



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

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

(11)



1-0049147

(51)^{2020.01} C12N 1/20; A23C 9/13; A23L 33/135; (13) B
A23C 9/127; A23L 2/52

(21) 1-2021-06038

(22) 27/02/2020

(86) PCT/KR2020/002845 27/02/2020

(87) WO2020/175940 03/09/2020

(30) 10-2019 0024254 28/02/2019 KR

(45) 25/07/2025 448

(43) 27/12/2021 405A

(73) KOREA FOOD RESEARCH INSTITUTE (KR)

245, Nongsaengmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-Gun, Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea

(72) CHOI, Hak-Jong (KR); LIM, Seul-Ki (KR).

(74) Công ty TNHH Trà và cộng sự (TRA & ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) LEUCONOSTOC CITREUM WIKIM0104 VÀ CHẾ PHẨM ĐỀ PHÒNG NGỪA,
CẢI THIỆN HOẶC ĐIỀU TRỊ BỆNH GAN NHIỄM MỠ, BỆNH BÉO PHÌ HOẶC
VIÊM CHỨA LEUCONOSTOC CITREUM WIKIM0104

(21) 1-2021-06038

(57) Sáng chế đề cập đến *Leuconostoc citreum* WiKim0104 mới được phân lập từ kimchi và chế phẩm chứa nó. *Leuconostoc citreum* WiKim0104 theo sáng chế cho thấy tác dụng ức chế sự sinh ra gan nhiễm mỡ bằng cách ức chế sự tích tụ chất béo trong tế bào gan và giảm biểu hiện của các gen liên quan đến gan nhiễm mỡ, do đó nó có thể được sử dụng khác nhau theo từng trường hợp để làm chế phẩm phòng ngừa, cải thiện và điều trị bệnh gan nhiễm mỡ, bệnh béo phì hoặc viêm.

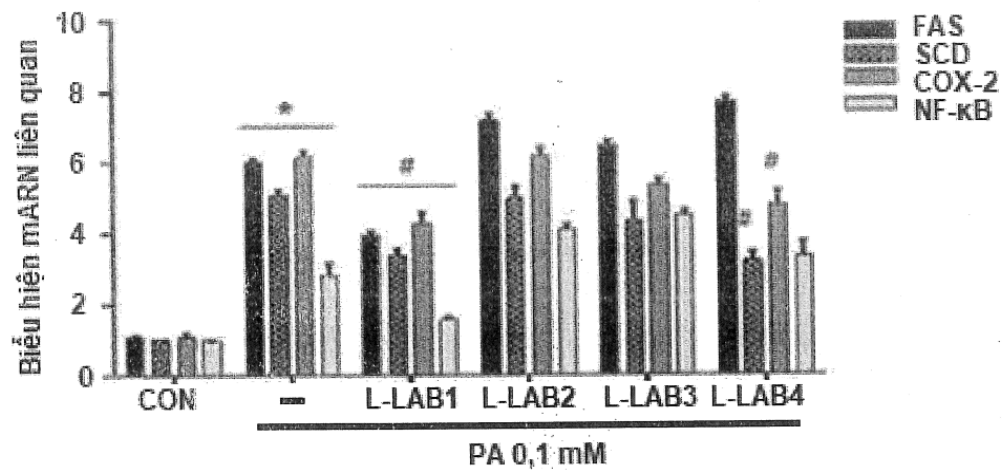


Fig. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng mới được phân lập từ kimchi và chế phẩm để phòng ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh gan nhiễm mỡ, bệnh béo phì hoặc viêm, chữa chủng mới này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gan nhiễm mỡ là bệnh trong đó không đạt được chuyển hóa mỡ bình thường do ăn vào quá nhiều mỡ, làm tăng tích tụ và tổng hợp ở gan, làm giảm sự bài tiết dẫn đến tích tụ triglycerit trong tế bào gan và khi mỡ chiếm trên 5% tổng khối lượng gan thì được xếp vào loại gan nhiễm mỡ.

Ngoài ra, do chế độ ăn uống phương Tây hoá gần đây chứa nhiều chất béo, nhiều calo và sự lười vận động do sự phát triển của nền văn minh nên số lượng bệnh nhân gan nhiễm mỡ ngày càng tăng nhanh, độ tuổi bệnh nhân cũng tăng từ thanh thiếu niên đến sau 60 tuổi. Khi chất béo liên tục được tích tụ trong gan, nó sẽ tiến triển thành bệnh viêm gan nhiễm mỡ kèm theo viêm, và bệnh xơ gan có thể xảy ra do hoại tử mô gan và xơ hóa gan vì viêm mạn tính. Khi các triệu chứng trầm trọng hơn, có khả năng phát triển thành ung thư gan. Vì vậy, gan nhiễm mỡ là nguyên nhân lớn nhất dẫn đến bệnh viêm gan, bệnh xơ gan và ung thư gan.

Các loại thuốc hiện đang được sử dụng trên thị trường bao gồm Xenical™ (Roche) có thành phần chính là orlistat, và Reductil™ (Abbott) có thành phần chính là sibutramine, và các loại thuốc tương tự nhưng có các tác dụng phụ như tiêu chảy, đau bụng, và mất ngủ, và các tác dụng phụ tương tự, và như một tác nhân điều trị gan nhiễm mỡ, các loại thuốc làm từ fibrate đại diện là clofibrate, và các loại tương tự được sử dụng trong thực hành lâm sàng, nhưng các tác dụng phụ như rối loạn chức năng gan đã được báo cáo.

Mặt khác, mặc dù các vi khuẩn axit lactic khác nhau trong tài liệu sáng chế 1 dưới đây cho thấy tác dụng cải thiện gan nhiễm mỡ, có nhu cầu cấp thiết để phát triển

một loại thuốc điều trị gan nhiễm mỡ có tác dụng cơ bản phòng ngừa hoặc cải thiện gan nhiễm mỡ và không có các tác dụng phụ đề cập trên đây.

Trong khi đó, tài liệu sáng chế 1 bộc lộ tác dụng cải thiện gan nhiễm mỡ của nhiều loại vi khuẩn axit lactic khác nhau như *Bifidobacterium* sp. và *Lactobacillus* sp. và các loại vi khuẩn tương tự, nhưng thuốc điều trị có tác dụng điều trị cơ bản đối với gan nhiễm mỡ và không có các tác dụng phụ nói trên vẫn chưa được phát triển. Vì vậy, có nhu cầu cấp thiết để phát triển một loại thuốc điều trị có thể điều trị cơ bản gan nhiễm mỡ và không có các tác dụng phụ.

(Tài liệu sáng chế 1) Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc số 10-1937365 (08/08/2018)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Sáng chế đề xuất vi khuẩn axit lactic *Leuconostoc citreum* sp. mới có tính hiệu quả tuyệt vời để phòng ngừa hoặc cải thiện bệnh gan nhiễm mỡ.

Giải pháp giải quyết vấn đề kỹ thuật

Theo đó, kết quả là các tác giả sáng chế này đã cố gắng tìm ra một chủng vi khuẩn axit lactic có tác dụng phòng ngừa hoặc cải thiện gan nhiễm mỡ từ các thực phẩm lên men truyền thống, họ đã phân lập và định danh được một chủng vi khuẩn axit lactic *Weissella* sp. mới, *Leuconostoc citreum* WiKim0104, theo cách đó hoàn thành sáng chế này.

Một phương án thực hiện của sáng chế đề xuất chế phẩm để phòng ngừa hoặc cải thiện chứng viêm, béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ chứa *Leuconostoc citreum* WiKim0104, giống cấy của nó, dịch phân giải của nó hoặc chiết xuất của nó làm thành phần hoạt tính.

Bệnh gan nhiễm mỡ có thể là bất kỳ một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm gan nhiễm mỡ đơn thuần, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu, xơ hóa gan và xơ gan.

Chế phẩm có thể là chế phẩm thực phẩm, chế phẩm vi khuẩn axit lactic khởi động để lên men thực phẩm, chế phẩm thức ăn chăn nuôi hoặc chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi, hoặc chế phẩm dược.

Chế phẩm thực phẩm có thể bao gồm dạng thực phẩm chức năng tốt cho sức khỏe, dạng đồ uống, dạng thanh hoặc dầu lên men.

Một phương án thực hiện khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng *Leuconostoc citreum* WiKim0104, giống cấy của nó, dịch phân giải của nó hoặc chiết xuất của nó để phòng ngừa, cải thiện hoặc điều trị chứng viêm, béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ.

Bệnh gan nhiễm mỡ có thể là bất kỳ một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm gan nhiễm mỡ đơn thuần, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu, xơ hóa gan và xơ gan.

Leuconostoc citreum WiKim0104 có thể được sử dụng làm chế phẩm thực phẩm, chế phẩm vi khuẩn axit lactic khởi động để lên men thực phẩm, chế phẩm thức ăn chăn nuôi hoặc chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi, hoặc chế phẩm dược.

Một phương án thực hiện của sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa, cải thiện hoặc điều trị chứng viêm, bệnh béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ, bao gồm việc sử dụng chế phẩm chứa *Leuconostoc citreum* WiKim 0104, giống cấy của nó, dịch phân giải của nó hoặc chiết xuất của nó cho đối tượng có nhu cầu. Đối tượng có thể là động vật bao gồm cả con người.

Sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa, cải thiện hoặc điều trị chứng viêm, béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ, trong đó bệnh gan nhiễm mỡ bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm gan nhiễm mỡ đơn thuần, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu, xơ hóa gan và xơ gan.

Sáng chế đề xuất *Leuconostoc citreum* WiKim0104.

Leuconostoc citreum WiKim0104 theo sáng chế là chủng mới *Leuconostoc citreum* có nguồn gốc từ kimchi. Mặc dù *Leuconostoc citreum* WiKim0104 được phân lập và được định danh từ kimchi theo sáng chế này, nhưng cách thức để có được nó không giới hạn ở kimchi.

Chủng vi khuẩn axit lactic được phân lập trong các ví dụ theo sáng chế đã được chứng minh là có trình tự axit nucleic SEQ ID NO: 1, như kết quả của việc giải trình tự 16S rADN để định danh và phân loại vi sinh vật.

Do đó, vi sinh vật theo sáng chế này có trình tự 16S rADN nêu trong SEQ ID NO: 1 được đặt tên là *Leuconostoc citreum* WiKim0104, và đã nộp lưu vào Trung tâm

Nuôi cấy Vi sinh vật Hàn Quốc vào ngày 14 tháng 12 năm 2018 (số truy cập KCCM12420P).

Leuconostoc citreum WiKim0104 theo sáng chế là vi khuẩn gram dương và vi khuẩn kỵ khí tùy ý có thể phát triển ở cả điều kiện hiếu khí và kỵ khí, và nó không hình thành bào tử, không có tính di động và tế bào ở dạng trực khuẩn.

Trong các ví dụ sau đây, người ta đã xác nhận rằng *Leuconostoc citreum* WiKim0104 theo sáng chế đã ức chế sự biểu hiện của FAS (synthase axit béo), SCD (gen liên quan đến tạo mỡ), COX-2 (xyclooxygenaza-2) và NF-K (gen liên quan đến viêm). Điều này khẳng định rằng chủng *Leuconostoc citreum* WiKim0104 có thể phòng ngừa hoặc cải thiện gan nhiễm mỡ bằng cách ức chế sự sản sinh gan nhiễm mỡ khoảng 30% đến 35%. Do đó, *Leuconostoc citreum* WiKim0104 theo sáng chế có thể được sử dụng khác nhau theo từng trường hợp để phòng ngừa, điều trị hoặc cải thiện bệnh gan nhiễm mỡ ở người hoặc động vật.

Ngoài ra, như có thể được khẳng định trong các ví dụ sau đây, chế phẩm chứa *Leuconostoc citreum* WiKim0104 làm thành phần hoạt tính đã được xác nhận là có khả năng ức chế sự tích tụ chất béo trong tế bào gan (tế bào HepG2) và chứng viêm, đồng thời cải thiện tính hiệu quả của sự giảm trọng lượng cơ thể và các chỉ số chức năng gan trong máu và giảm biểu hiện của các gen nhân tố liên quan đến chuyển hóa chất béo, viêm và xơ hóa gan trong mô gan. Do đó, chế phẩm có thể được sử dụng làm thành phần hoạt tính của chế phẩm để phòng ngừa, điều trị hoặc cải thiện tình trạng viêm, béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ đó là một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm gồm gan nhiễm mỡ đơn thuần, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu, xơ hóa gan và xơ gan.

Sáng chế đề xuất chế phẩm để phòng ngừa, cải thiện hoặc điều trị chứng viêm, bệnh béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ chứa *Leuconostoc citreum* WiKim0104, giống cấy của nó, dịch phân giải của nó hoặc chiết xuất của nó làm thành phần hoạt tính.

Leuconostoc citreum WiKim0104 có trong chế phẩm theo sáng chế có thể tồn tại dưới dạng tế bào sống hoặc tế bào chết, và *Leuconostoc citreum* WiKim0104 cũng có thể ở dạng sấy khô hoặc đông khô. Các dạng và các phương pháp đưa vào công thức vi khuẩn axit lactic có thể phù hợp để chứa trong các chế phẩm khác nhau đã được biết đến rộng rãi bởi những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Ví dụ, *Leuconostoc citreum* WiKim0104 có thể được đưa vào công thức dưới dạng giống cấy

thu được bằng cách nuôi cấy trong môi trường lỏng hoặc môi trường rắn đã biết, hoặc sản phẩm lên men thu được bằng cách nuôi cấy chủng *Leuconostoc citreum* WiKim0104 và một thành phần bổ sung với nhau, hoặc chiết xuất thu được bằng cách chiết xuất chủng *Leuconostoc citreum* WiKim0104 bằng dung môi hữu cơ, hoặc chất hòa tan (hoặc dịch phân giải) thu được bằng cách hòa tan màng tế bào của chủng *Leuconostoc citreum* WiKim0104 hoặc nghiền nát hoặc xử lý đồng nhất, hoặc các cách tương tự, nhưng không giới hạn ở các cách này.

Trong một ví dụ cụ thể, chế phẩm có thể là chế phẩm chứa chủng *Leuconostoc citreum* WiKim0104 tồn tại dưới dạng tế bào sống hoặc tế bào chết.

Theo sáng chế, bệnh gan nhiễm mỡ có thể bao gồm gan nhiễm mỡ đơn thuần, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu, xơ hóa gan và xơ gan.

Theo sáng chế, bệnh gan nhiễm mỡ có thể bao gồm cả gan nhiễm mỡ do rượu và gan nhiễm mỡ không do rượu, và ví dụ, có thể là gan nhiễm mỡ không do rượu do chế độ ăn nhiều chất béo gây ra. Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD) có thể bao gồm cả gan nhiễm mỡ không do rượu nguyên phát và gan nhiễm mỡ không do rượu thứ phát, và ví dụ, bệnh gan nhiễm mỡ có thể là gan nhiễm mỡ không do rượu xảy ra do tăng lipid máu nguyên phát, tiểu đường hoặc béo phì.

Trong một ví dụ cụ thể, chế phẩm có thể là chế phẩm được để phòng ngừa hoặc điều trị chứng viêm, béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ chứa giống cây, dịch phân giải, sản phẩm lên men hoặc chiết xuất của chủng *Leuconostoc citreum* WiKim0104.

Khi chế phẩm theo sáng chế được sử dụng làm chế phẩm dược, chế phẩm dược theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách sử dụng chất bổ trợ thích hợp về mặt dược dụng và sinh lý, và như chất bổ trợ thì có thể sử dụng tá dược, chất làm tan, chất làm ngọt, chất liên kết, vật liệu phủ, chất làm phòng, chất bôi trơn, chất bảo quản (glydent) hoặc chất tạo hương vị, hoặc các chất tương tự.

Tốt hơn là chế phẩm dược có thể được đưa vào công thức để sử dụng như một chế phẩm dược bằng cách chứa thêm một hoặc nhiều chất mang dược dụng ngoài thành phần hoạt tính đã mô tả trên đây.

Ví dụ, đối với chế phẩm ở dạng viên nén hoặc viên con nhộng, thành phần hoạt tính có thể được kết hợp với chất mang dược dụng bất hoạt để uống và không độc hại

như etanol, glyxerol, nước, và các chất tương tự. Ngoài ra, khi muốn hoặc cần thiết, cũng có thể chứa chất liên kết, chất bôi trơn, chất làm tan và chất tạo màu thích hợp làm hỗn hợp. Chất liên kết thích hợp bao gồm nhưng không giới hạn ở các loại đường tự nhiên như tinh bột, gelatin, glucoza hoặc beta-lactoza, gom tự nhiên và tổng hợp như chất làm ngọt ngô, nhựa cây keo, nhựa tragacan hoặc natri oleat, natri stearat, magie stearat, natri benzoat, natri axetat, natri clorua, và các chất tương tự. Chất làm tan bao gồm nhưng không giới hạn ở tinh bột, metyl xenluloza, thạch trắng, bentonit, gom xanthan, và các chất tương tự. Trong chế phẩm được bào chế dưới dạng dung dịch lỏng, như chất mang được dụng có thể phù hợp với những chất vô trùng và tương hợp sinh học, dung dịch muối, nước vô trùng, dung dịch Ringer, dung dịch muối đậm, dung dịch tiêm albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, etanol và một hoặc nhiều thành phần hỗn hợp của chúng có thể được sử dụng, và nếu cần, có thể thêm các chất phụ gia thông thường khác như chất chống oxy hóa, dung dịch đậm, chất kìm khuẩn, và các chất tương tự. Ngoài ra, nó có thể được đưa vào công thức làm chế phẩm tiêm như dung dịch nước, dạng huyền phù, dạng nhũ tương và các dạng tương tự, dạng viên nhỏ, dạng viên con nhộng, dạng hạt hoặc dạng viên nén, bằng cách bổ sung thêm chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất liên kết và chất bôi trơn.

Hơn nữa, theo phương pháp phù hợp trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, bằng cách sử dụng phương pháp được bộc lộ trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA, tốt hơn, chế phẩm có thể được đưa vào công thức tùy theo từng bệnh hoặc thành phần.

Trong một ví dụ cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm để phòng ngừa hoặc cải thiện tình trạng viêm, béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ chứa *Leuconostoc citreum* WiKim0104, giống cấy của nó, dịch phân giải của nó, sản phẩm lên men hoặc chiết xuất của nó làm thành phần hoạt tính. Chế phẩm thực phẩm có thể bao gồm dạng thực phẩm chức năng tốt cho sức khỏe hoặc dạng đồ uống, dạng thanh hoặc các loại tương tự.

Theo sáng chế, chế phẩm thực phẩm chứa chủng làm thành phần hoạt tính có thể bao gồm đồ uống như dầu lên men, và các loại tương tự. Theo đó, sáng chế đề xuất vi khuẩn axit lactic khởi động cho quá trình lên men bao gồm *Leuconostoc citreum* WiKim0104 hoặc giống cấy của nó.

Chế phẩm thực phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng làm thực phẩm chức năng hoặc được bổ sung vào các loại thực phẩm khác nhau như được đưa vào công thức theo cùng phương pháp với chế phẩm được. Thực phẩm trong đó chế phẩm theo sáng chế được bổ sung bao gồm ví dụ, đồ uống, phức hợp vitamin, thực phẩm bổ sung tốt cho sức khỏe, và các loại tương tự.

Chế phẩm thực phẩm theo sáng chế có thể bao gồm thành phần thường được bổ sung vào trong chế phẩm thực phẩm, và ví dụ, nó bao gồm protein, hydrat cacbon, chất béo, chất dinh dưỡng, gia vị và chất tạo hương vị. Ví dụ về hydrat cacbon đã mô tả trên đây là loại đường thông thường như monosacarit, ví dụ, glucoza, fructoza, v.v.; đisacarit, ví dụ, maltoza, sucroza, oligosacarit, v.v.; và polysacarit, ví dụ, dextrin, xyclodextrin, v.v., và rượu đường như xylitol, sorbitol, erytritol, và rượu đường tương tự. Với chất tạo hương vị, có thể sử dụng chất tạo hương vị tự nhiên [thaumatin, chiết xuất từ stevia (ví dụ, rebaudioside A, glycyrrhizin, v.v.)] và chất tạo hương vị tổng hợp (sacarin, aspartam, v.v.). Ví dụ, khi chế phẩm thực phẩm theo sáng chế được bào chế làm đồ uống và nước giải khát, nó có thể còn bao gồm axit xitric, fructoza lỏng, đường, glucoza, axit axetic, axit malic, nước hoa quả và các loại chiết xuất từ thực vật khác nhau, và các loại tương tự.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng làm phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc thức ăn chăn nuôi.

Khi được sử dụng làm phụ gia thức ăn chăn nuôi, chế phẩm có thể được bào chế dưới dạng cô đặc cao nằm trong khoảng từ 20% đến 90% hoặc ở dạng bột hoặc dạng hạt. Phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể còn chứa bất kỳ một, hoặc một hoặc nhiều trong số axit hữu cơ như axit xitric, axit fumaric, axit adipic, axit lactic, axit malic, v.v., hoặc các phosphat như natri phosphat, kali phosphat, pyrophosphat axit, polyphosphat, v.v., hoặc các chất chống oxy hóa tự nhiên như polyphenol, catechin, alpha-tocopherol, chiết xuất từ cây hương thảo, vitamin C, chiết xuất từ trà xanh, chiết xuất từ cây cam thảo, chitosan, axit tanic, axit phytic, v.v. Khi được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi, chế phẩm có thể được đưa vào công thức dưới dạng thức ăn chăn nuôi thông thường, và có thể chứa các thành phần thức ăn thông thường cùng với nhau.

Thức ăn chăn nuôi và phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể còn chứa hạt ngũ cốc, ví dụ như, lúa mì dạng bột hoặc dạng nghiền, yến mạch, lúa mạch, ngô và gạo; thức ăn

chăn nuôi chứa đậm thực vật, ví dụ như, thức ăn chăn nuôi chứa cải dầu, đậu và hạt hướng dương làm thành phần chính; thức ăn chăn nuôi chứa đậm động vật, ví dụ như, bột huyết, bột thịt, bột xương và bột cá; đường và các sản phẩm từ sữa, ví dụ như, các thành phần đã sấy khô bao gồm các loại sữa bột và bột whey khác nhau, và các loại tương tự, và ngoài các loại đó, có thể còn chứa chất bổ sung dinh dưỡng, chất tăng cường tiêu hóa và hấp thụ, chất thúc đẩy tăng trưởng, và các chất tương tự.

Phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể được sử dụng độc lập hoặc sử dụng kết hợp với phụ gia thức ăn chăn nuôi khác trong chất mang ăn được cho động vật. Hơn nữa, phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể được sử dụng một cách dễ dàng theo cách rải lên hoặc trộn trực tiếp vào thức ăn chăn nuôi, hoặc được sử dụng cho động vật như chế phẩm uống riêng với thức ăn chăn nuôi. Khi phụ gia thức ăn chăn nuôi được sử dụng riêng với thức ăn chăn nuôi, đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, nó có thể được sản xuất như một chế phẩm giải phóng tức thì hoặc giải phóng dần, kết hợp với chất mang được dùng ăn được. Chất mang ăn được này có thể ở dạng rắn hoặc dạng lỏng, ví dụ như, tinh bột ngô, lactoza, sucroza, mảnh đậu dẹt mỏng, dầu lạc, dầu ôliu, dầu mè và propylen glycol. Khi chất mang dạng rắn được sử dụng, phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể ở dạng viên nén, viên con nhộng, bột, viên ngậm dẹt, viên hình thoi, hoặc dạng không phân tán phủ lên trên. Khi chất mang ở dạng lỏng được sử dụng, phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể là chế phẩm viên con nhộng gelatin mềm, hoặc si rô hoặc huyền phù, nhũ tương hoặc dung dịch.

Hơn nữa, phụ gia thức ăn chăn nuôi và thức ăn chăn nuôi có thể chứa chất bổ trợ, ví dụ, chất bảo quản, chất ổn định, chất tạo ẩm hoặc chất nhũ hóa, chất hoạt hoá dung dịch, hoặc chất tương tự. Phụ gia thức ăn chăn nuôi có thể được sử dụng bằng cách ngâm, phun hoặc trộn để thêm vào thức ăn chăn nuôi.

Thức ăn chăn nuôi hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được áp dụng cho nhiều loại thức ăn chăn nuôi bao gồm thức ăn cho động vật có vú, cho gia cầm và cá.

Theo sáng chế, động vật bao gồm động vật có vú và thức ăn chăn nuôi có thể được sử dụng cho động vật có vú, không chỉ lợn, bò, cừu, dê, động vật gặm nhấm để thí nghiệm và ngoài loài gặm nhấm để thí nghiệm, động vật nuôi (ví dụ: chó, mèo) và các động vật tương tự, và có thể được dùng cho gia cầm, gà, gà tây, vịt, ngỗng, gà lôi và

chim cút, và các gia cầm tương tự, và có thể được dùng cho cá, cá hồi, và các loại tương tự, nhưng không giới hạn ở các loại này.

Lượng chủng *Leuconostoc citreum* WiKim0104 có trong chế phẩm theo sáng chế có thể vào khoảng từ 10^6 cfu/g đến 10^{12} cfu/g trên 1 lần, và ví dụ, lượng chủng có thể từ 10^7 cfu/g đến 10^{11} cfu/g, 10^8 cfu/g đến 10^{10} cfu/g. Khi chủng được sử dụng, tốt hơn là sử dụng nó như một tế bào sống, và trước khi đưa vào cơ thể, nó có thể được sử dụng ở dạng chết hoặc dạng suy yếu. Ngoài ra, khi được bào chế bằng cách sử dụng giống cấy nổi trên bề mặt và loại tương tự, quy trình khử trùng thông qua quy trình xử lý nhiệt có thể được thực hiện thêm. Lượng chủng và mức độ đưa vào cơ thể hàng ngày cần thiết để có tác dụng tối thiểu có thể thay đổi tùy thuộc vào tình trạng cơ thể hoặc tình trạng sức khỏe của người nhận, nhưng nói chung có thể nằm trong khoảng từ 10^6 cfu/g đến 10^{12} cfu/g, ví dụ, từ 10^7 cfu/g đến 10^{11} cfu/g, từ 10^8 cfu/g đến 10^{10} cfu/g.

Phương án thực hiện khác của sáng chế có thể được đề xuất dùng *Leuconostoc citreum* WiKim0104 để phòng ngừa, điều trị hoặc cải thiện chứng viêm, béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ ở người hoặc động vật.

Phương án thực hiện khác của sáng chế đề xuất dùng *Leuconostoc citreum* WiKim0104, giống cấy của nó, dịch phân giải của nó hoặc chiết xuất của nó để phòng ngừa, cải thiện hoặc điều trị chứng viêm, béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ.

Phương án thực hiện khác của sáng chế đề xuất *Leuconostoc citreum* WiKim0104, giống cấy của nó, dịch phân giải của nó hoặc chiết xuất của nó để phòng ngừa, cải thiện hoặc điều trị chứng viêm, béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ.

Một phương án thực hiện của sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa, cải thiện hoặc điều trị chứng viêm, bệnh béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ, bao gồm việc sử dụng chế phẩm chứa *Leuconostoc citreum* WiKim0104, giống cấy của nó, dịch phân giải của nó hoặc chiết xuất của nó cho đối tượng có nhu cầu. Đối tượng là động vật bao gồm cả con người và ví dụ về động vật có thể được bao gồm trong phạm vi của sáng chế miễn là các động vật nói trên tiêu thụ thức ăn. Bệnh gan nhiễm mỡ có thể bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm gan nhiễm mỡ đơn thuần, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu, xơ hóa gan và xơ gan.

Các ưu điểm và đặc điểm của sáng chế cũng như các phương pháp để đạt được chúng sẽ trở nên rõ ràng với sự tham chiếu đến các ví dụ được mô tả chi tiết dưới đây.

Tuy nhiên, sáng chế không giới hạn ở các ví dụ được bộc lộ dưới đây, mà sẽ được thực hiện dưới nhiều hình thức khác nhau, và chỉ được cung cấp để làm cho việc bộc lộ sáng chế trở nên hoàn chỉnh, và để thông báo đầy đủ cho những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, phạm vi của sáng chế, và sáng chế chỉ được xác định bởi phạm vi của các yêu cầu bảo hộ.

Ưu điểm của sáng chế

Leuconostoc citreum WiKim0104 theo sáng chế là vi khuẩn axit lactic được phân lập từ kimchi, và thể hiện tác dụng ức chế sự sinh ra gan nhiễm mỡ thông qua việc ức chế sự tích tụ chất béo nội bào và giảm biểu hiện của các gen liên quan đến gan nhiễm mỡ, và do đó, nó có thể được sử dụng khác nhau theo từng trường hợp để phòng ngừa, cải thiện và điều trị các chứng viêm, béo phì hay bệnh gan nhiễm mỡ. Hơn nữa, nó có thể được sử dụng hữu ích làm chất khởi động cho quá trình lên men.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ đo mức độ biểu hiện trong tế bào HepG2 theo cách điều trị chủng WiKim0104 theo sáng chế. L-LAB1 đại diện cho *Leu. citreum* WiKim0104, và L-LAB2 đại diện cho *Leu. Mesenteroides*, và L-LAB3 và L-LAB4 lần lượt đại diện cho chủng *Leu. citreum* #2, #3 được phân lập trong phòng thí nghiệm.

Fig.2a đến Fig.2c là biểu đồ thể hiện khối lượng cơ thể và các chỉ số chức năng gan (GPT, GOT) trong máu của mẫu chuột có gan nhiễm mỡ theo lượng nạp vào cơ thể chủng WiKim0104 theo sáng chế. *P <0,05, so sánh với ND; #P <0,05, so sánh với HFD. L-LAB1 đại diện cho *Leu. citreum* WiKim0104.

Fig.3a đến Fig.3c là biểu đồ đo mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến mô gan của mẫu chuột bị gan nhiễm mỡ theo lượng nạp vào cơ thể chủng WiKim0104 theo sáng chế. *P <0,05, so sánh với ND; #P <0,05, so sánh với HFD. L-LAB1 đại diện cho *Leu. citreum* WiKim0104.

Fig.4 thể hiện SEQ ID NO: 1 theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế này sẽ được mô tả chi tiết bằng các ví dụ. Các ví dụ sau đây chỉ nhằm minh họa cho sáng chế, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ dưới đây.

Ví dụ 1: Định danh *Leuconostoc citreum* WiKim0104

Khuẩn lạc đơn lẻ vi khuẩn thu được bằng cách phủ dung dịch chiết xuất kimchi không pha loãng lên môi trường MRS được thu thập bằng vòng lặp và được nuôi cấy trong môi trường MRS. Sự chiết xuất ADN được thực hiện bằng cách sử dụng QIAamp ADN Mini Kit (QIAGEN, Đức). ADN đã chiết xuất được xác nhận bằng cách sử dụng gel agarose 1%, và để khuếch đại gen 16S rADN, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) được xử lý bằng cách sử dụng ADN gen đã chiết xuất làm mẫu và 30 chu kỳ được thực hiện ở điều kiện PCR biến tính ở 95°C trong 1 phút, ủ ở 45°C trong 1 phút và kéo dài ở 72°C trong 1 phút 30 giây. Đối với các sản phẩm PCR thu được, trình tự được phân tích bằng cách gửi yêu cầu đến Macrogen (Seoul, Korea). Việc định danh vi khuẩn được thực hiện bằng phân tích quy nạp bằng công cụ tìm kiếm Basic Local Alignment Search (BLAST) của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) đối với trình tự 16S rADN.

Chúng đã phân lập theo ví dụ của sáng chế được chứng minh là có trình tự axit nucleic SEQ ID NO: 1, như kết quả phân tích trình tự 16S rADN để định danh vi sinh vật.

Theo đó, vi sinh vật của sáng chế được đặt tên là *Leuconostoc citreum* WiKim0104, và được nộp lưu vào Trung tâm Nuôi cấy Vi sinh vật Hàn Quốc ngày 14 tháng 12 năm 2018 (KCCM12420P).

Ví dụ 2: Xác nhận hiệu quả ức chế sự tích tụ chất béo và viêm trong tế bào gan (tế bào HepG2) của *Leuconostoc citreum* WiKim0104

Một phương pháp thí nghiệm trong ống nghiệm đã được nghĩ ra bằng cách sử dụng transwell để mô phỏng trực gan ruột của cơ thể người.

Vi khuẩn axit lactic *Leuconostoc citreum* WiKim0104 được nuôi cấy trong môi trường MRS ở 30°C trong 24 giờ. Vào lúc kết thúc nuôi cấy, để phục hồi tế bào vi sinh vật, nó được quay ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 5 phút và rửa bằng PBS để loại bỏ tất cả các thành phần môi trường còn lại.

Để nuôi cấy tế bào ruột (tế bào HT-29) và tế bào gan (tế bào HepG2), môi trường RPMI-1640 trong đó penicillin/streptomycin và huyết thanh thai bò 10% đã bổ sung được sử dụng và việc đồng nuôi cấy được thực hiện bằng cách sử dụng transwell đĩa 6

giếng. Trước khi đồng nuôi cấy, các tế bào ruột được phân ước trong màng transwell, và tế bào gan được phân ước trong đĩa 6 giếng, và các tế bào được bào chế bằng cách nuôi cấy tương ứng ở điều kiện 37°C, CO₂ 5%.

Khi tế bào ruột (tế bào HT-29) và tế bào gan (tế bào HepG2) phát triển khoảng 80% trong đĩa nuôi cấy, dung dịch nuôi cấy được thay thế bằng môi trường không có FBS và chúng được nuôi cấy trong 16 giờ. Sau khi nuôi cấy, 1×10^7 CFU vi khuẩn axit lactic đã bào chế được điều trị trong tế bào ruột, và việc đồng nuôi cấy vi khuẩn axit lactic và tế bào ruột và tế bào gan được thực hiện bằng cách lắp ráp một transwell, và sự sản sinh chất béo trong tế bào gan được tạo ra bằng cách điều trị bằng axit palmitic 0,1 mM trong 48 giờ. Sau khi nuôi cấy với axit palmitic 0,1 mM trong 48 giờ, để tìm ra mức độ biểu hiện của chuyển hóa chất béo và các gen liên quan đến viêm trong tế bào gan theo sự điều trị *Leuconostoc citreum* WiKim0104, phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực định lượng (qPCR) được tiến hành. Kết quả là, như thể hiện trên Fig.1, có thể được xác nhận rằng sự biểu hiện gen của synthase axit béo (FAS), và enzym sinh tổng hợp axit béo không bão hòa (Stearoyl-CoA desaturase, SCD), và các yếu tố liên quan đến viêm, COX-2 (Xyclooxygenaza-2) và NF- κ B (Yếu tố hạt nhân-kappa B) đã giảm đáng kể, trong tế bào gan (tế bào HepG2), trong đó axit palmitic 0,1 mM và *Leuconostoc citreum* WiKim0104 được đồng nuôi cấy so sánh với tế bào gan (đối chứng) trong đó được điều trị bằng axit palmitic 0,1 mM.

Ví dụ 3: Xác nhận hiệu quả giảm khối lượng cơ thể và cải thiện các chỉ số chức năng gan trong máu

Chuột đực 5 tuần tuổi (C57BL/6J) được nuôi bằng chế độ ăn chow (CD; Purina, Korea) trong môi trường phòng nuôi với điều kiện nhiệt độ $20 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm $50 \pm 5\%$ và chu kỳ sáng - tối 12 giờ trong 1 tuần. Các động vật thí nghiệm được cho ăn theo chế độ ăn bình thường (D12450B, Research Diets, New Brunswick, NJ) hoặc chế độ ăn nhiều chất béo (D12451, Research Diets, New Brunswick, NJ) trong đó 45% tổng lượng calo là chất béo và được điều chỉnh cho phù hợp với chế độ ăn trong 1 tuần, và sau đó thí nghiệm được thực hiện. Các nhóm thử nghiệm bao gồm tổng cộng 3 nhóm, đó là nhóm chế độ ăn bình thường (ND), nhóm chế độ ăn nhiều chất béo (HFD) và nhóm chế độ ăn hằng ngày có chứa *Leuconostoc citreum* WiKim0104 ở nồng độ 2×10^9 CFU/200 μ l với chế độ ăn nhiều chất béo (HFD+L-LAB1), và gan nhiễm mỡ được gây ra thông qua chế độ ăn trong 20 tuần. Nhóm chế độ ăn bình thường (ND) và nhóm chế độ ăn nhiều chất

béo (HFD) được cho uống với cùng một lượng nước muối đệm phosphat (PBS) hằng ngày. Trong 20 tuần sau khi thực hiện thí nghiệm, người ta đo khối lượng cơ thể của mỗi nhóm thí nghiệm. Ngoài ra, để đo các chỉ số chức năng gan (GOT, GPT trong huyết thanh) trong máu của các nhóm thí nghiệm, chúng được cho nhịn ăn 16 giờ trước khi kết thúc thí nghiệm, và máu được lấy từ tĩnh mạch chủ ở bụng, huyết thanh được tách ra và được sử dụng trong thí nghiệm.

GOT và GPT trong máu được đo bằng cách sử dụng thiết bị đo sinh hóa tự động (FUJI DRI-CHEM 7000i, Fujifilm, Tokyo, Japan), và trên Fig.2a đến Fig.2c, GLUTAMATE-OXALOACETATE TRANSAMINASE (GOT) và GLUTAMATE-PYRUVATE TRANSAMINASE (GPT) trong máu được thể hiện dưới dạng biểu đồ.

Kết quả là, như thể hiện trên Fig.2a đến Fig.2c, có thể được khẳng định rằng khối lượng cơ thể và các chỉ số chức năng gan trong máu đã giảm đáng kể khi chế độ ăn giàu chất béo và *Leuconostoc citreum* WiKim0104 được ăn cùng nhau (HFD+L-LAB1), so sánh với chuột ăn chế độ ăn giàu chất béo (HFD).

Ví dụ 4: Xác nhận mức độ biểu hiện của quá trình chuyển hóa chất béo, viêm và các gen liên quan đến xơ hóa gan trong mô gan

Để tìm ra mức độ biểu hiện của quá trình chuyển hóa chất béo, viêm và các gen liên quan đến xơ hóa gan trong mô gan theo lượng nạp vào cơ thể chủng *Leuconostoc citreum* WiKim0104, sử dụng mô gan đã chiết xuất sau khi kết thúc thí nghiệm, qPCR (phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực định lượng) được tiến hành.

Kết quả là, như thể hiện trên Fig.3a đến Fig.3c, có thể được khẳng định rằng sự biểu hiện gen của yếu tố liên quan đến chuyển hóa chất béo, CD36 (Cụm biệt hóa 36), yếu tố liên quan đến viêm, NF- κ B (yếu tố hạt nhân-kappa B), và yếu tố liên quan đến xơ hóa gan, Col1 α 1 (Collagen loại I alpha 1) đã giảm, theo lượng nạp vào cơ thể chủng *Leuconostoc citreum* WiKim0104.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Sáng chế đề xuất một chủng mới. Ngoài ra, chủng theo sáng chế có thể được sử dụng làm thực phẩm, thức ăn chăn nuôi hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi, chế phẩm được để phòng ngừa, cải thiện hoặc điều trị chứng viêm, béo phì hoặc bệnh gan nhiễm mỡ, hoặc các bệnh tương tự.

[Số truy cập]

Tên cơ quan nộp lưu: Trung tâm Nuôi cấy Vi sinh vật Hàn Quốc (Nước ngoài)

Số truy cập: KCCM12420P

Ngày nộp lưu: 14/12/2018

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. *Leuconostoc citreum* WiKim0104 với số truy cập KCCM12420P.
2. Chế phẩm để phòng ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh gan nhiễm mỡ, bệnh béo phì hoặc viêm chứa *Leuconostoc citreum* WiKim0104 (số truy cập KCCM12420P), giống cấy của nó, dịch phân giải của nó hoặc chiết xuất của nó làm thành phần hoạt tính.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này là chế phẩm thực phẩm, chế phẩm vi khuẩn axit lactic khởi động để lên men thực phẩm, thức ăn chăn nuôi hoặc chế phẩm phụ gia thức ăn chăn nuôi, hoặc chế phẩm dược.
4. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chế phẩm thực phẩm là dạng thực phẩm chức năng tốt cho sức khỏe, dạng đồ uống, dạng thanh hoặc dầu lên men.

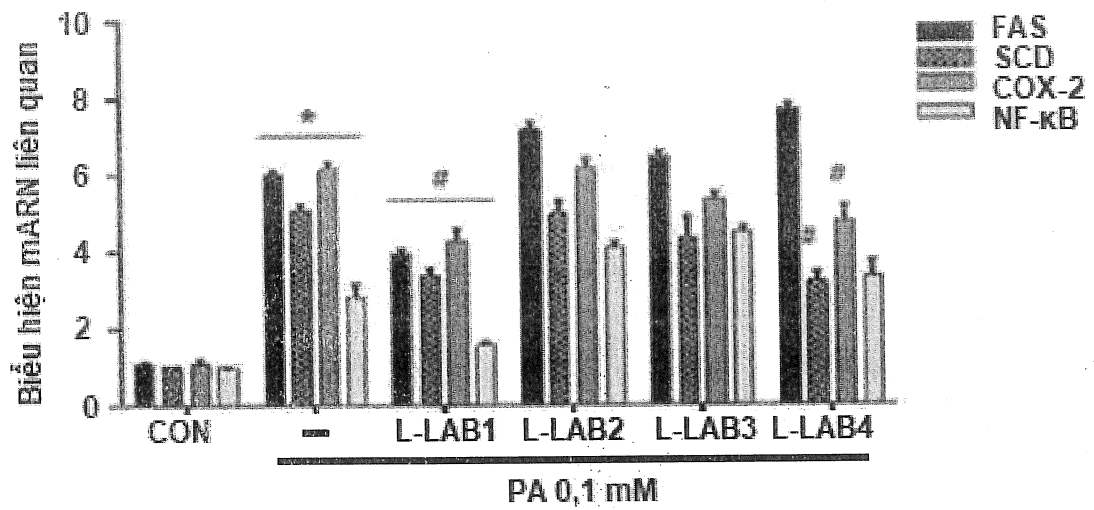


Fig. 1

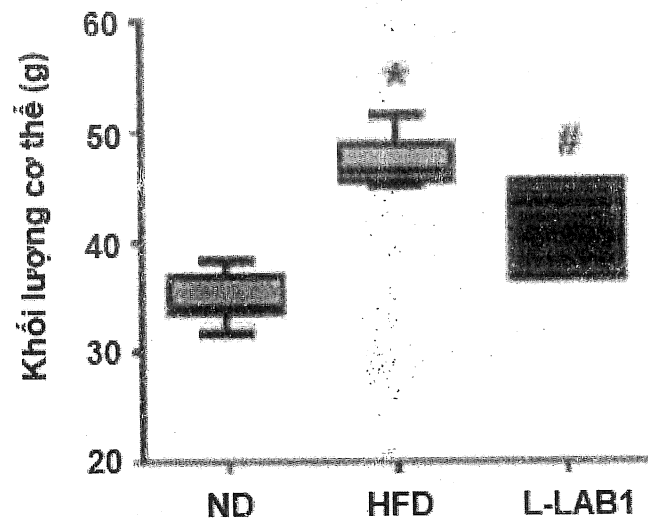


Fig. 2a

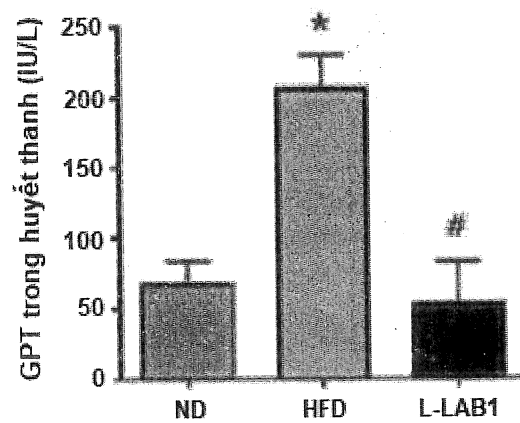


Fig. 2b

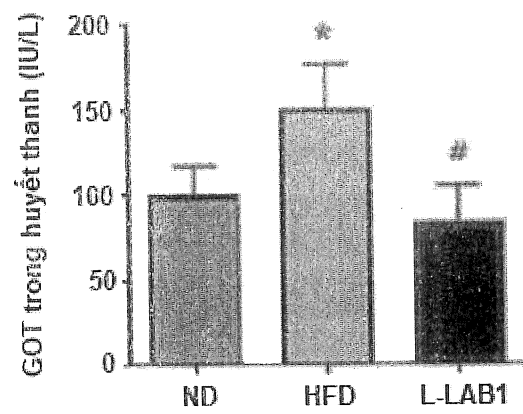


Fig. 2c

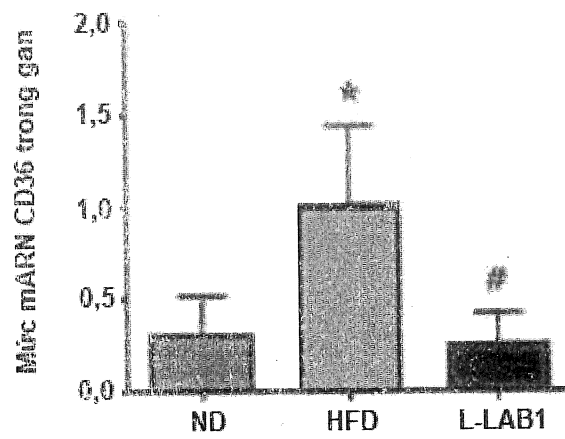


Fig. 3a

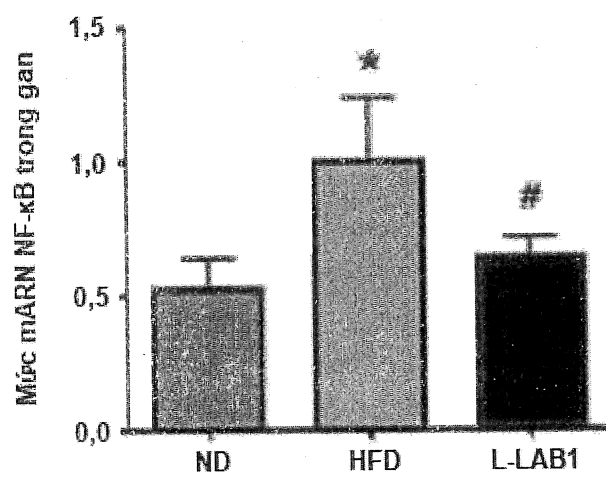


Fig. 3b

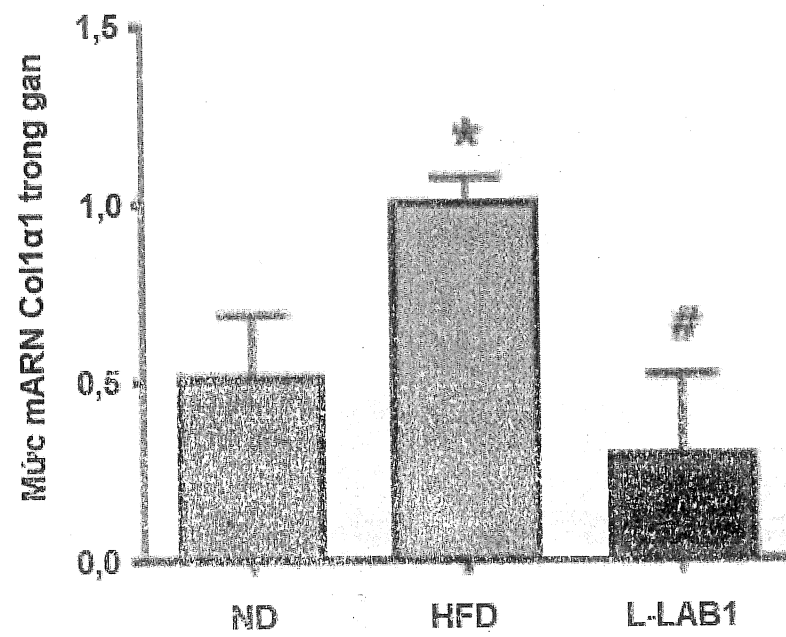


Fig. 3c

<400> 1
gatgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgaac gcgcagcgag aggtgcttgc 60
acctttcaag cgagtggcga acgggtgagt aacacgtgga taacctgcct caaggctggg 120
gataacatti ggaaacagat gctaataccg aataaaactt agtatcgcat gatatcaagt 180
taaaaggcgc tacggcgta cctagagatg gatccgcggt gcattagtta gttggtggg 240
taaaggctta ccaagacgat gatgcatagc cgagttgaga gactgatcgg ccacattggg 300
actgagacac ggcccaaact cctacgggag gctgcagtag ggaatcttc acaatgggcg 360
caagcctgat ggagcaacgc cgcgtgtgtg atgaaggctt tcgggtcgta aagcactgtt 420
gtatgggaag aaatgctaaa atagggaatg atttagttt gacggtacca taccagaaag 480
ggacggctaa atacgtgcca gcagccgcgg taatacgtat gtcccagcgg tttccggat 540
ttattggcgg taagcgagc gcagacggtt gattaagtct gatgtgaaag cccggagctc 600
aactccggaa tggcatigga aactggttaa cttagtgtt gtagaggtaa gtggaactcc 660
atgtgtagcg gtggaatgcg tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag gcggcttact 720
ggacaecaac tgacgttag gctcgaaagt gtgggtagca aacaggatta gataccctgg 780
tagtccacac cgtaaacgat gaatactagg tgttaggagg ttccgcctc ttagtgccga 840
agctaacgca ttaagtattc cgctgggga gtacgaccgc aagggtgaaa ctcaaaggaa 900
ttgacgggga cccgcacaag cggtaggca tgtggttaa ttcgaagcaa cgcgaagaac 960
cttaccaggt ctgacatcc ttgagctt tttagatag aagtgttctc ttcggagaca 1020
aagtgacagg tggtycatgg tcgtctcag ctctgtctgt gagatgttg gtttaagccc 1080
gcaacgagcg caacccttat tgttagtgc cagcattcag ttgggcactc tagcgagact 1140
gccggtgaca aaccggagga aggcggggac gacgtcagat catcatgccc cttatgacct 1200
gggctacaca cgtgctacaa tggcgtatac aacgagttgc caacctgcga aggtgagcta 1260
atctcttaaa gtacgtctca gttcggactg cagtctgcaa ctgactgca cgaagtcgga 1320
atcgctagta atcgcggtac agcacgccgc ggtgaatacg ttcccgggtc ttgtacacac 1380
cgcccgctac accatgggag ttgtaatgc ccaaagccgg tggcctaacc 1430

Fig. 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ**2. Wikim0104_Leuconostoc citreum****(1430bp)**

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGCAGCGAGAGGTGCTTGACCTTTCAA
GCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACA
GATGCTAATACCGAATAAACTTAGTATCGCATGATATCAAGTTAAAGGCGCTACGGCGTCACCTAGAG
ATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGACGATGATGCATAGCCGAGTTG
AGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAAT
CTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGC
ACTGTTGTATGGGAAGAAATGCTAAAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGGGAC
GGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAA
GCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAA
CTGGTTAACTTGAGTGTTGTAGAGGTAAGTGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA
GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACAACAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTAGGAGGTTCCGCCTC
TTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTATTCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTCTCTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCA
TGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGTTAGTT
GCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGT
CAGATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACC
TGCGAAGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAG
TCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCC
GTACACCATGGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACC