



(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)



1-0039076

(51)⁷ C12N 1/20; A61P 1/16; A61P 3/04;
A61K 36/06; A61P 3/00

(13) B

(21) 1-2019-02164

(22) 28/09/2017

(86) PCT/KR2017/010873 28/09/2017

(87) WO 2018/062914 05/04/2018

(30) 10-2016-0126823 30/09/2016 KR

(45) 25/03/2024 432

(43) 25/10/2019 379A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

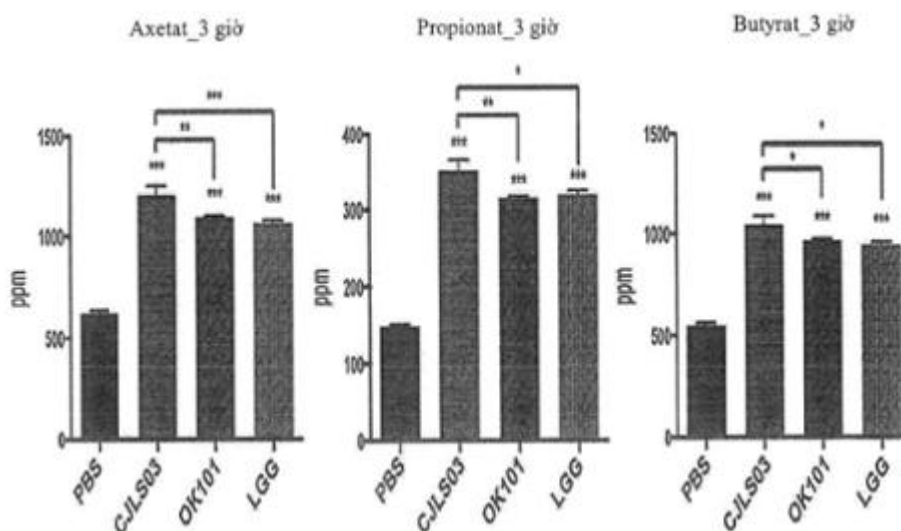
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea

(72) JEONG, Da Hye (KR); CHUNG, Young Mee (KR); KIM, Bong Joon (KR); KIM, So Young (KR); YUN, Hyun Sun (KR); MOON, Byoung Seok (KR); PARK, Jie Eun (KR); BAE, Gi Duk (KR); AHN, Hee Yoon (KR); JANG, Jae Ho (KR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) LACTOBACILLUS SAKEI VÀ CHẾ PHẨM CHỨA VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng *Lactobacillus sakei* mới và chế phẩm chứa vi khuẩn này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến *Lactobacillus sakei* và chế phẩm chứa vi khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gần đây, tỷ lệ những người bị béo phì gia tăng đáng kể do chế độ ăn và lối sống bị phương Tây hoá. Theo báo cáo của National Health Insurance Service năm 2013, tỷ lệ phần trăm bị bệnh béo phì (BMI bằng 30 hoặc cao hơn) ở Hàn Quốc đã tăng gấp 1,7 lần kể từ năm 2002, nghĩa là, từ 2,5% (năm 2002) lên 4,2% (năm 2013), và xu hướng này đã dẫn đến dự báo là cho đến năm 2025, tỷ lệ phần trăm này sẽ tăng đến mức 5,9%. Béo phì được xác định là một tình trạng bệnh lý đặc trưng bởi mô mỡ gia tăng quá mức do hấp thụ năng lượng nhiều hơn là tiêu thụ năng lượng, và có thể còn được xác định bằng các chỉ số như BMI, v.v.. Ở Hàn Quốc, béo phì được xác định là khi BMI bằng 25 hoặc cao hơn, trong khi đó theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) và các nước khác, béo phì được xác định là khi BMI bằng 30 hoặc cao hơn. Béo phì đa phần nổi cộm về mặt tác dụng bất lợi về mặt thẩm mỹ, tuy nhiên, ngoài khía cạnh thẩm mỹ, các quan ngại về sức khoẻ ngày càng gia tăng gần đây đã thu hút nhiều chú ý đến các bệnh về chuyển hoá gây ra do béo phì, như bệnh tiểu đường, chứng tăng lipid huyết, v.v..

Mối quan tâm đến sức khoẻ, mà ngày càng gia tăng cùng với thuật ngữ “khỏe cả thể chất lẫn tinh thần”, đã góp phần đáng kể làm gia tăng nhiều loại thực phẩm trị liệu và các chất trị liệu cho bệnh béo phì. Chiết xuất *Garcinia cambogia* (HCA), axit linoleic được liên hợp (CLA) (Patent Hàn Quốc số 10-1438177), v.v., là các thực phẩm chức năng chống béo phì, là các ví dụ đại diện cho các thực phẩm trị liệu này, và Orlistat (Zenical) là thuốc được Cơ quan Quản lý Dược (FDA) cấp phép lưu hành. HCA và CLA đã biết tương ứng là có hiệu lực chống béo phì thông qua cơ chế ức chế sinh tạo lipid từ các

hydrat cacbon và giảm thiểu các tế bào tạo mỡ. Thuốc Orlistat được FDA cấp phép lưu hành thể hiện hiệu lực chống béo phì tương tự thông qua ức chế hấp thu chất béo, nói một cách chính xác hơn, là thuốc này thể hiện tác dụng chống béo phì bằng cách không hấp thu 30% chất béo trong thức ăn qua ruột và thải trừ phần không hấp thu này qua phân.

Các thuốc và thực phẩm chức năng này đã được sử dụng dưới dạng nhiều loại sản phẩm trên thị trường, tuy nhiên, tác dụng phụ của chúng đang trở thành một vấn đề trong nhiều nghiên cứu và bài báo. Tác dụng phụ hay gặp nhất là hại gan như viêm gan cấp, suy gan, v.v.. Mặc dù chưa xác định được nguyên nhân, theo thông báo mới nhất của National Evidence-based Healthcare Collaborating Agency (NECA), một vài nghiên cứu trong nước và nước ngoài liên quan đến HCA đã công bố rằng có các bệnh nhân bị tổn thương gan hoặc rối loạn tim mạch sau khi dùng thực phẩm chức năng. Ngoài ra, Cơ quan quản lý Thuốc và Thực phẩm của Mỹ (US FDA) gần đây đã cấm bán “hydrocut”, một sản phẩm thực phẩm chức năng chứa HCA, và do đó, cần có nhiều nghiên cứu khảo sát cụ thể và chi tiết về các nguyên nhân. Tuy nhiên, cần thận trọng hơn khi lựa chọn các sản phẩm ăn kiêng chứa các thành phần này. Hiện có nhu cầu ngày càng tăng đối với các sản phẩm liên quan đến chế độ ăn, nhưng do các vấn đề về tính an toàn của chúng, nhiều nguyên liệu để làm thực phẩm đã đang nổi lên như các nguyên liệu thay thế.

Một trong số các nguyên liệu đó là vi khuẩn axit lactic. Các vi khuẩn axit lactic chỉ các vi khuẩn có hoạt tính chuyển hoá phân huỷ các hydrat cacbon thành các axit lactic, và đã biết là chủ yếu có trong các thực phẩm để lên men như kim chi, pho-mát, sữa chua, v.v. (Patent Hàn Quốc số 10-1498229). Các vi khuẩn axit lactic thuộc loại nguyên liệu Nói chung được Công nhận là An toàn (GRAS), nghĩa là, các vi khuẩn này được công nhận là nguyên liệu an toàn theo US FDA, và tính an toàn của chúng đã được chứng minh khi chúng có trong nhiều loại thực phẩm để lên men mà người ta hay ăn. Các vi khuẩn axit lactic, do tính an toàn của chúng được đảm bảo và chúng là các vi sinh vật thu

được từ tự nhiên, đáng tin cậy hơn các thuốc hoá được tổng hợp nói chung hay là thực phẩm biến đổi gen (GMO). Một vài nghiên cứu đã xác định được rằng đối với vấn đề hại gan, đã biết đến là tác dụng phụ nghiêm trọng của các sản phẩm ăn kiêng hiện nay, các vi khuẩn axit lactic có tác dụng có lợi đối với chứng gan nhiễm mỡ không phải do rượu hay chức năng gan.

Nói chung, các vi khuẩn axit lactic đã được thương mại hoá dưới dạng các sản phẩm từ sữa, đồng thời làm nổi bật chức năng điều hoà đường ruột của chúng. Gần đây, hiệu lực của các vi khuẩn axit lactic làm tăng cường miễn dịch và giảm nhẹ bệnh chuyển hoá đã được chứng tỏ ngoài chức năng điều hoà đường ruột, và do đó, việc thương mại hoá tác dụng này thành các sản phẩm men vi sinh thực phẩm chức năng đã được tích cực xúc tiến, và doanh số bán các sản phẩm này tăng trưởng hàng năm. Probiotic chỉ các vi sinh vật có các tính năng hữu ích, và các vi khuẩn axit lactic là vi khuẩn đóng góp đáng kể, thuật ngữ “probiotic” gợi ý một nghĩa tổng quát rộng hơn. Các chức năng tăng cường miễn dịch và giảm nhẹ bệnh chuyển hoá được giải thích liên quan đến hệ vi sinh vật đường ruột, hơn là được hiểu như các tính năng trực tiếp của các vi khuẩn axit lactic.

Các nghiên cứu về hệ vi khuẩn đường ruột và bệnh béo phì ngày càng gia tăng, và các nghiên cứu nhằm chứng tỏ hiệu lực chống béo phì bằng cách sử dụng hệ vi khuẩn hoặc chủng vi khuẩn đơn nhất đã được tiến hành. Ngoài ra, các nghiên cứu về mối tương quan giữa tác dụng chống béo phì và các axit béo mạch ngắn (SFCA) của hệ vi sinh vật đường ruột, hiện cũng đang được tiến hành.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã nỗ lực phát triển một chủng mà đỡ gây hại hơn đối với cơ thể con người và ổn định và có hiệu lực chống béo phì cao, và do đó, các tác giả đã phát triển chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 có khả năng thúc đẩy sản sinh axit béo mạch ngắn bằng cách kiểm soát hệ vi sinh vật đường ruột.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 (KCCM11905P).

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm chứa chủng vi khuẩn nêu trên.

Hiệu quả có lợi

Theo sáng chế, *Lactobacillus sakei* CJLS03 có thể thúc đẩy sản sinh các axit béo mạch ngắn bằng cách điều chỉnh hệ vi sinh vật đường ruột. Cụ thể hơn là, *Lactobacillus sakei* CJLS03, bằng cách làm giảm tỷ lệ *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) trong hệ vi sinh vật đường ruột và gia tăng lượng các axit béo mạch ngắn được sản sinh *in vivo*, đẩy mạnh quá trình oxy hoá và ức chế dự trữ chất béo nội tại, và do đó có hiệu quả không chỉ về tác dụng chống béo phì mà còn ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị các bệnh về chuyển hoá. Ngoài ra, *Lactobacillus sakei* CJLS03 có thể ức chế tích tụ chất béo trong các mô nội tạng và ức chế gia tăng kích cỡ các tế bào tạo mỡ, và do đó có thể được sử dụng làm thành phần có hiệu lực dự phòng, cải thiện hoặc trị liệu đối với bệnh béo phì hoặc các bệnh về chuyển hoá trong nhiều lĩnh vực như dược phẩm, thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm hay thực phẩm, v.v..

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là đồ thị thể hiện lượng butyrat, axetat, và propionat xác định được sau 3 giờ nuôi cấy mỗi nhóm trong mẫu ruột thừa theo Ví dụ 2.

Fig. 2 là đồ thị thể hiện lượng butyrat, axetat, và propionat xác định được sau 6 giờ nuôi cấy mỗi nhóm trong mẫu ruột thừa theo Ví dụ 2.

Fig. 3 là đồ thị thể hiện lượng tương đối của *Firmicutes* xác định được sau 6 giờ nuôi cấy mỗi nhóm trong mẫu ruột thừa theo Ví dụ 3.

Fig. 4 là đồ thị thể hiện lượng tương đối của *Bacteroidetes* xác định được sau 6 giờ nuôi cấy mỗi nhóm trong mẫu ruột thừa theo Ví dụ 3.

Fig. 5 là đồ thị thể hiện tỷ lệ tương đối của *Firmicutes/Bacteroidetes* xác định được sau 6 giờ nuôi cấy mỗi nhóm trong mẫu ruột thừa theo Ví dụ 3.

Fig. 6 là đồ thị thể hiện lượng tương đối của *Bifidobacterium* xác định được sau 6 giờ nuôi cấy mỗi nhóm trong mẫu ruột thừa theo Ví dụ 3.

Fig. 7 là đồ thị thể hiện mức thay đổi trọng lượng cơ thể của mỗi nhóm được xác định theo Ví dụ 4.

Fig. 8 là đồ thị thể hiện lượng tiêu thụ thức ăn của mỗi nhóm được xác định theo Ví dụ 4.

Fig. 9 là đồ thị thể hiện các chỉ số đo các thành phần của máu của mỗi nhóm theo Ví dụ 4.

Fig. 10 là đồ thị thể hiện trọng lượng cơ thể và các mô mỡ của mỗi nhóm theo Ví dụ 4.

Fig. 11 là bảng thể hiện trọng lượng tương đối của các mô mỡ so với trọng lượng cơ thể của mỗi nhóm theo Ví dụ 4.

Fig. 12 là hình ảnh của phân tích mô đối với mô gan của các nhóm ND, HFD, OLS, GC, và CJLS03 cao.

Fig. 13 là đồ thị thể hiện kích cỡ của các tế bào tạo mỡ của các nhóm ND, HFD, OLS, GC, và CJLS03 cao.

Fig. 14 là hình ảnh của các tế bào tạo mỡ của các nhóm ND, HFD, OLS, GC, và CJLS03 cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế được mô tả chi tiết hơn. Đồng thời, mỗi phần mô tả và phương án ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được áp dụng cho các phần mô tả và các phương án ví dụ khác. Nghĩa là, tất cả các tổ hợp của các dấu hiệu được bộc lộ trong bản mô tả này là thuộc phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không được hiểu là bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể dưới đây.

Để đạt được các mục đích nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 (KCCM11905P).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “*Lactobacillus*” là vi sinh vật thuộc nhóm bacillus ưa khí hoặc gram dương kỵ khí tùy ý được phân bổ rộng rãi trong tự nhiên. Các vi sinh vật thuộc giống *Lactobacillus* bao gồm *Lactobacillus sakei*, v.v. Các tác giả sáng chế đề xuất một chủng mới thuộc loài *Lactobacillus sakei* có số Truy cập KCCM11905P. Chủng này tương ứng với chủng probiotic, và vô hại đối với cơ thể con người và có thể sử dụng mà không có tác dụng phụ.

Lactobacillus sakei CJLS03 có trình tự nucleotit 16s rARN nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án ví dụ, chủng CJLS03 có thể có hoạt tính đầy mạnh sản sinh trong ruột các axit béo mạch ngắn, và/hoặc kiểm soát hệ vi sinh vật đường ruột.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “axit béo mạch ngắn (SCFA)” chỉ axit béo có 6 cacbon hoặc ít hơn, và còn được gọi là axit béo phân tử lượng thấp. Các SCFA là tan trong nước, và có rất nhiều trong chất béo sữa. Một phần đáng kể các SCFA được hấp thu vào tĩnh mạch cửa, điều này làm chúng khác biệt với các axit béo mạch dài. Ngoài ra, các SCFA là các chất chuyển hoá cuối cùng của chất xơ trong thức ăn được ăn vào bởi vật chủ, và đã biết là có liên quan nhiều đến chuyển hoá năng lượng. Các SCFA có thể là nguồn năng lượng của các tế bào biểu mô ruột, và tạo ra các tác dụng có lợi cho sức khoẻ, như tăng cường hệ miễn dịch, giảm viêm nhiễm, kiểm soát chuyển hoá năng lượng, v.v.. Ví dụ, tỷ lệ của axetat và propionat (A/P) trong số các SCFA trong máu có liên quan chặt chẽ với BMI, và butyrat ở ruột có tác dụng trị liệu tuyệt vời đối với các bệnh về chuyển hoá khi lượng axit béo này gia tăng ở ruột. Cụ thể hơn là, chế độ ăn tăng cường axetat hoặc butyrat làm giảm tỷ lệ mắc bệnh tiểu đường và gia tăng tiêu thụ năng lượng.

Chủng CJLS03 có thể có hoạt tính đầy mạnh sản sinh SCFA trong ruột.

Ví dụ, SCFA có thể là ít nhất một axit được chọn từ nhóm bao gồm axetat, propionat, và butyrat. Cụ thể hơn là, chủng CJLS03 có thể gia tăng sản sinh trong ruột ít nhất một SCFA được chọn từ nhóm bao gồm axetat, propionat, và butyrat. Nghĩa là, bằng cách gia tăng lượng các SCFA *in vivo*, chủng CJLS03 có thể làm tăng tiêu thụ năng lượng *in vivo*, và có thể hữu ích trong điều trị các bệnh về chuyển hoá. Ví dụ, chủng CJLS03 có thể gia tăng sản sinh trong ruột của axetat, propionat, và/hoặc butyrat từ 1,5 đến 2 lần.

Theo một phương án ví dụ, chủng CJLS03 có thể có hoạt tính kiểm soát hệ vi sinh vật đường ruột.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “hệ vi sinh vật đường ruột” chỉ hệ vi sinh vật có mặt ở ruột, và đã biết là số lượng các vi sinh vật này lớn bằng số lượng các tế bào trong cơ thể con người và có rất nhiều loại. Hệ vi sinh vật đường ruột ảnh hưởng không chỉ môi trường ở ruột mà các vi sinh vật khác thông qua các chất chuyển hoá hoặc các thay đổi về thể chất. Ví dụ, vi sinh vật ở ruột có thể ảnh hưởng đến việc sản sinh xytokin, là protein được sản xuất bởi các tế bào miễn dịch *in vivo* để thay đổi hiệu lực miễn dịch hoặc giảm thiểu các thay đổi về thể chất như rò rỉ ở ruột và giảm nhẹ các tác dụng gây viêm nhiễm nhằm làm tăng cường tính miễn dịch. Đối với các bệnh về chuyển hoá, vi sinh vật ở ruột có thể ảnh hưởng đến khả năng hấp thu chất béo *in vivo*, sản sinh hoặc giảm thiểu tế bào tạo mỡ, v.v., hoặc kiểm soát bài tiết hormon.

Ví dụ, các vi sinh vật ở ruột bao gồm *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, v.v.. *Firmicutes* là gram dương, trong khi đó *Bacteroidetes* là gram âm, và các vi khuẩn này là thành viên cư trú chính trong số các vi sinh vật ở ruột. Các vi sinh vật này có thể ảnh hưởng đến bệnh béo phì hoặc các bệnh về chuyển hoá. Ví dụ, nghiên cứu về vi sinh vật ở ruột và hệ vi sinh vật đường ruột của nhóm bị béo phì và không bị béo phì đã ghi nhận là nhóm bị béo phì bao gồm lượng đáng kể vi sinh vật ở ruột ngành *Firmicutes* trong khi đó nhóm không bị béo phì không bao gồm nhiều vi sinh vật ở ruột ngành *Bacteroidetes*. Điều này gợi ý là nồng độ *Firmicutes* ở ruột gia tăng có

thể gây cảm ứng béo phì do hấp thụ năng lượng gia tăng, trong khi đó gia tăng *Bacteroidetes* ở ruột có thể ức chế béo phì.

Chủng CJLS03 có thể có hoạt tính kiểm soát hệ vi sinh vật đường ruột. Cụ thể hơn là, chủng CJLS03 có thể có hoạt tính làm giảm tỷ lệ của *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) ở ruột so với trường hợp khi không có chủng CJLS03. Ví dụ, chủng CJLS03 có thể làm giảm tỷ lệ của *Firmicutes/Bacteroidetes* ở ruột xuống còn khoảng từ 40% đến 60%. Ngoài ra, chủng CJLS03 có thể làm tăng lượng các vi sinh vật giống *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*, các chủng này đã được biết là các chủng có lợi ở ruột. Nói cách khác, chủng CJLS03 có thể làm giảm tỷ lệ của *Firmicutes/Bacteroidetes* ở ruột và gia tăng các chủng có lợi ở ruột, và do đó có thể hữu ích để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị các bệnh về chuyển hoá.

Ngoài ra, chủng CJLS03 không có tác dụng phụ *in vivo*, và do đó có thể ức chế tích lũy chất béo ở các mô và gia tăng kích cỡ tế bào tạo mỡ. Chủng CJLS03 có thể thể hiện hiệu lực chống béo phì tương tự hoặc tốt hơn các chất chống béo phì đã biết trong lĩnh vực này, mặc dù có thể còn tùy thuộc vào nồng độ sử dụng CJLS03 hoặc từng đối tượng. Cụ thể hơn là, chủng CJLS03 có thể ức chế tích lũy chất béo trong mô màng treo ruột hoặc mô mỡ dưới da và gia tăng kích cỡ tế bào tạo mỡ.

Chủng CJLS03 có thể có hoạt tính làm giảm nồng độ aspartat transaminaza (AST; GOT) hoặc nồng độ alanin transaminaza (ALT; GPT). Khi tiêu thụ liên tục thức ăn có hàm lượng chất béo cao hoặc đồ uống có rượu, các chức năng gan có thể bị gây tổn hại một phần, mà có thể gây ra bệnh gan như gan nhiễm mỡ. Thông thường, xét nghiệm gan được tiến hành thông qua xét nghiệm AST hoặc ALT trong máu, trong đó nồng độ AST hoặc ALT bằng 40 IU/L hoặc thấp hơn được chẩn đoán là bình thường và nồng độ cao hơn được chẩn đoán là có tổn thương gan. Một vài chất chống béo phì đã biết thông thường có khả năng ức chế tích lũy chất béo ở mô mỡ, nhưng không thể làm giảm nồng độ AST hoặc ALT. Nói cách khác, do một vài chất chống béo phì

đã biết thông thường không thể ngăn ngừa hoặc cải thiện tổn thương mô gan, nguy cơ bị bệnh gan như gan nhiễm mỡ có thể vẫn hiện hữu nếu sử dụng các chất này. Tuy nhiên, chủng CJLS03, so với trường hợp không có chủng CJLS03, có thể ức chế gia tăng nồng độ AST và/hoặc ALT *in vivo* hoặc giảm thiểu nồng độ AST và/hoặc ALT *in vivo*. Trái ngược với một vài chất chống béo phì đã biết, chủng CJLS03 không chỉ ngăn ngừa tích lũy chất béo ở mô mỡ mà còn ức chế tích lũy chất béo ở mô gan và ngăn ngừa hoặc điều trị tổn thương mô gan.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chủng CJLS03. Mô tả chi tiết về chủng này được đề cập ở trên.

Chế phẩm này còn chứa chất bảo quản đông lạnh hoặc tá dược. Cụ thể hơn là, chế phẩm này còn chứa ít nhất một chất bảo quản đông lạnh được chọn từ nhóm bao gồm glyxerol, trehaloza, maltodextrin, bột sữa gầy, và tinh bột; và/hoặc ít nhất một tá dược được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, dextrin, và sữa không béo. Chất bảo quản đông lạnh theo sáng chế có thể được bao gồm với lượng từ 0,01% đến 20% theo trọng lượng hoặc từ 0,01% đến 10% theo trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của chế phẩm. Cụ thể là, glyxerol, trehaloza, maltodextrin, bột sữa gầy, và tinh bột có thể bao gồm trong chế phẩm với lượng tương ứng từ 5% đến 20% theo trọng lượng, từ 2% đến 10% theo trọng lượng, từ 2% đến 10% theo trọng lượng, từ 0,5% đến 2% theo trọng lượng, và từ 0,1% đến 1% theo trọng lượng. Ngoài ra, tá dược có thể được bao gồm với lượng từ 75% đến 95% theo trọng lượng hoặc từ 85% đến 95% theo trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của chế phẩm.

Theo một phương án ví dụ, chế phẩm có thể là một chế phẩm được chọn từ nhóm bao gồm thực phẩm, thực phẩm chức năng, thức ăn chăn nuôi, phụ gia thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm, dược phẩm, và dược mỹ phẩm.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chế phẩm để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh chuyển hoá, chứa chủng CJLS03.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh chuyển hoá”

nói chung chỉ tất cả các loại bệnh xuất hiện do các vấn đề về chuyển hoá, và còn được gọi là rối loạn chuyển hoá hoặc hội chứng chuyển hoá. Bệnh chuyển hoá bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh có thể ngăn ngừa hoặc điều trị bằng cách sử dụng chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 làm thành phần hoạt tính; ví dụ, bệnh chuyển hoá có thể ít nhất là một bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh béo phì, bệnh tiểu đường, bệnh cao huyết áp, bệnh tăng lipit huyết, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh đột quỵ, và bệnh tim mạch.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh tiểu đường” chỉ bệnh xuất hiện khi có thiếu hụt bài tiết insulin hoặc thiếu hụt tác dụng hoặc chức năng của insulin. Bệnh tiểu đường gây tăng bất thường nồng độ glucoza trong máu do phân huỷ quá mức protein và các lipit, mà có thể dẫn đến glucoza niệu và keton niệu. Bệnh tiểu đường có thể gây các rối loạn về chuyển hoá như cô đặc máu, rối loạn tuần hoàn, hoặc rối loạn thận, các chứng này được gây cảm ứng bởi mất các chất điện giải do bất thường về chuyển hoá nước và các chất điện giải. Bệnh tiểu đường có thể được phân loại thành bệnh tiểu đường phụ thuộc insulin (Týp I) và bệnh tiểu đường không phụ thuộc insulin (Týp II). Insulin là chất được bài tiết từ các tế bào β của đảo Langerhans có trong tụy, và điều hoà các hoạt động chuyển hoá cung cấp năng lượng, bài tiết insulin gia tăng khi nồng độ glucoza trong máu gia tăng, trong khi đó, bài tiết insulin bị ức chế khi nồng độ glucoza trong máu giảm đi. Bệnh tiểu đường nói chung được chuẩn đoán bằng cách xác định nồng độ glucoza trong máu. Ví dụ, những người được chẩn đoán bị bệnh tiểu đường khi nồng độ glucoza bình thường trong máu là 200 mg/dL hoặc cao hơn hoặc khi nồng độ glucoza lúc nhịn đói trong máu là 140 mg/dL hoặc cao hơn. Do đó, bệnh tiểu đường có thể được điều trị hoặc ngăn ngừa nếu nồng độ glucoza giảm đi trong máu hoặc gan.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh cao huyết áp” chỉ tình trạng bệnh lý, trong đó áp lực động mạch cao một cách mãn tính. Bệnh cao huyết áp cũng chỉ trường hợp khi người trưởng thành là 18 tuổi hoặc cao hơn có áp lực tâm thu bằng 140 mmHg hoặc cao hơn hoặc áp lực tâm trương

bằng 90 mmHg hoặc cao hơn, và có thể xảy ra do béo phì, v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh tăng lipit huyết” chỉ bệnh xuất hiện do gia tăng nồng độ các lipit trong máu do chuyển hoá bất thường các chất béo triglyxerit, cholesterol, v.v.. Cụ thể là, bệnh tăng lipit huyết bao gồm tăng cholesterol huyết hoặc tăng triglycerit huyết, đây là tình trạng bệnh lý có nồng độ các thành phần lipit gia tăng như các triglyxerit, LDL cholesterol, các phospholipit, các axit béo tự do, v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh xơ vữa động mạch” chỉ tình trạng bệnh lý trong đó các mảng bám chất béo chứa cholesterol, các phospholipit, canxi, v.v. được tích lũy dưới màng nội mạc của mạch máu, làm cho động mạch bị xơ cứng và mất độ đàn hồi, do đó dẫn đến ức chế cấp máu và tăng huyết áp, và cuối cùng là vỡ mạch, đứt động mạch, v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh đột quy” chỉ bệnh gây ra bởi tổn thương đột ngột một phần hoặc toàn bộ chức năng não kéo dài trong một thời gian đáng kể. Bệnh đột quy bao gồm nhồi máu não (bệnh đột quy thiếu máu cục bộ) mà xảy ra do tắc nghẽn mạch máu não, và xuất huyết não (bệnh đột quy xuất huyết) mà xảy ra do vỡ mạch máu, tràn máu vào các mô não.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “rối loạn tim mạch” chỉ bệnh có liên quan đến tim và các mạch máu chính. Các bệnh rối loạn tim mạch chính bao gồm bệnh cao huyết áp, bệnh tim thiếu máu cục bộ, bệnh tim mạch vành, bệnh đau thắt ngực, bệnh nhồi máu cơ tim, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh mạch máu não, bệnh đột quy, và bệnh loạn nhịp tim.

Chủng theo sáng chế có các tác dụng trị liệu và dự phòng đối với bệnh béo phì, bệnh tiểu đường, bệnh cao huyết áp, bệnh tăng lipit huyết, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh đột quy, và các rối loạn tim mạch nêu trên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ngăn ngừa” chỉ can thiệp dẫn đến ức chế hoặc trì hoãn sự khởi phát các bệnh về chuyển hoá như

bệnh béo phì, bệnh tiểu đường, bệnh cao huyết áp, bệnh tăng lipit huyết, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh đột quỵ, các rối loạn tim mạch, v.v. bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế, và thuật ngữ “giảm nhẹ” hoặc “điều trị” chỉ tác động bất kỳ dẫn đến giảm nhẹ các triệu chứng của các bệnh nêu trên hoặc cải thiện một cách có lợi các bệnh này bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế.

Chế phẩm để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị các bệnh về chuyển hoá có thể là dược phẩm mà có thể được sử dụng như thuốc. Nếu chế phẩm theo sáng chế là dược phẩm, chế phẩm này có thể còn chứa chất mang dược dụng.

Chế phẩm chứa chất mang dược dụng có thể ở dạng chế phẩm dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hoá. Khi bào chế chế phẩm này, các chất pha loãng hoặc các tá dược thông thường được sử dụng, như các chất độn, các chất kết dính, các chất thấm ướt, các chất gây phân rã, các chất hoạt động bề mặt v.v. có thể được sử dụng. Các chế phẩm rắn để dùng qua đường miệng bao gồm viên nén, viên tròn, bột, hạt, viên nang v.v., và các chế phẩm dạng rắn này được bào chế bằng cách trộn ít nhất một tá dược (ví dụ, tinh bột, canxi cacbonat, sucroza hoặc lactoza, gelatin, v.v.) với ít nhất một hợp chất. Ngoài các tá dược đơn giản, các chất làm trơn như magie stearat hoặc bột talc cũng được sử dụng. Các chế phẩm dạng lỏng để dùng qua đường miệng bao gồm hỗn dịch, dung dịch, nhũ tương, và xi-rô, v.v., và ngoài nước và parafin lỏng, là các chất pha loãng đơn giản thường được sử dụng, các chế phẩm này có thể chứa nhiều loại tá dược như các chất thấm ướt, các chất điều vị, các chất tạo hương thơm, và các chất bảo quản. Các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hoá bao gồm các dung dịch tiết khuẩn, các dung môi không phải là nước, các hỗn dịch, các nhũ tương, các chất bảo quản đông lạnh, và thuốc đạn. Các dung môi không phải là nước hoặc các chất tạo hỗn dịch, propylen glycol, polyetylen glycol, các dầu thực vật như dầu ôliu, các este để tiêm như etyl oleat, v.v. có thể được sử dụng.

Dược phẩm có thể có dạng chế phẩm được chọn từ nhóm bao gồm viên nén, viên tròn, bột, hạt, viên nang, hỗn dịch, dung dịch, nhũ tương, và xi-rô, dung dịch tiết khuẩn, dung môi không phải là nước, hỗn dịch, nhũ tương, chất

bảo quản đông lạnh, và thuốc đạn.

Theo một phương án ví dụ, chế phẩm còn có thể bao gồm chất bảo quản đông lạnh hoặc tá dược. Cụ thể hơn là, chế phẩm này còn chứa ít nhất một chất bảo quản đông lạnh được chọn từ nhóm bao gồm glyxerol, trehaloza, maltodextrin, bột sữa gầy, và tinh bột. Chất bảo quản đông lạnh theo sáng chế có thể được chứa với lượng từ 0,01% đến 20% theo trọng lượng hoặc từ 0,01% đến 10% theo trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của chế phẩm; cụ thể là, glyxerol có thể được chứa với lượng từ 5% đến 20% theo trọng lượng, trehaloza có thể được chứa với lượng từ 2% đến 10% theo trọng lượng, maltodextrin có thể được chứa với lượng từ 2% đến 10% theo trọng lượng còn bột sữa gầy có thể được chứa với lượng từ 0,5% đến 2% theo trọng lượng, và tinh bột có thể được chứa với lượng từ 0,1% đến 1% theo trọng lượng trong chế phẩm tính theo tổng trọng lượng của chế phẩm. Ngoài ra, tá dược có thể ít nhất là một tá dược được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, dextrin, và sữa không béo. Cụ thể hơn là, tá dược có thể được chứa với lượng từ 75% đến 95% theo trọng lượng hoặc từ 85% đến 95% theo trọng lượng tính theo tổng trọng lượng của chế phẩm.

Chế phẩm theo sáng chế được dùng với lượng hữu hiệu được dụng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng hữu hiệu được dụng” chỉ lượng đủ để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở tỷ lệ nguy cơ/lợi ích hợp lý hiện áp dụng cho điều trị y học bất kỳ. Mức liều lượng hữu hiệu có thể được xác định tùy thuộc vào các yếu tố bao gồm loại đối tượng và mức độ nghiêm trọng của bệnh, tuổi tác, giới tính, hoạt tính của dược chất, độ nhạy cảm của đối tượng đối với dược chất, thời gian dùng, đường dùng, tốc độ bài tiết, thời gian điều trị, các thuốc được sử dụng kết hợp, và các yếu tố khác đã biết trong lĩnh vực y học.

Chất dự phòng hoặc trị liệu theo sáng chế cho các bệnh về chuyển hoá, ví dụ, bệnh béo phì, bệnh tiểu đường, bệnh cao huyết áp, bệnh tăng lipit huyết, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh đột quỵ, các rối loạn tim mạch, v.v., có thể được

dùng hàng ngày hoặc cách quãng. Liều dùng hàng ngày có thể sử dụng làm một lần hoặc chia thành từ 2 đến 3 lần. Nếu 2 thành phần hoạt tính là các chế phẩm đơn liều, số lần dùng có thể là khác nhau hoặc giống nhau. Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng đơn độc hoặc kết hợp với các thuốc khác để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh về gan. Quan trọng là sử dụng chế phẩm với lượng tối thiểu mà thể hiện tác dụng tối đa đồng thời không gây ra các tác dụng phụ, có xét đến các yếu tố nêu trên, và lượng này có thể dễ dàng xác định được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh chuyển hoá, bao gồm cho đối tượng cần điều trị này dùng chế phẩm này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng” chỉ tất cả các động vật kể cả người, trong đó đã phát bệnh ung thư hoặc có khả năng phát bệnh. Các bệnh này có thể được ngăn ngừa hữu hiệu và điều trị bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế bao gồm *Lactobacillus sakei* chủng CJLS03 (KCCM11905P) làm thành phần hoạt tính cho đối tượng này. Đối tượng chỉ tất cả các động vật có vú bao gồm chó, bò, ngựa, thỏ, chuột nhắt, chuột cống, gà, hoặc người, nhưng không chỉ giới hạn ở các đối tượng này.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể hiểu được là liều lượng tối ưu và khoảng cách dùng để sử dụng cho một cá thể chế phẩm theo sáng chế sẽ được xác định tùy thuộc vào tính chất và mức độ của bệnh đang điều trị, dạng liều lượng, đường dùng và vị trí dùng thuốc, và tuổi tác, và thể trạng sinh lý của đối tượng đang điều trị. Có thể sử dụng lặp lại thường xuyên nếu thích hợp. Nếu có tác dụng phụ bất kỳ, có thể thay đổi liều lượng và tần suất sử dụng theo cách điều trị trên lâm sàng thông thường.

Đường dùng thông thường bất kỳ có thể được sử dụng cho chế phẩm miễn là chế phẩm này đến được mô đích. Chế phẩm theo sáng chế có thể sử dụng trong màng bụng, trong tĩnh mạch, hoặc qua đường miệng, nhưng không chỉ giới hạn ở các đường dùng này. Ngoài ra, chế phẩm có thể được sử dụng

bằng dụng cụ bất kỳ mà có thể tạo điều kiện cho hoạt chất di chuyển đến mô đích.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa chủng theo sáng chế.

Cụ thể là, chế phẩm theo sáng chế có thể được bổ sung vào chế phẩm thực phẩm để ngăn ngừa hoặc giảm nhẹ các bệnh về chuyển hoá như bệnh béo phì, bệnh tiểu đường, bệnh cao huyết áp, bệnh tăng lipit huyết, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh đột quỵ, các rối loạn tim mạch, v.v.. Chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 (KCCM11905P) là như mô tả ở trên. Chế phẩm thực phẩm có thể chứa chất mang chấp nhận được về mặt dinh dưỡng.

Chế phẩm thực phẩm theo sáng chế bao gồm tất cả các dạng thực phẩm chức năng, thực phẩm bổ sung dinh dưỡng, thực phẩm bảo vệ sức khoẻ, chất phụ gia thực phẩm, v.v., và các chế phẩm thực phẩm này có thể được sản xuất ở nhiều dạng khác nhau theo các phương pháp thông thường trong lĩnh vực này.

Khi sử dụng chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 làm phụ gia thực phẩm, chủng này có thể được thêm vào nguyên dạng hoặc có thể được sử dụng cùng với các thực phẩm hoặc thành phần thực phẩm khác, và có thể được sử dụng thích hợp theo các phương pháp thông thường. Lượng các thành phần hoạt tính sẽ trộn có thể được xác định một cách thích hợp theo mục đích sử dụng (ngăn ngừa, bảo vệ sức khoẻ, hay điều trị trị liệu). Khi pha chế thực phẩm hoặc đồ uống, các thành phần hoạt tính nói chung được thêm vào chế phẩm thô chứa chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 với lượng từ 0,0001% đến 1% theo trọng lượng, cụ thể là từ 0,001% đến 0,1% theo trọng lượng. Tuy nhiên, trong trường hợp dùng kéo dài vì sức khoẻ và vệ sinh hay để kiểm soát sức khoẻ, lượng này có thể nhỏ hơn.

Không giới hạn ở một loại thực phẩm cụ thể. Các ví dụ về thực phẩm có thể bổ sung các chất bao gồm thịt, xúc xích, bánh mì, sô-cô-la, kẹo, đồ ăn nhẹ, bánh kẹo, piza, mì ăn liền, các mì khác, kẹo gôm, các sản phẩm sữa bao gồm kem, súp các loại, đồ uống, trà, đồ uống năng lượng, đồ uống có rượu và các

multi-vitamin. Các thực phẩm bao gồm tất cả các thực phẩm bảo vệ sức khoẻ theo nghĩa thông thường.

Chế phẩm đồ uống bảo vệ sức khoẻ theo sáng chế, như các đồ uống thông thường, có thể chứa nhiều loại chất điều vị, các hydrat cacbon tự nhiên, v.v. làm các thành phần bổ sung. Các hydrat cacbon tự nhiên được mô tả ở trên là các monosacarit (*ví dụ*, glucoza và fructoza), các disacarit (*ví dụ*, maltoza và sucroza), các polysacarit (*ví dụ*, dextrin và xyclodextrin), và các rượu đường (*ví dụ*, xylitol, sorbitol, erythritol, v.v.). Để làm chất làm ngọt, có thể sử dụng các chất làm ngọt tự nhiên (*ví dụ*, chiết xuất thaumatin và stevia), các chất làm ngọt tổng hợp (*ví dụ*, sacarin và aspartam), v.v.. Tỷ lệ các thành phần bổ sung có thể là từ 0,01 phần theo trọng lượng đến 0,04 phần theo trọng lượng, cụ thể là từ 0,02 phần theo trọng lượng đến 0,03 phần theo trọng lượng tính trên 100 phần theo trọng lượng của chế phẩm theo sáng chế.

Ngoài các chất nêu trên, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa nhiều loại chất dinh dưỡng, các vitamin, các chất điện giải, các chất điều vị, các chất tạo màu, các axit pectic và các muối của chúng, các axit alginic và các muối của chúng, các axit hữu cơ, các chất làm đặc dạng keo có tính bảo vệ, các chất điều chỉnh độ pH, các chất làm ổn định, các chất bảo quản, glycerin, các alcohol, các chất cacbonat hoá được sử dụng trong các đồ uống có ga, v.v.. Tỷ lệ các chất phụ gia là không đáng kể, nhưng các chất phụ gia nói chung được chọn nằm trong khoảng từ 0,01 phần theo trọng lượng đến 0,1 phần theo trọng lượng tính theo 100 phần theo trọng lượng của chế phẩm theo sáng chế. Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các cùi của quả để sản xuất các nước ép hoa quả tự nhiên, nước ép hoa quả, và đồ uống từ rau. Tỷ lệ phần cùi là không đáng kể, nhưng tỷ lệ này nói chung được chọn nằm trong khoảng từ 0,01 phần theo trọng lượng đến 10 phần theo trọng lượng tính theo 100 phần theo trọng lượng của chế phẩm theo sáng chế. Các thành phần này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp với nhau.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn chăn

nuôi hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi chứa chủng theo sáng chế.

Chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 (KCCM11905P) là như mô tả ở trên. Cụ thể là, chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo sáng chế có thể được thêm vào phụ gia thức ăn chăn nuôi để ngăn ngừa hoặc cải thiện bệnh chuyển hoá hoặc chế phẩm thức ăn chăn nuôi chứa vi khuẩn này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “phụ gia thức ăn chăn nuôi” chỉ chất được thêm vào thức ăn chăn nuôi vì nhiều mục đích như bổ sung chất dinh dưỡng và ngăn ngừa giảm sút trọng lượng cơ thể, cải thiện tỷ lệ tận dụng tiêu hoá xenluloza trong thức ăn, cải thiện chất lượng sữa, ngăn ngừa suy giảm sinh sản và tăng cường tỷ lệ thụ thai, ngăn ngừa stress do nhiệt độ cao vào mùa hè, v.v.. Chất phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế tương ứng với thức ăn bổ sung theo Đạo Luật Kiểm Soát Thức ăn chăn nuôi và Thức ăn chăn nuôi Thủy sản, các khoáng chất, như natri hydrat cacbon, bentonit, magie oxit, các khoáng chất composit, v.v.; các khoáng chất vi lượng như kẽm, đồng, coban, selen, v.v.; các vitamin như caroten, vitamin E, vitamin A, vitamin D, và vitamin E, axit nicotinic, phức hợp vitamin B, v.v.; các chất bảo vệ axit amin như methionin, lysin, v.v.; các chất bảo vệ axit béo như canxi axit béo, v.v.; tế bào vi khuẩn sống và nấm men như probiotic (các vi khuẩn axit lactic), môi trường nuôi cấy nấm men, môi trường nuôi cấy nấm, v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “thức ăn chăn nuôi” là thức ăn tự nhiên hoặc nhân tạo bất kỳ, thức ăn dùng cho một bữa ăn, v.v., cho động vật ăn, tiêu thụ và tiêu hoá, hoặc một yếu tố của một bữa ăn. Thức ăn chăn nuôi bao gồm chế phẩm theo sáng chế để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh về chuyển hoá có thể được sản xuất ở nhiều dạng thức ăn chăn nuôi đã biết trong lĩnh vực, cụ thể là bao gồm thức ăn chăn nuôi đậm đặc, thức ăn thô, và/hoặc thức ăn chăn nuôi đặc biệt.

Thức ăn chăn nuôi đậm đặc bao gồm các loại hạt quả như lúa mì, yến mạch, ngô, v.v.; cám như cám gạo, cám lúa mì, cám lúa mạch, v.v., mà là các sản phẩm phụ khi chế biến ngũ cốc, các bã thải, là sản phẩm phụ sau khi chiết

xuất dầu từ đậu tương, hạt cải dầu, hạt vừng, hạt lanh, dừa, cò, v.v.; cặn như các chất tinh bột cặn, là thành phần chính của cặn tinh bột mà còn lại sau khi lấy tinh bột từ khoai lang, khoai tây, v.v.; các chất tan từ cá, là dịch cô đặc phân chất lỏng chiết từ thịt cá, bã cá, và cá, thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc động vật, như bột thịt, bột máu, bột lông vũ, bột sữa gầy, nước sữa sấy khô, thu được sau khi làm khô nước sữa, là cặn thừa sau khi sản xuất pho-mát hoặc casein từ sữa gầy, v.v.; nấm men, rong tiểu cầu, hoặc tảo biển, nhưng không giới hạn ở thức ăn chăn nuôi đậm đặc này.

Thức ăn thô có thể bao gồm thức ăn cỏ tươi, như cỏ đại, cỏ, phân xanh, v.v.; rau củ như củ cải để làm thức ăn chăn nuôi, củ cải đỏ để làm thức ăn chăn nuôi, củ cải rutabagas, là một loại củ cải, v.v.; cỏ ủ tươi, là một loại thức ăn chăn nuôi dự trữ thu được bằng cách cho cỏ tươi, phân xanh, dâu giấy, v.v., vào bể ủ thức ăn gia súc và để lên men axit lactic; cỏ khô có được bằng cách cắt và làm khô cỏ đại, cỏ, rơm rạ để cho gia súc; và lá các cây đậu, nhưng không giới hạn ở các thức ăn này. Thức ăn đặc biệt có thể bao gồm thức ăn khoáng, như vỏ hào, muối mỏ, v.v.; thức ăn chăn nuôi ure như ure hoặc dẫn xuất của nó, diureide isobuten, v.v.; và các chất phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc các thực phẩm bổ sung, mà được thêm với lượng nhỏ vào thức ăn chăn nuôi hỗn hợp để bổ sung các thành phần mà có thể thiếu khi chỉ trộn các thành phần thức ăn chăn nuôi tự nhiên hoặc để làm tăng hạn dùng của thức ăn chăn nuôi, nhưng không chỉ giới hạn ở các thức ăn này.

Chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế để ngăn ngừa hoặc cải thiện các bệnh về chuyển hoá có thể được điều chế theo nhiều phương pháp sản xuất thức ăn chăn nuôi đã biết trong lĩnh vực này bằng cách bổ sung chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 với khoảng nồng độ hữu hiệu thích hợp.

Đối tượng mà chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể sử dụng không bị giới hạn cụ thể miễn là nhằm ngăn ngừa, cải thiện, hoặc điều trị các bệnh về chuyển hoá. Ví dụ, chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể sử dụng cho đối tượng bất kỳ; nghĩa là, động vật không phải là người như khỉ, chó, mèo, thỏ,

chuột lang, chuột cống, chuột nhắt, bò, cừu, lợn, dê, v.v.; chim; cá; v.v..

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất mỹ phẩm chứa chủng theo sáng chế.

Mỹ phẩm có thể được sản xuất ở dạng chế phẩm được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch nước, mỡ bôi ngoài da, kem, bột, nước mỹ phẩm dinh dưỡng, nước mỹ phẩm làm mềm, mặt nạ đắp mặt, nước làm mềm, sữa lỏng, kem nền trang điểm, tinh chất, xà phòng, dung dịch nước làm sạch, xà phòng tắm, kem chống nắng, dầu chống nắng, hỗn dịch, nhũ tương, kem đặc, gel, sữa, bột, xà phòng, chất làm sạch chứa chất hoạt động bề mặt, dầu, phấn nền dạng bột, phấn nền dạng nhũ tương, phấn nền dạng sáp, miếng dán, và dạng xịt, nhưng không giới hạn ở các dạng này. Khi dùng lên da, mỹ phẩm theo sáng chế có thể cho độ bám dính tốt và có thể bao gồm các chế phẩm có thể dùng trực tiếp lên da như mỡ bôi ngoài da, kem, sữa lỏng, kem nền trang điểm, xà phòng, kem chống tia UV, kem đặc, gel, sữa, phấn nền dạng hỗn dịch, phấn nền sáp, son dưỡng môi, v.v., nhưng không giới hạn ở các dạng này.

Ngoài ra, mỹ phẩm theo sáng chế có thể còn chứa ít nhất một chất mang được phép sử dụng trong mỹ phẩm mà thường được dùng trong công thức sản phẩm mỹ phẩm cho da nói chung, ví dụ, dầu, nước, chất hoạt động bề mặt, chất làm ẩm, rượu bậc thấp, chất làm đặc, chất tạo chelat, chất tạo màu, chất bảo quản, và hương liệu, nhưng không giới hạn ở các chất này. Chất mang được phép sử dụng trong mỹ phẩm chứa trong mỹ phẩm theo sáng chế có thể được lựa chọn đa dạng theo dạng chế phẩm. Ví dụ, khi chế phẩm là dạng mỡ, kem đặc, kem, hoặc gel, không chỉ giới hạn ở dầu động vật, dầu thực vật, các loại sáp, parafin, tinh bột, gồm tragacanth, các dẫn xuất xenluloza, các polyetylen glycol, các silicon, các bentonit, silic oxit, bột talc, kẽm oxit, hoặc hỗn hợp các chất này có thể sử dụng làm thành phần chất mang.

Mỹ phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng mỹ phẩm chức năng bằng cách bao gồm thành phần có tác dụng chống oxy hoá, cải thiện nếp nhăn, chống lão hoá, và/hoặc chống nắng. Đối với thành phần có tác dụng chống oxy

hoá, cải thiện nếp nhăn, chống lão hoá, và/hoặc chống tia UV, có thể sử dụng thành phần hoạt tính bất kỳ có tác dụng chống oxy hoá, cải thiện nếp nhăn, chống lão hoá, và/hoặc chống tia UV, mà không giới hạn ở những thành phần này.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất được mỹ phẩm chứa chúng theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “dược mỹ phẩm” chỉ, trong số các vật phẩm được sử dụng để chẩn đoán, điều trị, cải thiện, giảm nhẹ, chữa khỏi hoặc ngăn ngừa bệnh cho người hoặc động vật, những chế phẩm có tác dụng nhẹ hơn thuốc; ví dụ, dược mỹ phẩm, theo luật được chỉ những chế phẩm ngoại trừ các chế phẩm để sử dụng trong y tế, và bao gồm các sản phẩm được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở người hoặc động vật, những chế phẩm có tác dụng nhẹ và gián tiếp lên cơ thể con người, v.v..

Dược mỹ phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng được chọn từ nhóm bao gồm sản phẩm làm sạch toàn thân, bọt, xà phòng, mặt nạ đắp mặt, mỡ, kem, sữa, tinh chất và dạng xịt, nhưng không giới hạn ở các dạng này.

Khi chế phẩm theo sáng chế được sử dụng như chất phụ gia cho dược mỹ phẩm, chế phẩm này có thể được thêm vào đơn độc hoặc được sử dụng kết hợp với các dược mỹ phẩm hoặc thành phần dược mỹ phẩm khác. Chế phẩm này có thể được sử dụng thích hợp theo các phương pháp thông thường. Lượng các thành phần hoạt tính sẽ phối trộn có thể được xác định một cách thích hợp theo mục đích sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn có tham chiếu đến các phương án ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, các phương án ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh hoạ, và sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án minh hoạ này.

Ví dụ 1: Phân lập và nhận biết chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03

CJLS03 theo sáng chế, một chủng *Lactobacillus sakei* mới được phân lập từ kimchi, một món ăn truyền thống của Hàn Quốc, được chọn là chủng probiotic ứng viên thông qua đánh giá tính chất cơ bản và kiểm tra tính an toàn. *Lactobacillus sakei* CJLS03 được phối trộn với 20% glyxerol và được bảo quản ở trong tủ đá nhanh -80°C. Khi được sử dụng làm thí nghiệm, nuôi cấy chủng trong từ 18 đến 48 giờ trong môi trường MRS rắn hoặc lỏng.

Trình tự nucleotit 16S rARN của *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo sáng chế được xét nghiệm để nhận biết và phân loại vi sinh vật, và kết quả là, chủng này thể hiện mức tương đồng cao nhất (99,9%) với chủng *Lactobacillus sakei* chuẩn (gen *Lactobacillus sakei* cho ARN ribosom 16S, trình tự một phần, chủng: qz1215) và có tỷ lệ tương quan phát sinh loài phân tử cao nhất.

Do đó, vi sinh vật mới này được chọn thông qua quy trình nêu trên được nhận biết bằng cách sử dụng *Lactobacillus sakei*, và được gọi là *Lactobacillus sakei* CJLS03. *Lactobacillus sakei* CJLS03 được nộp lưu ngày 26 tháng 9 năm 2016 tại Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM), cơ quan nộp lưu quốc tế theo Hiệp ước Budapest, và nhận Số nộp lưu KCCM11905P. Trình tự nucleotit của gen 16S rARN của *Lactobacillus sakei* CJLS03 là tương tự như SEQ ID NO. 1 trong danh mục trình tự được đính kèm theo bản mô tả này.

Lactobacillus sakei CJLS03 theo sáng chế là vi khuẩn kỵ khí tùy ý gram dương, có thể sinh trưởng trong cả điều kiện kỵ khí và hiếu khí. Vi khuẩn mới này không tạo bào tử hay di chuyển, và có dạng hình que. Các tính chất hình thái học và sinh lý học cụ thể hơn của *Lactobacillus sakei* CJLS03 được phân tích bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, và các kết quả phân tích này được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây. Xác định khả năng tiêu thụ đường của chủng này bằng cách sử dụng các bộ kit API50CH và API50CHL (Biomeriuex). Các tính chất hình thái học, sinh lý, và sinh hoá của CJLS03 đã được khẳng định được tóm tắt trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Tính chất hình thái học, sinh lý, và sinh hoá	Kết quả
Hình thái học	<i>Bacillus</i> (hình que)
Khả năng di chuyển	-
Bào tử	-
Catalaza	-
Lên men đồng nhất-không đồng nhất	Lên men không đồng nhất tùy ý
Tăng sinh ở 15°C	+
Tăng sinh ở 45°C	-
Tăng sinh ở 3% NaCl	+
Tăng sinh kỵ khí	+
Sản sinh CO ₂ sử dụng glucoza	-
Các tính chất lên men đường	
Glyxerol	-
Erythritol	-
D-Arabinosa	-
L-Arabinosa	+
Riboza	+
D-Xyloza	-
L-Xyloza	-
Adonitol	-
Xylosit	-
Galactoza	+
D-Glucoza	+
D-Fructoza	+
D-Mannoza	+
L-Sorboza	-
Rhamnoza	-
Dulcitol	-
Inositol	-
Mannitol	-
Sorbitol	-
D-Mannosit	-
D-Glucosit	-
Glucosamin	+
Amygdalin	-
Albutin	-
Esculin	+
Salicin	-
Cellobioza	+
Maltoza	+
Lactoza	+
Melibioza	+
Saccharoza	+
Trehaloza	-
Inulin	-
Melizitoza	-
D-Raffinoza	-
Amidon	-
Glycogen	-

Xylitol	-
Gentiobioza	-
D-Turanoza	-
D-Lyxzoza	-
D-tagatoza	-
D-Fucoza	-
L-Fucoza	-
D-Arabitol	-
L-Arabitol	-
Gluconat	+
2-Gluconat	-
5-Gluconat	-

+: phản ứng dương tính

-: phản ứng âm tính

Ví dụ 2: Thử nghiệm khẳng định SCFA bằng cách lên men *in vitro*

Lên men *in vitro* là một phương pháp thử nghiệm so sánh đơn giản, bao gồm đồng nuôi cấy từng mẫu phân/ruột thừa của chuột ăn chế độ ăn bình thường với các vi khuẩn axit lactic và xác định các mức thay đổi lượng các axit béo mạch ngắn để khảo sát năng suất sản sinh các axit béo mạch ngắn ở ruột, và quá trình lên men *in vitro* có sử dụng các mẫu phân là phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (Yang và các đồng tác giả, 2013, Salazar và các đồng tác giả, 2009, Hughes và các đồng tác giả, 2008). Tuy nhiên, phương pháp lên men *in vitro* có một vấn đề ở chỗ khi phân phân còn lại, mà không được hấp thu ở ruột được sử dụng làm cơ chất cho quá trình lên men bởi các vi khuẩn axit lactic, lượng cơ chất này không đủ, dẫn đến lên men không đúng cách. Do đó, trong thí nghiệm này, một phương pháp đã biết, trong đó, các chất bên trong ruột thừa của lợn được sử dụng để nghiên cứu cơ chất chuyển hoá ở ruột (Labib và các đồng tác giả, 2004) được sử dụng để tiến hành lên men *in vitro* trong đó các chất của ruột thừa có hàm lượng cơ chất cao hơn phân.

Cụ thể là, các chất của ruột thừa ở chuột ăn chế độ ăn bình thường không được điều trị bằng kháng sinh và probiotic được cho vào túi kỵ khí (MGC) ngay sau khi lấy mẫu này, và sau đó bảo quản ở -80°C trước khi bắt đầu thử nghiệm (Yang và các đồng tác giả, 2013). Trong khi thử nghiệm, mẫu

đã bảo quản được làm tan chảy trong buồng kỵ khí (Coy laboratory), sau đó thêm vào đó PBS tiệt khuẩn theo tỷ lệ 1:2 (trọng lượng/thể tích), và nghiền đồng nhất trong 2 phút. Các nhóm thử nghiệm và đối chứng được sử dụng cho thử nghiệm này là như được trình bày trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

#	Chủng	Đặc điểm chính
1	PBS	Đối chứng âm tính
2	CJLS03	Chủng theo sáng chế
3	OK101	Chủng chống béo phì được cấp (<i>L. sakei</i>)
4	LGG	Chủng probiotic (<i>L. rhamnosus</i>)

Để phân tích các axit béo mạch ngắn, phương pháp phân tích SCFA đã biết được sử dụng, phương pháp này cụ thể như sau: hỗn hợp axit béo không ổn định (ultrapure; Sigma (Supelco)) được sử dụng để phân tích đường đồ thị chuẩn và thời gian lưu phát hiện pic, các axit béo mạch ngắn được chiết xuất từ phân và máu và sau đó so sánh với đường đồ thị chuẩn để phân tích. Tiến hành chiết xuất các axit béo mạch ngắn theo phương pháp chiết xuất đã biết trong lĩnh vực này (Schwiertz và các đồng tác giả, 2010). Dịch chiết bao gồm 0,1 mol/L axit oxalic và 40 mmol/L natri azit được trộn với mẫu (tối đa 80 mg), và lắc ủ trong một giờ ở nhiệt độ trong phòng, tiếp theo phân tách dịch nổi bằng cách ly tâm. Dịch nổi thu được bằng cách ly tâm được phân tích bằng cách sử dụng máy sắc ký khí (Shimadzu GC2010) và bộ phát hiện ion hoá ngọn lửa (FID). Cột được sử dụng là HP INNO-WAS 30 m × 32 mm với nhiệt độ tách 260°C và FID 260°C, và phân tích cột ở nhiệt độ từ 100°C đến 180°C, 25°C/phút, và 27,1 psi.

Trong ví dụ này, 5×10^8 CFU của từng chủng trong số các chủng theo Bảng 2 được chủng nhiễm vào các mẫu ruột thừa đã nghiền đồng nhất, và lắc ủ ở 37°C trong tối đa 24 giờ trong môi trường kỵ khí. Trong quá trình ủ, thực hiện lấy mẫu dịch nuôi cấy tại các thời điểm 3 giờ và 6 giờ từ mỗi nhóm, và SCFA của mỗi nhóm được phân tích theo phương pháp phân tích SCFA.

Fig. 1 thể hiện các khối lượng của butyrat, axetat, và propionat, các lượng này được xác định trong mẫu ruột thừa sau 3 giờ ủ, và Fig. 2 thể hiện các khối lượng của butyrat, axetat, và propionat, các lượng này được xác định trong mẫu ruột thừa sau 6 giờ ủ.

Theo Fig. 1 và Fig. 2, lượng của các axit béo mạch ngắn (butyrat, axetat, và propionat) được sản sinh bằng cách nuôi cấy *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo sáng chế là lớn hơn lượng các axit này được sản sinh khi nuôi cấy OK101 hoặc LGG, là chủng *Lactobacillus sakei* thông thường đã biết. Ngoài ra, khi so sánh Fig. 1 và Fig. 2, mức độ chênh lệch lượng axit béo mạch ngắn lớn hơn sau 6 giờ ủ so với 3 giờ ủ.

Nghĩa là, *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo sáng chế kích thích sản sinh các axit béo mạch ngắn ở ruột, như ruột thừa, do đó gia tăng lượng các axit béo mạch ngắn.

Ví dụ 3: Thử nghiệm các thay đổi của hệ vi sinh vật bằng cách lên men *in vitro*

Theo các nghiên cứu liên quan đến mối tương quan giữa các bệnh về chuyển hoá và hệ vi sinh vật đường ruột, các lượng tương đối của *Bacteroidetes* và *Firmicutes* có mối liên quan chặt chẽ với các bệnh về chuyển hoá. Cụ thể là, lượng tương đối của *Firmicutes* ở ruột đã được báo cáo là tỷ lệ với bệnh béo phì hoặc các bệnh về chuyển hoá.

Trong Ví dụ này, phân tích các vi sinh vật được tạo ra trong mẫu ruột thừa đã được thêm các vi khuẩn axit lactic.

Cụ thể là, các chất của ruột thừa của chuột ăn chế độ ăn bình thường không được điều trị bằng kháng sinh và probiotic được cho vào túi kỵ khí (MGC) ngay sau khi lấy mẫu này, và sau đó bảo quản ở -80°C trước khi bắt đầu thử nghiệm (Yang và các đồng tác giả, 2013). Trong khi thử nghiệm, mẫu đã bảo quản được làm tan chảy trong buồng kỵ khí (Coy laboratory), sau đó thêm vào đó PBS tiệt khuẩn theo tỷ lệ 1:2 (trọng lượng/thể tích), và nghiền

đồng nhất trong 2 phút. Các nhóm thử nghiệm và đối chứng được sử dụng cho thử nghiệm này là như được trình bày trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

#	Chủng	Đặc điểm chính
1	PBS	Đối chứng âm tính
2	CJLS03	Chủng theo sáng chế
3	OK101	Chủng chống béo phì được cấp (<i>L. sakei</i>)
4	LGG	Chủng probiotic (<i>L. rhamnosus</i>)

5×10^8 CFU của từng chủng trong số các chủng đã được chuẩn bị theo Bảng 3 được chủng nhiễm vào các mẫu ruột thừa đã nghiền đồng nhất. PBS tiết khuẩn được thêm vào làm đối chứng âm tính. Các chủng được chủng nhiễm vào mẫu ruột thừa được lắc ủ ở 37°C trong tối đa 24 giờ trong môi trường kỵ khí. Trong quá trình ủ, thực hiện lấy mẫu dịch nuôi cấy ở thời điểm 6 giờ từ mỗi nhóm, và SCFA của mỗi nhóm được phân tích theo phương pháp phân tích SCFA. Tiến hành nghiền bằng hạt (Biospec, 607) các chất của ruột thừa được lấy mẫu từ chuột bằng cách sử dụng 600 μ L dịch đệm phân giải (dịch đệm phân giải Promega ReliaPrep) và 0,3 g hạt zirconi/silic oxit cỡ 0,1 mm. Khi nghiền hạt xong, ly tâm các mẫu, và gom dịch nổi để chiết xuất ARN theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit.

Tổng cộng 20 μ L ARN đã chiết xuất trong dịch đệm rửa giải được phiên mã ngược thành ADN bổ trợ bằng cách sử dụng hệ thống phiên mã ngược Promega GoScript, và hệ vi sinh vật trong mẫu được phân tích bằng cách sử dụng Takara RR820 SYBR Master Mix sử dụng ABI stepone plus hoặc PCR thời gian thực định lượng ABI7500. Hệ vi sinh vật được phân tích bằng cách PCR thời gian thực trong mẫu ADN được phiên mã ngược theo phương pháp Gut Low-Density Array (GULDA) đã biết (Bergstrom và các đồng tác giả, 2012).

Hơn nữa, vi khuẩn đơn vị phân loại được định lượng bằng cách sử dụng được chuẩn hoá theo phương pháp GULDA, và phương pháp phân tích

delta-delta Ct được rút ra dựa trên các giá trị định lượng của các vi khuẩn phổ quát và mỗi nhóm vi khuẩn đối chứng nhằm định lượng so sánh.

Fig. 3 là đồ thị thể hiện lượng so sánh của *Firmicutes* đo được sau 6 giờ ủ của mỗi nhóm trong mẫu manh tràng, và Fig. 4 là đồ thị thể hiện các lượng so sánh của *Bacteroidetes* đo được sau 6 giờ ủ của mỗi nhóm trong mẫu manh tràng.

Theo Fig. 3 và Fig. 4, lượng vi sinh vật ngành *Firmicutes* trong hệ vi sinh vật giảm đi khi ủ *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo sáng chế trong mẫu manh tràng trong 6 giờ, trong khi đó lượng vi sinh vật ngành *Bacteroidetes* tăng lên. Tuy nhiên, khi ủ chủng *Lactobacillus* đã biết thông thường OK101 hoặc LGG, lượng vi sinh vật ngành *Firmicutes* trong hệ vi sinh vật không giảm hoặc chỉ giảm rất ít, và lượng vi sinh vật ngành *Bacteroidetes* không tăng.

Hơn nữa, Fig. 5 là đồ thị thể hiện các tỷ lệ so sánh của *Firmicutes/Bacteroidetes* đo được sau 6 giờ ủ mỗi nhóm trong mẫu manh tràng.

Theo Fig. 5, tỷ lệ *Firmicutes/Bacteroidetes* của mẫu manh tràng trong đó chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 được ủ thấp hơn đáng kể so với tỷ lệ trong đó sử dụng các chủng *Lactobacillus sakei* khác. Nghĩa là, chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo sáng chế có thể hạ thấp tỷ lệ *Firmicutes/Bacteroidetes* ở ruột, và do đó có thể có hiệu lực chống béo phì và hiệu lực dự phòng hoặc trị liệu các bệnh về chuyển hoá.

Ngoài ra, Fig. 6 là đồ thị thể hiện các lượng so sánh của *Bifidobacterium* đo được sau 6 giờ ủ mỗi nhóm trong mẫu manh tràng. *Bifidobacterium* là một vi khuẩn ở ruột có lợi đại diện khác tương tự *Lactobacillus*.

Theo Fig. 6, khi ủ với *Lactobacillus sakei* CJLS03, lượng *Bifidobacterium* gia tăng đáng kể. Nghĩa là, so với các chủng đã biết trước đây, *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo sáng chế có thể thể hiện tác dụng chống béo phì cũng như tác dụng dự phòng và điều trị các bệnh về chuyển hoá đồng thời gia tăng các vi khuẩn có lợi ở ruột.

Ví dụ 4: Thử nghiệm trên chuột gây cảm ứng béo phì bằng chế độ ăn nhiều chất béo với hiệu lực chống béo phì của *Lactobacillus sakei* CJLS03

1) Phương pháp sử dụng và thời gian thử nghiệm

Kể từ khi đến, các con chuột được trải qua một giai đoạn gây cảm ứng-6 tuần, bao gồm 1 tuần để quen với thổ nhưỡng. Các con chuột được chia thành nhóm chế độ ăn bình thường (đối chứng âm tính) và chế độ ăn giàu chất béo (đối chứng dương tính và nhóm thử nghiệm) và mỗi nhóm được cho ăn như vậy, được cho ăn và uống nước thoải mái trong 6 tuần kể từ ngày chia nhóm (ngày 0). CJLS03 theo sáng chế được nhóm lại theo nồng độ (thấp: 10^8 CFU, trung bình: 10^9 CFU, cao: 10^{10} CFU). Để xác định hiệu lực chính xác, thuốc chống béo phì Orlistat đã được cấp phép lưu hành có bán sẵn trên thị trường (Tên sản phẩm: Xenical), và thực phẩm chức năng *Garcinia cambogia* được thêm vào làm nhóm thử nghiệm ngoài nhóm đối chứng chế độ ăn bình thường và nhóm chế độ ăn nhiều chất béo, và so sánh với tác dụng chống béo phì của các vi khuẩn axit lactic. Chi tiết của các nhóm được trình bày trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

		Nhóm	Liều dùng
1	ND	Nhóm đối chứng có chế độ ăn bình thường	-
2	HFD	Nhóm đối chứng có chế độ ăn giàu chất béo	-
3	OLS	Orlistat (Xenical)	40 mg/kg
4	GC	Garcinia	300 mg/kg
5	CJLS03 thấp	Nồng độ CJLS03 thấp	1×10^8 CFU
6	CJLS03 trung bình	Nồng độ CJLS03 trung bình	1×10^9 CFU
7	CJLS03 cao	Nồng độ CJLS03 cao	1×10^{10} CFU

Để sử dụng, các vi khuẩn axit lactic được tạo hỗn dịch đồng nhất trong PBS và cho dùng ở liều dùng 10 mL/kg x 2 lần/ngày ở các thời điểm xác định (từ 10:00 đến 11:00 giờ sáng, từ 5:00 đến 6:00 giờ chiều) trong 7 tuần, đồng

thời các nhóm đối chứng được cho uống cùng lượng chất dẫn (PBS) x 2 lần/ngày trong 7 tuần. Các chất thử nghiệm là mới điều chế và cho vào chũng được dùng vào buổi sáng và buổi chiều. Các chũng được bảo quản trong tủ lạnh để giữ được tình trạng hoạt tính của chúng, và PBS được bảo quản trong tủ lạnh để sử dụng rửa các mẫu chũng và pha chế các dung dịch. Chuột thử nghiệm trong mỗi nhóm được để nhịn ăn 16 giờ và giết vào ngày kết thúc thử nghiệm (ngày 49) được sử dụng để làm xét nghiệm sinh hoá máu và phân tích đánh giá mô.

2) Xác định trọng lượng cơ thể và lượng thức ăn tiêu thụ

Để các định các mức thay đổi trọng lượng cơ thể theo thời gian, xác định trọng lượng cơ thể một lần/tuần trong giai đoạn gây cảm ứng béo phì (6 tuần) và hai lần/tuần trong giai đoạn sử dụng chất thử nghiệm (7 tuần) ở thời gian định trước. Xác định lượng thức ăn hàng ngày một lần/tuần (khi xác định trọng lượng cơ thể) trong toàn bộ thời gian thử nghiệm (6 tuần) ở thời gian định trước bằng cách trừ đi lượng còn lại xác định được sau 24 giờ khỏi lượng lượng thức ăn.

Fig. 7 là đồ thị thể hiện các mức thay đổi trọng lượng cơ thể của mỗi nhóm theo Ví dụ nêu trên.

Theo Fig. 7, vào thời điểm mà tác dụng ức chế tăng trọng lượng cơ thể xuất hiện và mức độ của tác dụng này được phân tích tổng hợp, chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo sáng chế được khẳng định là thể hiện tác dụng ức chế tuyệt vời đối với sự tăng trọng lượng cơ thể khi nồng độ của chũng gia tăng. Cụ thể là, tác dụng ức chế tăng trọng lượng cơ thể của chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 không chỉ thể hiện mức tác dụng cao hơn so với thực phẩm chức năng chống béo phì Garnicia, mà còn có tác dụng tương tự như thuốc chống béo phì Orlistat đã được FDA cấp phép lưu hành.

Fig. 8 là đồ thị thể hiện các lượng thức ăn tiêu thụ được xác định theo Ví dụ nêu trên và thể hiện mức tiêu thụ thức ăn hàng ngày được xác định một lần/tuần trong 7 tuần.

Theo Fig. 8, lượng thức ăn tiêu thụ của tất cả các nhóm trừ nhóm OLS nói chung thấp hơn hoặc tương tự như lượng này của nhóm ND, và không thể hiện tăng hoặc giảm đáng kể đồng thời duy trì một mức nói chung ổn định. Kết quả này chỉ ra rằng chất phụ gia thức ăn chăn nuôi ngoại trừ Orlistat không có ảnh hưởng đáng kể đối với lượng thức ăn tiêu thụ của các con chuột.

Dựa vào các kết quả trên, nhóm trong đó chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo sáng chế được sử dụng không thể hiện gia tăng đáng kể trọng lượng cơ thể so với các nhóm còn lại, mặc dù có thể hiện lượng thức ăn tiêu thụ tương đương. Nghĩa là, chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo sáng chế được khẳng định là có tác dụng chống béo phì tốt hơn các chất chống béo phì đã biết và thể hiện tác dụng chống béo phì mạnh hơn khi tăng nồng độ sử dụng.

3) Mổ xác và xét nghiệm sinh hoá máu

Vào ngày kết thúc thử nghiệm theo Ví dụ 4-1 (ngày 49), giết các con chuột thử nghiệm sau khi ngừng cho ăn trong 16 giờ và mổ xác. Lấy máu tất cả các con chuột thử nghiệm trong khoảng từ 500 μ L đến 700 μ L sử dụng ống mao quản không có heparin từ đám rối tĩnh mạch trong điều kiện gây mê bằng ete. Máu đã lấy được cho vào ống nghiệm SST và để đông tụ trong từ 30 phút đến 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, ly tâm máu này ở 4°C và 4000 vòng/phút trong 10 phút để tách riêng huyết thanh, tiếp đó bảo quản ở -80°C cho đến khi phân tích. Lượng glucoza (GLU), triglyxerit (TG), cholesterol tổng (TC), lipoprotein cholesterol tỷ trọng thấp (LDL), lipoprotein cholesterol tỷ trọng cao (HDL), glutamat oxaloacetat transaminaza (GOT; AST), glutamat pyruvat transaminaza (GPT; ALT), CREA (creatinin), và lactat dehydrogenaza (LDH) trong huyết thanh đã tách được xác định bằng cách sử dụng thiết bị xét nghiệm sinh hoá máu (Accute TBA-40FR, Toshiba Medical System Co., Nhật Bản).

Fig. 9 là bảng thể hiện các cấu phần của máu của các cá thể thử nghiệm được xác định theo Ví dụ trên.

Theo Fig. 9, nồng độ của glucoza, TC, LDL, và HDL trong máu được

xác định từ các nhóm cho ăn thức ăn giàu chất béo nói chung cao hơn nồng độ các chất này được xác định ở nhóm ND. Tuy nhiên, nồng độ ở nhóm OLS hoặc CJKS03 được cho dùng Orlistat cùng với chế độ ăn giàu chất béo được khẳng định là giảm đáng kể so với nồng độ được xác định cho nhóm HFD hoặc GC. Ngoài ra, nồng độ LDH, ALT, và creatin trong máu, đây là các chỉ số của bệnh về gan, tim, cơ xương hoặc thận, được xác định ở nhóm CJLS03, là tương tự như nồng độ xác định ở nhóm ND. Nghĩa là, ngay cả khi cho dùng CJLS03, đã khẳng định là không có tác dụng phụ lên các chức năng của thận, gan, tim, và cơ xương. Cụ thể là, mặc dù là bình thường nếu nồng độ của ALT, thường được gọi là chỉ số bệnh gan, là 40 u/L hoặc thấp hơn, nồng độ của ALT được xác định ở nhóm OLS hoặc GC cho dùng Orlistat hoặc Garnicia là bằng 40 u/L hoặc lớn hơn. Các kết quả này tương tự như nồng độ ALT được xác định ở nhóm HFD cho ăn chế độ ăn giàu chất béo mà không có chất phụ gia nào. Tuy nhiên, nồng độ ALT được xác định ở nhóm cho dùng CJLS03 là tương tự như nồng độ được xác định ở nhóm ND ăn thức ăn bình thường. Nói cách khác, đã khẳng định được là CJLS03 không chỉ có tác dụng chống béo phì tuyệt vời, mà còn có thể ngăn ngừa hoặc điều trị các tổn thương gan trong khi các chất đã biết thông thường có tác dụng chống béo phì có khả năng gây tổn thương gan hoặc bệnh gan.

4) Xác định trọng lượng mỡ nội tạng

Sau khi lấy máu, tiến hành xét nghiệm mỡ xác để xem có các bất thường ở nội tạng, và các mô mỡ (mỡ mào tinh hoàn, mỡ dưới da, mỡ màng treo ruột) được tách ra. Rửa lần lượt mô mỡ bằng nước muối sinh lý, và thấm loại bỏ nước bằng giấy lọc. Xác định trọng lượng của từng mô mỡ bằng cân điện tử. Ngoài ra, tính tỷ lệ tương đối trọng lượng mô/100 g trọng lượng cơ thể dựa vào trọng lượng cơ thể xác định lúc để không cho ăn trước khi mổ xác (công thức tính: tỷ lệ trọng lượng nội tạng tương đối (%) = trọng lượng nội tạng (g) / trọng lượng cơ thể lúc không cho ăn trước khi mổ xác (g) × 100). Trọng lượng cơ thể lúc không cho ăn được xác định sau khi không cho ăn 16 giờ và xác định trước

khi giết chuột nhóm thử nghiệm.

Fig. 10 là đồ thị thể hiện trọng lượng cơ thể và mô mỡ của mỗi nhóm, và Fig. 11 là bảng thể hiện trọng lượng so sánh của mô mỡ dựa vào trọng lượng cơ thể của mỗi nhóm.

Theo Fig. 10 và Fig.11, trọng lượng lúc không cho ăn và trọng lượng mô mỡ của các nhóm OLS và CJLS03 thấp hơn trọng lượng của nhóm HFD. Cụ thể là, trọng lượng mỡ dưới da và màng treo ruột của nhóm CJLS03 là giảm đáng kể so với nhóm HFD, và thể hiện sự giảm tương tự hoặc nhiều hơn nhóm OLS. Nói cách khác, *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo sáng chế có tác dụng ức chế tăng trọng lượng cơ thể và mỡ, và hiệu lực chống béo phì của CJLS03 là tương tự hoặc tốt hơn Orlistat, thuốc chống béo phì đã biết.

5) Xét nghiệm mô

Mô gan của các nhóm ND, HFD, OLS, GC, và nồng độ CJLS03 cao được đánh giá mô. Mô gan của mỗi nhóm được gắn vào parafin, và khối parafin được cắt bằng dao phẫu đến độ dày 4 μm . Sau đó loại bỏ parafin bằng cách sử dụng xylen, và thuỷ phân bằng rượu 100%, 95%, 90%, 80%, và 70%, và nhuộm màu bằng hematoxylin và eosin (H & E) tiếp đó khử nước bằng cách sử dụng rượu để lên mẫu. Soi kính hiển vi quang học ((kính hiển vi Olympus MVX10, có trang bị máy ảnh DC71, Center Valley, PA) Olympus, Nhật Bản) để đánh giá mô.

Fig. 12 là ảnh chụp đánh giá mô gan của các nhóm ND, HFD, OLS, GC, và nồng độ CJLS03 cao.

Theo Fig. 12, hạt mỡ màu trắng được thấy ở mô gan của nhóm ND được cho ăn chế độ ăn bình thường, trong khi đó mô gan của nhóm HFD với thức ăn giàu chất béo chứa nhiều hạt mỡ màu trắng. Mô gan của nhóm GC cũng chứa số lượng lớn các hạt mỡ, tương tự như mô gan của nhóm HFD. Trong các mô gan của các nhóm OLS và CJLS03, hiếm khi thấy các hạt chất béo và mô gan là tương tự như của nhóm ND được cho ăn chế độ ăn bình thường. Nghĩa là,

Lactobacillus sakei CJLS03 theo sáng chế ức chế sự tích lũy chất béo của mô gan và cải thiện gan nhiễm mỡ.

6) Xác định kích cỡ các tế bào tạo mỡ

Xác định kích cỡ các tế bào tạo mỡ đã biết là một phương pháp hiệu quả có thể chứng minh hiệu lực chống béo phì. Các ảnh chụp các tế bào tạo mỡ thu được từ 5 phiên mô riêng rẽ cho mỗi nhóm thử nghiệm (CJLS03: nhóm nồng độ cao). Fig. 14 là ảnh chụp thể hiện kích cỡ tế bào tạo mỡ của mỗi nhóm. Phân tích các ảnh chụp tế bào tạo mỡ bằng cách sử dụng chương trình hình ảnh Scion (từ NIH Image) bằng cách tính toán giá trị trung bình của hai kích cỡ tế bào tạo mỡ.

Fig. 13 là đồ thị thể hiện kích cỡ các tế bào tạo mỡ của mỗi nhóm. Kích cỡ các tế bào tạo mỡ của mỗi nhóm được trình bày dưới dạng tỷ lệ so sánh với nhóm HFD.

Theo Fig. 13, kích cỡ của các tế bào tạo mỡ của các nhóm OLS và CJLS03 giảm đáng kể so với kích cỡ này của các nhóm HFD và GC. Kích cỡ các tế bào tạo mỡ của CJLS03 giảm còn 40% đến 70% của nhóm HFD, mặc dù kích cỡ này có thể khác nhau một chút tùy thuộc vào mô lấy các tế bào tạo mỡ này.

Nói cách khác, *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo sáng chế không chỉ giảm lượng mỡ mà còn giảm cả các tế bào tạo mỡ.

Ví dụ 5: Điều chế probiotic bao gồm *Lactobacillus sakei* CJLS03

Lactobacillus sakei CJLS03 được xác định trong Ví dụ 1 được sản xuất hàng loạt và được đông khô để sản xuất probiotic để sử dụng làm thuốc, thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi, hoặc nguyên liệu cho mỹ phẩm.

Để sản xuất chủng, nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng MRS (Difco) được bổ sung thêm dung dịch NaOH 25% để đạt đến độ pH = 6,0 trong 18 ở 37°C. Sau đó, thu lấy vi khuẩn bằng cách ly tâm. Vi khuẩn thu được tiếp

đó được làm đông lạnh ở -40°C bằng cách sử dụng 5% dextrin và 10% sữa gầy làm chất bảo quản đông lạnh, và vi khuẩn đã làm khô được nghiền bằng cách sử dụng máy trộn thành dạng bột. Vi khuẩn đã nghiền bột được trộn với một lượng thích hợp chất pha loãng như glucoza, lactoza, sữa gầy, v.v. và bảo quản và đóng gói trong túi nhôm.

Probiotic được điều chế như trên có thể sử dụng làm probiotic cho thức ăn bằng cách trộn với bột ngũ cốc được sử dụng làm nguyên liệu thô trong thức ăn, hoặc làm thuốc như viên nén, viên nang, v.v. bằng cách trộn chất mang hoặc chất phụ gia, hoặc làm probiotic cho thực phẩm. Lượng probiotic cụ thể có thể trộn với nguyên liệu được sử dụng cho mỹ phẩm được sử dụng trong nhiều lĩnh vực như thuốc, thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm, v.v. theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Từ phần mô tả ở trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng sáng chế có thể thể hiện ở các dạng cụ thể khác mà không tách rời khỏi bản chất hoặc các đặc tính cơ bản. Về mặt này, các phương án đã mô tả sẽ được xem ở tất cả các khía cạnh chỉ để minh họa và không nhằm giới hạn. Phạm vi của sáng chế do đó được chỉ ra bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo, hơn là phần mô tả ở trên. Tất cả các thay đổi thuộc ý nghĩa và khoảng tương đương của các yêu cầu bảo hộ sẽ được coi là thuộc phạm vi của sáng chế.

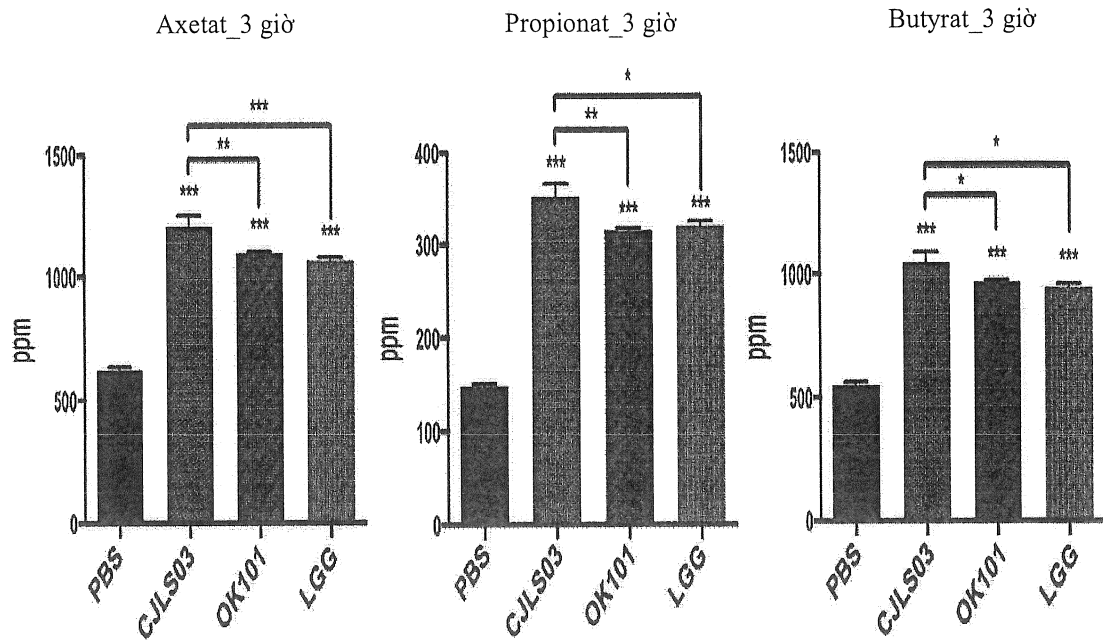
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 (KCCM11905P).
2. Chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo điểm 1, trong đó chủng này có hoạt tính đầy mạnh sản sinh trong ruột axit béo mạch ngắn hoặc kiểm soát hệ vi sinh vật đường ruột.
3. Chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo điểm 2, trong đó axit béo mạch ngắn ít nhất là một axit được chọn từ nhóm bao gồm axetat, propionat, và butyrat.
4. Chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo điểm 1, trong đó chủng này có hoạt tính làm giảm tỷ lệ của *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) ở ruột.
5. Chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 theo điểm 1, trong đó chủng này có hoạt tính làm giảm nồng độ aspartat transaminaza (AST; GOT) hoặc nồng độ alanin transaminaza (ALT; GPT).
6. Chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus sakei* CJLS03 (KCCM11905P).
7. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó chủng này có hoạt tính đầy mạnh sản sinh trong ruột axit béo mạch ngắn hoặc kiểm soát hệ vi sinh vật đường ruột.
8. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó axit béo mạch ngắn ít nhất là một axit được chọn từ nhóm bao gồm axetat, propionat, và butyrat.
9. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó chủng này có hoạt tính làm giảm tỷ lệ của *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) ở ruột.
10. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó chủng này có hoạt tính làm giảm nồng độ aspartat transaminaza (AST; GOT) hoặc nồng độ alanin transaminaza (ALT; GPT).
11. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó chế phẩm này còn chứa chất bảo quản đông lạnh hoặc tá dược.
12. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó chất bảo quản đông lạnh là ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm glyxerol, trehaloza, maltodextrin, bột sữa gầy,

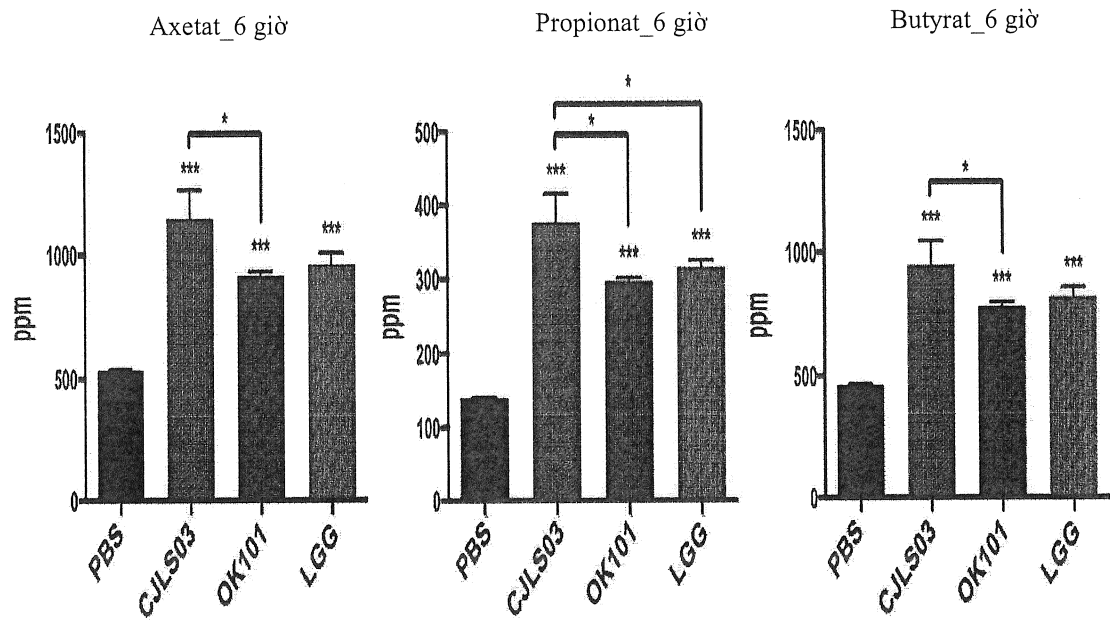
và tinh bột, và tá dược là ít nhất một tá dược được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, dextrin, và sữa không béo.

13. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó chế phẩm này là thực phẩm, thực phẩm chức năng, thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm, dược phẩm, hoặc dược mỹ phẩm.

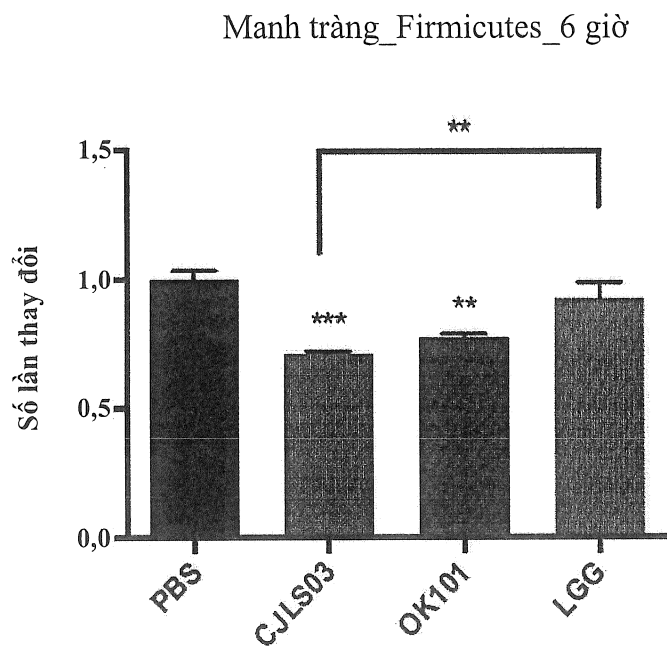
[Fig. 1]



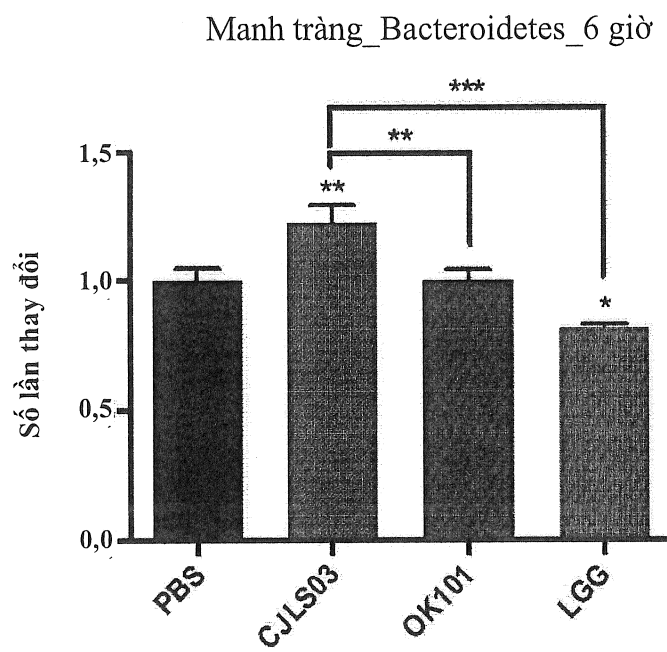
[Fig. 2]



[Fig. 3]

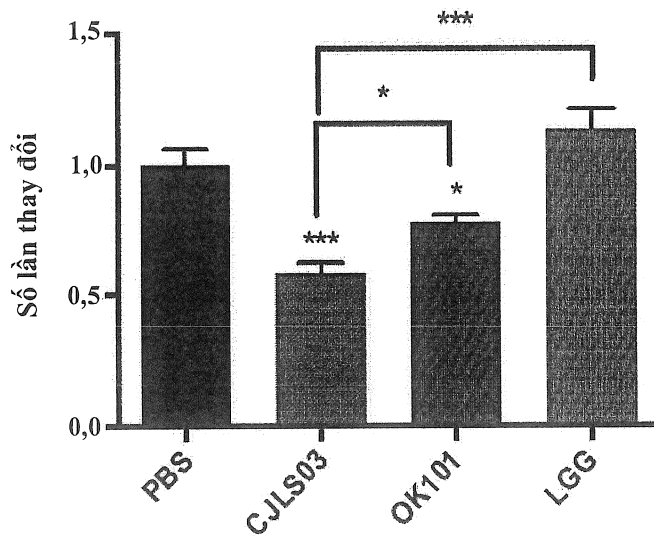


[Fig. 4]



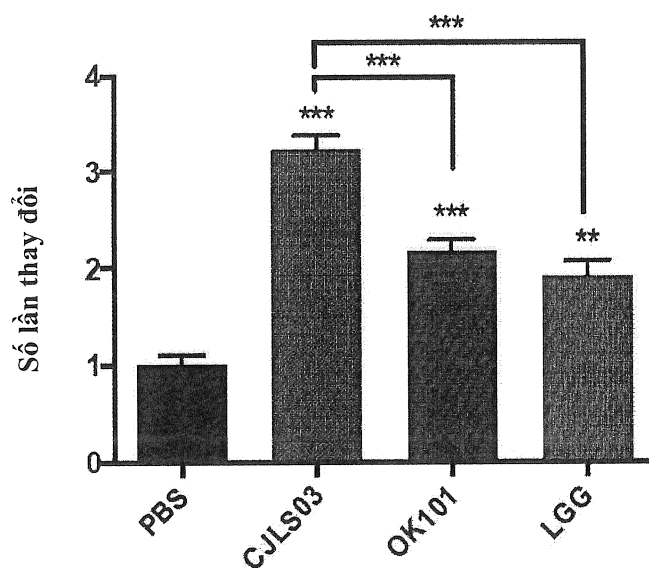
[Fig. 5]

Manh tràng_ Tỷ lệ F/B_6 giờ



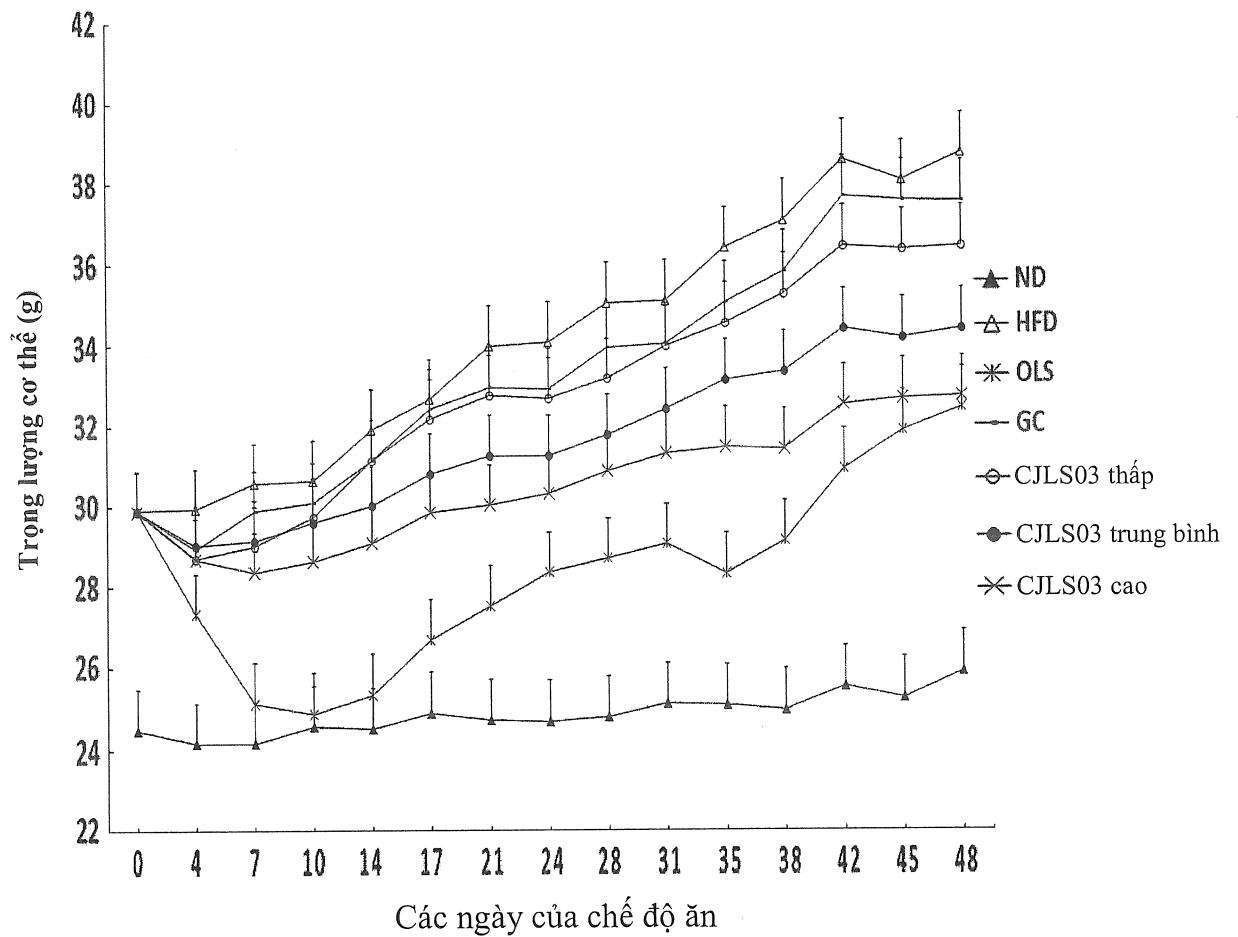
[Fig. 6]

Manh tràng_Bifidobacterium_6 giờ

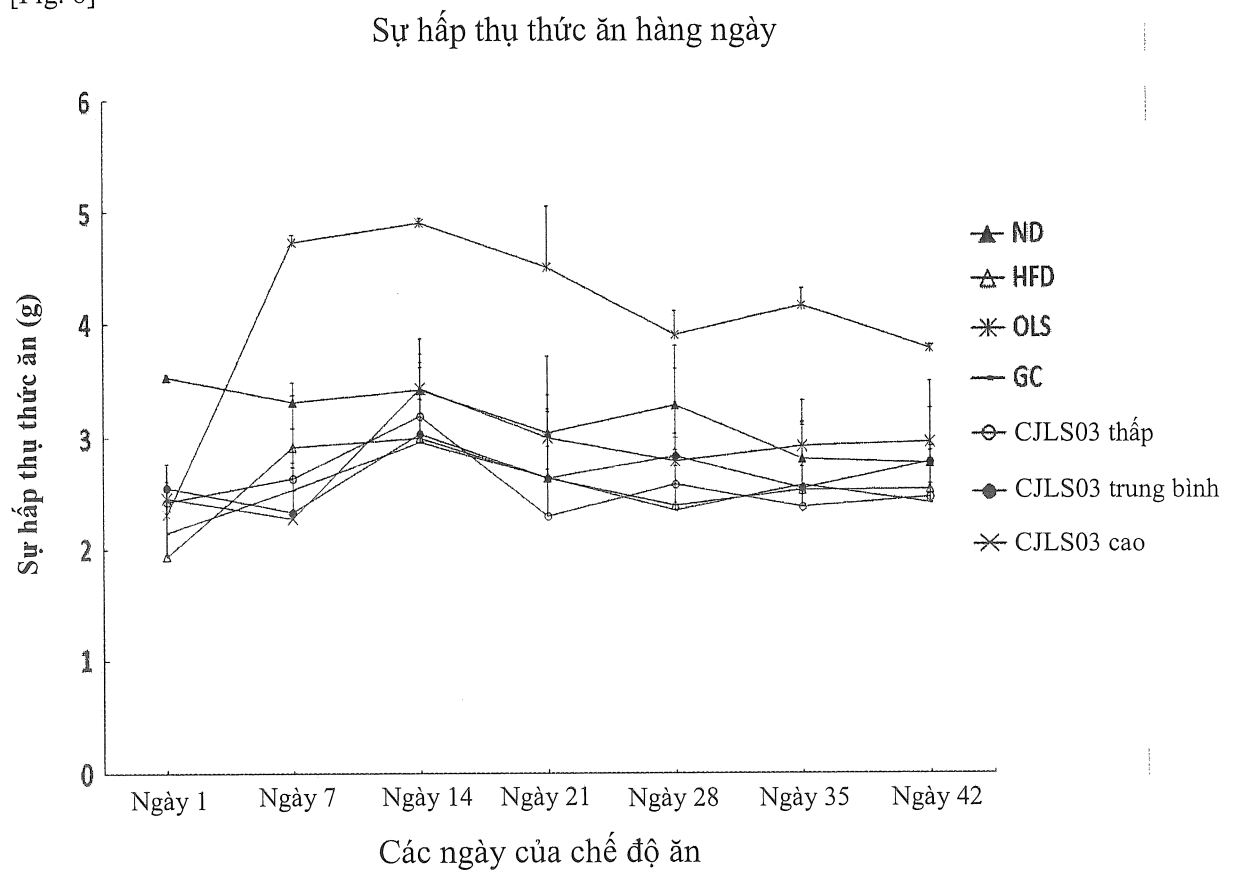


[Fig. 7]

Mức thay đổi trọng lượng cơ thể



[Fig. 8]



[Fig. 9]

Nhóm	TC mg/dl	TG mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl	Glucoza mg/dl	AST U/L	ALT U/L	LDH mg/dl	Creatin mg/dl
ND	80,40	39,00	41,00	8,32	112,40	69,60	30,60	811,60	0,28
HFD	138,60**	75,80	59,40*	14,40**	182,20*	116,00*	52,80	979,40	0,32
OLS	98,80***	43,40	55,40*	9,10**	152,80*	123,40*	51,00	1051,20	0,26
GC	122,80**	35,20*	59,80*	9,50**	170,00*	89,60	43,60	756,80	0,22
CJLS03 thấp	126,80**	38,80	66,40*	10,10*	190,60*	79,80*	30,00	615,00	0,22
CJLS03 trung bình	117,80***	34,20*	54,80*	9,96**	159,20*	72,40*	32,60	606,00	0,24
CJLS03 cao	111,40***	30,40*	54,20*	10,32*	146,60	65,80*	28,00	557,40	0,24

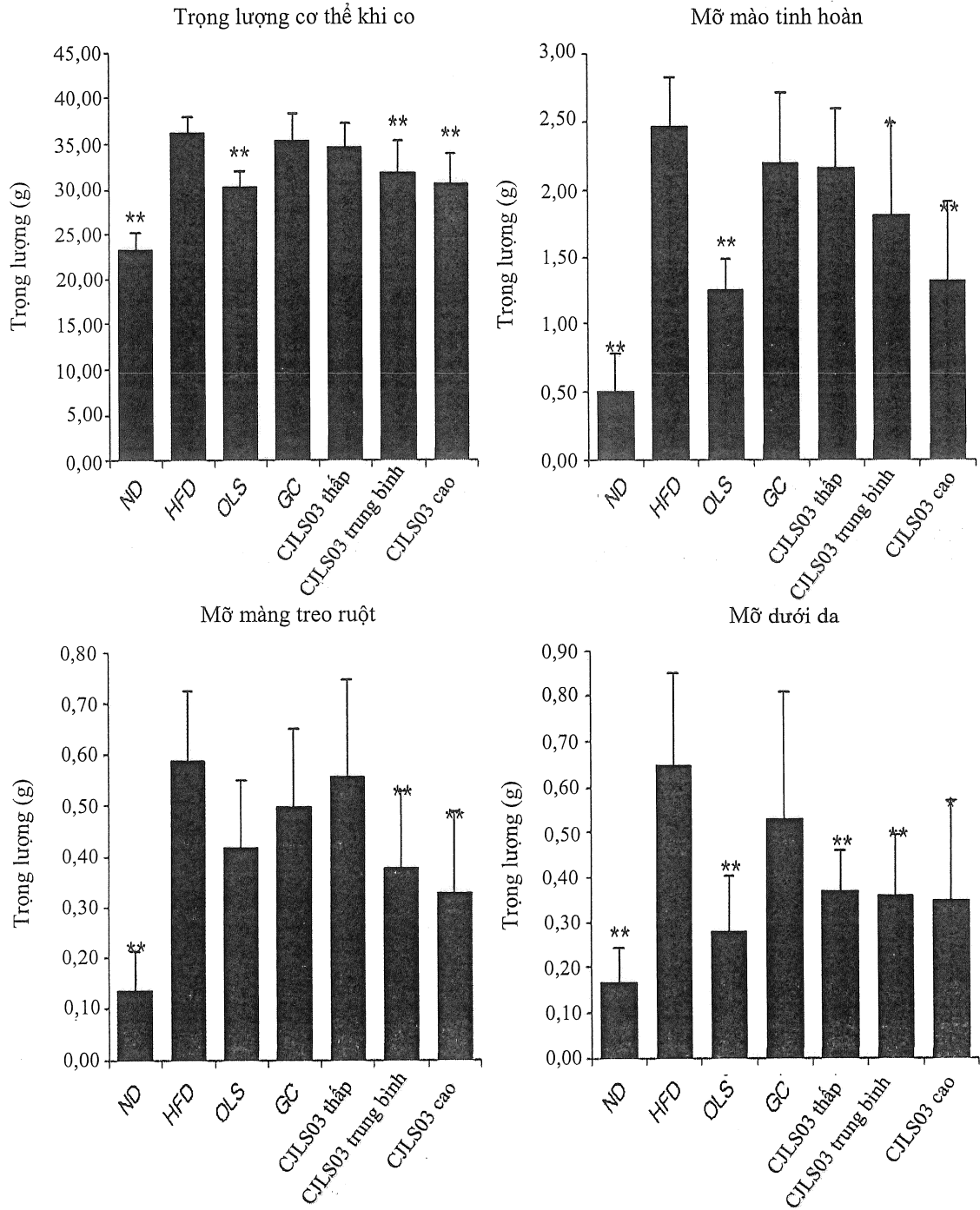
##: Giá trị $p < 0,01$ so với nhóm HFD

#: Giá trị $p < 0,05$ so với nhóm HFD

** : Giá trị $p < 0,1$ so với nhóm ND

*: Giá trị $p < 0,05$ so với nhóm ND

[Fig. 10]

*: Giá trị $p < 0,05$ so với nhóm HFD**: Giá trị $p < 0,01$ so với nhóm HFD

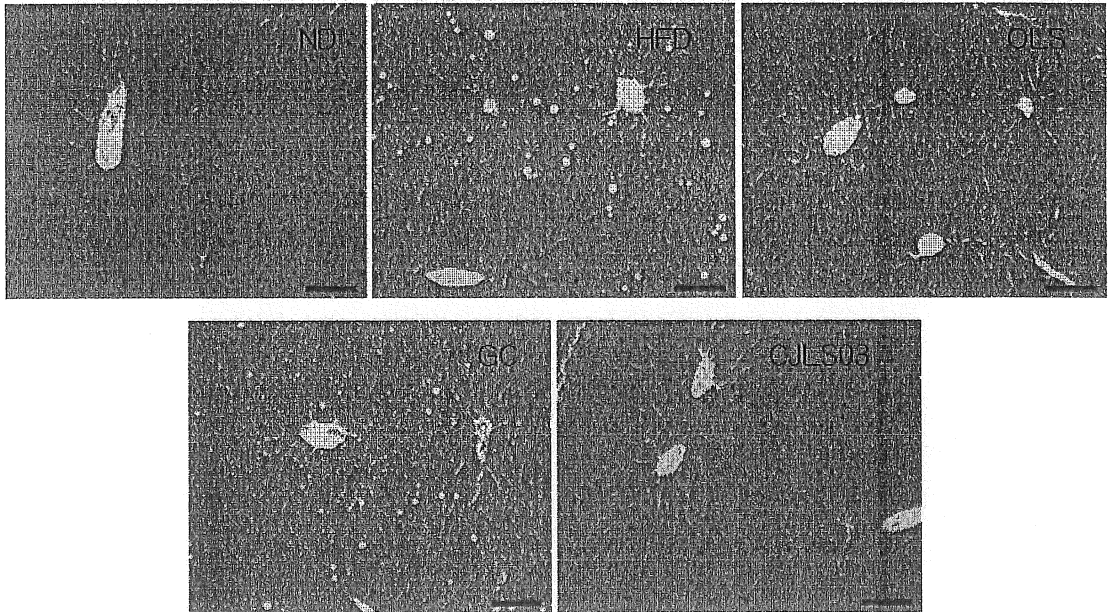
[Fig. 11]

Nhóm	Trọng lượng cơ thể (g)	Mô mỡ (%)		
		Mỡ mào tinh hoàn (MF)	Mỡ màng treo ruột (SF)	Mỡ dưới da (EF)
ND	23,30	0,59	0,71	2,16
HFD	36,36**	1,61**	1,78**	6,77**
OLS	30,34***	1,39**	0,94***	4,13***
GC	35,48**	1,39**	1,47**	6,13**
CJLS03 thấp	34,79**	1,58**	1,05**	6,23**
CJLS03 trung bình	31,97***	1,17***	1,14***	5,57***
CJLS03 cao	30,80***	1,03***	1,12***	4,22***

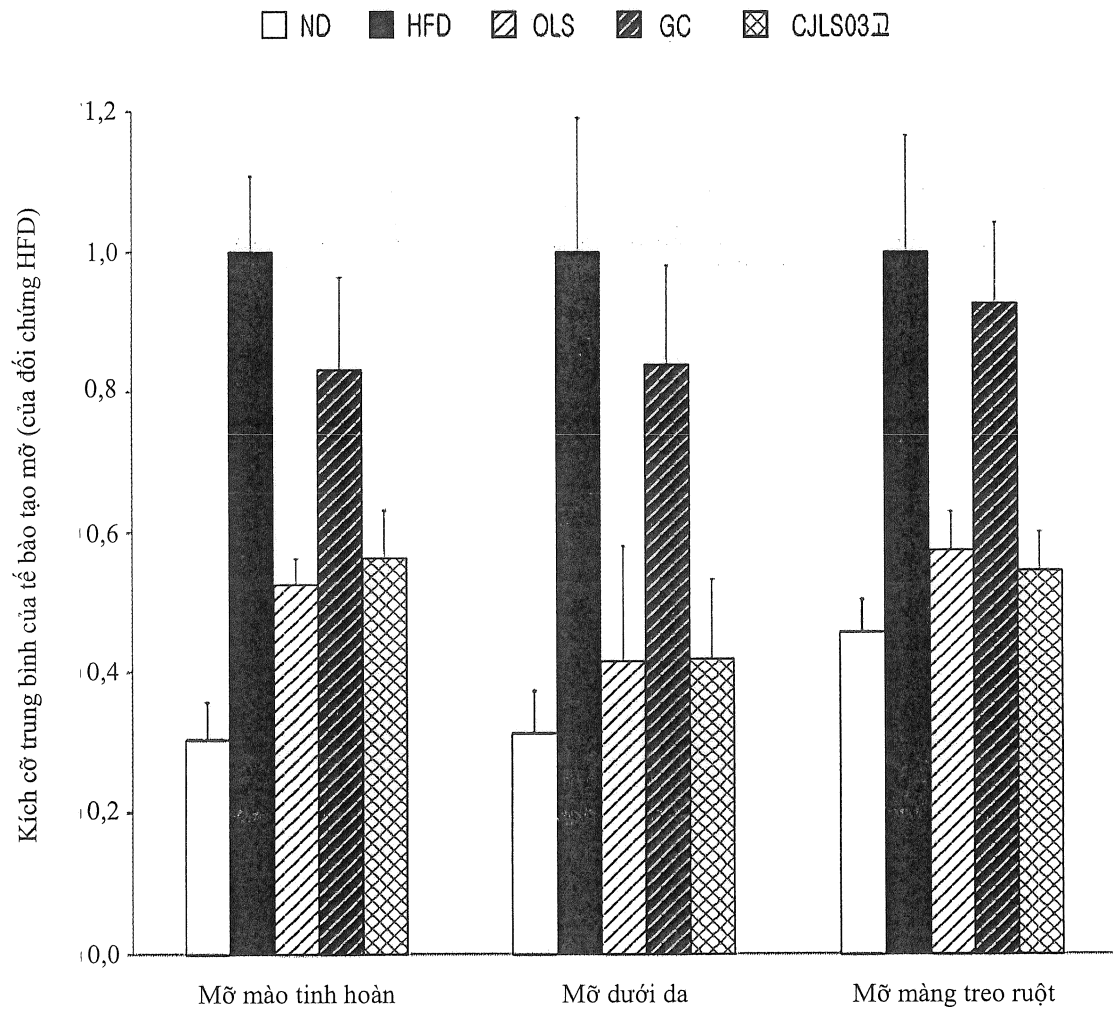
##: Giá trị $p < 0,01$ so với nhóm HFD#: Giá trị $p < 0,05$ so với nhóm HFD**: Giá trị $p < 0,1$ so với nhóm ND*: Giá trị $p < 0,05$ so với nhóm ND

9/11

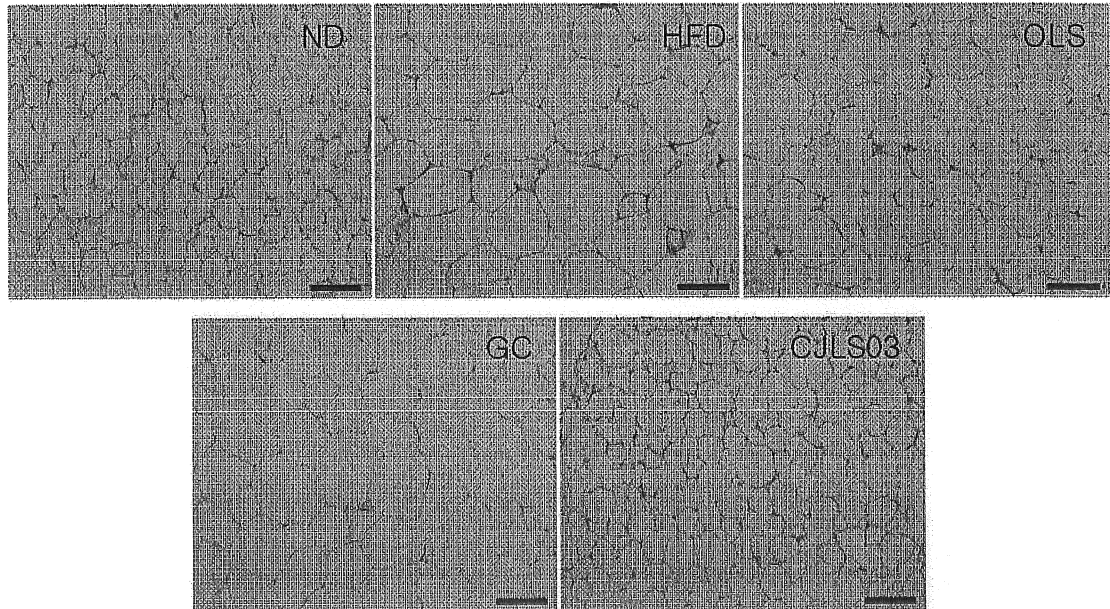
[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> *LACTOBACILLUS SAKEI* VÀ CHẾ PHẨM CHỨA VI KHUẨN NÀY
 <130> OPA17141
 <150> 10-2016-0126823
 <151> 2016-09-30
 <160> 1
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 1466
 <212> ARN
 <213> Chưa biết
 <220>
 <223> *Lactobacilluse sakei* CJLS03

 <400> 1
 gggngtgcta tantgcagtc gaacgcactc tcgttttagat tgaaggagct tgctcctgat
 60
 tgataaacat ttgagtgagt ggcggacggg tgagtaacac gtgggtaacc tgccctaaag
 120
 tgggggataa catttggaag cagatgctaa taccgcataa aacctaacac cgcattggtgt
 180
 aggggtgaaa gatgggttcg gctatcactt taggatggac ccgcggtgca ttagttagtt
 240
 ggtgaggtaa aggctcacca agaccgtgat gcatrgccgw sckgrgaggg taatcggcca
 300
 cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atcttccaca
 360
 atggacgaaa gtctgatgga gcaacgccgc gtgagtgaag aaggttttcg gatcgtaaaa
 420
 ctctgttggt ggagaagaat gtatctgata gtaactgac aggtagtgac ggtatccaac
 480
 cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgttg
 540
 tccggattta ttgggcgtaa agcgagcgca ggcggtttct taagtctgat gtgaaagcct
 600

tcggctcaac cgaagaagtg catcggaac tgggaaactt gagtgcagaa gaggacagtg
660

gaactccatg tgtagcgggtg aaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt ggcgaaggcg
720

gctgtctggt ctgtaactga cgctgaggct cgaaagcatg ggtagcaaac aggattagat
780

accctggtag tccatgccgt amacgatgag tgctaggtgt tggaggggtt cgcaccttca
840

gtgccgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta cgaccgcaag gttgaaactc
900

aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc
960

gaagaacctt accaggtctt gacatccttt gaccactcta gagatagagc tttcccttcg
1020

gggacaaagt gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta
1080

agtcccsmc cgagcgcaac ccttattact agttgccagc atttagttgg gcactctagt
1140

gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggacgacg tcaaatacgc atgccctta
1200

tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga tggtagaacg agttgagaga ccgcgaggtt
1260

tagctaattc cttaaaacca ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa
1320

gccggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcgggtg aatacgttcc cgggccttgt
1380

acacaccgcc cgtcacacca tgagagtttg taacacccaa agccggtgag gtaacccttc
1440

ggggagccag ccgtctaang nggaca
1466