



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

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



1-0045064

(51)^{2020.01} **A23L 33/105**; A61P 1/04; A61K 35/747; (13) **B**
A23B 7/10; A61K 35/744

(21) 1-2021-04549	(22) 27/12/2019
(86) PCT/KR2019/018606 27/12/2019	(87) WO2020/139020 02/07/2020
(30) 10-2018-0171845 28/12/2018 KR	
(45) 25/04/2025 445	(43) 25/10/2021 403A
(71) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR) 330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea	
(72) LEE, Dong Yun (KR); CHOI, Seung Hye (KR); OH, Ji Young (KR).	
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)	

(54) KIM CHI ĐỀ PHÒNG NGỪA HOẶC ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH LIÊN QUAN ĐẾN
HELICOBACTER PYLORI VÀ CHẾ PHẨM ĐỂ LÀM THUYỀN GIẢM BỆNH
LIÊN QUAN ĐẾN HELICOBACTER PYLORI CHỨA NÓ

(21) 1-2021-04549

(57) Sáng chế đề cập đến kim chi chứa vi khuẩn axit lactic mà có thể được sử dụng một cách hiệu quả để phòng ngừa và điều trị các bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*.

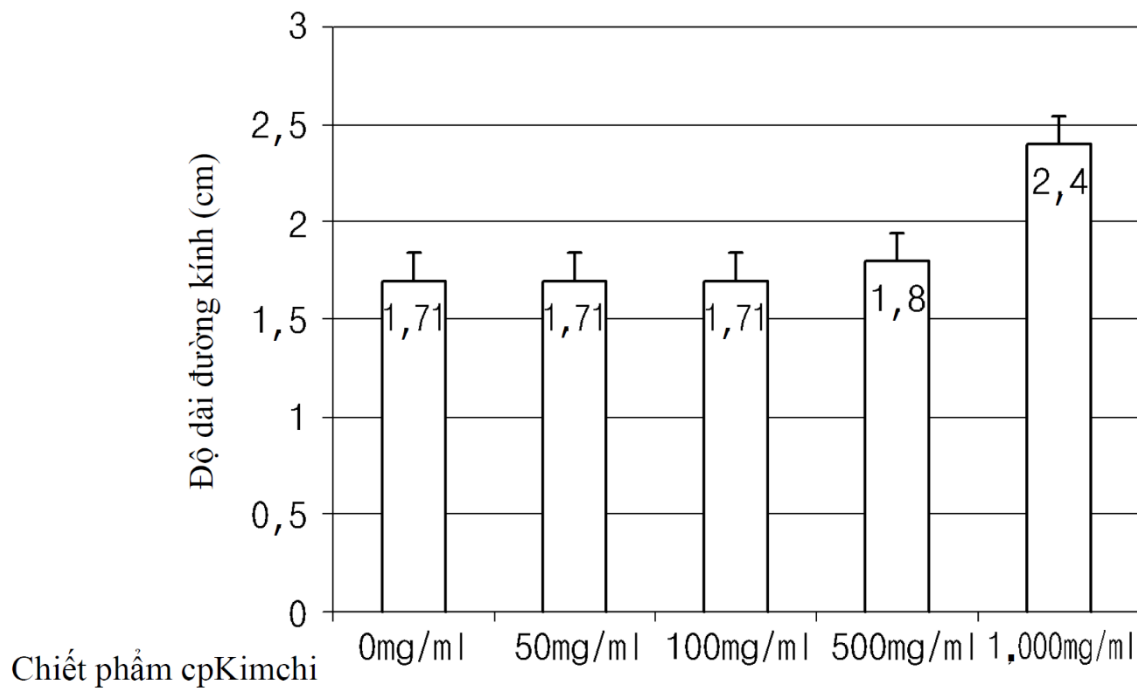


Fig. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kim chỉ chứa vi khuẩn axit lactic mà có thể được sử dụng một cách hiệu quả để phòng ngừa và điều trị bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Năm 1983, các nhà vi sinh vật học người Úc Marshall và Warren lần đầu tiên phát hiện ra vi khuẩn cong trong các mô sinh thiết niêm mạc dạ dày ở các bệnh nhân mắc bệnh viêm dạ dày typ B, và sau đó, nuôi cấy vi khuẩn này và nhận thấy rằng nó là một loài mới liên quan đến chi *Campylobacter*. Kể từ đó, các nghiên cứu tích cực đã được tiến hành về mối liên quan giữa *Helicobacter pylori* và các bệnh đường tiêu hóa trên như bệnh viêm dạ dày, chứng loét tiêu hóa, và các bệnh tương tự. *Helicobacter pylori* là trực khuẩn gram âm, có roi được bao quanh bởi màng mỏng, giải phóng một lượng lớn ureaza, và đã biết là lây lan qua đường phân-miệng, và là mầm bệnh mà thu hút được sự quan tâm lớn trên toàn thế giới bởi vì Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization - WHO) đã xác định nó là chất sinh ung thư rõ ràng vào năm 1994.

Hiện nay, sinh bệnh học của bệnh do *Helicobacter pylori* gây ra được biết như sau: vi khuẩn mà xâm nhập vào lòng dạ dày cùng với thức ăn xuyên qua lớp dịch nhầy dạ dày bằng roi có nhu động mạnh, và sống ở lớp biểu mô trên và chỗ tiếp giáp giữa các tế bào trong lớp dịch nhầy dạ dày, và giải phóng một lượng lớn ureaza để thay đổi lớp dịch nhầy thành kiềm, nhờ đó dẫn đến sự kích thích tiết axit dạ dày quá mức một cách bất thường bởi gastrin, và do đó dẫn đến chứng viêm và loét. Ngoài ra, theo một

nghiên cứu gần đây đã phát hiện ra rằng *Helicobacter pylori* là yếu tố nguy cơ quan trọng đối với sinh bệnh học của caxinom tuyến dạ dày, Tổ chức Y tế Thế giới đã chỉ định *Helicobacter pylori* là chất sinh ung thư nhóm I.

Cụ thể là, sự nhiễm *Helicobacter pylori* đã được báo cáo là xảy ra một cách thường xuyên ở các nước đang phát triển trong đó có Hàn Quốc. Theo điều tra dịch tễ quốc gia được thực hiện trên 5.732 người không có các triệu chứng đường tiêu hóa trên, tổng tỷ lệ lưu hành nhiễm *Helicobacter pylori* là 46,6%, và mức độ nhiễm là 69,4% ở người trưởng thành trên 16 tuổi và đặc biệt cao khi người ở độ tuổi 40 (78,5%). Ngoài ra, theo khảo sát được thực hiện trên 1.031 bệnh nhân mắc chứng loét tiêu hóa, 66% bệnh nhân loét dạ dày và 79% bệnh nhân loét tá tràng được phát hiện là nhiễm *Helicobacter pylori* và 71% bệnh nhân mắc chứng loét dạ dày và tá tràng được báo cáo là nhiễm *Helicobacter pylori*.

Là phương pháp điều trị các bệnh trên do nhiễm *Helicobacter pylori*, hiện nay, chủ yếu thực hiện hóa trị liệu bằng các thuốc kháng sinh. Tuy nhiên, việc sử dụng rộng rãi phương pháp này có thể có hiệu quả trong thời gian ngắn, nhưng phương pháp này có vấn đề liên quan đến nguy cơ xuất hiện các chủng kháng thuốc kháng sinh do việc sử dụng thuốc kháng sinh liên tục. Ngoài ra, việc sử dụng liên tục liệu pháp kháng khuẩn đã được báo cáo là gây ra các tác dụng phụ khác nhau, như tiêu chảy, viêm thực quản hồi lưu, ức chế hệ vi khuẩn bình thường trong ruột, xuất hiện của các chủng kháng thuốc, và các tác dụng tương tự.

Do đó, có nhu cầu phát triển nguyên liệu hoặc thực phẩm kháng vi sinh vật phù hợp mà có thể ngăn chặn *Helicobacter pylori*, đồng thời thay thế chất trị liệu gây ra các tác dụng phụ và tính kháng được mô tả trên đây trong cơ thể người.

Trong khi đó, vi khuẩn axit lactic được lên men của kim chi, mà là thực phẩm lên men truyền thống, là vi khuẩn loại GRAS (Generally Recognized As Safe - nói chung được công nhận là an toàn), từ lâu đã được con người tiêu thụ trong thực phẩm lên men. Do các ưu điểm về chức năng và độ an toàn của vi khuẩn axit lactic, sự chú ý được tập trung vào sự phát triển các thực phẩm chức năng và các thuốc sử dụng vi khuẩn axit lactic. Ví dụ, người nộp đơn đã báo cáo chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 tạo ra một lượng khí giảm và phương pháp chế biến kim chi bằng cách sử dụng chủng này, và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP133 và chế phẩm để điều trị các bệnh đường ruột và tăng cường khả năng miễn dịch chứa chủng này (các tài liệu sáng chế 1 đến 3). Tuy nhiên, các nghiên cứu về các phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh do nhiễm *Helicobacter pylori* thông qua các thực phẩm lên men như kim chi mà được tiêu thụ thường xuyên là chưa hoàn thiện, và vẫn đang được tiến hành.

Các tài liệu trong tình trạng kỹ thuật

Các tài liệu sáng chế

(Tài liệu sáng chế 1) Patent Hàn Quốc số 1,807,995

(Tài liệu sáng chế 2) Patent Hàn Quốc số 1,486,999

(Tài liệu sáng chế 3) Patent Hàn Quốc số 1,406,168

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Sáng chế đề cập đến kim chi chứa vi khuẩn axit lactic có tác dụng ức chế *Helicobacter pylori* làm thành phần hoạt tính, và việc sử dụng kim chi và chiết phẩm của nó để sử dụng trong việc phòng ngừa và điều trị bệnh liên quan đến *Helicobacter*

pylori.

Giải pháp kỹ thuật

Để giải quyết vấn đề nêu trên, một khía cạnh của sáng chế đề xuất kim chi chứa *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133, mà là các vi khuẩn axit lactic có nguồn gốc từ kim chi, và phương pháp chế biến nó.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm để làm thuyên giảm bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*, chế phẩm này chứa kim chi hoặc chiết phẩm của nó.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa, điều trị, hoặc làm thuyên giảm bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*, phương pháp này sử dụng kim chi hoặc chiết phẩm của nó.

Tác dụng có lợi

Kim chi chứa *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133, mà là các vi khuẩn axit lactic có nguồn gốc từ kim chi, hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế có hoạt tính ức chế chống lại *Helicobacter pylori*, và khi dùng kéo dài, có thể phòng ngừa, điều trị, hoặc làm chậm sự tiến triển của chứng viêm teo dạ dày và loét dạ dày do *Helicobacter pylori* gây ra, và cũng có thể được sử dụng một cách hữu ích để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư dạ dày do *Helicobacter pylori* gây ra.

Tuy nhiên, các tác dụng theo sáng chế không chỉ giới hạn ở các tác dụng nêu trên và các tác dụng khác không được đề cập sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế hiểu một cách rõ ràng từ phần mô tả sau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là đồ thị thể hiện tác dụng ức chế của kim chi theo sáng chế trên vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Fig. 2 là ảnh điện di thể hiện tác dụng của kim chi theo sáng chế đến sự biểu hiện của các yếu tố tăng trưởng mạch máu khác nhau.

Fig. 3 là ảnh điện di thể hiện tác dụng của kim chi theo sáng chế đến sự biểu hiện của các yếu tố viêm khác nhau.

Fig. 4 là đồ thị thể hiện tác dụng của kim chi theo sáng chế đến sự kết nối chặt chẽ của các tế bào trong mô hình nhiễm *Helicobacter pylori*.

Fig. 5 là đồ thị thể hiện tác dụng của kim chi theo sáng chế đến sự sinh trưởng của dòng tế bào ung thư dạ dày.

Fig. 6 là đồ thị thể hiện tác dụng của kim chi theo sáng chế đến sự chết tế bào theo chương trình của dòng tế bào ung thư dạ dày.

Fig. 7 là ảnh điện di thể hiện tác dụng của kim chi theo sáng chế đến sự biểu hiện của các yếu tố gây chết tế bào theo chương trình khác nhau của dòng tế bào ung thư dạ dày.

Fig. 8 là ảnh điện di thể hiện tác dụng của kim chi theo sáng chế đến sự biểu hiện của các yếu tố liên quan đến chu kỳ tế bào của dòng tế bào ung thư dạ dày.

Fig. 9 thể hiện thiết kế của thử nghiệm trên động vật để xác định tác dụng của kim chi theo sáng chế đến bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*.

Fig. 10 là đồ thị thể hiện tác dụng của kim chi theo sáng chế đến điểm chỉ số thương tổn vĩ mô trong mô hình động vật bị nhiễm *Helicobacter pylori*.

Fig. 11 là ảnh chụp thể hiện tác dụng của kim chi theo sáng chế đến sự phát

triển của ung thư dạ dày trong mô hình động vật bị nhiễm *Helicobacter pylori*.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

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

1. Kim chi chứa *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 và phương pháp chế biến nó

Sáng chế đề xuất kim chi chứa *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 và phương pháp chế biến nó.

Leuconostoc mesenteroides CJLM119 là chủng vi sinh vật được nộp lưu tại ngân hàng gen của Viện nghiên cứu khoa học sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc với số nộp lưu KCTC 13043BP, và phương pháp phân lập và nhận diện chủng này được bộc lộ cụ thể trong patent Hàn Quốc số 1,807,995. Ngoài ra, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 là chủng vi sinh vật được nộp lưu tại ngân hàng gen của Viện nghiên cứu khoa học sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc với số nộp lưu KCTC 11403BP, và phương pháp phân lập và nhận diện chủng này được bộc lộ cụ thể trong patent Hàn Quốc số 1,486,999.

Trong sáng chế này, "kim chi" có nghĩa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thực phẩm được chế biến bằng cách ướp muối và thêm gia vị vào rau và sau đó, lên men chúng. Theo một phương án của sáng chế, rau có thể là cải thảo Kim chi, củ cải trắng, hành lá, cải bẹ xanh, dưa chuột, và các loại tương tự. Cụ thể, rau có thể là cải thảo Kim chi, và các rau bất kỳ khác có thể được sử dụng làm nguyên liệu thô của kim chi là đối tượng của sáng chế. Theo một phương án của sáng chế, rau có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, rau có hàm lượng lycopene cao. Theo một phương án khác của sáng chế, lycopene có thể được bao gồm với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05

đến 5 mg, như từ 0,1 đến 3 mg, từ 0,2 đến 2 mg, từ 0,3 đến 1 mg, từ 0,5 đến 0,8 mg trên 100 g rau, nhưng hàm lượng không chỉ giới hạn ở đó.

Rau có hàm lượng lycopene cao có thể là cải thảo Kim chi, và cụ thể là, cải thảo Kim chi sử dụng giống cải thảo Kim chi của TheHan1ho (Đơn giống cây trồng số công bố 2015-688, được công bố vào ngày 15 tháng mười hai, năm 2015). Khi rau có hàm lượng lycopene cao được lên men với *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133, sự giảm hàm lượng lycopene được ngăn ngừa, và do đó, chức năng phòng ngừa bệnh ung thư của lycopene có thể được duy trì.

Theo một phương án của sáng chế, gia vị được chế biến bằng cách trộn các thành phần như bột ớt, tỏi, gừng, cá muối, v.v., và ngoài các thành phần này, đối với các thành phần cấu thành gia vị, các thành phần bất kỳ khác có thể được bổ sung hoặc được loại trừ khi thích hợp, nếu cần tùy thuộc vào sở thích cá nhân, phương pháp lên men, thời gian lên men, v.v..

Theo một phương án của sáng chế, kim chi theo sáng chế có thể được chế biến bằng phương pháp gồm việc trộn các rau đã được ướp muối, ví dụ, cải thảo Kim chi ướp muối, với gia vị và sau đó, lên men chúng, theo phương pháp thông thường để chế biến kim chi. Để làm rau, có thể thích hợp hơn khi sử dụng rau có hàm lượng lycopene cao. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở trường hợp đó, và rau thông thường có thể được sử dụng mà không giới hạn để chế biến kim chi theo sáng chế.

Theo một phương án khác của sáng chế, kim chi theo sáng chế có thể còn chứa các chất phụ gia đã biết mà được chấp nhận cho thực phẩm. Để làm chất phụ gia, các hương thơm tự nhiên khác nhau như hương mặn, hương chanh, hương dứa, hương thảo mộc hoặc các hương thơm tương tự; các chất màu tự nhiên khác nhau như nước quả

ép tự nhiên, chlorophyllin, flavonoit hoặc các chất tương tự; các thành phần làm ngọt như fructoza, mật ong, rượu đường, hoặc đường; hoặc chất làm chua như axit xitric hoặc natri xitrat có thể được bao gồm mà không giới hạn trong kim chi theo sáng chế.

Theo một phương án của sáng chế, kim chi theo sáng chế có thể chứa *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 với lượng từ 0,01 đến 5% khối lượng, đặc biệt là từ 0,02 đến 3% khối lượng, đặc biệt hơn là từ 0,05 đến 2,0% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của kim chi.

Theo một phương án khác của sáng chế, kim chi theo sáng chế có thể chứa *Lactobacillus plantarum* CJLP133 với lượng từ 0,01 đến 5% khối lượng, đặc biệt là từ 0,02 đến 3% khối lượng, đặc biệt hơn là từ 0,05 đến 2,0% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của kim chi.

Theo một phương án của sáng chế, kim chi theo sáng chế có thể được chế biến bằng cách bổ sung *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 với lượng từ 0,01 đến 5% khối lượng, đặc biệt là từ 0,02 đến 3% khối lượng, đặc biệt hơn là từ 0,05 đến 2,0% khối lượng và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 với lượng từ 0,01 đến 5% khối lượng, đặc biệt là từ 0,02 đến 3% khối lượng, đặc biệt hơn là từ 0,05 đến 2,0% khối lượng vào rau đã được ướp muối, ví dụ, rau đã được ướp muối có hàm lượng lycopene cao, và sau đó, tiến hành lên men ở nhiệt độ cụ thể trong khoảng thời gian cụ thể.

Nhiệt độ trong quá trình lên men không bị giới hạn cụ thể, nhưng quá trình lên men có thể được thực hiện, ví dụ, ở 1°C đến 30°C, đặc biệt là 3°C đến 15°C, hoặc 5°C đến 10°C.

Thời gian lên men không bị giới hạn cụ thể, nhưng quá trình lên men có thể được thực hiện, ví dụ, trong 1 đến 365 ngày, đặc biệt là 5 đến 180 ngày, 10 đến 90

ngày, 15 đến 60 ngày, hoặc 20 đến 40 ngày.

Theo một phương án của sáng chế, chính các chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có thể được sử dụng, nhưng môi trường nuôi cấy chứa các chủng này cũng có thể được sử dụng. Theo một phương án của sáng chế, các chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có thể được sử dụng dưới dạng các tế bào sống, các tế bào chết, hoặc hỗn hợp của chúng.

Trong sáng chế này, thuật ngữ “môi trường nuôi cấy” có nghĩa là nguyên liệu thu được từ quá trình nuôi cấy các chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 sau khi gây nhiễm vào trong môi trường. Ví dụ, môi trường nuôi cấy có thể bao gồm bản thân môi trường nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy các chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 trong môi trường (tức là, môi trường nuôi cấy có thể chứa các chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133, môi trường hoặc các sản phẩm chuyển hóa của các chủng), phần dịch lọc (ví dụ, dịch nổi được ly tâm) thu được bằng cách lọc hoặc ly tâm môi trường nuôi cấy để loại bỏ các chủng, hoặc các môi trường tương tự. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, môi trường thu được bằng cách làm khô (ví dụ, sấy thăng hoa) và nghiền môi trường nuôi cấy thành bột.

Theo một phương án của sáng chế, việc nuôi cấy các chủng có thể được thực hiện ở nhiệt độ từ 10°C đến 30°C trong 6 đến 48 giờ, đặc biệt ở nhiệt độ từ 20°C đến 30°C trong 12 đến 36 giờ hoặc 18 đến 30 giờ. Nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó.

Để làm môi trường, môi trường đã biết bất kỳ cho vi khuẩn axit lactic có thể được sử dụng mà không giới hạn. Môi trường có thể bao gồm nguồn cacbon và nguồn nitơ. Nguồn cacbon có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số sucroza, glucoza, fructoza, và các chất tương tự, và nguồn nitơ có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số, nhưng không chỉ giới hạn ở, chiết phẩm nấm men, pepton, chiết phẩm thịt bò, chiết phẩm mạch nha, dịch chiết ngô, amoni xitrat, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, amoni nitrat, và các chất tương tự. Ngoài ra, môi trường có thể còn bao gồm một hoặc nhiều trong số Tween 80, natri xitrat, kali phosphat, natri axetat, mangan sulfat, magie sulfat, và nước cất.

2. Chế phẩm để làm thuyên giảm bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*, chứa kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó

Sáng chế đề xuất chế phẩm để làm thuyên giảm bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*, chế phẩm này chứa kim chi chứa *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 hoặc chiết phẩm của nó.

Kim chi theo sáng chế và phương pháp chế biến nó là giống như được đề cập ở mục “1. Kim chi chứa *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 và phương pháp chế biến nó,” và do đó, phần mô tả của chúng được lược bỏ.

Trong sáng chế này, bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori* có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh viêm dạ dày, bệnh loét dạ dày, bệnh ung thư dạ dày, và các bệnh tương tự.

Trong sáng chế này, "chiết phẩm kim chi" được dùng để chỉ nguyên liệu được chiết bằng phương pháp bất kỳ từ kim chi, mà là nguyên liệu thô, và có nghĩa bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn ở, tất cả chiết phẩm theo cách đó được chiết, sản phẩm cô đặc thu được từ đó, sản phẩm khô và bột của sản phẩm cô đặc.

Khi chiết phẩm được thu bằng cách chiết kim chi, mà là nguyên liệu thô, các phương pháp chiết thông thường, như chiết bằng dung môi, chiết bằng siêu âm, lọc và chiết hồi lưu, có thể được sử dụng mà không giới hạn. Đặc biệt, chiết bằng dung môi hoặc chiết hồi lưu có thể được sử dụng, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó. Quá trình chiết có thể được lặp lại vài lần, sau đó, chiết phẩm có thể còn được đưa vào các bước như cô đặc hoặc sấy thăng hoa. Đặc biệt, bột chiết phẩm kim chi nồng độ cao có thể được chế biến bằng cách cô đặc chiết phẩm kim chi thu được dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm cô đặc, và sấy thăng hoa sản phẩm cô đặc này, và sử dụng máy nghiền.

Theo một phương án của sáng chế, chiết phẩm kim chi có nghĩa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chiết phẩm thu được bằng cách chiết kim chi bằng nước, dung môi hữu cơ, hoặc dung môi hỗn hợp của chúng, sản phẩm cô đặc hoặc bột của chiết phẩm này. Dung môi hữu cơ có thể là dung môi bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm các rượu, đặc biệt là các rượu thấp có 1-4 nguyên tử cacbon, như metanol, etanol, propanol, hoặc butanol, hexan (n-hexan), ete, glyxerol, propylen glycol, butylen glycol, etyl axetat, metyl axetat, diclometan, clorofom, benzen và dung môi hỗn hợp của chúng. Đặc biệt là, dung môi chiết có thể là dung môi bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm nước, rượu có 1-4 nguyên tử cacbon, và dung môi hỗn hợp của rượu có 1-4 nguyên tử cacbon và nước. Ví dụ, dung môi chiết có thể là dung dịch nước metanol hoặc dung dịch nước etanol. Dung dịch nước của metanol hoặc etanol có thể là từ 10% (thể tích/thể tích) đến 99% (thể tích/thể tích) dung dịch nước, đặc biệt là từ 20% (thể

tích/thể tích) đến 70% (thể tích/thể tích) dung dịch nước, và đặc biệt hơn là, từ 30% (thể tích/thể tích) đến 60% (thể tích/thể tích) dung dịch nước, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó.

Theo một phương án của sáng chế, việc chiết có thể được thực hiện ở nhiệt độ từ 5°C đến 100°C, đặc biệt ở nhiệt độ từ 20°C đến 95°C, và đặc biệt hơn là ở nhiệt độ từ 50°C đến 90°C, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó. Ngoài ra, việc chiết có thể được thực hiện trong 1 đến 20 giờ, đặc biệt là trong 2 đến 16 giờ, và đặc biệt hơn là trong 3 đến 12 giờ, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó.

Theo một phương án của sáng chế, việc chiết có thể được thực hiện từ một đến tám lần, đặc biệt là từ một đến sáu lần, và đặc biệt hơn là từ một đến năm lần, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó. Chiết phẩm có thể là chiết phẩm đơn thu được từ mỗi lần chiết hoặc chiết phẩm hỗn hợp của các chiết phẩm thu được từ mỗi lần chiết, đặc biệt là chiết phẩm hỗn hợp của các chiết phẩm thu được từ mỗi lần chiết.

Trong sáng chế này, thuật ngữ “làm thuyên giảm” được dùng để chỉ, nhưng không chỉ giới hạn ở, tất cả các tác động mà ít nhất là làm giảm các thông số, như mức độ của các triệu chứng, liên quan đến việc điều trị bằng cách dùng kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó. Việc làm thuyên giảm bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori* theo sáng chế có thể là tác dụng của chính *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133, và có thể là tác dụng được gây ra bởi việc lên men của rau bằng các chủng, nhưng cơ chế không chỉ giới hạn ở đó.

Trong sáng chế này, chế phẩm có thể là thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe.

Thuật ngữ “thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe” là thuật ngữ giống như thực phẩm dùng để bảo vệ sức khỏe đặc biệt (food for special health use - FoSHU) và

được dùng để chỉ thực phẩm mà được chế biến để gây ra một cách hiệu quả chức năng điều hòa cơ thể bên cạnh việc cung cấp chất dinh dưỡng, do đó, có tác dụng chữa bệnh và y học cao. Ở đây, thuật ngữ “chức năng” có nghĩa liên quan đến việc kiểm soát các chất dinh dưỡng cho các cấu trúc và chức năng của cơ thể người hoặc thu được các tác dụng có lợi trong việc sử dụng hợp vệ sinh như trong các chức năng sinh lý học.

Chế phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có thể được chế biến bằng cách sử dụng phương pháp được sử dụng thông thường trong lĩnh vực này. Các nguyên liệu và các thành phần được sử dụng thông thường trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để chế biến chế phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Ngoài ra, chế phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có thể được chế biến thành sản phẩm bất kỳ được coi là thực phẩm, mà không giới hạn. Chế phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có thể được chế biến thành các dạng sản phẩm khác nhau và có ưu điểm so với các thuốc thông thường ở chỗ chế phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe này không có các tác dụng phụ mà có thể xảy ra khi dùng thuốc trong thời gian dài bởi vì nó dựa trên các nguyên liệu thực phẩm. Hơn nữa, chế phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tính linh động cao vì vậy nó có thể được tiêu thụ dưới dạng chế phẩm hỗ trợ để thúc đẩy tác dụng làm thuyên giảm các triệu chứng của bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*.

Thực phẩm bảo vệ sức khỏe được dùng để chỉ thực phẩm có tác dụng duy trì hoặc thúc đẩy sức khỏe tích cực so với thực phẩm nói chung, và thực phẩm bổ sung cho sức khỏe được dùng để chỉ thực phẩm nhằm mục đích bổ sung cho sức khỏe. Các thuật ngữ thực phẩm chức năng, thực phẩm bảo vệ sức khỏe, và thực phẩm bổ sung cho sức khỏe được sử dụng thay thế cho nhau, tùy từng trường hợp.

Trong sáng chế này, chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất mang tương

hợp sinh lý. Loại chất mang không bị giới hạn cụ thể, và chất mang bất kỳ có thể được sử dụng mà không giới hạn miễn là nó thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Hơn nữa, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các thành phần bổ sung mà có thể được sử dụng phổ biến trong các chế phẩm thực phẩm để cải thiện mùi, vị, hình thức bên ngoài, và các yếu tố tương tự. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa vitamin A, vitamin C, vitamin D, vitamin E, vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, vitamin B12, niacin, biotin, folat, axit pantothenic, và các chất tương tự. Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các chất khoáng như kẽm (Zn), sắt (Fe), canxi (Ca), crom (Cr), magie (Mg), mangan (Mn), đồng (Cu), và các chất tương tự, và các axit amin như lysin, tryptophan, xystein, valin, và các chất tương tự.

Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các chất phụ gia thực phẩm như chất bảo quản, chất tiết trùng, chất chống oxy hóa, chất màu, chất cố định màu, chất tẩy trắng, gia vị, chất làm ngọt, chất tạo hương vị, các chất trương nở, chất gia cố, chất nhũ hóa, chất làm đặc, lớp phủ, chất ức chế bột, dung môi, chất cải thiện, v.v.. Chất phụ gia có thể được chọn theo loại thực phẩm và được sử dụng với lượng thích hợp. Tỷ lệ của chất phụ gia như vậy không phải là quan trọng, nhưng thông thường chọn tỷ lệ của chất phụ gia như vậy trong khoảng từ 0,01 đến 5 phần khối lượng trên 100 phần khối lượng của chế phẩm theo sáng chế.

Hàm lượng của kim chi hoặc chiết phẩm của nó được chứa trong chế phẩm theo sáng chế có thể được xác định một cách thích hợp tùy thuộc vào mục đích sử dụng. Theo một phương án của sáng chế, hàm lượng của kim chi hoặc chiết phẩm của nó được chứa trong chế phẩm theo sáng chế có thể, nhưng không chỉ giới hạn ở, từ 0,0001 đến 20,0% khối lượng, ví dụ, và đặc biệt là từ 0,001 đến 1,0% khối lượng, tính

theo tổng khối lượng chế phẩm. Khi hàm lượng của kim chi hoặc chiết phẩm của nó nằm trong khoảng nêu trên, có thể thu được tác dụng làm thuyên giảm trên các triệu chứng của bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori* với một lượng kinh tế. Tuy nhiên, lượng kim chi hoặc chiết phẩm của nó để dùng trong thời gian dài cho sức khỏe và vệ sinh, hoặc kiểm soát sức khỏe có thể dưới khoảng nêu trên. Vì kim chi hoặc chiết phẩm của nó không có các vấn đề bất kỳ về độ an toàn, nó có thể được sử dụng với lượng lớn hơn so với khoảng nêu trên.

Chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa các thành phần được bổ sung phổ biến vào trong quá trình sản xuất thực phẩm, ngoài kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó, và ví dụ, chế phẩm này có thể chứa protein, hydrat cacbon, chất béo, chất dinh dưỡng, đồ gia vị, chất tạo hương vị, và các chất tương tự. Các ví dụ về các hydrat cacbon như vậy là các monosacarit như glucoza, fructoza và các chất tương tự; các disacarit như maltoza, sucroza, oligosacarit, và các chất tương tự; và các đường thông thường như polysacarit như dextrin, xyclodextrin, và rượu đường như xylitol, sorbitol, và erythritol. Để làm chất tạo hương vị, các chất tạo hương vị tự nhiên như Thaumatin và chiết phẩm của cây cỏ ngọt và chất tạo hương vị tổng hợp có thể được sử dụng. Ví dụ, khi chế phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe theo sáng chế được chế biến dưới dạng đồ uống, axit xitric, xirô ngô fructoza cao, đường, glucoza, axit axetic, axit malic, nước quả ép, các chiết phẩm tự nhiên, và các chất tương tự có thể còn được bao gồm ngoài chiết phẩm kim chi theo sáng chế.

Loại chế phẩm không bị giới hạn cụ thể. Các ví dụ về thực phẩm mà kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó có thể được bổ sung vào là thịt, xúc xích, bánh mì, sôcôla, kẹo, đồ ăn nhẹ, bánh kẹo, bánh pítsa, mì, mì sợi khác, gôm, các sản phẩm

sữa bao gồm kem, các loại xúp khác nhau, đồ uống, trà, đồ uống, đồ uống có cồn, và các phức hợp vitamin, và có thể bao gồm tất cả các thực phẩm cho sức khỏe với nghĩa thông thường của chúng.

Vì kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó chứa *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133, và hai vi khuẩn axit lactic này có đặc điểm là ức chế cao hoạt tính của *Helicobacter pylori*, chế phẩm chứa kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó có thể được sử dụng một cách hữu ích để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh liên quan do *Helicobacter pylori* gây ra.

3. Phương pháp phòng ngừa, điều trị, hoặc làm thuyên giảm bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*, phương pháp này sử dụng kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó

Sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa, điều trị, hoặc làm thuyên giảm bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*, bao gồm bước dùng kim chi hoặc chiết phẩm của nó cho đối tượng có hoặc có thể phát triển bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*.

Sáng chế đề xuất việc sử dụng kim chi hoặc chiết phẩm của nó để phòng ngừa, điều trị, hoặc làm thuyên giảm bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*.

Sáng chế đề xuất việc sử dụng kim chi hoặc chiết phẩm của nó để chế biến chế phẩm để phòng ngừa, điều trị, hoặc làm thuyên giảm bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*.

Kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó và phương pháp chế biến chúng là giống như được đề cập ở mục “1. Kim chi chứa *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 và phương pháp chế biến nó” và “2. Chế phẩm để làm thuyên giảm bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*, chứa kim chi

theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó,” và do đó, phần mô tả của chúng được lược bỏ.

Trong sáng chế này, thuật ngữ “phòng ngừa” có nghĩa bao gồm tất cả các tác động mà ức chế hoặc làm chậm triệu chứng của bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori* bằng cách dùng kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó.

Ngoài ra, trong sáng chế, thuật ngữ “điều trị” có nghĩa bao gồm tất cả các tác động mà cải thiện hoặc biến đổi có lợi triệu chứng của bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori* bằng cách dùng kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó.

Ngoài ra, trong sáng chế, thuật ngữ “việc dùng” được dùng để chỉ việc đưa một chất định trước vào trong đối tượng theo cách thích hợp.

Ngoài ra, trong sáng chế, thuật ngữ “đối tượng” được dùng để chỉ tất cả các động vật, như chuột cống, chuột nhắt, và vật nuôi, bao gồm người. Ví dụ cụ thể của chúng có thể là động vật có vú bao gồm người. Để làm một ví dụ khác, đối tượng có thể là đối tượng có hoặc có thể phát triển bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*.

Trong phương pháp theo sáng chế, đường dùng và phương thức dùng, của kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó, không bị giới hạn cụ thể, và đường dùng bất kỳ và phương thức dùng bất kỳ có thể được theo miễn là chế phẩm chứa kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó có thể đạt đến vị trí đích mong muốn. Đặc biệt, kim chi hoặc chiết phẩm của nó có thể được dùng thông qua các đường khác nhau bao gồm đường dùng qua miệng hoặc đường dùng ngoài đường tiêu hóa, nhưng việc dùng qua miệng là phổ biến.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm chứa kim chi phòng ngừa ung thư dưới dạng chế phẩm thực phẩm để can thiệp vào chế độ ăn đối với sự nhiễm *Helicobacter pylori* mới được nghiên cứu. Theo một phương án khác của sáng chế, giả

thuyết rằng sự can thiệp vào chế độ ăn bằng kim chi phòng ngừa ung thư trong mô hình chuột nhất thông thường có thể phòng ngừa, làm thuyên giảm hoặc điều trị các bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori* như bệnh viêm dạ dày, bệnh loét dạ dày, bệnh ung thư dạ dày, và các bệnh tương tự. Kim chi phòng ngừa ung thư có thể được chế biến bằng cách bổ sung rau có hàm lượng lycopene cao, chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119, và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP133 trong phương pháp chế biến kim chi thông thường, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó. Theo một phương án của sáng chế, kim chi theo sáng chế hoặc chiết phẩm của nó thể hiện tác dụng phòng bệnh và trị liệu tuyệt vời chống lại các bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*, cụ thể là bệnh viêm dạ dày, bệnh loét dạ dày, và bệnh ung thư dạ dày.

Theo một phương án của sáng chế, các chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133, mà là vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong việc chế biến kim chi theo sáng chế, có hoạt tính ức chế rõ rệt chống lại *Helicobacter pylori*, so với các chủng khác thuộc cùng loài.

Theo một phương án khác của sáng chế, kim chi chứa các chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 thể hiện tác dụng ức chế chống lại *Helicobacter pylori* ở nồng độ định trước (xem Fig. 1).

Theo một phương án khác của sáng chế, kim chi theo sáng chế có thể ngăn chặn một cách đáng kể sự biểu hiện của các yếu tố tăng trưởng mạch máu và các yếu tố viêm trong các tế bào dạ dày bình thường và phục hồi sự kết nối chặt chẽ của các tế bào (xem các Fig. 2 đến 4).

Theo một phương án khác của sáng chế, kim chi theo sáng chế có thể ức chế một cách đáng kể sự sinh trưởng của các tế bào ung thư dạ dày, gây ra sự chết tế bào

theo chương trình của các tế bào ung thư dạ dày (xem các Fig. 5 và 6), và ức chế sự tạo thành ung thư dạ dày trong mô hình động vật bị nhiễm *Helicobacter pylori* (xem Fig. 10).

Như vậy, kim chi chứa các chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo sáng chế thể hiện hoạt tính ức chế đáng kể chống lại *Helicobacter pylori*, và do đó, có thể được sử dụng một cách hữu ích để phòng ngừa, điều trị, hoặc làm thuyên giảm các bệnh khác nhau mà có thể là do *Helicobacter pylori*, như bệnh viêm dạ dày, bệnh loét dạ dày, và bệnh ung thư dạ dày.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ.

Tuy nhiên, các ví dụ sau chỉ minh họa cụ thể sáng chế, và các nội dung của sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ dưới đây.

Thứ nhất, quy trình chế biến, phương pháp thử nghiệm và các số liệu thống kê đối với kim chi theo sáng chế sẽ được mô tả. Các phân tích thống kê được thực hiện bằng GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) và phần mềm SPSS (phiên bản 12.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Ý nghĩa thống kê giữa các nhóm được xác định bằng thử nghiệm Mann-Whitney U. Ý nghĩa thống kê được chấp nhận ở $p < 0,05$.

Ví dụ 1: Phân lập các chủng có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng cao chống lại vi khuẩn *Helicobacter pylori*

<1-1> Phân lập và nhận diện chủng

Leuconostoc mesenteroides CJLM119, mà là vi khuẩn axit lactic có nguồn gốc từ kim chi và được dùng để chế biến kim chi theo sáng chế, là chủng vi sinh vật được nộp lưu tại ngân hàng gen của Viện nghiên cứu khoa học sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc với số nộp lưu KCTC 13043BP, và phương pháp phân lập và nhận diện chủng này được bộc lộ cụ thể trong patent Hàn Quốc số 10-1807995. Ngoài ra, *Lactobacillus plantarum* CJLP133, mà là vi khuẩn axit lactic có nguồn gốc từ kim chi và được dùng để chế biến kim chi theo sáng chế, là chủng vi sinh vật được nộp lưu tại ngân hàng gen của Viện nghiên cứu khoa học sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc với số nộp lưu KCTC 11403BP, và phương pháp phân lập và nhận diện chủng này được bộc lộ cụ thể trong patent Hàn Quốc số 10-1486999. Do đó, phần mô tả chi tiết của chúng được lược bỏ.

Trong sáng chế này, kim chi được chế biến bằng cách sử dụng các chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo phương pháp chế biến thông thường.

<1-2> Lựa chọn các chủng có hoạt tính ức chế cao chống lại vi khuẩn *Helicobacter pylori*

Các hoạt tính ức chế *Helicobacter pylori* của các chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133, mà được phân lập và nhận diện trong ví dụ <1-1>, và *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3100 / KCTC3722 và *Lactobacillus plantarum* KCTC3108 / DSM17853, mà được sử dụng làm đối chứng, được đo.

Kết quả là, các chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133 cho thấy hoạt tính ức chế rõ rệt chống lại *Helicobacter pylori*, so

với các chủng khác mà được sử dụng làm đối chứng và thuộc cùng loài.

Ví dụ 2: Chế biến kim chi

Kim chi tiêu chuẩn (dưới đây, đôi khi được gọi là 'sKimchi' hoặc 'SK') mà là đối chứng và kim chi phòng ngừa ung thư (dưới đây, đôi khi được gọi là 'CpKimchi' hoặc 'CPK') theo sáng chế được chế biến như sau.

<2-1> Chế biến kim chi tiêu chuẩn (sKimchi)

Dựa trên công thức làm kim chi tiêu chuẩn của Viện Kim chi Thế giới, kim chi tiêu chuẩn được chế biến bằng cách trộn cải thảo Kim chi đã được ướp muối với gia vị bao gồm bột ớt, tỏi, gừng, nước mắm cá cơm, củ cải trắng xay, hành lá, bột gạo nếp nhào, và đường, và sau đó, tiến hành lên men ở nhiệt độ thấp.

<2-2> Chế biến kim chi phòng ngừa ung thư (CpKim chi)

Kim chi phòng ngừa ung thư chủ yếu được làm từ cải thảo Kim chi có hàm lượng lycopene cao. Các hạt giống của “TheHan1ho” (Đơn giống cây trồng số công bố 2015-688, được công bố vào ngày 15 tháng mười hai, năm 2015) mà là giống cải thảo Kim chi có hàm lượng lycopene cao, vốn không tồn tại trong cải thảo Kim chi bình thường, được mua. Cải thảo Kim chi được bảo đảm thông qua hợp đồng canh tác với nông dân trồng cải thảo Kim chi và cải thảo Kim chi thu hoạch được sử dụng cho kim chi phòng ngừa ung thư sau khi ướp muối theo quy trình chế biến kim chi. Kim chi phòng ngừa ung thư được chế biến theo cách giống như trong chế biến kim chi tiêu chuẩn, ngoại trừ rằng: cải thảo Kim chi có hàm lượng lycopene cao được sử dụng làm cải thảo Kim chi, và hai loại vi khuẩn axit lactic có nguồn gốc từ kim chi, các chủng *Leuconostoc mesenteroides* CJLM119 và *Lactobacillus plantarum* CJLP133, mà được phân lập và được nhận diện trong ví dụ <1-1>, được bổ sung vào.

<2-3> Chế biến sản phẩm cô đặc của chiết phẩm kim chi

Kim chi chế biến được trong các ví dụ <2-1> và <2-2> được sấy thăng hoa và sau đó, được nghiền thành bột. Metanol được bổ sung vào bột với lượng 20 lần khối lượng bột, và sau đó, việc chiết được thực hiện bằng bộ phận khuấy trong 12 giờ. Dịch nổi chiết được được lọc qua giấy lọc, và metanol được bổ sung lần nữa vào kết tủa còn lại để thực hiện chiết trong 12 giờ. Chiết phẩm được cô bằng nhiệt ở nhiệt độ khoảng 40°C bằng máy cô để tạo ra sản phẩm cô đặc, và sản phẩm cô đặc này được bảo quản ở 4°C để sử dụng trong các thử nghiệm nữa.

Ví dụ 3: Xác định tác dụng ức chế sự sinh trưởng chống lại *Helicobacter pylori*

<3-1> Môi trường nuôi cấy của chủng *Helicobacter pylori*

Chủng *Helicobacter pylori* ATCC 43504 (Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ, chủng thuộc loại cagA+ và vacA s1-m1) được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường thạch BBL Trypticase đậu nành (Trypticase soy - TS) (TSAB; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) với 5% máu cừu trong điều kiện ưa vi khí (BD GasPaK EZ Gas Generating Systems, BD Biosciences) trong 3 ngày. Chủng *Helicobacter pylori* được thu hoạch trong môi trường TS, được ly tâm ở 3000 X g trong 5 phút, và được tái tạo huyền phù trong môi trường ở nồng độ cuối là 10⁹ đơn vị tạo khuẩn lạc (colony-forming unit - CFU)/ml. Trong tất cả các thử nghiệm, các môi trường nuôi cấy được nuôi trồng trong 72 giờ trong môi trường thạch TS được sử dụng.

<3-2> Xác định hoạt tính ức chế sự sinh trưởng chống lại *Helicobacter pylori*

Để xác định tác dụng ức chế của kim chi theo sáng chế chống lại *Helicobacter pylori*, môi trường đã được đưa chủng *Helicobacter pylori* của ví dụ <3-1> vào được xử lý và được nuôi cấy với các nồng độ khác nhau của sản phẩm cô đặc của chiết phẩm

kim chi chế biến được trong ví dụ <2-3>, và kích thước của vùng ức chế được đo.

Kết quả là, đã phát hiện ra rằng sản phẩm cô đặc của chiết phẩm kim chi theo sáng chế có tác dụng ức chế chống lại vi khuẩn *Helicobacter pylori* ở nồng độ 500 mg/ml hoặc cao hơn (Fig. 1).

Ví dụ 4: Xác định các tác dụng trên bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori* ở dòng tế bào dạ dày bình thường (RGM1; tế bào niêm mạc dạ dày bình thường)

<4-1> Xác định hoạt tính ức chế trên các yếu tố tạo mạch

Để xác định tác dụng của kim chi theo sáng chế đến các yếu tố tăng trưởng mạch máu, các tế bào dòng tế bào dạ dày bình thường RGM1 được xử lý bằng 50 MOI của *Helicobacter pylori* và sau đó, bằng sản phẩm cô đặc của chiết phẩm kim chi chế biến được trong ví dụ <2-3> ở nồng độ 5 mg/ml trong 6 giờ. Sau khi xử lý, các thành phần môi trường được loại bỏ và các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch PBS (Dulbecco). Sau đó, RiboEX (500 µl, GeneAll, Seoul, South Korea) được bổ sung vào đĩa được ủ ở 4°C trong 10 phút để tiến hành RT-PCR. RiboEX được thu lại và được đặt vào trong ống 1,5 ml, và 100 µl clorofom được bổ sung vào và được trộn từ từ. Sau 10 phút ủ trên đá, các mẫu được ly tâm ở 10.000 g trong 30 phút. Dịch nổi được chiết và được trộn với 200 µl isopropanol và hỗn hợp được ủ ở 4°C trong 1 giờ. Sau khi ly tâm ở 13.000 g trong 30 phút, kết tủa được rửa bằng etanol 70% (thể tích/thể tích). Etanol được làm bay hơi hoàn toàn, và sau đó, hạt được hòa tan trong 100 µl nước đã được xử lý bằng DEPC (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.). Sau đó, PCR được tiến hành để xác định các thay đổi trong các gen liên quan.

Kết quả là, đã phát hiện ra rằng sự biểu hiện của VEGF và bFGF, mà là các chất chỉ thị của các yếu tố tạo mạch tăng lên qua việc xử lý bằng *Helicobacter pylori*,

được giảm ở nhóm xử lý bằng kim chi phòng ngừa ung thư (CPK) (Fig. 2).

<4-2> So sánh tác dụng chống viêm

Để xác nhận tác dụng chống viêm của kim chi theo sáng chế, các tế bào RGM1 được xử lý bằng 50 MOI của *Helicobacter pylori* và sau đó, bằng sản phẩm cô đặc của chiết phẩm kim chi chế biến được trong ví dụ <2-3> ở nồng độ 5 mg/ml. Sau đó, các thay đổi trong các gen liên quan được xác định theo phương pháp RT-PCR trong ví dụ <4-1>.

Kết quả là, đã phát hiện ra rằng sự biểu hiện của COX-2 và iNOS, mà là các chất chỉ thị của chứng viêm tăng lên qua việc xử lý bằng *Helicobacter pylori*, được giảm ở nhóm xử lý bằng kim chi phòng ngừa ung thư (CPK) (Fig. 3).

<4-3> So sánh tác dụng kết nối tế bào

Để xác định tác dụng của kim chi theo sáng chế đến các chất chỉ thị của sự kết nối chặt chẽ của các tế bào, các tế bào RGM1 được xử lý bằng 100 MOI của *Helicobacter pylori* và sau đó, bằng sản phẩm cô đặc của chiết phẩm kim chi chế biến được trong ví dụ <2-3> ở các nồng độ 5 g/ml và 10 g/ml trong 6 giờ. Tại thời điểm này, phần trên của lớp tế bào đơn, mà trở nên hợp dòng do sự tăng sinh của các tế bào, được rửa ba lần bằng 0,5 ml D-PBS(-) lạnh và được nạp bằng 0,5 ml HBSS lạnh và được chuyển sang lỗ mới chứa 1,5 ml HBSS lạnh. Sau khi để lỗ như vậy trong 30 phút, điện trở qua biểu mô (transepithelial electrical resistance) (TERR%) giữa lớp trên và lớp dưới được đo.

Kết quả là, đã phát hiện ra rằng trong mô hình nhiễm *Helicobacter pylori*, sự kết nối chặt chẽ của các tế bào được phục hồi khi xử lý bằng kim chi phòng ngừa ung thư theo sáng chế ở nồng độ cao (Fig. 4).

Ví dụ 5: Xác định các tác dụng trên bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori* ở dòng tế bào ung thư dạ dày (MKN28; tế bào ung thư dạ dày)

<5-1> Xác định tác dụng ức chế sự sinh trưởng trên dòng tế bào ung thư dạ dày

Để xác định tác dụng ức chế sự sinh trưởng của kim chi theo sáng chế trên dòng tế bào ung thư dạ dày, các tế bào MKN28 được xử lý bằng các sản phẩm cô đặc của các chiết phẩm kim chi chế biến được trong ví dụ <2-3> của kim chi tiêu chuẩn và kim chi phòng ngừa ung thư lần lượt ở các nồng độ là 10, 20, và 50 mg/ml trong 6 giờ. Sau đó, khả năng sống của tế bào của mỗi nhóm xử lý được so sánh.

Kết quả là, đã phát hiện ra rằng kim chi phòng ngừa ung thư theo sáng chế có thể ức chế đáng kể hơn sự sinh trưởng của dòng tế bào ung thư dạ dày theo cách phụ thuộc nồng độ so với kim chi tiêu chuẩn (Fig. 5).

<5-2> Xác định tác dụng gây chết tế bào theo chương trình trên dòng tế bào ung thư dạ dày

Để xác định tác dụng gây chết tế bào theo chương trình của việc xử lý bằng kim chi phòng ngừa ung thư trong các tế bào ung thư có đặc điểm là không chết tế bào theo chương trình, mỗi tế bào được xử lý bằng sản phẩm cô đặc của các chiết phẩm kim chi chế biến được bằng phương pháp trong ví dụ <2-3> của kim chi tiêu chuẩn và kim chi phòng ngừa ung thư ở nồng độ thích hợp trong 48 giờ, và sau đó, được thu hồi bằng 1X PBS chứa 1% FBS. Chất phản ứng AnnexinV & Dead Cell được phân phối ở tỷ lệ 1:1 vào mỗi tế bào thu hồi được ở một nồng độ khác, và sau đó, các tế bào được cho phản ứng trong 20 phút trong điều kiện tối ở nhiệt độ trong phòng, và tỷ lệ của các tế bào bị gây chết tế bào theo chương trình được đo và được phân tích.

Kết quả là, đã phát hiện ra rằng khi xử lý dòng tế bào ung thư dạ dày MKN28

bằng kim chi phòng ngừa ung thư theo sáng chế, sự chết tế bào theo chương trình được gây ra ở 70% tế bào hoặc nhiều hơn (Fig. 6).

<5-3> Xác định các yếu tố điều hòa sự chết tế bào theo chương trình của dòng tế bào ung thư dạ dày

Để xác định tác dụng của kim chi theo sáng chế trên các yếu tố điều hòa sự chết tế bào theo chương trình của dòng tế bào ung thư dạ dày, dòng tế bào ung thư dạ dày MKN28 được xử lý bằng sản phẩm cô đặc của chiết phẩm kim chi chế biến được trong ví dụ <2-3> ở nồng độ 20 mg/ml, và sau đó, các thành phần môi trường được loại bỏ, và các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch PBS (Dulbecco). Các tế bào được làm tan bằng dung dịch đệm gây tan tế bào đá lạnh (Cell Signaling Technology, Denver, MA) chứa 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl florua, Sigma Aldrich, St Louis, MO). Sau 20 phút phản ứng, mỗi mẫu được ly tâm ở 10.000 x g trong 10 phút. Sau đó, dịch nổi được thu lại. Các protein của dịch tan được tách ra bằng cách điện di trên gel natri dodecyl sulfat-polyacrylamit (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis - SDS-PAGE), được chuyển sang màng polyvinyliden florua (polyvinylidene fluoride - PVDF), được cho phản ứng với kháng thể sơ cấp, được rửa, và sau đó, được cho phản ứng với kháng thể thứ cấp được liên hợp peroxidaza, được rửa lại, và sau đó, các thay đổi về sự biểu hiện của các yếu tố điều hòa sự chết tế bào theo chương trình được xác định bằng hệ thống ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Kết quả là, đã phát hiện ra rằng mức độ biểu hiện của caspase 3 được phân cắt, caspase 8 được phân cắt, và PARP được phân cắt, mà tham gia vào sự chết tế bào theo chương trình, được tăng lên đáng kể trong nhóm xử lý bằng kim chi phòng ngừa ung

thư theo sáng chế (CPK) so với mức độ biểu hiện của các chất này trong nhóm xử lý bằng kim chi tiêu chuẩn (SK) (Fig. 7).

<5-4> Xác định các yếu tố liên quan đến chu kỳ tế bào của dòng tế bào ung thư dạ dày

Để xác định tác dụng của kim chi theo sáng chế trên các yếu tố liên quan đến chu kỳ tế bào của dòng tế bào ung thư dạ dày, dòng tế bào ung thư MKN28 được xử lý bằng sản phẩm cô đặc của chiết phẩm kim chi chế biến được trong ví dụ <2-3> ở nồng độ 20 mg/ml, và sau đó, các thành phần môi trường được loại bỏ, và các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch PBS (Dulbecco). Các tế bào được làm tan bằng dung dịch đệm gây tan tế bào đá lạnh (Cell Signaling Technology, Denver, MA) chứa 1 mM PMSF (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Sau 20 phút phản ứng, mỗi mẫu được ly tâm ở 10.000 x g trong 10 phút. Sau đó, dịch nổi được thu lại. Các protein của dịch tan được tách ra bằng SDS-PAGE, được chuyển sang màng PVDF, được cho phản ứng với kháng thể sơ cấp, được rửa, và sau đó, được cho phản ứng với kháng thể thứ cấp được liên hợp peroxidaza, được rửa lại, và sau đó, các thay đổi về sự biểu hiện của các yếu tố liên quan đến chu kỳ tế bào được xác định bằng hệ thống ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Kết quả là, mức độ biểu hiện của cyclin D1, CDK4, CDK2, cyclin E, và cyclin A, mà tham gia trong chu kỳ tế bào, được giảm đáng kể trong nhóm xử lý bằng kim chi phòng ngừa ung thư theo sáng chế (CPK) so với mức độ biểu hiện của các chất này trong nhóm xử lý bằng kim chi tiêu chuẩn (SK). Từ kết quả này, đã phát hiện ra rằng cơ chế của sự chết tế bào theo chương trình của dòng tế bào ung thư dạ dày là do sự điều hòa chu kỳ tế bào (Fig. 8).

Ví dụ 6: Xác định tác dụng trên bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori* trong mô hình trong thời gian dài của các động vật bị nhiễm *Helicobacter pylori*

Để xác định tác dụng ức chế của kim chi theo sáng chế trên các thông số bệnh lý trong mô hình trong thời gian dài của các động vật bị nhiễm *Helicobacter pylori*, chuột nhắt cái C57BL/6 năm tuần tuổi (Charles River Japan) được cho ăn chế độ ăn hạt thương mại được tiệt trùng (Biogenomics, South Korea) và nước vô trùng tùy thích, và được nhốt trong buồng điều hòa không khí ở nhiệt độ 24°C. Sau 1 tuần thích nghi, 20 mg/kg pantoprazol được tiêm ba lần để tạo thuận lợi cho sự xâm chiếm của *Helicobacter pylori* nhờ giảm độ axit trong dạ dày. Và sau đó, mỗi động vật được gây nhiễm trong dạ dày bằng huyền phù chứa *Helicobacter pylori* (chứa 10^9 CFU/ml) với thể tích tương đương (0,3 ml) của canh TS sạch bằng cách sử dụng kim luồn vào dạ dày. Nhóm đối chứng được tiêm canh TS sạch, và tất cả các nhóm thử nghiệm được tiêm *Helicobacter pylori* tổng số bốn lần trong vòng một tuần. Chuột nhắt được cho ăn chế độ ăn hạt đặc biệt dựa trên AIN76 chứa 7,5% NaCl để gây ra bệnh viêm dạ dày trong 4 tuần.

Sau đó, chuột nhắt dương tính với *Helicobacter pylori* được chia một cách ngẫu nhiên thành bốn nhóm ($n = 10$). Chế độ ăn hạt AIN76 chứa 7,5% NaCl được dùng trong 24 tuần để thúc đẩy quá trình gây ung thư do *Helicobacter pylori* ở tất cả các động vật đã được gây nhiễm. Nhóm đối chứng và các nhóm thử nghiệm lần lượt được thể hiện trên Fig. 9. Nhóm 1: Nhóm đối chứng, Nhóm 2: Nhóm bị nhiễm *Helicobacter pylori*, Nhóm 3: Nhóm bị nhiễm *Helicobacter pylori* và chế độ ăn kim chi phòng ngừa ung thư nồng độ thấp, Nhóm 4: Nhóm bị nhiễm *Helicobacter pylori* và chế độ ăn kim chi phòng ngừa ung thư nồng độ cao, Nhóm 5: Nhóm bị nhiễm *Helicobacter pylori* và

chế độ ăn kim chi tiêu chuẩn lần lượt được thử nghiệm.

Kết quả là, chỉ số thương tổn vĩ mô được tăng lên một cách đáng kể trong nhóm đối chứng G2, còn được giảm một cách đáng kể trong các nhóm được điều trị bằng kim chi phòng ngừa ung thư G3 và G4 ($p < 0,01$). Ngoài ra, kích thước đáng kể của ung thư dạ dày được tạo ra trong nhóm đối chứng G2, còn sự tạo thành ung thư dạ dày được giảm trong các nhóm được điều trị bằng kim chi phòng ngừa ung thư G3 và G4 (các Fig. 10 và 11).

Mặc dù các phương án làm ví dụ của sáng chế đã được mô tả trên đây, phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể như được mô tả trên đây, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thay đổi sáng chế trong phạm vi được mô tả trong yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kim chi được chế biến bằng cách ướp muối và thêm gia vị vào rau, và sau đó, lên men nó bằng vi khuẩn axit lactic, trong đó vi khuẩn axit lactic bao gồm *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 13043BP và *Lactobacillus plantarum* KCTC 11403BP.
2. Kim chi theo điểm 1, trong đó rau được chọn từ nhóm bao gồm cải thảo Kim chi, củ cải trắng, hành lá, cải bẹ xanh, dưa chuột, và các kết hợp của chúng.
3. Kim chi theo điểm 2, trong đó rau là cải thảo Kim chi.
4. Kim chi theo điểm 3, trong đó cải thảo Kim chi là cải thảo có hàm lượng lycopene cao.
5. Kim chi theo điểm 4, trong đó lycopene được chứa với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5 mg trên 100 g cải thảo Kim chi.
6. Kim chi theo điểm 1, trong đó *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 13043BP được chứa với lượng từ 0,01 đến 5% khối lượng tính theo tổng khối lượng của kim chi và *Lactobacillus plantarum* KCTC 11403BP được chứa với lượng từ 0,01 đến 5% khối lượng tính theo tổng khối lượng của kim chi.
7. Chế phẩm để làm thuyên giảm bệnh liên quan đến *Helicobacter pylori*, chế phẩm này chứa kim chi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 hoặc chiết phẩm của nó.

8. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó chiết phẩm kim chi là chiết phẩm thu được bằng cách chiết kim chi bằng nước, dung môi hữu cơ hoặc dung môi hỗn hợp của chúng.
9. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó dung môi hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm rượu, hexan, ete, glyxerol, propylen glycol, butylen glycol, etyl axetat, metyl axetat, diclometan, clorofom, benzen và các dung môi hỗn hợp của chúng.
10. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó dung môi hỗn hợp được chọn từ nhóm bao gồm nước, rượu có 1-4 nguyên tử cacbon, và dung môi hỗn hợp của rượu có 1-4 nguyên tử cacbon và nước.
11. Chế phẩm theo điểm 10, trong đó dung môi hỗn hợp là dung dịch nước metanol hoặc dung dịch nước etanol.
12. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó chiết phẩm kim chi được chọn từ nhóm bao gồm chiết phẩm, sản phẩm cô đặc của chiết phẩm, sản phẩm khô của sản phẩm cô đặc, và bột.

HÌNH VẼ

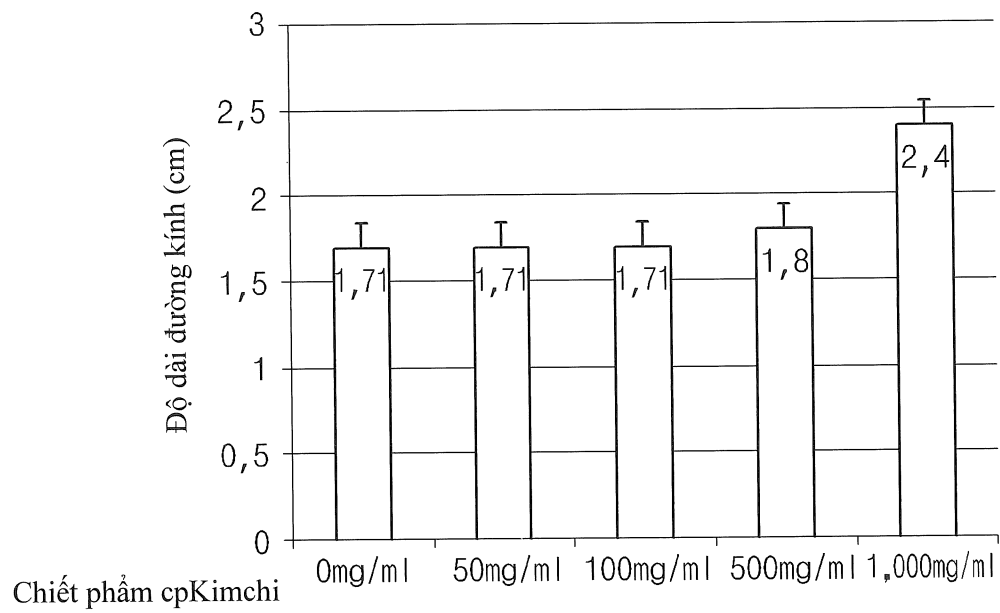


Fig. 1

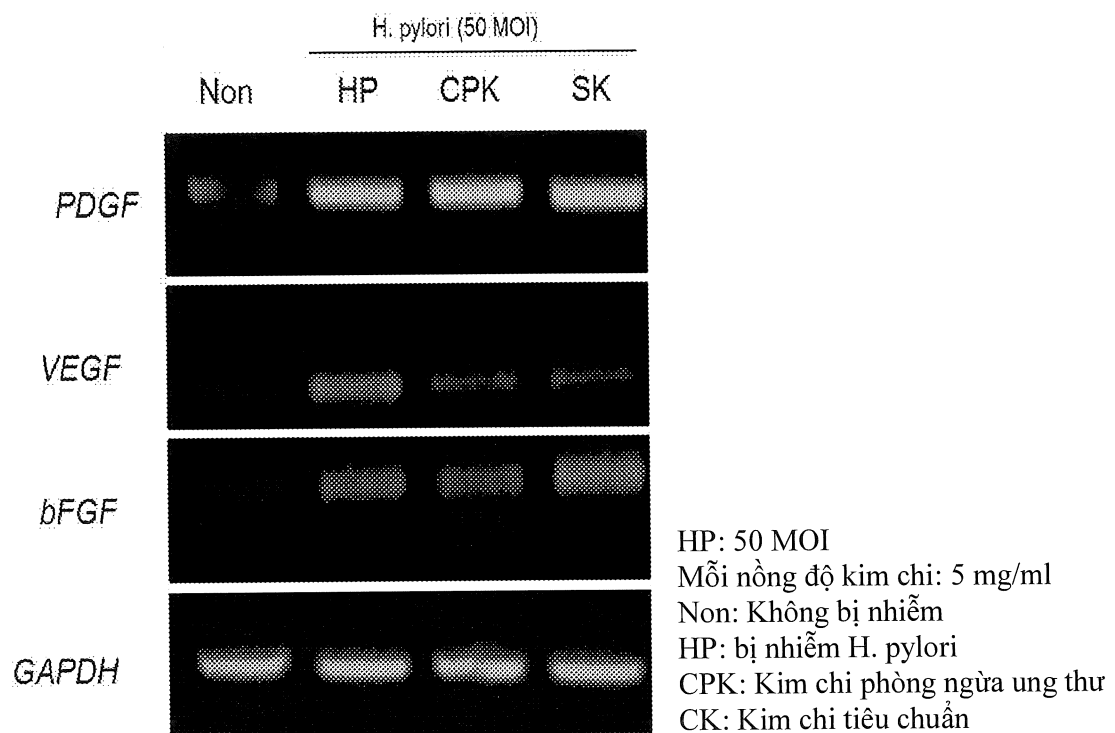


Fig. 2

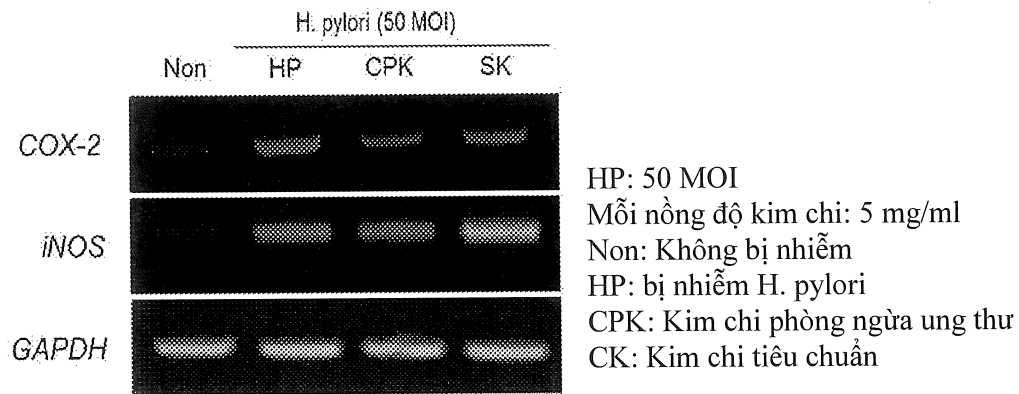


Fig. 3

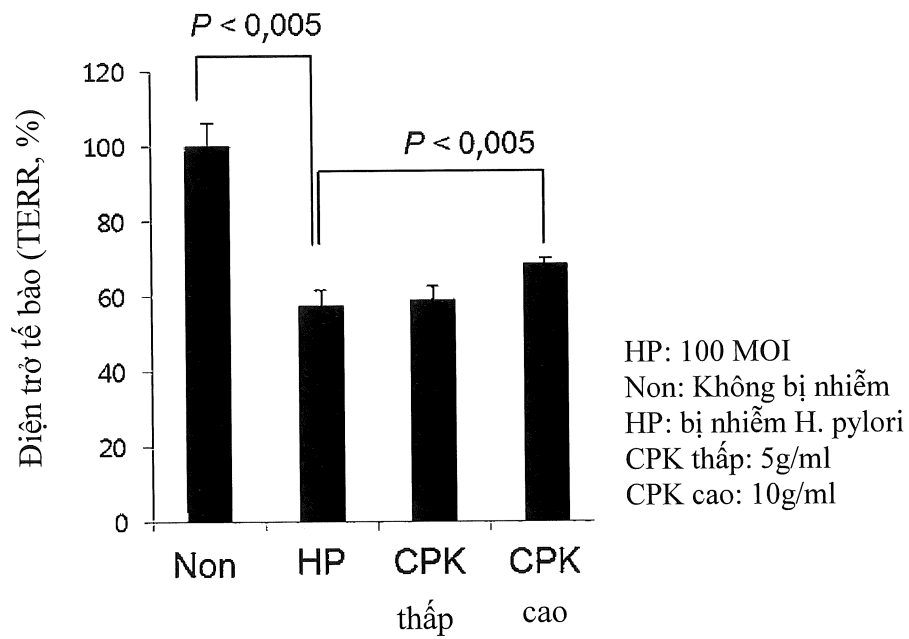


Fig. 4

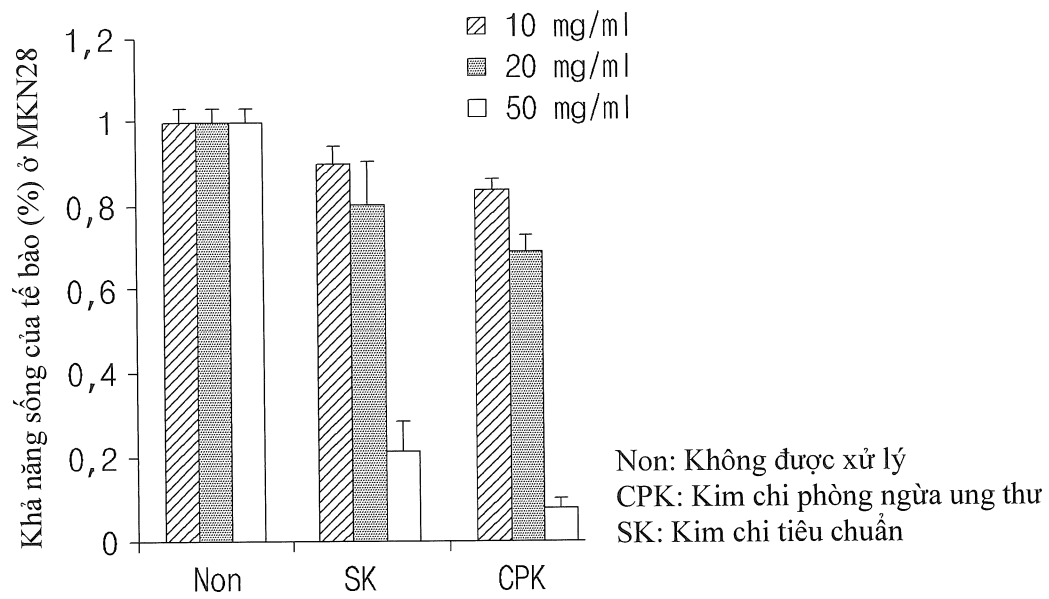


Fig. 5

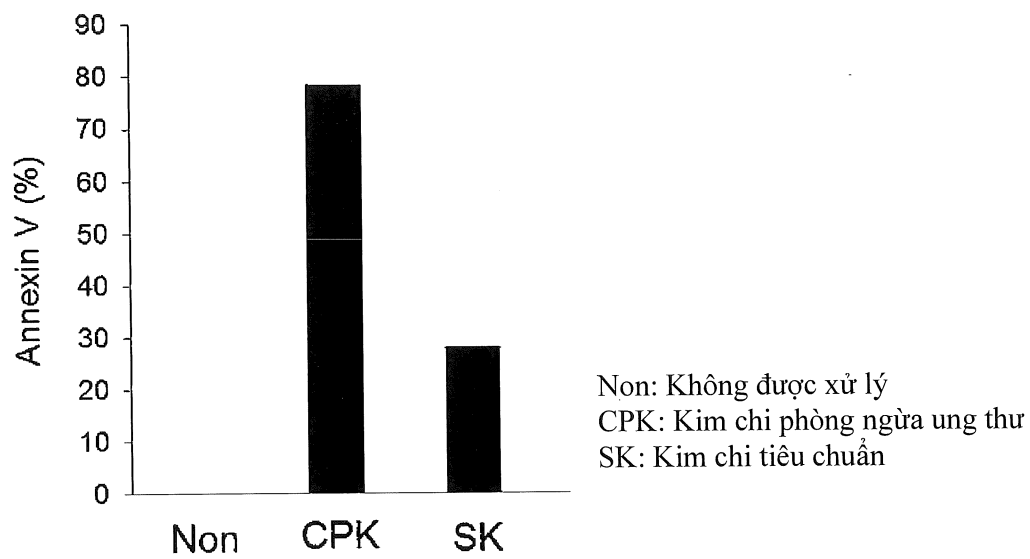


Fig. 6

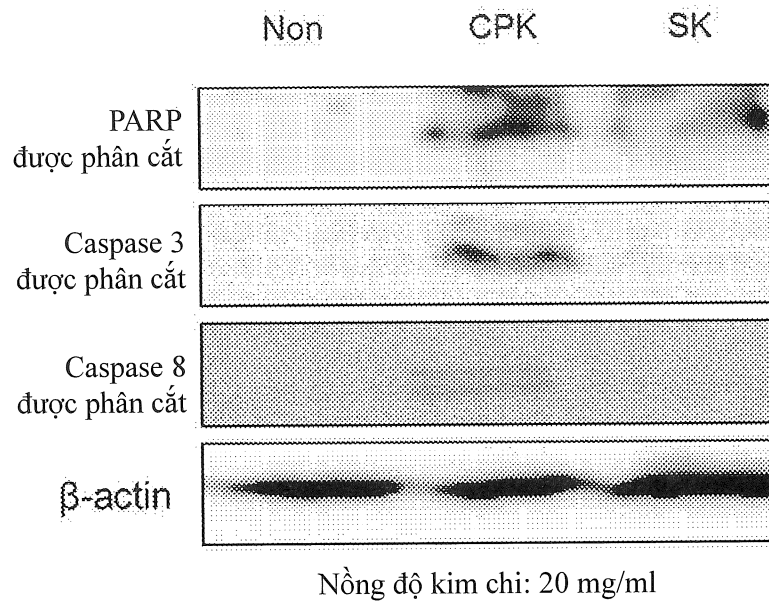


Fig. 7

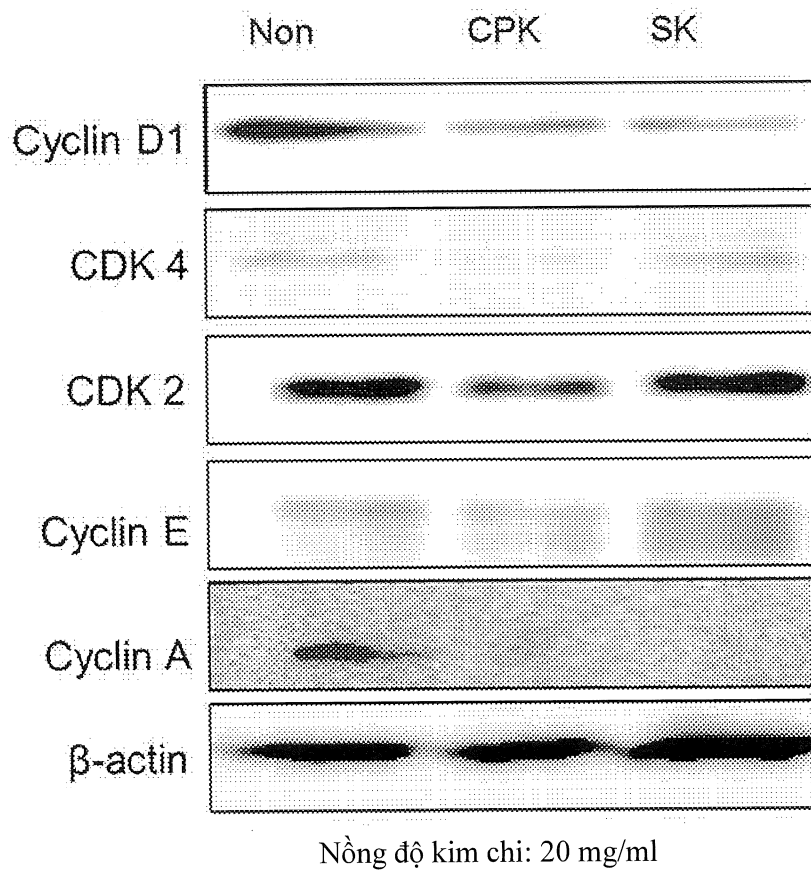


Fig. 8

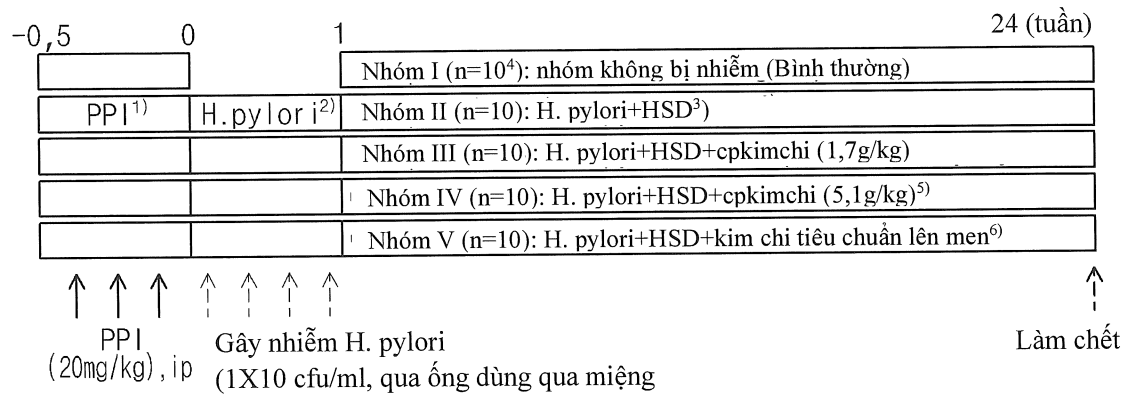


Fig. 9

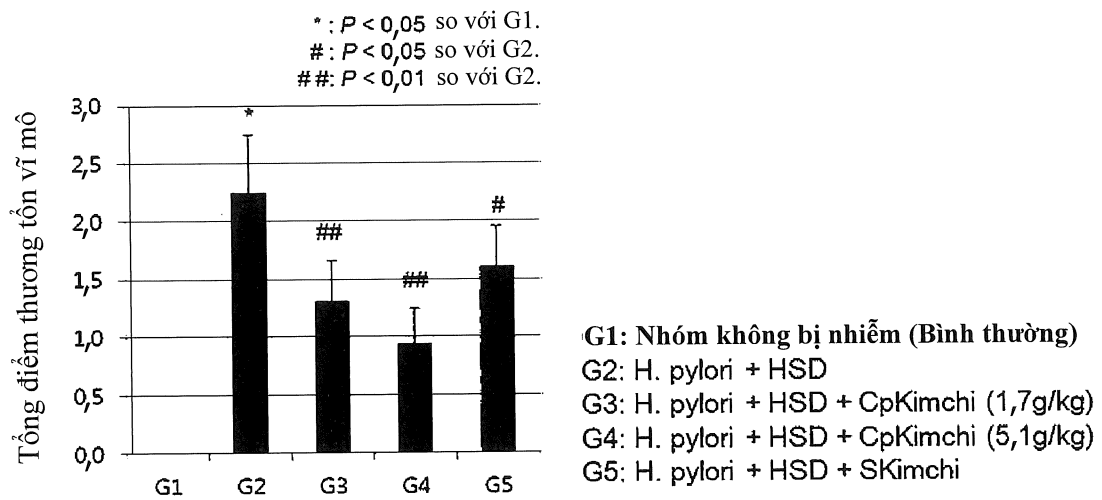


Fig. 10

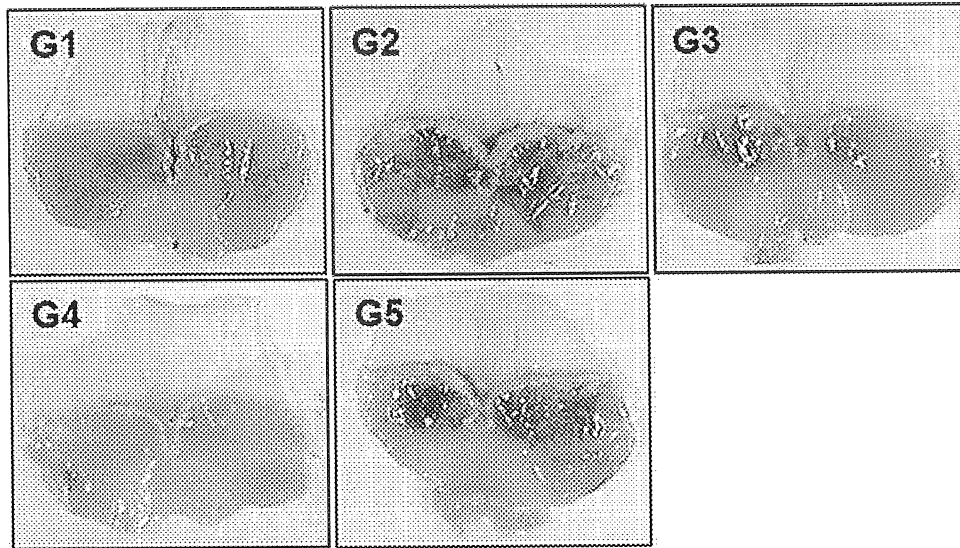


Fig. 11