách đối với lợn con được sinh ra từ lợn nái cho ăn chế phẩm

Để xác nhận ảnh hưởng đến tỷ lệ tử vong của lợn con khi lợn con được sinh ra từ lợn nái đã bị nhiễm virus PED được cho ăn chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17, thí nghiệm đã được thực hiện bằng cách sử dụng lợn nái trong ví dụ 6. Do thí nghiệm này yêu cầu thử nghiệm thử thách trên lợn con với virus PED, nên các nhóm thử nghiệm đã được giảm thiểu theo tư vấn của ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật, theo đó nhóm thử nghiệm chứa từng chủng đơn không được thử nghiệm và chỉ nhóm có bao gồm chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 đã được thử nghiệm.

Hai mươi lợn con 4 ngày tuổi sau khi được sinh ra từ những con lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 đã được chọn cho từng nhóm điều trị và được thử thách với virus PED (PEDv QIAP 1401, 100 LD₅₀/ml). Nhiệt độ cơ thể và điểm tiêu

chảy được đo hàng ngày trong tổng cộng 7 ngày sau thử thách (0-3, 0: phân bình thường, 1: phân xám, 2: tiêu chảy trung bình, 3: tiêu chảy nặng). Lợn con được thay thế sữa và nước được uống tự do, và mỗi lợn con được cho ăn với chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 với lượng 1×10^{10} CFU mỗi ngày bằng cách trộn với sữa thay thế. Khi lợn con chết, khám nghiệm tử thi được thực hiện, và hồng tràng và đại tràng được lấy mẫu, cố định bằng formalin trung hòa, được nhúng bằng cách xử lý bằng parafin, và vi phân, và sau đó các phần mô được khử parafin và hydrat hóa. Sau khi nhuộm H & E, tỷ lệ chiều cao của nhung mao và chiều sâu của các tiểu nang được đo để kiểm tra tỷ lệ V/C (Villus height/crypt depth ratio). Số lượng tế bào hình đài để trên mỗi mm^2 đã được xác nhận bằng cách lấy mẫu niêm mạc của đại tràng. Ngoài ra, máu được thu thập từ mỗi đối tượng và huyết thanh được tách ra từ đó để so sánh mức độ ức chế viêm của từng nhóm điều trị. Về vấn đề này, mức độ của TGF-beta, yếu tố ức chế viêm điển hình, được đo bằng ELISA (Các hệ thống R&D, USA) và kết quả của thí nghiệm thử thách được thể hiện trên các Fig.8 đến Fig.13.

TGF-beta trong huyết thanh lợn con ở nhóm cho ăn chế phẩm được thấy cao hơn so với nhóm đối chứng. Do đó, xác nhận rằng phản ứng chống viêm đã được kích hoạt nhiều hơn trong nhóm được cho ăn chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 (Fig.8).

Tỷ lệ V/C của hồng tràng lợn con ở nhóm được cho ăn chế phẩm cao hơn so với nhóm đối chứng, và do đó, đã xác nhận rằng việc loại bỏ nhung bởi virus đã được giảm xuống so với nhóm đối chứng (Fig.9).

Các tế bào hình đài để trong ruột lợn con có hàm lượng trong nhóm được cho ăn chế phẩm cao hơn so với nhóm đối chứng, và do đó đã xác nhận rằng sự ức chế hình thành niêm mạc ruột do nhiễm virus PED đã giảm đáng kể (Fig.10).

Kết quả của việc kiểm tra sự thay đổi nhiệt độ cơ thể của lợn con sau thử thách với virus PED, đã xác nhận rằng nhiệt độ cơ thể được duy trì trong phạm vi bình thường trong nhóm được cho ăn bằng chế phẩm so với nhóm đối chứng. Cụ thể, ở mức 5, 6 và 7 dpi, sự thay đổi nhiệt độ cơ thể của lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm được duy trì đáng kể nhiệt độ trung bình của cơ thể so với đối chứng (Fig.11)

Do kết quả xác nhận điểm tiêu chảy (điểm có ý nghĩa lâm sàng) của lợn con gây

ra bởi virus PED, điểm tiêu chảy ở nhóm thực nghiệm được cho ăn bằng chế phẩm thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng ở mức 6 và 7 dpi (Fig.12).

Tỷ lệ sống của lợn con được theo dõi cho đến 7 ngày sau thử thách với virus PED. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống sót của nhóm đối chứng là 55% và tỷ lệ sống sót của lợn con sinh ra từ lợn nái được cho ăn bằng chế phẩm là 65% khi bị nhiễm virus PED, do đó cho thấy hiệu quả chống virus vượt trội hơn so với nhóm đối chứng (Fig.13).

Dựa trên những kết quả trên, xác nhận rằng tỷ lệ tử vong của lợn con đã giảm sau khi nhiễm virus, bởi vì khả năng miễn dịch của lợn nái và các kháng thể trong sữa non được cải thiện bằng cách cho lợn nái ăn chế phẩm, và do đó đã có ảnh hưởng đến khả năng miễn dịch của lợn con.

Ví dụ 9: Chuẩn bị Probiotic chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17

Probiotic chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và probiotic chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được xác định trong ví dụ 1 được sản xuất trên quy mô lớn và sấy đông khô để sản xuất probiotic phù hợp để sử dụng làm nguyên liệu dược phẩm, thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc mỹ phẩm.

Để sản xuất mỗi chủng, từng chủng được ủ trong môi trường MRS lỏng (Difco) ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ trong khi điều chỉnh độ pH đến 6,0 bằng dung dịch NaOH 25%, sau đó thu hoạch các chủng bằng máy ly tâm. Mỗi chủng thu hoạch được đông lạnh ở nhiệt độ -40°C với 5% dextrin và 10% sữa tách kem dùng làm chất bảo quản lạnh, sấy khô ở nhiệt độ 37°C và nghiền thành bột bằng máy trộn. Từng chủng sống dạng bột được trộn lẫn với nhau để điều chỉnh số lượng chủng đến mức mong muốn. Hỗn hợp này được trộn với lượng tá dược thích hợp như glucoza, lactoza và sữa tách kem để lưu trữ và được đóng gói trong túi nhôm có thể bịt kín.

Các probiotic có thể được áp dụng cho các lĩnh vực khác nhau theo một phương pháp thông thường trong kỹ thuật, như dược phẩm, thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm và loại 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 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 và phạm vi của sáng chế và các đương lượng của nó đều nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa:

(a) chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P; và

(b) chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12249P.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm có hoạt tính chịu axit, chịu dịch mật, và tăng cường miễn dịch, trong đó hoạt tính tăng cường miễn dịch và tăng cường tiết xytokin bằng cách thúc đẩy kích hoạt các tế bào miễn dịch.

3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó xytokin có ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm IL-10, IL-12 và TGF-beta.

4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm có hoạt tính kháng virus chống lại virus tiêu chảy trên lợn (PEDV).

5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chủng (a) và (b) ở dạng nguyên chủng, sản phẩm phân giải của chúng, môi trường nuôi cấy của chúng, sản phẩm cô đặc của chúng, hoặc dạng sấy khô của chúng.

6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó chế phẩm còn chứa chất bảo quản lạnh và tá dược.

7. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó chất bảo quản lạnh có ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm glyxerol, trehaloza, maltodextrin, sữa bột tách béo và tinh bột, và

tá dược có ít nhất một loại được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, đextrin và sữa tách kem.

8. Phương pháp điều chế chế phẩm probiotic, bao gồm các bước:

điều chế từng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P; và chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP17 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12249P; và

trộn chế phẩm chứa chủng CJLP475 và chế phẩm chứa chủng CJLP17.

9. Phương pháp theo điểm 8, còn bao gồm bước bổ sung chất phụ gia vào ít nhất một trong các chế phẩm chứa chủng CJLP475, chế phẩm chứa chủng CJLP17 hoặc chế phẩm probiotic.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó phụ gia là chất bảo quản lạnh và phương pháp này còn bao gồm bước làm đông khô sau khi bổ sung phụ gia.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó chủng trong chế phẩm đông khô ở trạng thái sống.
12. Phương pháp theo điểm 8, còn bao gồm bước đóng gói lượng được xác định trước của chế phẩm vào bao gói sau bước trộn.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó ở bước đóng gói, chế phẩm được chuẩn bị cho vào bao gói sao cho tổng số chủng chứa chủng CJLP475 và chủng CJLP17 tối thiểu là 10^6 CFU/g.

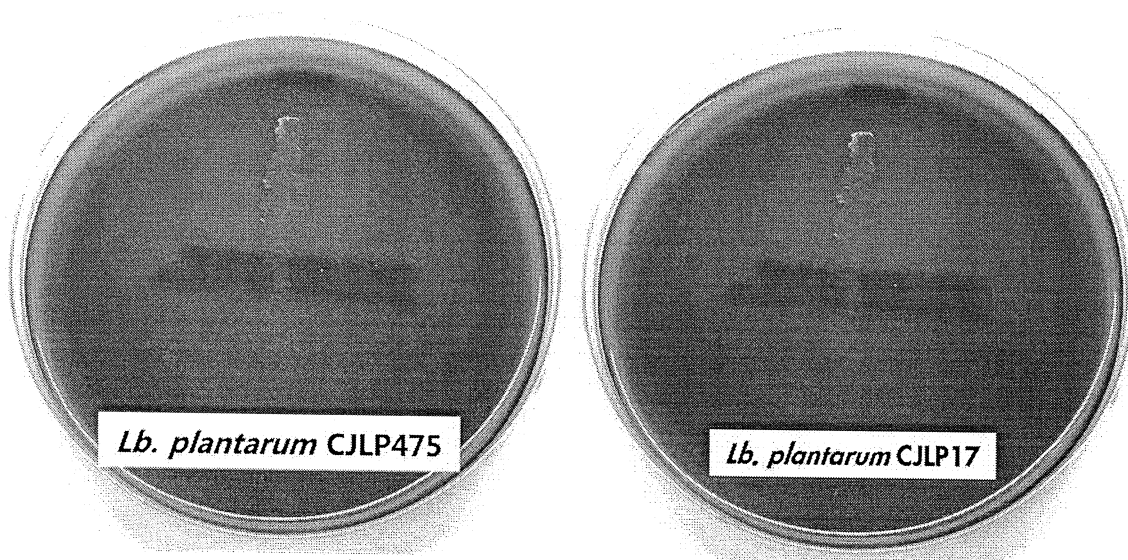


Fig.1

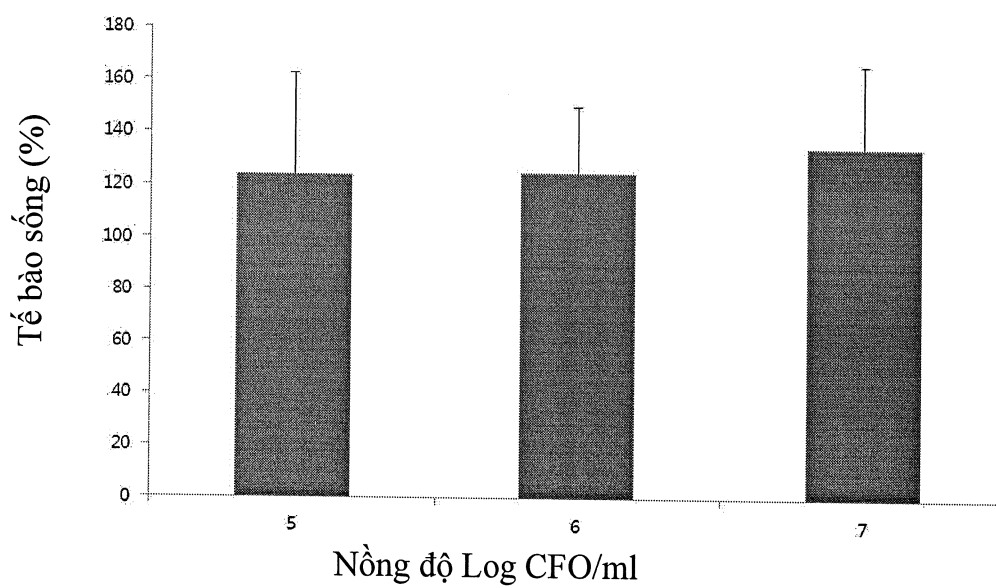
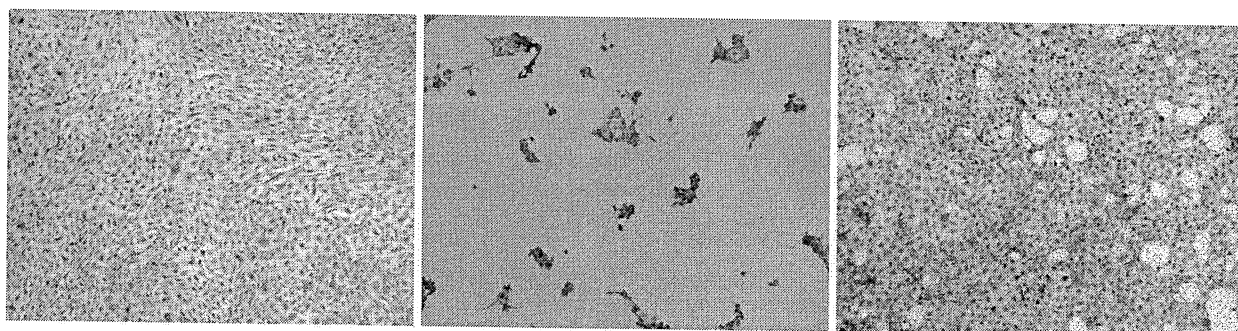


Fig.2



Tế bào IPEC-J2 không bị nhiễm

PEDv trên tế bào IPEC-J2

CJLP 17/475 và PEDv trên tế bào IPEC-J2

Fig.3

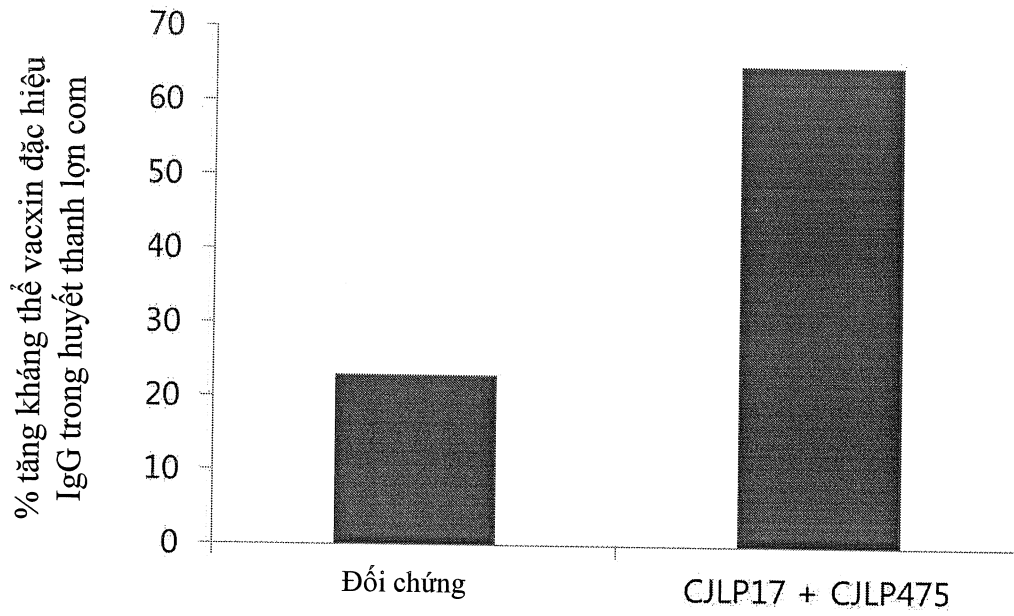


Fig.4

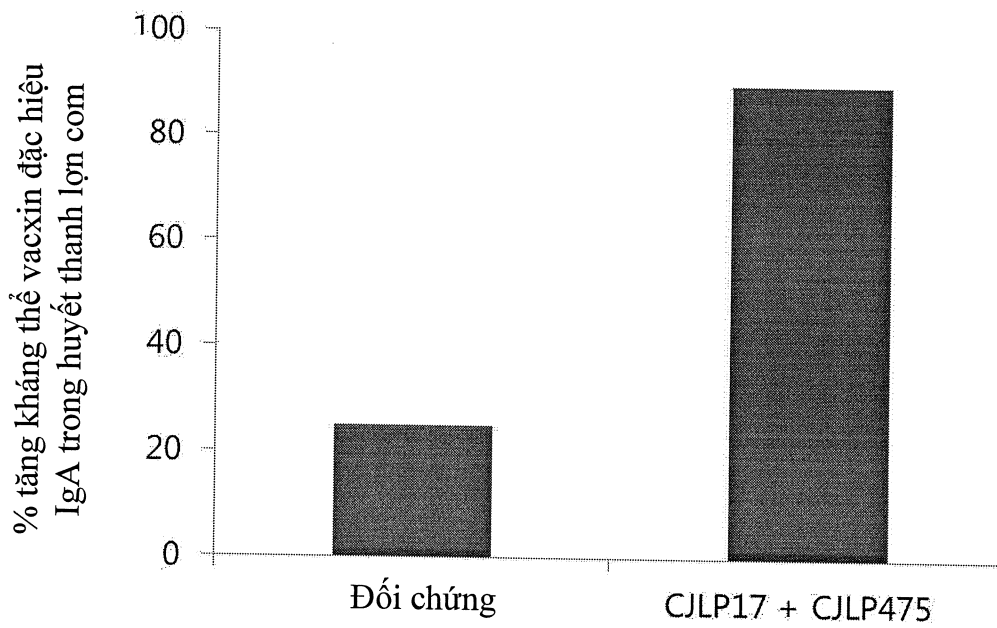


Fig.5

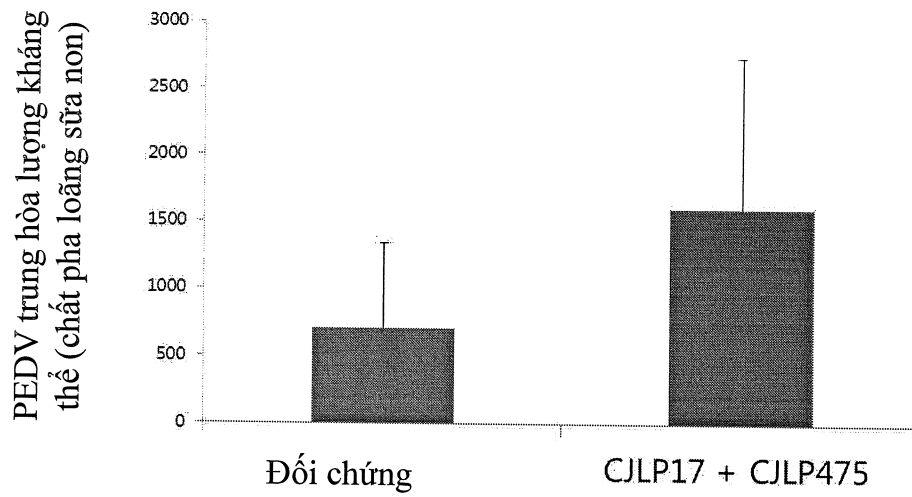


Fig.6

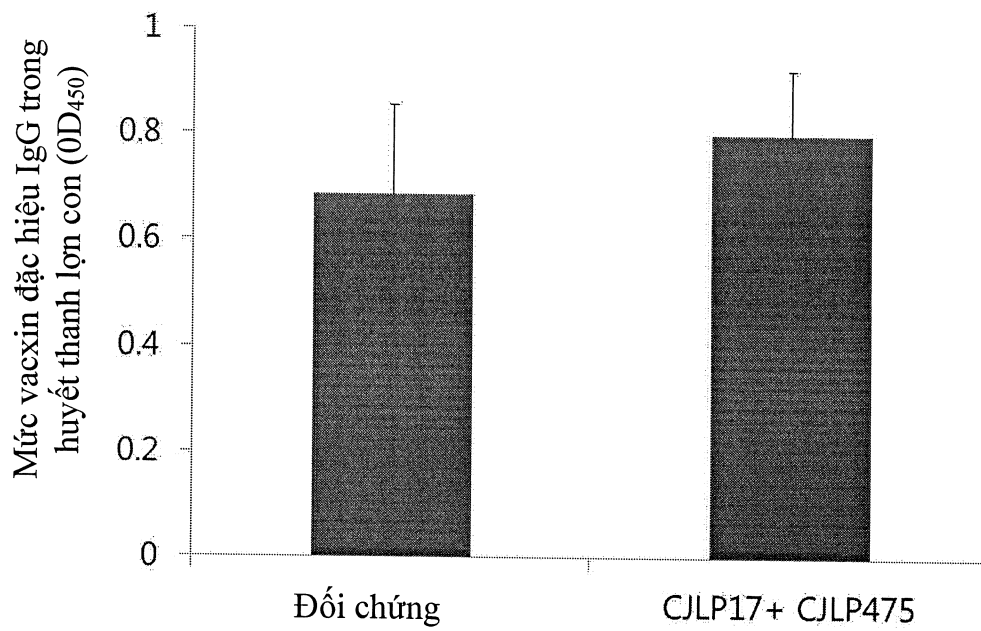


Fig.7

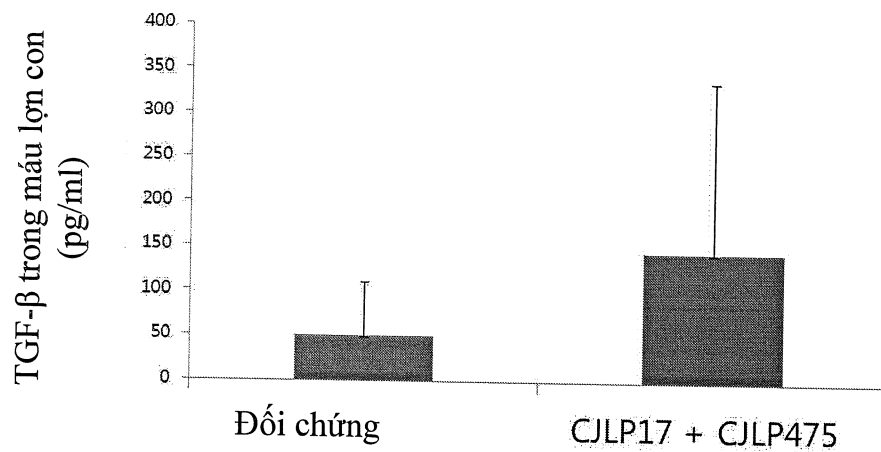


Fig.8

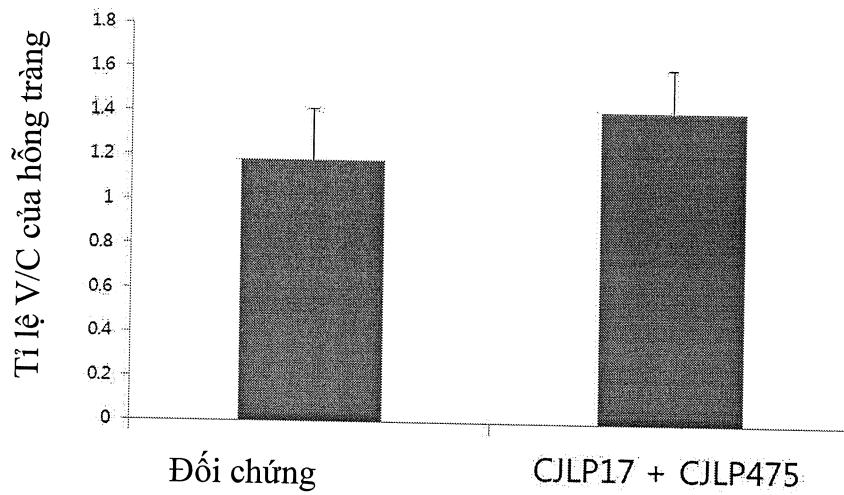


Fig.9

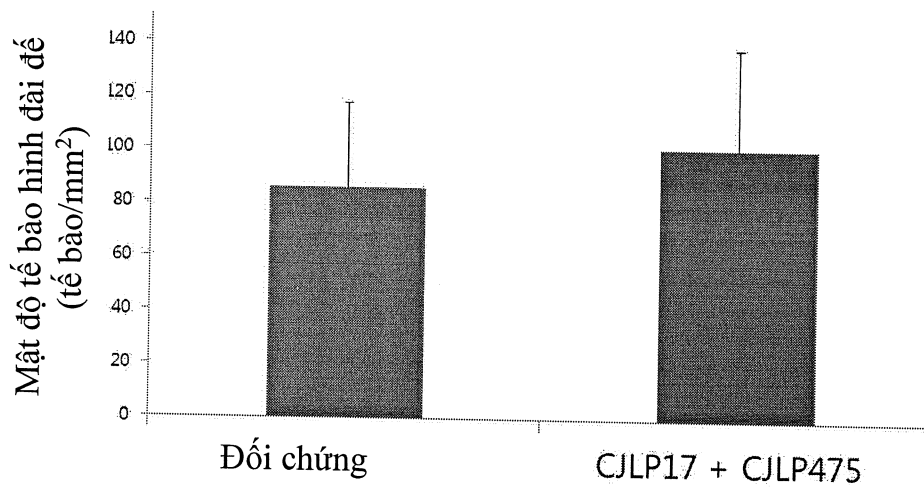


Fig.10

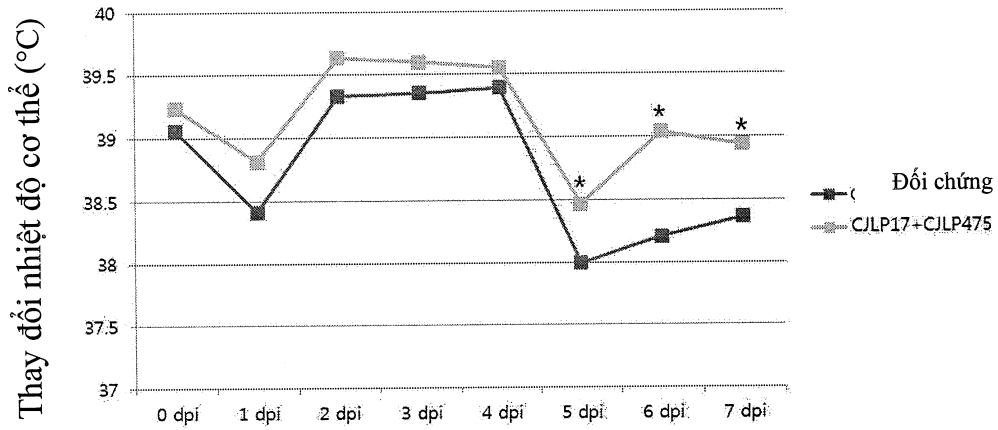


Fig.11

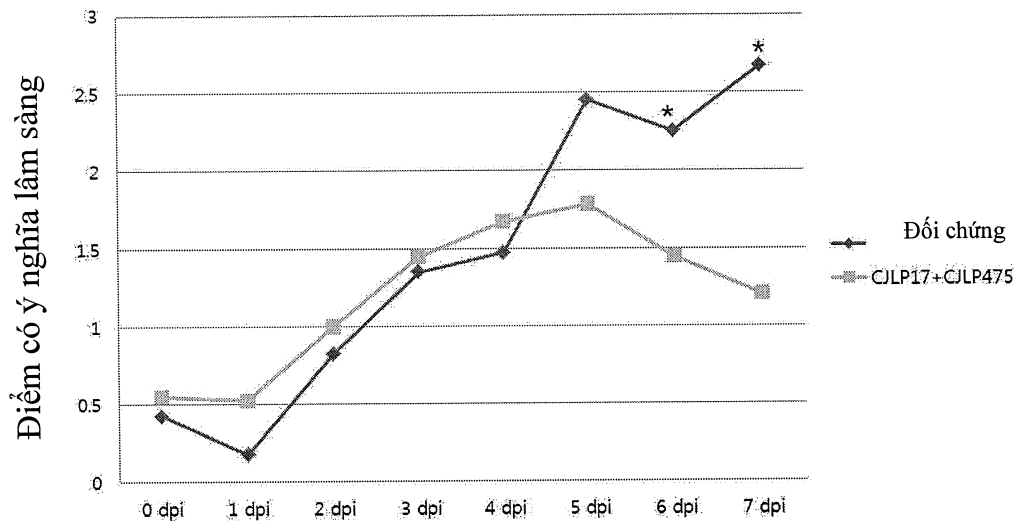


Fig.12

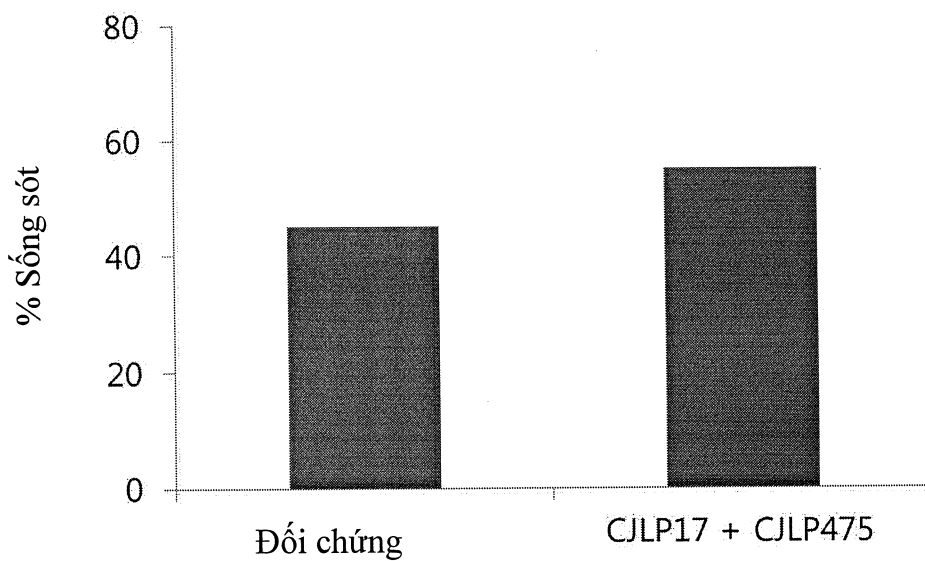


Fig.13

DANH MỤC TRÌNH TỰ GEN

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> CHẾ PHẨM CHỨA CHỦNG *LACTOBACILLUS PLANTARUM* CJLP475 VÀ CHỦNG *LACTOBACILLUS PLANTARUM* CJLP17, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM PROBIOTIC

<130> OPA19037

<150> KR 10-2018-0081909

<151> 2018-07-13

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1454

<212> ADN

<213> Không xác định

<220>

<223> *Lactobacillus plantarum* CJLP475

<400> 1

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact	60
ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct	120
aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagtttga aagatggctt cggctatcac	180
ttttggatgg tcccgcggcg tattagctag atggtggggt aacggctcac catggcaatg	240
atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc	300
ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc	360
gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga	420
gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacgggctaac tacgtgccag	480

38941

cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt aaagcgagcg 540
 caggcggttt ttaagtctg atgtgaaagc cttcggctca accgaagaag tgcacgga 600
 actgggaaac ttgagtgcag aagaggacag tggaaactca tgtgtagcgg tgaaatgcgt 660
 agatatatgg aagaacacca gtggcgaagg cggctgtctg gtctgtaact gacgctgagg 720
 ctcgaaagta tgggtagcaa acaggattag ataccctggg agtccatacc gtaaacgatg 780
 aatgctaagt gttggagggt ttccgccctt cagtgtctga gctaacgcat taagcattcc 840
 gcctggggag tacggccgca aggctgaaac tcaaaggaat tgacgggggc cgcacaagc 900
 ggtggagcat gtggtttaat tcgaagctac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatact 960
 atgcaaactt aagagattag acgttcctt cggggacatg gatacagggt gtgcatggtt 1020
 gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca acccttatta 1080
 tcagttgcca gcattaagtt gggcactctg gtgagactgc cggtgacaaa cgggaggaag 1140
 gtggggatga cgtcaaatca tcatgccctt tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg 1200
 gatgttacia cgagttgcga actcgcgaga gtaagctaat ctcttaaagc cattctcagt 1260
 tcggattgta ggctgcaact cgcctacatg aagtcggaat cgctagtaat cgcggatcag 1320
 catgccgagg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgagagtt 1380
 tgtaacaccc aaagtcggtg gggtaacctt ttaggaacca gccgcctaag gtgggacaga 1440
 tgattagggt gaag 1454

<210> 2

<211> 1333

<212> ADN

<213> Không xác định

<220>

<223> *Lactobacillus plantarum* CJLP17

<400> 2

gacgggCGgt gtgtacaagg cccgggaacg tattcaccgc ggcAtgctga tccgcgatta	60
ctagcGattc cgacttcatg taggcgagtt gcagcctaca atccgaactg agaatggctt	120
taagagatta gcttactctc gcgagttcgc aactcgttgt accatccatt gtagcacgtg	180
tgtagcccag gtcataaggG gcatgatgat ttgacgtcat cccaccttc ctccggtttg	240
tcaccggcag tctcaccaga gtgcccaact taatgctggc aactgataat aagggttgcg	300
ctcgttgcgG gacttaacc aacatctcac gacacgagct gacgacaacc atgcaccacc	360
tgtatccatg tccccgaagg gaacgtctaa tctcttagat ttgcatagta tgtcaagacc	420
tggtAaggtt cttcgcgtag cttcgaatta aaccacatgc tccaccgctt gtgcgggccc	480
ccgtcaattc ctttgagttt cagccttgcg gccgtactcc ccaggcggaa tgcttaatgc	540
gtagctgca gcaactgaagg gcggaaacc tccaacactt agcattcatc gtttacggta	600
tggactacca gggatctaa tctgtttgc taccatact ttcgagcctc agcgtcagtt	660
acagaccaga cagccgcctt cgccactggT gttcttccat atatctacgc attcaccgc	720
tacacatgga gttccactgt cctcttctgc actcaagttt cccagtttcc gatgcacttc	780
ttcggttgag ccgaaggctt tcacatcaga cttaaaaaac cgcctgcgct cgctttacgc	840
ccaataaatc cggacaacgc ttgccaccta cgtattaccg cggctgctgg cacgtagtta	900
gccgtggctt tctggttaaa taccgtcaat acctgaacag ttactcttaa atatgttctt	960
cttaacaac agagttttac gagccgaaac ctttcttcac tcacggggcg ttgctccatc	1020
agactttcgt ccattgtgga agattcccta ctgctgcctc ccgtaggagt ttgggcccgtg	1080
tctcagtccc aatgtggccg attaccctct caggttggtc acgtatcatt gccatggtga	1140

38941

gccgttacct caccatctag ctaatacgcc gcgggacat ccaaaagtga tagccgaagc	1200
catctttcaa actcggacca tgcggtccaa gttgttatgc ggtattagca tctgtttcca	1260
ggtgttatcc cccgcttctg ggcaggtttc ccacgtgtta ctcaccagtt cgccactcac	1320
tcaaagttaa atc	1333