



(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)



1-0052336

(51)^{2022.01} C12N 1/20; A61K 35/745; C12R 1/24; (13) B
C12R 1/225; A23L 33/135; A61K
35/747

(21) 1-2023-09022

(22) 07/09/2016

(62) 1-2018-01551

(86) PCT/KR2016/009994 07/09/2016

(87) WO/2017/047968 23/03/2017

(30) 10-2015-0130124 15/09/2015 KR; 10-2016-0005018 15/01/2016 KR

(45) 27/10/2025 451

(43) 25/04/2024 433

(73) 1. UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE
UNIVERSITY (KR)

(Seocheon-dong, KYUNG HEE UNIVERSITY GLOBAL CAMPUS) 1732

Deogyong-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 17104, Republic of Korea

2. NAVIPHARM CO, LTD (KR)

5, Jangan-ro 448beon-gil, Jangan-gu Suwon-si Gyeonggi-do 16209, Republic of
Korea

(72) KIM, Dong Hyun (KR); HAN, Myung Joo (KR).

(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) VI KHUẨN BIFIDOBACTERIUM, DƯỢC PHẨM VÀ THỰC PHẨM CHỨA
CHỨNG

(21) 1-2023-09022

(57) Sáng chế đề cập đến vi khuẩn *Bifidobacterium* sp., hoặc hỗn hợp của chúng, được phân lập từ kim chi hoặc phân người, dược phẩm và thực phẩm chứa chúng. Chủng vi khuẩn *Bifidobacterium* sp. theo sáng chế được phân lập từ kim chi hoặc phân người, và do đó có độ an toàn cao và có các hoạt tính sinh lý khác nhau như hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính ức chế β -glucuronidaza, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS) hoặc hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bịt. Theo đó, chủng *Bifidobacterium* sp. hoặc hỗn hợp của chúng theo sáng chế có thể được sử dụng làm thực phẩm chức năng hoặc dược liệu hữu ích để phòng, giảm bớt hoặc điều trị tổn thương đường ruột, tổn thương gan, dị ứng, bệnh viêm hoặc chứng béo phì.

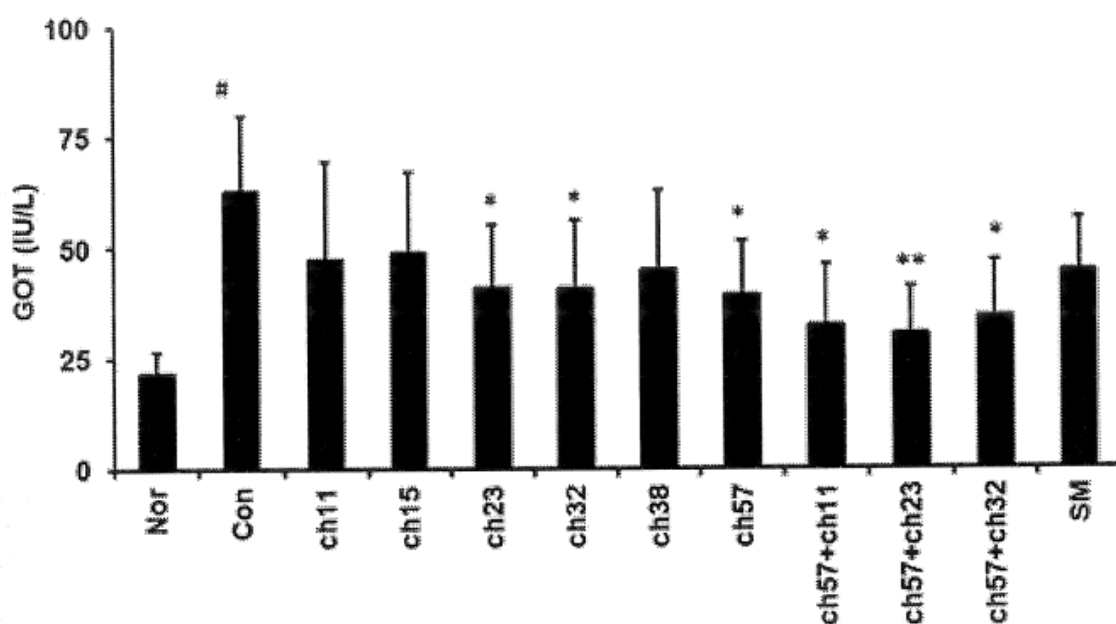


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi khuẩn lactic và dạng tương tự, cụ thể hơn là các chủng vi khuẩn lactic hoặc các hỗn hợp chủng vi khuẩn lactic, được phân lập từ kim chi hoặc phân người có các chức năng sinh lý khác nhau như hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính ức chế β -glucuronidaza, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS) hoặc hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt. Sáng chế cũng đề cập đến thực phẩm và thực phẩm chứa các chủng vi khuẩn lactic hoặc các hỗn hợp chủng vi khuẩn lactic này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khi xã hội phát triển phồn thịnh, thức ăn nhanh ngày càng phổ biến và các loại bệnh cũng thay đổi đáng kể. Cụ thể là, cơ thể con người hiện nay, các bệnh như rối loạn hệ vi khuẩn đường ruột, các hội chứng liên quan tới trao đổi chất ở ruột, viêm đại tràng, các bệnh liên quan đến gan, bệnh liên quan tới dị ứng, béo phì và các bệnh tương tự đang gia tăng do thói quen dùng thức ăn nhanh chứa nhiều thịt và chất béo, bữa ăn không điều độ, uống quá mức, căng thẳng quá mức, không tập thể dục, tiếp xúc với môi trường độc hại, và những tác động có hại khác.

Rối loạn hệ vi khuẩn đường ruột

Trong đường tiêu hóa của cơ thể người có rất nhiều vi khuẩn sống. Cơ thể con người có khoảng 10 nghìn tỷ tế bào, nhưng có khoảng 100 nghìn tỷ vi khuẩn có kích thước gấp 10 lần tế bào bình thường. Những vi khuẩn này có thể được chia thành nhóm các vi khuẩn đường ruột có lợi cho sức khỏe và các vi khuẩn có hại cho sức khỏe con người. Sức khỏe của con người có thể được duy trì khi các vi khuẩn có lợi như *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* và các loại tương tự chiếm ưu thế trong đường tiêu hóa hơn là các vi khuẩn có hại. Nếu không sẽ có thể gây ra các bệnh như béo phì, hội chứng rò rỉ ruột, các bệnh về gan, lão hóa nhanh, viêm ruột non và những bệnh tương tự.

Các hội chứng liên quan tới trao đổi chất qua thành ruột

Ổng dạ dày ruột của cơ thể người có chứa dịch nhầy và lông nhung để hấp thu hiệu quả các chất dinh dưỡng và cũng ngăn chặn việc hấp phụ các vi sinh vật gây bệnh có trọng lượng phân tử cao hoặc các chất độc do các vi sinh vật đó gây ra. Ngoài ra, cơ thể người còn có hệ thống miễn dịch có khả năng bảo vệ cơ thể khỏi sự xâm nhập của kháng nguyên bên ngoài có trọng lượng phân tử cao. Tuy nhiên, do nhiễm các vi sinh vật gây bệnh hoặc nhiễm độc tố, sự căng thẳng quá mức, chế độ ăn với các loại thực phẩm nhiều chất béo mà có khả năng làm tăng nhanh vi khuẩn có hại trong ống dạ dày ruột, uống rượu quá mức, lạm dụng thuốc (ví dụ thuốc kháng sinh) và các thói quen tiêu cực khác, nên hệ vi khuẩn ở ruột bị xáo trộn, dẫn đến sự bất thường trong hệ thống miễn dịch của ống dạ dày ruột, và gây ức chế sự biểu hiện của các protein liên kết vòng bịt. Nếu sự biểu hiện của protein liên kết vòng bịt bị ức chế, thì sự liên kết chặt của các tế bào niêm mạc bị lỏng lẻo, và các phân tử có trọng lượng lớn sẽ xâm nhập vào cơ thể (*in vivo*) do các khe liên kết lỏng lẻo và những bất thường trong hệ thống miễn dịch. Các hội chứng liên quan tới trao đổi chất qua thành ruột còn được gọi là hội chứng rò rỉ ruột, đề cập đến tình trạng trong đó các yếu tố bên ngoài như các loại thức ăn khó tiêu, vi sinh vật gây bệnh, chất độc hoặc tương tự liên tục được đưa vào máu, do hệ thống rào chắn liên kết vòng bịt của các tế bào biểu mô cấu tạo nên ống dạ dày ruột không hoạt động trơn tru. Khi các hội chứng liên quan tới trao đổi chất qua thành ruột xảy ra, các kháng nguyên bên ngoài mà bình thường không được hấp thu vào cơ thể sẽ đi vào cơ thể, do đó gây ra viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, tổn thương gan, rối loạn chức năng gan, các bệnh liên quan tới dị ứng (bao gồm cả hen suyễn), bệnh liên quan tới dị ứng có tính di truyền, các bệnh tự miễn, chứng phân mỡ, rối loạn hấp thu ở ruột, mụn nhọt, sự tăng tốc độ lão hóa, nhiễm nội độc tố máu, nhiễm trùng đường ruột, hội chứng ruột kích thích, hội chứng mệt mỏi mãn tính, bệnh vẩy nến, viêm khớp dạng thấp, thiếu năng tụy, các bệnh viêm khớp hoặc các bệnh tương tự.

Viêm đại tràng

Mặc dù trước đây tỷ lệ bệnh viêm loét đại tràng và bệnh Crohn thường cao ở người châu Âu, tuy nhiên, gần đây số lượng bệnh nhân bị viêm loét đại tràng và bệnh Crohn ở các nước phương Đông bao gồm cả Hàn Quốc đã tăng nhanh do sự thay đổi lối sống như các thói quen ăn uống. Tuy nhiên, vì nguyên nhân không rõ ràng, nên về cơ bản phương pháp điều trị cho những bệnh này chưa được hình thành. Vì lý do này, các

loại thuốc được sử dụng không nhằm mục đích điều trị hoàn toàn, mà nhằm làm giảm các triệu chứng và duy trì trạng thái bớt nghiêm trọng trong thời gian dài nhất có thể. Các thuốc có thành phần là axit aminosalixylic, adrenocorticosteroid, các loại thuốc ức chế miễn dịch và các loại thuốc tương tự được sử dụng chủ yếu để điều trị các triệu chứng này, nhưng đã được báo cáo là gây ra nhiều phản ứng phụ. Ví dụ, salazosulfapyridin thường được sử dụng làm tác nhân axit aminosalixylic, có thể gây ra các triệu chứng buồn nôn, nôn mửa, chán ăn, phát ban, nhức đầu, tổn thương gan, giảm bạch cầu, hồng cầu bất thường, protein niệu, tiêu chảy và những triệu chứng tiêu cực tương tự khác. Ngoài ra, các tác nhân adrenocorticosteroid thường được sử dụng dưới dạng thuốc prednisolon thông qua đường uống, thuốc đạn, tiêm truyền, tiêm tĩnh mạch hoặc các hình thức tương tự, nhưng nó gây ra các phản ứng phụ mạnh mẽ như loét dạ dày hoặc hoại tử ruột khi sử dụng lâu dài. Tuy nhiên, ngưng sử dụng thuốc có thể làm tái phát các triệu chứng kể trên, do đó các thuốc này phải được sử dụng liên tục. Theo đó, cần phải phát triển các tác nhân để điều trị các bệnh về ruột như viêm loét đại tràng, bệnh Crohn và các bệnh tương tự, mà đem lại tác dụng tốt, an toàn và không gây ra các phản ứng phụ. Hội chứng ruột kích thích (IBS) cũng là một bệnh mãn tính ở vùng bụng mà nguyên nhân gây bệnh chưa được xác định rõ ràng. Hiện nay, không có thuốc điều trị cơ bản cho IBS, và việc trị liệu triệu chứng được thực hiện nhằm mục đích làm giảm các triệu chứng của mỗi loại IBS. Ví dụ, đối với bệnh tiêu chảy - một loại bệnh IBS, thuốc kháng cholin có tác dụng giảm đau được sử dụng để ngăn chặn sự co thắt của cơ trơn, và các loại thuốc nhuận tràng dạng muối được sử dụng cho bệnh táo bón - một loại bệnh IBS. Đối với bệnh rối loạn tiêu hóa - một loại IBS thì rất khó để kiểm soát bằng thuốc, các tác nhân dùng để cải thiện chức năng vận động của dạ dày - ruột về cơ bản được sử dụng.

Các bệnh về gan

Gan trong cơ thể con người đóng vai trò chuyển hóa năng lượng (xử lý chất dinh dưỡng và dự trữ, bài tiết chất thải), khử độc các chất độc, tổng hợp protein huyết thanh và hấp thu chất béo trong ruột bằng cách tiết dịch mật, và cũng rất quan trọng trong duy trì miễn dịch (bảo vệ cơ thể) và chuyển hóa vitamin. Tuy nhiên, nhiễm virus gây viêm gan hoặc uống quá nhiều chất cồn hoặc ăn nhiều chất béo có thể gây ra các bệnh gan như viêm gan hoặc xơ gan. Ngoài ra, các bệnh gan cũng có thể là do dùng thuốc (thuốc điều trị bệnh lao, aspirin, kháng sinh, thuốc gây mê, thuốc hạ huyết áp, thuốc tránh thai, vv),

rối loạn chuyển hóa bẩm sinh, suy tim, sốc, hoặc tương tự. Khi bị bệnh về gan, bệnh này có thể phát triển thành viêm gan mãn tính, bắt đầu với viêm gan cấp tính với các triệu chứng như mệt mỏi, nôn mửa, tiêu chảy, chán ăn, vàng da, đau phần tư trên bên phải, sốt hoặc đau cơ.

Các bệnh liên quan tới dị ứng

Khi xã hội trở nên đa dạng hơn và ngành công nghiệp cũng như nền văn minh phát triển, ô nhiễm môi trường và căng thẳng gia tăng, khi thói quen ăn uống thay đổi, số lượng bệnh nhân bệnh liên quan tới dị ứng đã tăng lên hàng năm. Tỷ lệ các bệnh nhân bị bệnh liên quan tới dị ứng như tạng dị ứng, bệnh hen và các bệnh tương tự ít hơn 1% vào năm 1980, nhưng tăng lên nhanh chóng tới trên 5% vào những năm 2000, và ước tính là hơn 10%, bao gồm cả những bệnh nhân có nguy cơ bị bệnh cao. Các bệnh liên quan tới dị ứng hình thành do phản ứng miễn dịch quá mức của cơ thể sống, do phản ứng kháng nguyên và kháng thể, và các bệnh liên quan tới dị ứng được phân loại thành các loại phản ứng quá mẫn từ 1-4 dựa trên thời gian đáp ứng và có sự tham gia của bỏ thể hay không. Phản ứng quá mẫn tuýp 1 bao gồm: tạng dị ứng, sốc phản vệ, hen phế quản, nổi mề đay, viêm phế quản và các bệnh tương tự; phản ứng quá mẫn tuýp 2 bao gồm truyền nhầm nhóm máu, thiếu máu do tan máu tự miễn, thiếu máu tan máu do dùng thuốc, chứng giảm bạch cầu hạt, ban xuất huyết giảm tiểu cầu; phản ứng quá mẫn tuýp 3 bao gồm ban đỏ, phù bạch huyết, đau khớp, viêm khớp, viêm thận, viêm cầu thận cấp sau nhiễm liên cầu khuẩn, và các bệnh tương tự; và phản ứng quá mẫn tuýp 4 bao gồm bệnh viêm mãn tính và các bệnh tương tự. Để cải thiện các bệnh liên quan tới dị ứng, tốt nhất là nên loại bỏ các chất gây dị ứng (bụi nhà, ve, vv) khỏi da bằng cách tắm rửa và tránh ăn các chất gây dị ứng. Tuy nhiên, khi các bệnh liên quan tới dị ứng không được cải thiện, các loại thuốc như steroid, kháng histamin, thuốc ức chế miễn dịch hoặc loại tương tự được sử dụng, thì dễ gây các phản ứng phụ như teo da, giãn mạch, đổi màu da, ban xuất huyết (steroid), buồn ngủ (thuốc kháng histamin), suy thận (thuốc ức chế miễn dịch) và các loại tương tự. Trong số các loại thuốc được phát triển cho đến nay, chưa có loại thuốc nào có thể chữa khỏi hoàn toàn bệnh liên quan tới dị ứng, và các thuốc này chỉ nhằm cải thiện các triệu chứng, nhưng có hạn chế là có thể gây ra các phản ứng phụ.

Chứng béo phì

Chúng béo phì là rối loạn chuyển hóa gây ra bởi sự mất cân bằng giữa lượng calo nạp vào và tiêu thụ, và do gây tăng kích thước (phì đại) hoặc tăng số lượng (tăng sinh) các tế bào mỡ trong cơ thể theo hình thái học. Chúng bệnh béo phì không chỉ là rối loạn suy dinh dưỡng phổ biến nhất trong xã hội phương Tây, mà sự phổ biến của chúng béo phì ở Hàn Quốc cũng đang gia tăng nhanh do sự thay đổi thói quen ăn uống và Tây hoá lối sống. Do đó, tầm quan trọng của điều trị và phòng chúng béo phì đã được nhấn mạnh nhiều. Chúng béo phì là yếu tố quan trọng làm xáo trộn cá nhân về mặt tâm lý và cũng làm tăng nguy cơ mắc các bệnh khác nhau ở người trưởng thành về mặt xã hội. Chúng béo phì được biết là liên quan trực tiếp đến sự gia tăng tỷ lệ các bệnh khác nhau ở người trưởng thành như bệnh đái tháo đường tuýp 2, bệnh cao huyết áp, tăng mỡ máu, bệnh tim và các loại tương tự (Tạp chí Cell 87: 377, 1999) và các bệnh liên quan đến béo phì được gọi chung là hội chứng liên quan đến chuyển hóa hoặc hội chứng kháng insulin và những bệnh này đã được báo cáo là gây ra xơ vữa động mạch và các bệnh tim mạch. Các tác nhân điều trị chúng béo phì được biết đến từ trước đến nay là Xenical (Công ty Dược phẩm Roche, Thụy Sĩ), Reductil (Evothe, Abbott, Mỹ), Exolise (Arkopharma, Pháp) và các loại tương tự và được phân loại thành chất ức chế sự thèm ăn, chất kích thích tiêu hao năng lượng và các chất ức chế hấp thụ chất béo. Hầu hết các tác nhân điều trị béo phì là những chất ức chế sự thèm ăn để ngăn chặn sự thèm ăn bằng cách kiểm soát các chất dẫn truyền thần kinh liên quan đến vùng dưới đồi. Tuy nhiên, các tác nhân điều trị thông thường sẽ gây ra các phản ứng phụ như bệnh tim, các bệnh về đường hô hấp, các bệnh thần kinh và những tác dụng tiêu cực tương tự khác, và sự duy trì hiệu quả của chúng cũng thấp. Do đó, cần có sự phát triển các chất điều trị cải thiện chúng béo phì. Ngoài ra, trong số các sản phẩm hiện đang được phát triển, có rất ít hoặc không có các tác nhân điều trị có hiệu quả điều trị tốt mà không gây ra các phản ứng phụ, và do đó cần phải phát triển tác nhân điều trị mới cho chúng béo phì.

Probiotics là tập hợp các vi sinh vật sống nhằm cải thiện môi trường vi sinh vật của người chủ trong hệ tiêu hóa của động vật, bao gồm cả con người, và có tác dụng có lợi cho sức khỏe của vật chủ. Để có hiệu quả probiotic, thì điều cần thiết là cần có khả năng chịu axit tuyệt tốt, chịu được dịch mật và bám được trên các tế bào biểu mô bởi hầu hết các probiotic này phải đến ruột non khi được dùng bằng đường uống và phải được bám dính chặt với bề mặt ruột. Các chủng vi khuẩn lactic được sử dụng làm probiotic vì chúng đóng vai trò phân hủy các protein phức tạp và protein sợi để tạo ra các chất dinh

đưỡng quan trọng trong khi sống trong hệ thống tiêu hóa của cơ thể người. Các chủng vi khuẩn lactic đã được báo cáo là có tác dụng như duy trì hệ vi khuẩn bình thường ở ruột, cải thiện hệ vi khuẩn ở ruột, có hiệu quả chống bệnh tiểu đường và chống tăng nhiễm mỡ máu, ức chế sự gây ung thư, ức chế bệnh viêm đại tràng, và hoạt động không đặc hiệu của hệ miễn dịch vật chủ. Trong số các chủng vi khuẩn lactic này, chủng *Lactobacillus* sp. là chủng chính của các hệ vi khuẩn thông thường sống trong ruột của cơ thể người và từ lâu đã được biết đến là quan trọng trong việc duy trì hệ thống tiêu hóa khỏe mạnh và duy trì môi trường âm đạo. Hiện tại, theo hướng dẫn của Sở Y tế Công cộng Hoa Kỳ, tất cả các chủng *Lactobacillus* được lưu giữ trong Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC) được xếp loại 'An toàn sinh học cấp 1', được biết là không có nguy cơ gây ra bệnh ở người hay động vật. Trong khi đó, các chủng vi khuẩn lactic kim chi có liên quan đến quá trình lên men kim chi đã được báo cáo là có tác dụng tăng cường miễn dịch, hiệu quả kháng khuẩn, hiệu quả chống oxy hoá, tác dụng chống ung thư, tác dụng chống béo phì, có tác dụng dự phòng cao huyết áp hoặc hiệu quả phòng táo bón [Hivak P, Odrska J, Ferencik M, Ebringer L, Jahnova E, Mikes Z. : Một năm áp dụng Probiotic chủng *Enterococcus faecium* M-74 làm giảm mức cholesterol trong huyết thanh: Bratisl lek Listy 2005; 106(2); 67-72; Agerholm-Larsen L. Bell ML. Grunwald GK. Astrup A. : Hiệu quả của sản phẩm sữa probiotic đối với cholesterol huyết tương: các nghiên cứu phân tích tổng hợp trong thời gian ngắn; Eur J Clin Nutr. 2000; 54 (11) 856-860; Jaroslava Helper, Jian Zhang, Stephen J Lewis and Wani O Li; Ảnh hưởng của dịch nổi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* tới trọng lượng cơ thể và sự biểu hiện leptin ở chuột; Tạp chí BMC complementary and alternative medicine. 2008; 8(5)1-8].

Khi các hoạt động sinh học của vi khuẩn lactic đã được biết đến, các nghiên cứu gần đây đã được tiến hành để phát triển các chủng vi khuẩn lactic có chức năng tốt trong khi vẫn an toàn cho con người và việc sử dụng các chủng này vào các loại dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng. Cụ thể như, đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-2009-0116051 bộc lộ chủng *Lactobacillus brevis* HY7401 có hiệu quả trong việc điều trị và phòng bệnh viêm đại tràng. Hơn nữa, đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-2006-0119045 bộc lộ chủng vi khuẩn lactic để phòng hoặc điều trị viêm da dị ứng, được lựa chọn từ nhóm gồm *Leuconostoc citreum* KACC91035, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* KCTC 3100 và *Lactobacillus brevis* KCTC 3498. Hơn nữa, đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-2013-0092182 bộc lộ một loại thực phẩm chức năng tốt cho sức khỏe để phòng bệnh

gan do rượu hoặc loại bỏ các triệu chứng sau khi sử dụng đồ uống có cồn, mà có chứa chủng *Lactobacillus brevis* HD-01 (mã số truy cập: KACC91701P) có khả năng phân hủy rượu tốt. Ngoài ra, đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-2010-0010015 bộc lộ chủng vi khuẩn *Lactobacillus johnsonii* HFI 108 (KCTC 11356BP) có hoạt tính làm giảm cholesterol máu và chống béo phì. Ngoài ra, đơn sáng chế Hàn Quốc số 10-2014-0006509 bộc lộ chế phẩm dùng để phòng hoặc điều trị chứng béo phì, trong đó có chứa một thành phần hoạt tính là chủng *Bifidobacterium longum* CGB-C11 (mã số truy cập: KCTC 11979BP) tạo ra axit linoleic liên hợp.

Tuy nhiên, hiện chưa có kỹ thuật sử dụng các chủng vi khuẩn lactic để làm giảm bớt hoặc điều trị tất cả rối loạn hệ vi khuẩn ở ruột, các hội chứng liên quan tới trao đổi chất qua thành ruột, viêm đại tràng, các bệnh gan, bệnh liên quan tới dị ứng, chứng béo phì và các bệnh tương tự đang gia tăng ở người hiện đại. Do đó, cần phải sàng lọc chủng vi khuẩn mới đa năng và để phát triển các loại dược phẩm, thực phẩm chức năng và các chế phẩm tương tự bằng cách sử dụng chủng này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế được thực hiện dựa trên tình trạng kỹ thuật đã được đề cập ở trên, và sáng chế đề xuất vi khuẩn lactic có các hoạt tính sinh lý khác nhau hoặc các chức năng cần thiết cho các probiotic, và cho thực phẩm và dược phẩm sử dụng nó.

Một mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất hỗn hợp vi khuẩn lactic có khả năng biểu hiện các hoạt tính sinh lý hoặc chức năng khác nhau ở mức tối đa, và thực phẩm và dược phẩm sử dụng nó.

Các tác giả sáng chế đã sàng lọc được nhiều chủng vi khuẩn lactic từ kim chi hoặc phân người, và đã phát hiện ra rằng, trong số các chủng vi khuẩn lactic được sàng lọc đó, chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sp., chủng vi khuẩn *Bifidobacterium* sp. hoặc hỗn hợp của chúng có hiệu quả tốt trong việc cải thiện tình trạng tổn thương dạ dày - ruột như hội chứng thẩm thấu qua ruột, tổn thương gan như gan nhiễm mỡ, các bệnh liên quan tới dị ứng như viêm da dị ứng, các bệnh viêm như viêm đại tràng, hoặc béo phì, qua đó hoàn thành được sáng chế.

Để đạt được các mục tiêu trên, phương án thực hiện của sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn lactic được chọn lọc từ chủng vi khuẩn *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5, hoặc *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7. *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* hoặc *Bifidobacterium longum* có hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính ức chế β -glucuronidaza, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS) hoặc hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bọt. Một phương án thực hiện khác của sáng chế đề xuất được phẩm dùng để phòng hoặc điều trị tổn thương ruột, tổn thương gan, bệnh liên quan tới dị ứng, bệnh viêm hoặc chứng béo phì, trong đó bao gồm các chủng vi khuẩn sau làm một thành phần hoạt tính: chủng vi khuẩn lactic được chọn lọc từ chủng vi khuẩn *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5, hoặc *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7, sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn lactic, sản phẩm ly giải vi khuẩn lactic, hoặc dịch chiết vi khuẩn lactic. Một phương án thực hiện khác của sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm dùng để phòng hoặc giảm nhẹ tổn thương ruột, tổn thương gan, bệnh liên quan tới dị ứng, bệnh viêm hoặc chứng béo phì, trong đó có chứa các chủng vi khuẩn sau như là một thành phần hoạt tính: chủng vi khuẩn lactic được chọn lọc từ chủng vi khuẩn *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5, hoặc *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7, sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn lactic, sản phẩm ly giải vi khuẩn lactic, hoặc dịch chiết vi khuẩn lactic.

Để đạt được các mục tiêu khác của sáng chế, phương án thực hiện của sáng chế đề xuất hỗn hợp gồm hai hoặc nhiều các chủng vi khuẩn lactic được chọn lọc từ nhóm bao

gồm vi khuẩn *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5, và *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7. Hỗn hợp gồm các chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính ức chế β -glucuronidaza, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS) hoặc hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bọt. Một phương án thực hiện khác của sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để phòng hoặc điều trị tổn thương ruột, tổn thương gan, bệnh liên quan tới dị ứng, bệnh viêm hoặc chứng béo phì, trong đó có chứa hỗn hợp gồm hai hay nhiều chủng vi khuẩn lactic như là một thành phần hoạt tính, được lựa chọn từ nhóm gồm vi khuẩn *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO:1, chủng vi khuẩn *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO:3, chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4, chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5, và chủng vi khuẩn *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7, sản phẩm nuôi cấy của hỗn hợp vi khuẩn lactic, sản phẩm ly giải của hỗn hợp vi khuẩn lactic, hoặc dịch chiết hỗn hợp vi khuẩn lactic. Một phương án thực hiện khác của sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm dùng để phòng hoặc giảm nhẹ tổn thương ruột, tổn thương gan, bệnh liên quan tới dị ứng, bệnh viêm, hoặc chứng béo phì, trong đó có chứa hỗn hợp của hai hay nhiều chủng vi khuẩn lactic như một thành phần hoạt tính, được lựa chọn từ nhóm bao gồm: chủng vi khuẩn *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO:1, chủng vi khuẩn *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO:3, chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO:4, chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO:5, và chủng vi khuẩn *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO:7, sản phẩm nuôi cấy hỗn hợp vi khuẩn lactic, sản phẩm ly giải hỗn hợp vi khuẩn lactic, hoặc dịch chiết hỗn hợp vi khuẩn lactic.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sp. hoặc chủng *Bifidobacterium* sp. theo sáng chế được phân lập từ kim chi hoặc phân người, và do đó có sự an toàn cao và có các hoạt tính sinh lý khác nhau như hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính ức chế β -glucuronidaza, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS) hoặc hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bít. Theo đó, chủng *Lactobacillus* sp., chủng *Bifidobacterium* sp. hoặc hỗn hợp của chúng theo sáng chế có thể được sử dụng làm thực phẩm chức năng hoặc được liệu hữu ích để phòng, giảm bớt hoặc điều trị tổn thương đường ruột, tổn thương gan, dị ứng, bệnh viêm hoặc chứng béo phì.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ minh họa sự thay đổi giá trị glutamic pyruvat transaminaza (GOT) khi vi khuẩn lactic được sử dụng cho các động vật mô hình bị tổn thương gan được cảm ứng bằng D-galactosamin theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.2 là biểu đồ minh họa sự thay đổi giá trị glutamic oxalaxetic transaminaza (GPT) khi vi khuẩn lactic được sử dụng cho các động vật mô hình bị tổn thương gan được cảm ứng bằng D-galactosamin theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.3 là biểu đồ minh họa sự thay đổi giá trị malondiandehit (MDA) khi vi khuẩn lactic được sử dụng cho các động vật mô hình bị tổn thương gan được cảm ứng bằng D-galactosamin theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.4 là biểu đồ minh họa hiệu quả của các chủng vi khuẩn axit lactic được chọn lọc theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế đối với lipopolysaccarit (LPS) - chất cảm ứng gây phản ứng viêm của các tế bào tua. Biểu đồ bên trái Fig.4 thể hiện hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với tế bào không được xử lý với LPS (lipopolysaccarit), và biểu đồ bên phải thể hiện hiệu quả của vi khuẩn lactic đối với các tế bào được xử lý với LPS (lipopolysaccarit).

Fig.5 là biểu đồ minh họa hiệu quả của chủng vi khuẩn *Bifidobacterium longum* CH57 đối với LPS (lipopolysaccarit) - chất cảm ứng gây ra phản ứng viêm của đại thực bào theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.6 là hình minh họa kết quả phân tích ảnh hưởng của *Lactobacillus brevis* CH23 đối với sự biệt hóa của tế bào T (được phân lập từ lá lách) thành các tế bào Th17 hoặc các tế bào Treg bằng hệ thống sàng lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.7 là hình minh họa kết quả phân tích ảnh hưởng của *Lactobacillus brevis* CH23, *Bifidobacterium longum* CH57 hoặc hỗn hợp của nó đến sự biểu hiện của protein ZO-1 trong tế bào Caco2 theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.8 là hình minh họa hình dạng của đại tràng hoặc hoạt độ của myeloperoxidaza (MPO) cho thấy hiệu quả của *Bifidobacterium longum* CH57 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do axit 2,4,6-trinitrobenzensulfonic (TNBS) gây ra theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.9 là các hình ảnh mô học cho thấy hiệu quả của *Bifidobacterium longum* CH57 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.10 là hình minh họa các nồng độ xytokin liên quan đến phản ứng viêm cho thấy hiệu quả của *Bifidobacterium longum* CH57 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.11 là hình minh họa hình dáng của đại tràng hoặc hoạt độ của myeloperoxidaza cho thấy hiệu quả của *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.12 là các hình ảnh mô học của đại tràng cho thấy hiệu quả của *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.13 là hình minh họa các dạng biệt hóa của tế bào T cho thấy hiệu quả của *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.14 là hình minh họa các nồng độ của xytokin liên quan đến phản ứng viêm cho thấy hiệu quả của *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính được cảm nhiễm bởi TNBS theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.15 là hình minh họa hình dáng của đại tràng hoặc hoạt độ của myeloperoxidaza cho thấy hiệu quả của hỗn hợp chủng *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính được cảm nhiễm bởi TNBS theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.16 là các hình ảnh mô học cho thấy hiệu quả của hỗn hợp chủng *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính được cảm nhiễm bởi TNBS theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.17 là hình minh họa các nồng độ xytokin liên quan đến phản ứng viêm cho thấy hiệu quả của hỗn hợp chủng *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính được cảm nhiễm bởi TNBS theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.18 là hình minh họa sự thay đổi trọng lượng cho thấy hiệu quả của hỗn hợp chủng *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính được cảm nhiễm bởi TNBS theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.19 là hình minh họa hình dáng của đại tràng, hoạt động của enzym myeloperoxidaza, hình ảnh mô học của đại tràng, và các hình ảnh tương tự, cho thấy hiệu quả của hỗn hợp chủng *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị gây béo phì theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.20 là hình minh họa các nồng độ xytokin liên quan đến phản ứng viêm cho thấy hiệu quả của hỗn hợp chủng *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị gây béo phì theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.21 là hình minh họa các dấu hiệu đáp ứng viêm cho thấy hiệu quả của hỗn hợp chủng *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị gây béo phì theo thí nghiệm thứ nhất của sáng chế.

Fig.22 là hình minh họa các dạng biệt hóa của tế bào T thành tế bào Th17 cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính được cảm nhiễm bởi TNBS theo thí nghiệm thứ hai của sáng chế.

Fig.23 là hình minh họa các dạng biệt hóa của tế bào T thành tế bào Treg cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính được cảm nhiễm bởi TNBS theo thí nghiệm thứ hai của sáng chế.

Fig.24 là hình minh họa các dấu hiệu đáp ứng viêm cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính được cảm nhiễm bởi TNBS theo thí nghiệm thứ hai của sáng chế.

Fig.25 là hình ảnh cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày chuột bị viêm loét dạ dày được cảm nhiễm bởi etanol theo thí nghiệm thứ hai của sáng chế.

Fig.26 là hình minh họa mức độ tổn thương trên toàn bộ dạ dày được tính theo điểm số để cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày chuột bị viêm loét dạ dày được cảm nhiễm bởi etanol theo thí nghiệm thứ hai của sáng chế.

Fig.27 là hình minh họa chỉ số viêm loét cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày chuột bị viêm loét dạ dày được cảm nhiễm bởi etanol theo thí nghiệm thứ hai của sáng chế.

Fig.28 là hình minh họa chỉ số hoạt động mô học cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày chuột bị viêm loét dạ dày được cảm nhiễm bởi etanol theo thí nghiệm thứ hai của sáng chế.

Fig.28 là hình minh họa hoạt động của enzym myeloperoxidaza cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày chuột bị viêm loét dạ dày được cảm nhiễm bởi etanol theo thí nghiệm thứ hai của sáng chế.

Fig.30 là hình minh họa các mức biểu hiện của CXCL4 cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày chuột bị viêm loét dạ dày được cảm nhiễm bởi etanol theo thí nghiệm thứ hai của sáng chế.

Fig.31 là hình minh họa các mức biểu hiện của TNF- α cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày chuột bị viêm loét dạ dày được cảm nhiễm bởi etanol theo thí nghiệm thứ hai của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này sẽ được định nghĩa rõ ràng hơn.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sản phẩm nuôi cấy" dùng để chỉ sản phẩm thu được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường lỏng hoặc môi trường rắn đã biết, và do đó có thể bao gồm vi sinh vật.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "dược dụng" và "dưỡng dụng" dùng để chỉ việc không kích thích cơ thể hoặc ức chế hoạt động sinh học và đặc tính của chất hoạt tính được sử dụng một cách đáng kể.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phòng" dùng để chỉ toàn bộ các hoạt động ức chế các triệu chứng hoặc trì hoãn sự tiến triển của các triệu chứng bằng việc sử dụng các chế phẩm của sáng chế.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "điều trị" dùng để chỉ toàn bộ các hoạt động làm giảm hoặc làm thay đổi theo hướng tích cực các triệu chứng của một bệnh cụ thể bằng việc sử dụng các chế phẩm của sáng chế.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "làm giảm bớt" dùng để chỉ toàn bộ các hoạt động mà làm giảm bớt ít nhất một thông số liên quan đến tình trạng điều trị, ví dụ như mức độ của triệu chứng.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "cho sử dụng" dùng để chỉ việc cung cấp chế phẩm của sáng chế cho một đối tượng bằng bất kỳ phương pháp thích hợp nào. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" dùng để chỉ tất cả các loài động vật, bao gồm cả

con người, khi, chó, dê, lợn hoặc chuột mà bị một bệnh nào đó mà triệu chứng của nó có thể được làm giảm bớt bằng việc cho sử dụng chế phẩm của sáng chế.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "lượng có hiệu quả được lý" dùng để chỉ một lượng đủ để điều trị bệnh, với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý áp dụng cho bất kỳ việc điều trị bằng thuốc nào. Lượng có hiệu quả được lý có thể được xác định tùy thuộc vào các yếu tố, bao gồm loại bệnh của chủ thể, mức độ nghiêm trọng của bệnh, hoạt động của thuốc, độ nhạy của thuốc, thời điểm điều trị, lộ trình điều trị, tỷ lệ bài tiết, thời gian điều trị và việc thuốc có được sử dụng kết hợp với thành phần, và các yếu tố khác đã biết trong lĩnh vực y tế không.

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

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính sinh lý khác nhau hoặc hỗn hợp các chủng vi khuẩn lactic có thể có các hoạt tính sinh lý tăng lên.

Chủng vi khuẩn lactic theo một phương án thực hiện của sáng chế được lựa chọn từ chủng *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5, hoặc *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7, và có hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính ức chế β -glucuronidaza, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS) hoặc hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bít.

Chủng *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 là loài vi khuẩn kỵ khí gram dương được phân lập từ kim chi, có khoảng nhiệt độ sinh trưởng rộng, tồn tại được ở pH thấp và nồng độ muối cao, và tiết ra enzym glucosidaza. Hơn nữa, chủng *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 sử dụng D-riboza, D-xyloza, D-glucoza, D-fructoza, esculin, salixin, mantoza, melibioza, 5-keto-gluconat và các loại tương tự làm nguồn cacbon. Ngoài ra, chủng *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 tốt hơn là chủng *Lactobacillus brevis* CH23 (mã số truy cập: KCCM

11762P). Chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3 là chủng vi khuẩn kỵ khí gram dương được phân lập từ phân người, và tiết ra enzym glucosidaza. Hơn nữa, chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3 sử dụng D-galactoza, D-glucoza, D-fructoza và các loại tương tự làm nguồn cacbon. Ngoài ra, chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3 tốt hơn là chủng *Bifidobacterium longum* CH57 (mã số truy cập: KCCM 11764P). Chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4 là chủng vi khuẩn kỵ khí gram dương được phân lập từ kim chi. Hơn nữa, chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4 sử dụng D-riboza, D-galactoza, D-glucoza, D-fructoza, D-mannoza, mannitol, sorbitol, N-axetyl glucosamin, amygdalin, arbutin, esculin, salixin, xenlobioza, mantoza, melibioza, saccaroza, trehaloza, melezitoza và các loại tương tự làm nguồn cacbon. Ngoài ra, chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4 tốt hơn là chủng *Lactobacillus plantarum* LC5 (mã số truy cập: KCCM 11800P). Chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5 là chủng vi khuẩn kỵ khí gram dương được phân lập từ kim chi. Hơn nữa, chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5 sử dụng L-arabinoza, D-riboza, D-glucoza, D-fructoza, D-mannoza, mannitol, sorbitol, N-axetyl glucosamin, amygdalin, arbutin, esculin, salixin, xenlobioza, mantoza, melibioza, saccaroza, trehaloza, melezitoza và các loại tương tự làm nguồn cacbon. Ngoài ra, chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5 tốt hơn là chủng *Lactobacillus plantarum* LC27 (mã số truy cập: KCCM 11801P). Chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7 là chủng vi khuẩn kỵ khí gram dương được phân lập từ phân người. Hơn nữa, chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7 sử dụng L-arabinoza, D-xyloza, D-glucoza, D-fructoza, esculin, mantoza, lactoza, melibioza, saccaroza và các loại tương tự làm nguồn cacbon. Ngoài ra, chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7 tốt hơn là *Bifidobacterium longum* LC67 (mã số truy cập: KCCM 11802P).

Hỗn hợp các vi khuẩn lactic theo một phương án thực hiện của sáng chế là hỗn hợp gồm hai hoặc nhiều chủng vi khuẩn lactic được lựa chọn từ nhóm gồm chủng *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1, *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3, *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4, *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5 và *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7. Để có được hiệu quả tăng cường lẫn nhau giữa các chủng vi khuẩn lactic, hỗn hợp vi khuẩn lactic theo phương án thực hiện của sáng chế tốt hơn là kết hợp giữa chủng *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 và chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3. Ngoài ra, để có được hiệu quả tăng cường lẫn nhau giữa các chủng vi khuẩn lactic, hỗn hợp vi khuẩn lactic theo phương án thực hiện của sáng chế tốt hơn là kết hợp giữa chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4 hoặc chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5 và chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7. Hỗn hợp vi khuẩn lactic có hoạt tính chống oxy hóa, có hoạt tính ức chế enzym β -glucuronidaza, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS) hoặc hoạt tính ức chế sự cảm ứng sự biểu hiện của protein liên kết vòng bịt cao hơn so với hoạt tính của một vi khuẩn lactic đơn lẻ do tác dụng tăng cường lẫn nhau của một *Lactobacillus* sp. chủng nhất định và một chủng *Bifidobacterium* sp. nhất định, và nhiều thuận lợi hơn liên quan tới thực phẩm chức năng và dược liệu. Trong hỗn hợp vi khuẩn lactic theo phương án thực hiện của sáng chế, chủng *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 tốt hơn là *Lactobacillus brevis* CH23 (mã số truy cập: KCCM 11762P); chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3 tốt hơn là *Bifidobacterium longum* CH57 (mã số truy cập: KCCM 11764P); chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4 tốt hơn là *Lactobacillus plantarum* LC5 (mã số truy cập: KCCM 11800P); chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5 tốt hơn là *Lactobacillus plantarum* LC27 (mã số truy cập: KCCM 11801P); chủng

Bifidobacterium longum có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7 tốt hơn là *Bifidobacterium longum* LC67 (mã số truy cập: KCCM 11802P).

Vi khuẩn lactic hoặc hỗn hợp vi khuẩn lactic theo sáng chế được sử dụng trong chế phẩm dùng để phòng, làm giảm nhẹ hoặc điều trị tổn thương ruột, tổn thương gan, bệnh liên quan tới dị ứng, bệnh viêm, hoặc chứng béo phì, trong đó có chứa vi khuẩn lactic như một thành phần hoạt tính, được lựa chọn từ nhóm bao gồm: chủng *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1, chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3, chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4, chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5, hoặc chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7, sản phẩm nuôi cấy của nó, sản phẩm ly giải hoặc dịch chiết của nó. Hơn nữa, để sử dụng các chủng vi khuẩn lactic, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để phòng, làm giảm nhẹ hoặc điều trị tổn thương ruột, tổn thương gan, bệnh liên quan tới dị ứng, bệnh viêm, hoặc chứng béo phì, trong đó có chứa hỗn hợp của hai hoặc nhiều vi khuẩn lactic như một thành phần hoạt tính, được lựa chọn từ nhóm bao gồm: chủng *Lactobacillus brevis* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1, chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3, chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4, chủng *Lactobacillus plantarum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5, và chủng *Bifidobacterium longum* có trình tự nucleotit 16S rADN được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7, sản phẩm nuôi cấy của nó, sản phẩm ly giải hoặc dịch chiết của nó. Trong chế phẩm của sáng chế, các đặc tính kỹ thuật của *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* và *Bifidobacterium longum* đã được mô tả ở trên, và do đó việc mô tả chúng được bỏ qua. Tổn thương đường ruột đề cập đến tình trạng trong đó chức năng ruột (cụ thể là ruột non hoặc ruột già) bị bất thường do rối loạn hệ vi khuẩn ở ruột hoặc các nguyên nhân tương tự. Tốt hơn là tổn thương đường ruột là các hội chứng liên quan tới trao đổi chất qua thành ruột. Hơn nữa, tổn thương gan đề cập đến một tình trạng trong đó chức năng của gan là bất thường gây ra bởi các yếu tố bên ngoài hoặc các yếu tố bên trong. Tốt hơn là, tổn thương gan là viêm gan, gan nhiễm mỡ hoặc xơ gan. Hơn nữa, viêm gan bao gồm tất cả các viêm gan không do rượu và viêm gan do rượu. Hơn nữa, gan nhiễm mỡ bao gồm gan nhiễm mỡ không do rượu và

gan nhiễm mỡ do rượu. Hơn nữa, bệnh liên quan tới dị ứng có thể là bất kỳ bệnh nào do phản ứng miễn dịch quá mức của cơ thể sống, và tốt hơn là các bệnh viêm da dị ứng, hen suyễn, viêm họng hoặc viêm da mãn tính. Hơn nữa, bệnh viêm có thể là bất kỳ bệnh nào gây ra bởi phản ứng viêm, và tốt hơn là các bệnh viêm dạ dày, viêm loét dạ dày, viêm khớp hoặc viêm đại tràng. Hơn nữa, viêm khớp bao gồm viêm khớp dạng thấp. Viêm đại tràng là tình trạng viêm xảy ra ở đại tràng do nhiễm khuẩn hoặc sự lên men gây bệnh bên trong ruột. Viêm đại tràng bao gồm viêm đại tràng do nhiễm khuẩn và viêm đại tràng không do nhiễm khuẩn. Các ví dụ cụ thể cho bệnh viêm đại tràng bao gồm các bệnh viêm đường ruột, hội chứng ruột kích thích, và những bệnh tương tự. Hơn nữa, các bệnh viêm đường ruột gồm viêm loét đại tràng, bệnh Crohn hoặc các bệnh tương tự.

Theo sáng chế, sản phẩm nuôi cấy của vi khuẩn lactic hoặc sản phẩm nuôi cấy của hỗn hợp vi khuẩn lactic được sản xuất bằng cách nuôi cấy chủng vi khuẩn nào đó hoặc hỗn hợp các chủng vi khuẩn trong môi trường thích hợp. Ở đây, môi trường có thể được lựa chọn từ môi trường lỏng hoặc môi trường rắn đã biết, và có thể là, môi trường MRS lỏng, môi trường thạch MRS, hoặc môi trường thạch BL.

Theo sáng chế, chế phẩm có thể ở dạng một dược phẩm, phụ gia thực phẩm, chế phẩm thực phẩm (cụ thể là chế phẩm thực phẩm chức năng), phụ gia thức ăn chăn nuôi hoặc dạng tương tự tùy thuộc vào mục đích hoặc khía cạnh sử dụng. Ngoài ra, lượng vi khuẩn lactic hoặc lượng hỗn hợp vi khuẩn lactic làm thành phần hoạt tính cũng có thể được điều chỉnh trong phạm vi rộng tùy thuộc loại chế phẩm cụ thể, mục đích hoặc khía cạnh sử dụng của chế phẩm.

Lượng vi khuẩn lactic, hỗn hợp vi khuẩn lactic, sản phẩm nuôi cấy của nó, sản phẩm ly giải hoặc dịch chiết của nó làm thành phần hoạt tính trong dược phẩm theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể. Cụ thể là, hàm lượng có thể chiếm từ 0,01 đến 99% trọng lượng, tốt hơn là từ 0,5 đến 50% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 1 đến 30% trọng lượng trên tổng trọng lượng của chế phẩm. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm thêm các chất phụ gia như chất mang dược dụng, tá dược dược dụng hoặc chất pha loãng dược dụng ngoài các thành phần hoạt tính. Các chất mang, tá dược và chất pha loãng có thể có trong dược phẩm theo sáng chế bao gồm lactoza, dextroza, saccaroza, sorbitol, mannitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, gum acacia, muối alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinyl

pyrolidon, nước, metyl hydroxybenzoat, propyl hydroxylbenzoat, bột tan (talc), magie stearat và dầu khoáng. Ngoài ra, ngoài vi khuẩn lactic, hỗn hợp vi khuẩn lactic, sản phẩm nuôi cấy của nó, sản phẩm ly giải hoặc dịch chiết của nó, dược phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm thêm một hoặc nhiều thành phần hoạt tính khác có hiệu quả trong việc phòng hoặc điều trị hư hỏng đường ruột, tổn thương gan, bệnh liên quan tới dị ứng, bệnh viêm hoặc chứng béo phì. Dược phẩm theo sáng chế có thể được điều chế dưới dạng công thức để sử dụng bằng đường miệng hoặc các công thức để sử dụng bằng đường tiêm, và các công thức có thể được điều chế sử dụng các chất pha loãng hoặc tá dược thường được sử dụng, như chất độn, chất bổ sung, chất kết dính, chất làm ướt, chất phân rã, chất hoạt động bề mặt và các chất tương tự. Các công thức dạng rắn để sử dụng qua đường miệng bao gồm thuốc viên tròn, viên nén, thuốc cốm, viên nang và các dạng tương tự, và các công thức dạng rắn này có thể được điều chế bằng cách trộn thành phần hoạt tính với ít nhất một tá dược, ví dụ như tinh bột, canxi cacbonat, saccharoza, lactoza hoặc gelatin. Ngoài các tá dược đơn giản, các chất làm trơn như magie stearat hoặc bột talc cũng có thể được sử dụng. Các công thức dạng lỏng để sử dụng qua đường miệng bao gồm hỗn dịch, dung dịch, nhũ tương và xirô, và có thể chứa nhiều tá dược ngoài nước và parafin lỏng thường được sử dụng để pha loãng, ví dụ như chất làm ướt, chất tạo hương, chất thơm, chất bảo quản và các chất tương tự. Các công thức để sử dụng qua đường tiêm bao gồm các dung dịch chứa nước, các dung dịch không chứa nước, hỗn dịch, nhũ tương, được khử trùng, các chế phẩm đông khô, và thuốc đạn. Các dung môi không chứa nước hoặc các chất tạo hỗn dịch như propylen glycol, polyetylen glycol, các loại dầu thực vật như dầu ô liu, các este sử dụng được cho đường tiêm như etyl oleat, và các chất tương tự có thể được sử dụng. Các loại chất như witepsol, Macrogol, Tween 61, bơ cacao, laurin béo, glyxerogelatin và các chất tương tự có thể được sử dụng làm tá dược cho thuốc đạn. Hơn nữa, chế phẩm tốt hơn có thể được bào chế dựa trên từng loại bệnh hoặc thành phần của phương pháp thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật hoặc phương pháp đã được bộc lộ trong Khoa học dược phẩm Remington (ấn bản mới nhất), Công ty xuất bản Mack, Easton PA. Tùy phương pháp điều trị mong muốn mà dược phẩm của sáng chế có thể được sử dụng bằng đường miệng hoặc đường tiêm cho động vật có vú, bao gồm cả con người. Con đường để sử dụng qua đường tiêm bao gồm tiêm da, tiêm màng bụng, tiêm vào trực tràng, tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm trong lồng ngực hoặc tương tự. Liều dùng của dược phẩm theo sáng chế không bị

giới hạn cụ thể, miễn là đạt được lượng có hiệu quả dược lý. Liều dùng có thể thay đổi tùy thuộc vào cân nặng, độ tuổi, giới tính, tình trạng sức khỏe, chế độ ăn uống, thời gian dùng thuốc, chế độ điều trị, tỷ lệ bài tiết của người bệnh và mức độ nghiêm trọng của bệnh. Liều dùng hàng ngày của dược phẩm của sáng chế không giới hạn cụ thể, nhưng tốt hơn là từ 0,1 đến 3000 mg/kg (căn cứ trên thành phần hoạt tính), tốt hơn nữa là từ 1 đến 2000 mg/kg (căn cứ trên thành phần hoạt tính) và có thể được sử dụng một hoặc vài lần trong ngày.

Hơn nữa, hàm lượng vi khuẩn lactic, hỗn hợp vi khuẩn lactic, sản phẩm nuôi cấy của nó, sản phẩm ly giải hoặc dịch chiết của nó dưới dạng thành phần hoạt tính trong chế phẩm thực phẩm theo sáng chế là từ 0,01 đến 99% trọng lượng, tốt hơn là từ 0,1 đến 50% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 0,5 đến 25% trọng lượng, trên tổng trọng lượng của chế phẩm, nhưng không giới hạn. Chế phẩm thực phẩm của sáng chế có thể ở dạng viên, bột, hạt, tiêm truyền, viên nén, viên nang, chất lỏng, hoặc các dạng tương tự, và các ví dụ cụ thể của thực phẩm có thể bao gồm thịt, xúc xích, bánh mì, sôcôla, kẹo, đồ ăn nhẹ, đồ ngọt, pizza, ramen, mì ăn liền, gum, các sản phẩm từ sữa bao gồm kem, các loại súp, đồ uống, trà, thức uống bổ sung, đồ uống, đồ uống chứa cồn, vitamin phức hợp và các loại tương tự và có thể bao gồm tất cả các loại thực phẩm theo nghĩa chung là tốt cho sức khỏe. Chế phẩm thực phẩm của sáng chế ngoài các thành phần hoạt tính còn có thể chứa các chất tạo hương hoặc cacbohydrat tự nhiên như là các thành phần bổ sung. Ngoài ra, chế phẩm thực phẩm theo sáng chế có thể chứa các chất dinh dưỡng, vitamin, chất điện giải, chất tạo hương, chất tạo màu, axit pectic và muối của nó, axit alginic và muối của nó, axit hữu cơ, chất làm dày và keo hóa an toàn, chất điều chỉnh độ pH, chất ổn định, chất bảo quản, glyxerin, rượu, chất cacbonat được sử dụng cho các loại đồ uống có ga, và các loại tương tự. Ngoài ra, chế phẩm thực phẩm theo sáng chế có thể chứa thịt quả để chế biến nước trái cây tự nhiên, nước ép trái cây, và nước rau củ. Các thành phần này có thể được sử dụng dưới dạng độc lập hoặc dưới dạng hỗn hợp. Các cacbohydrat tự nhiên được mô tả ở trên có thể bao gồm các monosaccarit như glucoza và fructoza, các disaccarit như mantôza và saccaroza, các polysaccarit như dextrin và cyclodextrin, và cồn như xylitol, sorbitol và erythritol. Các chất tạo hương được sử dụng là chất tạo hương tự nhiên như thaumatin hoặc dịch chiết cỏ ngọt, hoặc chất tạo hương tổng hợp như sacarin hoặc aspartam.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ minh họa cụ thể. Tuy nhiên, cần hiểu rằng các ví dụ chỉ nhằm mục đích minh họa rõ ràng các đặc tính kỹ thuật của sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

I. Thí nghiệm thứ nhất để sàng lọc vi khuẩn lactic và đánh giá hiệu quả của chúng

1. Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn lactic

(1) Phân lập các chủng vi khuẩn lactic từ kim chi

Kim chi cải bắp Trung Quốc, kim chi củ cải và kim chi hành tây được ép, và dịch ép được hòa thành hỗn dịch trong môi trường MRS lỏng (MRS Broth, Difco, Mỹ). Tiếp theo, phần dịch nổi được thu lấy, được chuyển sang môi trường MRS thạch (Difco, USA), và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong khoảng 48 giờ, và sau đó các chủng hình thành các khuẩn lạc được phân lập.

(2) Phân lập các chủng vi khuẩn lactic từ phân người

Phân người được hòa thành hỗn dịch trong môi trường GAM lỏng (GAM broth, Công ty Dược Nissui, Nhật Bản). Tiếp theo, phần dịch nổi được thu lấy, được chuyển sang môi trường BL thạch (Công ty Dược Nissui, Nhật Bản), và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong khoảng 48 giờ, và sau đó chủng *Bifidobacterium* sp. hình thành các khuẩn lạc được phân lập.

(3) Định danh các chủng vi khuẩn lactic được sàng lọc

Các đặc tính sinh lý và trình tự 16S rADN của các chủng được phân lập từ kim chi hoặc phân người đã được phân tích để định danh loài của các chủng, và đưa ra tên cho các chủng. Bảng 1 dưới đây là số tham chiếu và tên chủng của các vi khuẩn lactic được phân lập từ kim chi cải bắp Trung Quốc, kim chi củ cải, kim chi hành tây và phân người.

Bảng 1

Số tham chiếu	Tên chủng	Số tham chiếu	Tên chủng
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH1	31	<i>Lactobacillus sakei</i> CH31
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH2	32	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH32
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3	33	<i>Lactobacillus sakei</i> CH33
4	<i>Lactobacillus brevis</i> CH4	34	<i>Lactobacillus sakei</i> CH34
5	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH5	35	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH35
6	<i>Lactobacillus brevis</i> CH6	36	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> CH36
7	<i>Lactobacillus casei</i> CH7	37	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH37
8	<i>Lactobacillus planantrum</i> CH8	38	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38
9	<i>Lactobacillus sakei</i> CH9	39	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH39
10	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH10	40	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH40
11	<i>Lactobacillus sakei</i> CH11	41	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41
12	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH12	42	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH42
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH13	43	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH43
14	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH14	44	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH44
15	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH15	45	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH45
16	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH16	46	<i>Bifidobacterium breve</i> CH46
17	<i>Lactobacillus paracasei</i>	47	<i>Bifidobacterium breve</i> CH47

Số tham chiếu	Tên chủng	Số tham chiếu	Tên chủng
	CH17		
18	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH18	48	<i>Bifidobacterium breve</i> CH48
19	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH19	49	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH49
20	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH20	50	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH50
21	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21	51	<i>Bifidobacterium dentium</i> CH51
22	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH22	52	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH52
23	<i>Lactobacillus brevis</i> CH23	53	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH53
24	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH24	54	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH54
25	<i>Lactobacillus kim chi</i> CH25	55	<i>Bifidobacterium longum</i> CH55
26	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH26	56	<i>Bifidobacterium longum</i> CH56
27	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH27	57	<i>Bifidobacterium longum</i> CH57
28	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH28	58	<i>Bifidobacterium longum</i> CH58
29	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH29	59	<i>Bifidobacterium longum</i> CH59
30	<i>Lactobacillus reuteri</i> CH30	60	<i>Bifidobacterium longum</i> CH60

Trong số các chủng được trình bày trên bảng 1 ở trên, *Lactobacillus brevis* CH23 là vi khuẩn gram dương kỵ khí, không hình thành bào tử, và có thể tồn tại ngay cả trong điều kiện hiếu khí. Hơn nữa, *Lactobacillus brevis* CH23 tồn tại ở nhiệt độ từ 10 đến 42°C và là chủng chịu được axit ở pH 2 trong vòng 2 giờ. Hơn nữa, *Lactobacillus brevis*

CH23 tồn tại được ngay cả trong dung dịch natri clorua 2% và sản xuất một cách tích cực glucosidaza. Ngoài ra, để phân loại theo khía cạnh hóa học, chủng *Lactobacillus brevis* CH23, vùng 16S rADN của nó được phân tích, và kết quả là, *Lactobacillus brevis* CH23 có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 1. Trình tự nucleotit 16S rADN của *Lactobacillus brevis* CH23 đã được tìm kiếm bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), và kết quả là, không tìm thấy chủng *Lactobacillus brevis* nào có cùng trình tự nucleotit 16S rADN với *Lactobacillus brevis* CH23, và *Lactobacillus brevis* CH23 cho thấy sự tương đồng 99% với trình tự 16S rADN của chủng *Lactobacillus brevis* FJ004.

Trong số các chủng được trình bày trên bảng 1 ở trên, *Lactobacillus johnsonii* CH32 là vi khuẩn gram dương kỵ khí, không hình thành bào tử, và có thể tồn tại ngay cả trong điều kiện hiếu khí. Hơn nữa, *Lactobacillus johnsonii* CH32 sinh trưởng ổn định ở nhiệt độ lên đến 45°C, và là chủng chịu axit ổn định ở pH = 2 trong 2 giờ. Hơn nữa, *Lactobacillus johnsonii* CH32 chủ động sản xuất enzym glucosidaza, nhưng không sản xuất enzym β -glucuronidaza. Ngoài ra, để phân loại theo khía cạnh hóa học chủng *Lactobacillus johnsonii* CH32, vùng 16S rADN của nó được phân tích, và kết quả chỉ ra rằng, *Lactobacillus johnsonii* CH32 có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 2. Trình tự nucleotit 16S rADN của *Lactobacillus johnsonii* CH32 đã được tìm kiếm bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), và kết quả là, không tìm thấy chủng *Lactobacillus johnsonii* nào có cùng trình tự nucleotit 16S rADN với *Lactobacillus johnsonii* CH32, và *Lactobacillus johnsonii* CH32 cho thấy sự tương đồng 99% với trình tự 16S rADN của chủng *Lactobacillus johnsonii* JCM 2012.

Trong số các chủng trình bày trên bảng 1 ở trên, *Bifidobacterium longum* CH57 là vi khuẩn gram dương kỵ khí, không hình thành bào tử, và thể hiện khả năng tồn tại thấp trong điều kiện hiếu khí. Hơn nữa, *Bifidobacterium longum* CH57 không ổn định với nhiệt. Hơn nữa, *Bifidobacterium longum* CH57 chủ động sản xuất enzym glucosidaza, nhưng không sản xuất enzym β -glucuronidaza. Ngoài ra, để phân loại theo khía cạnh hóa học chủng *Bifidobacterium longum* CH57, vùng 16S rADN của nó được phân tích, và kết quả chỉ ra rằng, *Bifidobacterium longum* CH57 có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 3. Trình tự nucleotit 16S rADN của *Bifidobacterium longum* CH57 đã được tìm kiếm bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), và kết

quả là, không tìm thấy chủng *Bifidobacterium longum* nào có cùng trình tự nucleotit 16S rADN với *Bifidobacterium longum* CH57, và *Bifidobacterium longum* CH57 cho thấy sự tương đồng 99% với trình tự 16S rADN của chủng *Bifidobacterium longum* CBT-6.

Ngoài ra, trong số các đặc điểm sinh lý của *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32 và *Bifidobacterium longum* CH57, việc sử dụng nguồn cacbon cũng được phân tích bằng cách sử dụng một quá trình lên men đường bằng bộ kit API (phiên bản: API 50 CHL; được sản xuất bởi BioMerieux's, Mỹ). Bảng 2 dưới đây thể hiện các kết quả phân tích việc sử dụng nguồn cacbon của *Lactobacillus brevis* CH23; Bảng 3 dưới đây thể hiện các kết quả phân tích việc sử dụng nguồn cacbon của *Lactobacillus johnsonii* CH32; và Bảng 4 dưới đây thể hiện kết quả phân tích việc sử dụng nguồn cacbon của *Bifidobacterium longum* CH57. Trên bảng 2, 3 và 4, "+" cho biết trường hợp sử dụng nguồn cacbon là dương tính; "-" cho biết trường hợp sử dụng nguồn cacbon là âm tính; và "±" chỉ ra trường hợp sử dụng nguồn cacbon là không xác định. Như được thể hiện trong các Bảng 2, 3 và 4 dưới đây, các chủng *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32 và *Bifidobacterium longum* CH57 cho thấy sự sử dụng nguồn cacbon khác với các chủng khác cùng loài tương ứng với một số nguồn cacbon.

Bảng 2

Nguồn cacbon	Tên chủng		Nguồn cacbon	Tên chủng	
	<i>L. brevis</i> ¹⁾	<i>L. brevis</i> CH23		<i>L. brevis</i> ¹⁾	<i>L. brevis</i> CH23
glyxerol	-	-	salixin	+	+
erythritol	-	-	xenlobioza	+	-
D-arabinoza	-	-	mantoza	+	+
L-arabinoza	+	-	lactoza	+	-
D-riboza	+	+	melibioza	-	+
D-xyloza	+	+	saccaroza	+	-
L-xyloza	-	-	trehaloza	+	-

D-adonitol	-	-	inulin	+	-
metyl- β -D-xylopyranozit	-	-	melezitoza	+	-
D-galactoza	+	-	raffinoza	-	-
D-glucoza	+	+	Tinh bột	-	-
D-fructoza	+	+	Glycogen	-	-
D-mannoza	+	-	Xylitol	-	-
L-sorboza	-	-	gentiobioza	+	-
L-rhamnoza	-	-	D-turanoza	+	-
dulcitol	+	-	D-lyxoza	-	-
inositol	-	-	D-tagatoza	+	-
mannitol	+	-	D-fucoza	-	-
sorbitol	+	-	L-fucoza	-	-
α -metyl-D-mannozit	-	-	D-arabitol	-	-
α -metyl-D-glucozit	-	-	L-arabitol	-	-
N-axetyl-glucosamin	+	$\pm$	gluconat	+	$\pm$
amygdalin	+	-	2-keto-gluconat	-	-
arbutin	+	-	5-keto-gluconat	-	+
esculin	+	+			

¹⁾ Suriasih K., Aryanta WR, MahardikaG, Astawa NM. Đặc tính vi sinh và hóa học của sữa lên men Kefir được làm từ sữa gia súc ở Bali. Tạp chí Quản lý chất lượng và khoa học thực phẩm 2012;6:112-22.

Bảng 3

Nguồn cacbon	Tên chủng		Nguồn cacbon	Tên chủng	
	<i>L. johnsonii</i> ²⁾	<i>L. johnsonii</i> CH32		<i>L. johnsonii</i> ²⁾	<i>L. johnsonii</i> CH32
glyxerol	-	-	salixin	-	-
erythritol	-	-	xenlobioza	+	-
D-arabinoza	-	-	mantoza	-	+
L-arabinoza	-	-	lactoza	-	+
D-riboza	-	-	melibioza	+	-
D-xyloza	-	-	saccaroza	+	+
L-xyloza	-	-	trehaloza	+	-
D-adonitol	-	-	inulin	-	-
metyl- β -D-xylopyranozit	-	-	melezitoza	-	-
D-galactoza	-	-	raffinoza	+	-
D-glucoza	-	+	Tinh bột	-	-
D-fructoza	-	+	Glycogen	-	-
D-mannoza	+	+	Xylitol	-	-
L-sorboza	-	-	gentiobioza	-	+
L-rhamnoza	-	-	D-turanoza	-	-
dulcitol	-	-	D-lyxoza	-	-
inositol	-	-	D-tagatoza	-	-
mannitol	-	-	D-fucoza	-	-
sorbitol	-	-	L-fucoza	-	-
α -metyl-D-mannozit	-	-	D-arabitol	-	-
α -metyl-D-glucozit	-	-	L-arabitol	-	-

N-axetyl-glucosamin	+	+	gluconat	-	-
amygdalin	-	-	2-keto-gluconat	-	-
arbutin	-	-	5-keto-gluconat	-	-
esculin	-	-			

²⁾ Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, Pittet AC, Zwahlen MC, Rouvet M, Altermann E, Barrangou R, Mollet B, Mercenier A, Klaenhammer T, Arigoni F, Schell MA. Trình tự hệ gen của lợi khuẩn đường ruột *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Feb 24;101(8):2512-7.

Bảng 4

Nguồn cacbon	Tên chủng		Nguồn cacbon	Tên chủng	
	<i>B. longum</i> ³⁾	<i>B. longum</i> CH57		<i>B. longum</i> ³⁾	<i>B. longum</i> CH57
glyxerol	±	-	salixin	±	-
erythritol	-	-	xenlobioza	±	±
D-arabinoza	-	-	mantoza	-	-
L-arabinoza	-	-	lactoza	-	-
D-riboza	±	-	melibioza	-	-
D-xyloza	-	-	saccaroza	+	±
L-xyloza	-	-	trehaloza	±	-
D-adonitol	-	-	inulin	-	-
metyl-β-D-xylopyranozit	-	-	melezitoza	-	-
D-galactoza	+	+	raffinoza	-	-
D-glucoza	+	+	Tinh bột	-	-
D-fructoza	+	+	Glycogen	-	-

D-mannoza	-	-	Xylitol	-	-
L-sorboza	-	-	gentiobioza	-	-
L-rhamnoza	-	-	D-turanoza	-	-
dulcitol	-	-	D-lyxoza	-	-
inositol	-	-	D-tagatoza	-	-
mannitol	+	-	D-fucoza	-	-
sorbitol	-	-	L-fucoza	-	-
α -metyl-D-mannozit	-	-	D-arabitol	-	-
α -metyl-D-glucosit	-	-	L-arabitol	-	-
N-axetyl-glucosamin	$\pm$	-	gluconat	$\pm$	-
amygdalin	-	-	2-keto-gluconat	-	-
arbutin	$\pm$	-	5-keto-gluconat	-	-
esculin	-	-			

³⁾ Lukacova D, Karovucova J, Greifova M, Greif G, Sovcikova A, Kohhajdova Z. Thí nghiệm *in vitro* một số đặc tính probiotic được chọn lọc của *Lactobacillus plantarum* và *Bifidobacterium longum*. Tạp chí Nghiên cứu dinh dưỡng và thực phẩm 2006; 45: 77-83.

(4) Thông tin về việc đăng ký các chủng vi khuẩn lactic

Các tác giả sáng chế đã đăng ký chủng *Lactobacillus brevis* CH23 với Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (địa chỉ: Tòa nhà Yurim, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc), một cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế, vào ngày 01 tháng 9 năm 2015 với mã số truy cập KCCM 11762P. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã đăng ký chủng *Lactobacillus johnsonii* CH32 với Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (địa chỉ: Tòa nhà Yurim, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc).

Quốc), một cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế, vào ngày 01 tháng 9 năm 2015 với mã số truy cập KCCM 11763P. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã đăng ký chủng *Bifidobacterium longum* CH57 với Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (địa chỉ: Tòa nhà Yurim, 45, Hongjengae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc), một cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế, vào ngày 01 tháng 9 năm 2015 với mã số truy cập KCCM 11764P.

2. Đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với việc làm giảm tổn thương ruột hoặc tính thấm qua ruột

Để đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ kim chi hoặc phân người trong việc làm giảm bớt sự hư hỏng ở ruột hoặc tính thấm qua ruột, các thông số về hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS), hoạt tính ức chế β -glucuronidaza (enzym gây hại đường ruột) và hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bịt của các chủng vi khuẩn lactic đã được đo.

(1) Phương pháp thí nghiệm

* Hoạt tính chống oxy hoá

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) được hòa tan trong etanol tới nồng độ 0,2 mM để tạo ra dung dịch DPPH. Huyền dịch các chủng vi khuẩn lactic (1×10^8 CFU/ml) hoặc dung dịch vitamin C (1 g/ml) được bổ sung vào 0,1 ml dung dịch DPPH và được nuôi cấy ở 37°C trong 20 phút. Sản phẩm nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút (rpm) trong 5 phút, và dịch nổi được thu lấy. Tiếp theo, độ hấp thụ của dịch nổi ở bước sóng 517 nm được đo, và hoạt tính chống oxy hoá của các chủng vi khuẩn lactic được tính toán.

* Hoạt tính ức chế sản xuất Lipopolysaccarit (LPS)

0,1 g phân người tươi được hòa thành hỗn dịch trong 0,9 ml dung dịch muối sinh lý vô trùng và được pha loãng 100 lần với môi trường vi sinh kỵ khí thông thường để thu được hỗn dịch phân. 0,1 ml hỗn dịch phân và 0,1 ml vi khuẩn lactic (1×10^4 hoặc 1×10^5 CFU) được thêm vào 9,8 ml môi trường vi sinh kỵ khí vô trùng (Công ty Dược phẩm Nissui, Nhật Bản) và được nuôi cấy kỵ khí trong 24 giờ. Tiếp theo, sản phẩm nuôi cấy

được nghiền bằng sóng siêu âm trong khoảng 1 giờ để phá vỡ màng tế bào bên ngoài của vi khuẩn, và ly tâm ở tốc độ 5000×g, và thu lấy dịch nổi. Tiếp đó, hàm lượng LPS (lipopolysaccarit) (là một loại nội độc tố) trong dịch nổi được đo bằng một kit định lượng LAL (phép thử dựa vào tính chất ly giải tế bào dạng amip trong máu con sam của lipopolysaccarit) (được sản xuất bởi Cape Cod Inc., Mỹ). Ngoài ra, để đánh giá hoạt tính ức chế sự tăng sinh của *E. coli* của các chủng vi khuẩn lactic, sản phẩm nuôi cấy thu được thông qua thí nghiệm tương tự như được mô tả ở trên được pha loãng 1000 lần và 100000 lần và được nuôi cấy trong môi trường DHL, sau đó đếm số lượng tế bào *E. coli*.

***Hoạt tính ức chế β -glucuronidaza**

0,1 ml dung dịch p-nitrophenyl- β -D-glucuronit 0,1 mM, 0,2 ml dung dịch muối đệm phosphat 50 mM và 0,1 ml hỗn dịch vi khuẩn lactic (được tạo ra bằng cách hòa thành hỗn dịch sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn lactic vào trong 5 ml dung dịch muối sinh lý) được đặt trong một bình phản ứng và chịu ảnh hưởng của enzym, và 0,5 ml dung dịch NaOH 0,1 mM đã được thêm vào để làm dừng phản ứng. Tiếp theo, dung dịch phản ứng được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút, và dịch nổi được thu lấy. Sau đó, độ hấp thụ của dịch nổi ở bước sóng 405 nm được đo.

*** Hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bọt**

Tế bào Caco2 được lấy từ Ngân hàng tế bào Hàn Quốc được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 trong 48 giờ, và sau đó các tế bào Caco2 đã nuôi cấy được chia vào mỗi giếng của đĩa nuôi cấy 12 giếng với mật độ 2×10^6 tế bào/giếng. Tiếp theo, mỗi giếng được xử lý với 1 μ g LPS (lipopolysaccarit) hoặc kết hợp 1 μ g LPS (lipopolysaccarit) và 1×10^3 CFU hỗn hợp vi khuẩn lactic, sau đó được ủ trong 24 giờ. Tiếp theo, thu lấy các tế bào được nuôi cấy từ mỗi giếng, và mức biểu hiện của protein liên kết vòng bọt ZO-1 trong tế bào được đo bằng phương pháp thấm miễn dịch.

(2) Kết quả thí nghiệm

Hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS), hoạt tính ức chế β -glucuronidaza và hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bọt của các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ kim chi hoặc phân người đã được đo và kết quả đo được trình bày trên bảng 5 và 6 dưới đây. Như được trình bày trên bảng 5 và 6

dưới đây, các chủng vi khuẩn *Lactobacillus curvatus* CH5, *Lactobacillus sakei* CH11, *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CH38 và *Bifidobacterium longum* CH57 có hoạt tính chống oxy hoá tốt, hoạt tính ức chế mạnh sự sản xuất lipopolysaccarit (LPS) và β - glucuronidaza, và cảm ứng mạnh sự biểu hiện của protein liên kết vòng bọt. Các chủng vi khuẩn lactic này có hiệu quả chống oxy hoá tốt, có hiệu quả tốt trong việc ức chế hoạt động enzyme của vi khuẩn gây bệnh đường ruột có liên quan đến chứng viêm và gây ung thư, ức chế sự sản sinh nội độc tố LPS (lipopolysaccarit) của hệ vi khuẩn gây bệnh đường ruột và cảm ứng sự biểu hiện của protein liên kết vòng bọt. Vì vậy, các chủng vi khuẩn lactic này có thể cải thiện các hội chứng liên quan tới trao đổi chất qua thành ruột.

Bảng 5

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta-glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH1	+	+	-	-
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH2	+	+	+	-
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH3	+	+	+	-
4	<i>Lactobacillus brevis</i> CH4	+	+	-	-
5	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH5	+++	+	+++	++
6	<i>Lactobacillus brevis</i> CH6	+	+	-	-
7	<i>Lactobacillus casei</i> CH7	+	+	-	-
8	<i>Lactobacillus planantrum</i> CH8	+	+	-	-
9	<i>Lactobacillus sakei</i> CH9	-	+	-	-

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
10	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH10	-	+	-	-
11	<i>Lactobacillus sakei</i> CH11	+++	+	+++	++
12	<i>Lactobacillus curvatus</i> CH12	-	+	-	+
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> CH13	-	+	-	-
14	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH14	-	+	-	-
15	<i>Lactobacillus fermentum</i> CH15	+++	+	++	-
16	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH16	+	+	-	-
17	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH17	+	+	-	-
18	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH18	+	+	-	-
19	<i>Lactobacillus helveticus</i> CH19	+	+	-	-
20	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH20	+	+	-	+
21	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH21	+	+	-	+
22	<i>Lactobacillus johnsonii</i> CH22	+	+	-	+
23	<i>Lactobacillus brevis</i> CH23	+++	+	++	++
24	<i>Lactobacillus paracasei</i> CH24	+	+	-	-

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
25	<i>Lactobacillus kim chi</i> CH25	+	+	-	-
26	<i>Lactobacillus gasseri</i> CH26	+	+	-	-
27	<i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> CH27	+	+	-	+
28	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH28	+	+	-	-
29	<i>Lactobacillus pentosus</i> CH29	+	+	-	-
30	<i>Lactobacillus reuteri</i> CH30	+	-	-	-

Bảng 6

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
31	<i>Lactobacillus sakei</i> CH31	-	+	-	+
32	<i>Lactobacillus</i> <i>johnsonii</i> CH32	+++	+	++	++
33	<i>Lactobacillus sakei</i> CH33	+	+	-	+
34	<i>Lactobacillus sakei</i> CH34	+	+	-	+
35	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> CH35	+	+	+	+
36	<i>Lactobacillus</i> <i>sanfranciscensis</i> CH36	+	+	+	+

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
37	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH37	-	+	-	+
38	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CH38	+++	+	++	++
39	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH39	-	+	-	+
40	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH40	-	+	+++	+
41	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CH41	+	+	-	+
42	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH42	+	+	-	-
43	<i>Bifidobacterium animalis</i> CH43	+	+	-	-
44	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH44	+	+	-	-
45	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CH45	+	+	-	-
46	<i>Bifidobacterium breve</i> CH46	+	-	-	-
47	<i>Bifidobacterium breve</i> CH47	+	+	-	+
48	<i>Bifidobacterium breve</i> CH48	+	+	-	+
49	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH49	+	+	-	++
50	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> CH50	-	+	-	-
51	<i>Bifidobacterium</i>	+	-	-	-

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
	<i>dentium</i> CH51				
52	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH52	-	+	-	-
53	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH53	-	+	-	-
54	<i>Bifidobacterium infantis</i> CH54	+	+	-	-
55	<i>Bifidobacterium longum</i> CH55	+	+	-	+
56	<i>Bifidobacterium longum</i> CH56	+++	+	++	+
57	<i>Bifidobacterium longum</i> CH57	+++	+	+++	++
58	<i>Bifidobacterium longum</i> CH58	+	+	+	+
59	<i>Bifidobacterium longum</i> CH59	+	+	+	+
60	<i>Bifidobacterium longum</i> CH60	+	-	+	+

* Nồng độ cuối của các chủng vi khuẩn lactic trong đánh giá hoạt tính chống oxy hoá: 1×10^4 CFU/ml; nồng độ của các chủng vi khuẩn lactic được cho vào để đo hoạt tính ức chế beta-glucuronidaza và hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS): 1×10^4 CFU/ml; nồng độ của các chủng vi khuẩn lactic trong đánh giá hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt: 1×10^4 CFU/ml.

* Các tiêu chuẩn trong đánh giá các hoạt tính khác nhau của các chủng vi khuẩn lactic: rất mạnh (+++; > 90%); mạnh (++; >60-90%); yếu (+; >20-60%); không hoặc ít hơn 20% (-; <20%).

3. Đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với việc làm giảm sự tổn thương gan

Dựa trên sự đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với việc làm giảm tổn thương ruột hoặc các hội chứng liên quan tới trao đổi chất qua thành ruột, bảy chủng vi khuẩn dưới đây đã được lựa chọn: *Lactobacillus curvatus* CH5, *Lactobacillus sakei* CH11, *Lactobacillus fermentum* CH15, *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32, *Bifidobacterium pseudocatemulatum* CH38, and *Bifidobacterium longum*. Hiệu quả của mỗi chủng được lựa chọn này hoặc của hỗn hợp các chủng được lựa chọn này trong việc làm giảm bớt tổn thương gan được đánh giá bằng việc sử dụng những động vật mô hình bị tổn thương gan khác nhau.

(1) Đánh giá hiệu quả làm giảm tổn thương gan của các chủng vi khuẩn lactic được thực hiện bằng cách sử dụng động vật mô hình bị tổn thương gan do D-galactosamin gây ra

(1) Phương pháp thí nghiệm

Chuột (C57BL/6, giống đực) được chia thành nhiều nhóm, mỗi nhóm gồm 6 cá thể. D-galactosamin được tiêm trong màng bụng cho các cá thể được thí nghiệm ở các nhóm với liều 800 mg/kg và một nhóm bình thường không tiêm để gây tổn thương gan. Sau 2 giờ tiêm D-galactosamin trong màng bụng, 1×10^9 CFU các chủng vi khuẩn lactic được tiêm cho các cá thể thí nghiệm của các nhóm thí nghiệm mỗi ngày một lần trong 3 ngày và nhóm bình thường không tổn thương gan và nhóm đối chứng âm không được tiêm khuẩn. Ngoài ra, các cá thể thí nghiệm của nhóm đối chứng dương được cho uống silymarin thay cho tiêm các chủng vi khuẩn lactic với liều lượng 100 mg/kg, mỗi ngày một lần trong 3 ngày. Sau 6 giờ sau khi dùng thuốc lần cuối, tiến hành lấy máu từ tim. Máu được lấy được để ở nhiệt độ phòng trong 60 phút, và ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 15 phút để tách huyết thanh. Mức GPT (glutamic pyruvat transaminaza) và mức GOT (glutamic oxalaxetic transaminaza) trong huyết thanh đã phân tách được đo bằng kit định lượng máu (kit đo ALT & AST, Công ty Dược phẩm Asan, Hàn Quốc).

Ngoài ra, mô gan được cắt từ các cá thể thí nghiệm, và lượng MDA trong mô gan được đo. Malondiandehyt là dấu hiệu của sự peroxy hóa lipid. Cụ thể, 0,5 g mô gan đã cắt được thêm vào 16 lần thể tích dung dịch RIPA (0,21M mannitol, 0,1M Na₂EDTA,

saccaroza 0,07M, Trizma base 0,01M), và sau đó được đồng nhất hóa bằng máy đồng hóa. Dung dịch đồng nhất được ly tâm ở tốc độ 3.000 rpm trong 10 phút, và huyền dịch mô gan đồng thể được thu lấy. 0,5 ml huyền dịch mô gan đồng thể được thêm vào 0,4 ml SDS 10%, được ủ ở 37°C trong 30 phút và được làm mát, và sau đó được thêm vào 3 ml dung dịch phosphat 1% và 1 ml 0,6% TBA và được gia nhiệt trong bể ủ nhiệt ở 100°C trong 45 phút để tạo thành dung dịch mẫu. 4 ml n-butanol được thêm và trộn với dung dịch mẫu được tạo thành, và sau đó được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút, và thu lấy phần dịch nổi. Độ hấp thụ của dịch nổi thu được được đo ở bước sóng 535 nm để định lượng MDA. Ngoài ra, đường chuẩn cho phép đo MDA được dựng bằng việc sử dụng 1,1,3,3-tetraethoxypropan.

2) Kết quả thí nghiệm

Fig.1 là biểu đồ minh họa sự thay đổi giá trị GOT khi vi khuẩn lactic được sử dụng cho các động vật mô hình bị tổn thương gan do D-galactosamin; Fig.2 là đồ thị thể hiện sự thay đổi giá trị GPT khi vi khuẩn lactic được sử dụng cho các động vật mô hình bị tổn thương gan do D-galactosamin; và Fig.3 là biểu đồ minh họa sự thay đổi giá trị MDA khi vi khuẩn lactic được sử dụng cho các động vật mô hình bị tổn thương gan do D-galactosamin.

Trên trục x của các Fig.1-3, "Nor" biểu thị cho nhóm bình thường; "Con" biểu thị cho nhóm đối chứng âm là nhóm gồm các cá thể động vật mô hình bị tổn thương gan do D-galactosamin không được sử dụng vi khuẩn lactic; "ch11" biểu thị nhóm được cho sử dụng *Lactobacillus sakei* CH11; "ch15" biểu thị nhóm được cho sử dụng *Lactobacillus fermentum* CH15; "ch23" biểu thị nhóm được cho sử dụng *Lactobacillus brevis* CH23; "ch32" biểu thị nhóm được cho sử dụng *Lactobacillus johnsonii* CH32; "ch38" biểu thị nhóm được cho sử dụng *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CH38; "ch57" biểu thị nhóm được cho sử dụng *Bifidobacterium longum* CH57; "ch57 + ch11" biểu thị nhóm được cho sử dụng hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus sakei* CH11 với cùng một lượng; "ch57 + ch23" biểu thị nhóm được cho sử dụng hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 với cùng một lượng; "ch57 + ch32" biểu thị nhóm được cho sử dụng hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus johnsonii* CH32 với cùng một

lượng; và "SM" biểu thị nhóm đối chứng dương được cho sử dụng silymarin thay cho vi khuẩn lactic.

Như được thể hiện trên các Fig.1-3, khi mỗi chủng *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32 và *Bifidobacterium longum* CH57 được sử dụng cho các động vật mô hình mà các giá trị GOT, GPT và MAD tăng lên do tổn thương gan thì sự tổn thương gan đã được giảm bớt. Cụ thể là, khi hỗn hợp vi khuẩn lactic gồm *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 hoặc hỗn hợp vi khuẩn lactic gồm *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus johnsonii* CH32 được sử dụng, sự tổn thương gan được làm giảm bớt một cách đáng kể. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn lactic cụ thể hoặc hỗn hợp các vi khuẩn lactic được chọn cho thấy hiệu quả làm giảm tổn thương gan tốt hơn silymarin - chất được sử dụng làm thuốc điều trị tổn thương gan. Các kết quả này cho thấy các chủng vi khuẩn lactic cụ thể hoặc hỗn hợp các vi khuẩn lactic được chọn có hiệu quả trong việc làm giảm chứng gan nhiễm mỡ do rượu hoặc chế độ ăn nhiều chất béo hoặc làm giảm các bệnh về gan do stress oxy hóa.

(2) Đánh giá hiệu quả làm giảm tổn thương gan của các chủng vi khuẩn lactic được thực hiện bằng cách sử dụng động vật mô hình bị tổn thương gan do tert-butylperoxit gây ra

1) Phương pháp thí nghiệm

Chuột (C57BL/6, giống đực) được chia thành nhiều nhóm, mỗi nhóm gồm 6 cá thể. Tert-butylperoxit được tiêm trong màng bụng cho các cá thể được thí nghiệm ở các nhóm với lượng 2,5 mmol/kg và một nhóm bình thường không tiêm để gây tổn thương gan. Sau 2 giờ tiêm tert-butylperoxit trong màng bụng, 1×10^9 CFU các chủng vi khuẩn lactic được tiêm cho các cá thể thí nghiệm của các nhóm thí nghiệm mỗi ngày một lần trong 3 ngày và nhóm bình thường không tổn thương gan và nhóm đối chứng âm không được tiêm khuẩn. Ngoài ra, các cá thể thí nghiệm của nhóm đối chứng dương được cho uống silymarin thay cho tiêm các chủng vi khuẩn lactic với liều lượng 100 mg/kg, mỗi ngày một lần trong 3 ngày. Sau 6 giờ sau khi dùng thuốc lần cuối, tiến hành lấy máu từ tim. Máu được lấy được để ở nhiệt độ phòng trong 60 phút, và ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 15 phút để tách huyết thanh. Mức GPT và mức GOT trong huyết thanh đã phân

tách được đo bằng kit định lượng máu (kit đo ALT & AST, Công ty Dược phẩm Asan, Hàn Quốc).

2) Kết quả thí nghiệm

Bảng 7 dưới đây thể hiện sự thay đổi trong giá trị GOT và GPT khi các chủng vi khuẩn lactic được sử dụng cho các động vật mô hình bị tổn thương gan do tert-butylperoxit. Như được trình bày trên bảng 7 dưới đây, *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32 và *Bifidobacterium longum* CH57 cho thấy hiệu quả tốt trong việc làm giảm tổn thương gan so với silymarin và hỗn hợp vi khuẩn lactic gồm *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 hoặc hỗn hợp vi khuẩn lactic gồm *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus johnsonii* CH32 cho thấy hiệu quả tốt hơn trong việc làm giảm tổn thương gan.

Bảng 7

Nhóm thí nghiệm	GOT (IU/L)	GPT(IU/L)
Nhóm bình thường	36,1	26,3
Nhóm đối chứng âm	84,1	96,1
Nhóm được sử dụng CH23	58,0	74,2
Nhóm được sử dụng CH32	53,0	70,5
Nhóm được sử dụng CH57	57,6	71,2
Nhóm được sử dụng CH57+CH23	48,6	64,3
Nhóm được sử dụng CH57+CH32	51,2	68,4
Nhóm được sử dụng silymarin	61,7	69,1

Trên bảng 7 ở trên, "CH23" biểu thị chủng *Lactobacillus brevis* CH23; "CH32" biểu thị chủng *Lactobacillus johnsonii* CH32; "CH57" biểu thị chủng *Bifidobacterium longum* CH57; "CH57 + CH23" biểu thị hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách

trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 với cùng một lượng; và "CH57 + CH32" biểu thị hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus johnsonii* CH32 với cùng một lượng.

4. Đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với việc làm giảm sự dị ứng

(1) Đánh giá việc ức chế sự thoát bọt của các chủng vi khuẩn lactic

Dòng tế bào RBL-2H3 (dòng tế bào mast của chuột, Ngân hàng tế bào Hàn Quốc, Cat. No.22256) được nuôi cấy trong môi trường DMEM (môi trường nuôi cấy Dulbeccos cải tiến, Sigma, 22256) chứa 10% FBS (huyết thanh thai bò) và L-glutamin trong tủ ẩm vi sinh được làm ẩm với nồng độ 5% CO₂ ở 37°C. Các tế bào chứa trong môi trường nuôi cấy được làm nổi lên bằng dung dịch trypsin-EDTA, và các tế bào nổi lên được phân lập, được thu thập và được sử dụng trong thí nghiệm. Các tế bào RBL-2H3 đã được thu thập được đưa vào đĩa 24 giếng với mật độ 5×10⁵ tế bào/giếng và được cảm ứng bằng cách ủ với 0,5 µg/ml kháng thể đơn dòng IgE của chuột trong 12 giờ. Các tế bào đã được cảm ứng được rửa sạch với 0,5 ml đệm siragani (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7,2) và sau đó được ủ với 0,16 ml dung dịch đệm Siracangan (bổ sung 5,6 mM glucoza, 1 mM CaCl₂, 0,1% BSA) ở 37°C trong 10 phút. Tiếp đó, các chủng vi khuẩn lactic với vai trò thuốc thí nghiệm đã được thêm vào môi trường chứa tế bào được nuôi cấy với nồng độ 1×10⁴ CFU/ml, hoặc 0,04 ml DSCG (natri cromoglycat) với vai trò thuốc đối chứng đã được bổ sung vào môi trường chứa tế bào được nuôi cấy và sau 20 phút, các tế bào được hoạt hóa với 0,02 ml kháng nguyên (1 µg/ml DNP-BSA) ở 37°C trong 10 phút. Tiếp theo, môi trường chứa tế bào được nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút, và dịch nổi được thu lấy. 0,025 ml dịch nổi thu được được đưa vào đĩa 96 giếng, sau đó 0,025 ml p-NAG 1mM (dung dịch p-nitrophenyl-N-axetyl-β-D-glucosamit trong đệm xitrat 0,1M, pH 4,5) được bổ sung vào, và sau đó hỗn hợp được để phản ứng ở 37°C trong 60 phút. Tiếp đó, phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 0,2 ml Na₂CO₃/NaHCO₃ 0,1M và đo sự hấp thụ ở bước sóng 405 nm bằng máy phân tích ELISA.

(2) Đánh giá tác dụng ức chế chứng ngứa của các chủng vi khuẩn lactic

Chuột BALB/c được chia thành nhiều nhóm, mỗi nhóm gồm 5 cá thể. Các chủng vi khuẩn lactic có mật độ 1×10^9 CFU với vai trò là thuốc thí nghiệm được cho uống mỗi ngày một lần trong 3 ngày với các cá thể của nhóm thí nghiệm và không cho uống với các cá thể nhóm bình thường và nhóm đối chứng, hoặc DSCG (natri cromoglycat) hoặc Azelastin với vai trò là thuốc đối chứng được cho uống mỗi ngày 1 lần trong 3 ngày với lượng 0,2 mg/cá thể chuột. Sau lần dùng thuốc cuối cùng 1 giờ, chuột được nuôi trong một chuồng quan sát (24 cm $\times$ 22 cm $\times$ 24 cm) trong 10 phút để thích nghi với môi trường, và sau đó tiến hành cạo phần sau đầu của chuột. Tiếp theo, các cá thể chuột của nhóm bình thường đã được tiêm dung dịch muối sinh lý, và các cá thể chuột của các nhóm thí nghiệm được tiêm một mũi gây ngứa (50 μ g hợp chất 48/80, Sigma, Mỹ) bằng kim 29-gauge.

Tiếp theo, mỗi con chuột ngay lập tức bị nhốt lại trong lồng quan sát, và diễn biến ngứa được quan sát bằng máy quay tự động 8-mm (SV-K80, Samsung) trong 1 giờ. Việc cào vùng bị tiêm bằng chân sau được xem là hành vi chỉ thị triệu chứng ngứa, và việc cào ở các vị trí khác không được xem xét.

(3) Đánh giá việc ức chế tính thấm mao mạch của các chủng vi khuẩn lactic

Biết rằng các vùng bị ngứa gây ra sự tăng tính thấm mao mạch. Vì vậy, thí nghiệm này được thực hiện để kiểm tra hiệu quả ức chế tính thấm mao mạch gây ra bởi các hợp chất khác nhau của các chủng vi khuẩn lactic. Đánh giá hoạt tính ức chế triệu chứng ngứa được thực hiện bằng phương pháp giống với thí nghiệm được mô tả ở trên, thuốc được sử dụng cho cùng một loài chuột. Tiếp theo, nước muối sinh lý được tiêm dưới da vào phần sau của đầu các cá thể chuột ở nhóm bình thường, và chất gây ngứa (50 μ g hợp chất 48/80, Sigma, Mỹ) được tiêm dưới da vào phần sau của đầu các cá thể chuột của nhóm thí nghiệm. Tiếp theo, 0,2 ml dung dịch Evans xanh 1% (Sigma, Mỹ) được tiêm vào tĩnh mạch đuôi và sau 1 giờ, những con chuột này bị giết chết. Phần da của vùng tiêm dưới da được cắt miếng, và ủ trong 1 ml KOH 1N ở 37°C qua đêm. Ngày tiếp theo, các mô da đã ủ được trộn với 4 ml hỗn hợp axit phosphoric-axeton 0,6N (5:13) và ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 15 phút, và dịch nổi được thu và được đo độ hấp thụ ở bước sóng 620 nm. Tỷ lệ ức chế (%) tính thấm mao mạch được tính bằng phương trình sau:

Tỷ lệ ức chế (%) = $\{1 - [\text{Độ hấp thụ của vùng được xử lý với thuốc và chất gây ngứa} - \text{độ hấp thụ của vùng không được xử lý với chất gây ngứa}] / [\text{độ hấp thụ của vùng được xử lý với chất gây ngứa} - \text{độ hấp thụ của vùng không được xử lý với chất gây ngứa}]\} \times 100$

(4) Kết quả thí nghiệm

Bảng 8 dưới đây thể hiện kết quả đo tỷ lệ ức chế sự thoát bọt, tỷ lệ ức chế triệu chứng ngứa và tỷ lệ ức chế tính thấm mao mạch của các chủng vi khuẩn lactic. Trên bảng 8 dưới đây, "CH5" biểu thị chủng *Lactobacillus curvatus* CH5; "CH11" biểu thị chủng *Lactobacillus sakei* CH11; "CH15" biểu thị chủng *Lactobacillus fermentum* CH15; "CH23" biểu thị chủng *Lactobacillus brevis* CH23; "CH32" biểu thị chủng *Lactobacillus johnsonii* CH32; "CH38" biểu thị chủng *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CH38; "CH57" biểu thị chủng *Bifidobacterium longum* CH57; "CH57 + CH11" biểu thị hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus sakei* CH11 với cùng một lượng; "CH57 + CH23" biểu thị hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 với cùng một lượng; và "CH57 + CH32" biểu thị hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus johnsonii* CH32 với cùng một lượng.

Như được trình bày trên bảng 8 dưới đây, các chủng *Lactobacillus curvatus* CH5, *Lactobacillus brevis* CH23, *Lactobacillus johnsonii* CH32 và *Bifidobacterium longum* CH57 đã ức chế một cách hiệu quả sự thoát bọt của các bạch cầu ái kiềm, và *Bifidobacterium longum* CH57 ức chế mạnh mẽ triệu chứng ngứa và tính thấm mao mạch. Ngoài ra, khi so sánh với các chủng vi khuẩn lactic đơn lẻ, thì hỗn hợp của các vi khuẩn lactic, cụ thể là hỗn hợp của *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 hoặc hỗn hợp của *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus johnsonii* CH32 cho thấy tỷ lệ ức chế sự thoát bọt, tỷ lệ ức chế triệu chứng ngứa và tỷ lệ ức chế tính thấm mao mạch cao hơn. Vì vậy, có thể thấy rằng các chủng vi khuẩn lactic này hoặc hỗn hợp của nó có thể làm giảm rất hiệu quả các bệnh liên quan tới dị ứng, bệnh hen, viêm họng, viêm da mẩn tính hoặc các bệnh tương tự.

Bảng 8

Thuốc	Tỷ lệ ức chế (%)		
	Sự thoát bọt	Ngứa	Tính thấm mao mạch
không	0	2	1
CH5	53	46	45
CH11	47	46	45
CH15	48	42	42
CH23	54	47	47
CH32	52	45	46
CH38	44	45	42
CH57	55	55	52
CH57 + CH11	59	56	54
CH57 + CH23	63	62	61
CH57 + CH32	61	58	56
DSCG (natri cromoglycat)	62	25	37
Azelastin	-	65	68

5. Đánh giá *in vitro* về hiệu quả chống viêm và hiệu quả ức chế tính thấm qua ruột của các chủng vi khuẩn lactic

(1) Phân lập tế bào tua và đánh giá dấu hiệu gây viêm

Các tế bào miễn dịch được phân lập từ tủy xương của chuột C57BL/6 (đực, nặng 20-23g) bằng cách sử dụng RPMI 1640 (chứa 10% FBS, 1% kháng sinh, 1% glutamax, 0,1% mercaptoetanol). Các tế bào được phân lập được xử lý với dung dịch ly giải RBC, được rửa sạch, được tra vào mỗi giếng của đĩa 24 giếng, được xử lý với GM-CSF và IL-4 với tỷ lệ 1: 1000, và được nuôi cấy. Trong 5 ngày nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển sang môi trường mới, và trong 8 ngày, các tế bào đã được thu thập và được sử dụng ở dạng tế bào tua. Tiếp theo, các tế bào tua được tra trên đĩa 24 giếng với mật độ $0,5 \times 10^6$ tế bào/giếng và được xử lý với các chủng vi khuẩn lactic (chất thí nghiệm) và chất gây viêm LPS (lipopolysaccarit) trong 2 giờ hoặc 24 giờ, và sau đó dịch nổi và các tế bào

được thu thập. Sử dụng dịch nổi thu được để đo mức độ biểu hiện của IL-10 và IL-12 bằng phương pháp thấm miễn dịch.

Fig.4 là biểu đồ minh họa hiệu quả của các chủng vi khuẩn axit lactic được chọn lọc của sáng chế đối với lipopolysaccarit (LPS) - chất gây phản ứng viêm của các tế bào tua. Biểu đồ bên trái Fig.4 thể hiện hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với tế bào không được xử lý với LPS (lipopolysaccarit), và biểu đồ bên phải thể hiện hiệu quả của vi khuẩn lactic đối với các tế bào được xử lý với LPS (lipopolysaccarit). Ngoài ra, trên trục x trên Fig.4, "Nor" biểu thị cho nhóm không được xử lý với các chủng vi khuẩn lactic thí nghiệm và chất gây viêm LPS (lipopolysaccarit); "LPS" biểu thị cho nhóm được xử lý với chất gây viêm LPS (lipopolysaccarit); "ch11" biểu thị nhóm được xử lý với *Lactobacillus sakei* CH11; "ch15" biểu thị nhóm được xử lý với *Lactobacillus fermentum* CH15; "ch23" biểu thị nhóm được xử lý với *Lactobacillus brevis* CH23; "ch32" biểu thị nhóm được xử lý với *Lactobacillus johnsonii* CH32; "ch38" biểu thị nhóm được xử lý với *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CH38; "ch57" biểu thị nhóm được xử lý với *Bifidobacterium longum* CH57; "ch57 + ch11" biểu thị nhóm được xử lý với hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus sakei* CH11 với cùng một lượng; "ch57 + ch23" biểu thị nhóm được xử lý với hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 với cùng một lượng; và "ch57 + ch32" biểu thị nhóm được xử lý với hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus johnsonii* CH32 với cùng một lượng.

Như được thể hiện trên Fig.4, các chủng *Lactobacillus sakei* CH11, *Lactobacillus brevis* CH23 và *Lactobacillus johnsonii* CH32 cảm ứng kích thích sản xuất IL-10 của tế bào tua thu được bởi quá trình biệt hóa sau khi được phân lập từ tủy xương, và ức chế một cách hiệu quả LPS (lipopolysaccarit) - chất cảm ứng sinh IL-12, và hiệu quả cũng được tăng lên khi được sử dụng phối hợp với *Bifidobacterium longum* CH57. Cụ thể là, hỗn hợp *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 có hiệu quả tốt nhất đến việc ức chế sự viêm. Khi tế bào tua được kiểm soát, thì các tế bào Treg (các tế bào T điều hòa) có thể được kiểm soát hiệu quả. Vì lý do này, các chủng vi khuẩn lactic được sàng lọc theo sáng chế làm giảm một cách hiệu quả các bệnh viêm mãn tính như viêm đại tràng, các bệnh tự miễn như viêm khớp dạng thấp, và các bệnh tương tự.

(2) Phân lập các đại thực bào và đánh giá dấu hiệu gây viêm

Các con chuột đực 6 tuần tuổi C57BL/6J (nặng 20-23g) được mua từ Công ty TNHH RaonBio. 2 ml dung dịch thioglycolat vô trùng 4% được tiêm vào khoang bụng của mỗi con chuột, và sau 96 giờ, chuột được gây mê, và 8 ml môi trường RPMI 1640 được đưa vào khoang bụng của mỗi cá thể chuột. Sau 5 đến 10 phút, môi trường RPMI (có chứa các đại thực bào) trong khoang bụng của chuột được lấy ra, ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 10 phút, và sau đó được rửa hai lần với môi trường RPMI 1640. Các đại thực bào được tra trên đĩa 24 giếng với mật độ $0,5 \times 10^6$ tế bào/giếng và được xử lý với các chủng vi khuẩn lactic thí nghiệm và chất gây viêm LPS (lipopolysaccarit) trong 2 giờ hoặc 24 giờ, và sau đó dịch nổi và các tế bào được thu thập. Các tế bào được thu thập được hòa đồng thể trong dung dịch đệm (Gibco). Sử dụng dịch nổi thu được để đo mức độ biểu hiện của các xytokin như TNF- α và IL-1 β bằng kit ELISA. Ngoài ra, sử dụng các tế bào thu được để đo mức biểu hiện p65 (NF-kappa B), p-p65 (phospho-NF-kappa B) và β -actin được đo bằng phương pháp thấm miễn dịch. Cụ thể, 50 μ g dịch nổi được thu và điện di trên gel polyacrylamit SDS 10% (w/v) trong 1 giờ 30 phút. Mẫu sau điện di được chuyển lên màng nitroxenluloza ở 100 V và 400 mA trong 1 giờ 10 phút. Màng nitroxenluloza đã lai mẫu được xử lý với sữa gầy 5% trong 30 phút, và sau đó được rửa 3 lần với PBS-Tween, 5 phút mỗi lần và được ủ với dung dịch pha loãng 1:100 của kháng thể sơ cấp (Santa Cruz Biotechnology, Mỹ) qua đêm. Tiếp theo, màng được rửa 3 lần, 10 phút mỗi lần và ủ với dung dịch pha loãng 1: 1000 của kháng thể thứ cấp (Santa Cruz Biotechnology, Mỹ) trong 1 giờ 20 phút. Tiếp theo, màng được rửa ba lần, 15 phút mỗi lần, và được gắn với chất huỳnh quang và được hiển thị.

Fig.5 là biểu đồ minh họa hiệu quả của chủng vi khuẩn *Bifidobacterium longum* CH57 đối với LPS (lipopolysaccarit) - chất cảm ứng gây ra phản ứng viêm của đại thực bào. Như được thể hiện trên Fig.5, *Bifidobacterium longum* CH57 ức chế hiệu quả chất gây đáp ứng viêm LPS (lipopolysaccarit).

(3) Phân lập các tế bào T từ lá lách và đánh giá sự biệt hóa của tế bào T thành tế bào Th17 hoặc tế bào Treg (tế bào T điều hòa)

Lá lách được lấy ra từ chuột C56BL/6J, được nghiền thích hợp, và được hòa thành hỗn dịch trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FCS và các tế bào T CD4 được phân

lập bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào T CD4 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức). Các tế bào T CD4 được phân lập được tra vào đĩa 12 giếng với mật độ 5×10^5 tế bào/giếng và bổ sung vào kháng thể anti-CD3 ($1 \mu\text{g/ml}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức) và kháng thể anti-CD28 ($1 \mu\text{g/ml}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức), hoặc bổ sung kháng thể anti-CD3 ($1 \mu\text{g/ml}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức), kháng thể anti-CD28 ($1 \mu\text{g/ml}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức), kháng thể tái tổ hợp IL -6 (20 ng/ml , MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức) và nhân tố tăng trưởng chuyển hóa beta tái tổ hợp (1 ng/ml , MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức). Trong khi nuôi cấy các tế bào T, tiến hành bổ sung 1×10^3 hoặc 1×10^5 CFU các chủng vi khuẩn lactic vào môi trường nuôi cấy, và các tế bào này được nuôi cấy trong 4 ngày. Tiếp theo, các tế bào của sản phẩm nuôi cấy được nhuộm với kháng thể anti-FoxP3 hoặc anti-IL-17A, và sự phân bố của các tế bào Th17 và Treg được phân tích bằng hệ thống FACS (sàng lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang) (C6 Flow Cytometer® System, San Jose, CA, Mỹ).

Fig.6 thể hiện các kết quả phân tích ảnh hưởng của *Lactobacillus brevis* CH23 đối với sự biệt hóa của tế bào T (được phân lập từ lá lách) thành các tế bào Th17 hoặc các tế bào Treg bằng hệ thống sàng lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang. Như được thể hiện trên Fig.6, *Lactobacillus brevis* CH23 ức chế sự biệt hóa của tế bào T thành tế bào Th17 (tế bào T trợ giúp 17) và thúc đẩy sự biệt của tế bào T thành tế bào Treg. Những kết quả này cho thấy chủng *Lactobacillus brevis* CH23 có thể làm giảm bớt một cách hiệu quả các bệnh viêm như viêm đại tràng và viêm khớp.

(4) Đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với sự biểu hiện protein ZO-1 của các tế bào Caco2

Tế bào Caco2 được lấy từ Ngân hàng tế bào Hàn Quốc được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 trong 48 giờ, và sau đó các tế bào Caco2 đã nuôi cấy được tra vào đĩa nuôi cấy 12 giếng với mật độ 2×10^6 tế bào/giếng. Tiếp theo, mỗi giếng được xử lý với $1 \mu\text{g}$ LPS (lipopolysaccarit) đơn lẻ hoặc kết hợp $1 \mu\text{g}$ LPS (lipopolysaccarit) và 1×10^3 CFU hoặc 1×10^5 CFU hỗn hợp vi khuẩn lactic, sau đó được ủ trong 24 giờ. Tiếp theo, thu lấy các tế bào được nuôi cấy từ mỗi giếng, và mức biểu hiện của protein liên kết vòng bịt ZO-1 được đo bằng phương pháp thẩm miễn dịch.

Fig.7 thể hiện kết quả phân tích ảnh hưởng của *Lactobacillus brevis* CH23, *Bifidobacterium longum* CH57 hoặc hỗn hợp của nó đến sự biểu hiện của protein ZO-1 của tế bào Caco2. Trên Fig.7, "CH23" biểu thị cho *Lactobacillus brevis* CH23; "CH57" biểu thị cho *Bifidobacterium longum* CH57; "mix" biểu thị cho hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus johnsonii* CH32 với cùng một lượng. Như được thể hiện trên Fig.7, việc xử lý với *Lactobacillus brevis* CH23 và *Bifidobacterium longum* CH57 đã làm tăng sự biểu hiện của protein liên kết vòng bịt ZO-1, và việc xử lý với hỗn hợp *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus johnsonii* CH32 làm tăng cường sự biểu hiện của protein liên kết vòng bịt ZO-1. Khi sự biểu hiện của protein liên kết vòng bịt tăng lên, sự xâm nhập của các chất độc bị khống chế, qua đó ngăn ngừa chứng viêm đại tràng, viêm khớp hoặc tổn thương gan.

6. Đánh giá *in vivo* về hiệu quả chống viêm và hiệu quả làm giảm bớt chứng viêm đại tràng của các chủng vi khuẩn lactic

(1) Động vật thí nghiệm

Chuột đực C57BL/6 5 tuần tuổi (nặng 24-27g) được mua từ OrientBio và được nuôi trong điều kiện môi trường được kiểm soát (độ ẩm: $50 \pm 10\%$, nhiệt độ: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, chu kỳ sáng tối 12 giờ/12 giờ) và sau đó được sử dụng trong thí nghiệm. Các loại thức ăn chăn nuôi thí nghiệm tiêu chuẩn (Samyang, Hàn Quốc) để sử dụng làm thức ăn và các động vật mô hình được uống nước tùy thích. Trong tất cả các thí nghiệm, một nhóm bao gồm 6 cá thể.

(2) Gây viêm đại tràng bằng TNBS và cho sử dụng mẫu

Một nhóm động vật thí nghiệm được sử dụng như một nhóm bình thường, và các cá thể động vật thí nghiệm của các nhóm khác được xử lý với TNBS để gây viêm đại tràng cấp tính. Cụ thể, các động vật thí nghiệm được gây mê nhẹ bằng ete, và sau đó một dung dịch hỗn hợp chứa 2,5 g TNBS trong 100 ml 50% etanol được tiêm vào đại tràng thông qua hậu môn với lượng 0,1 ml mỗi lần bằng cách sử dụng ống tiêm 1 ml, và con chuột được dựng thẳng lên và duy trì trong 30 giây, qua đó gây viêm. Mặt khác, nhóm bình thường được cho uống 0,1 ml dung dịch muối. Vào ngày hôm sau, các chủng vi khuẩn lactic hoặc hỗn hợp vi khuẩn lactic dưới dạng mẫu thí nghiệm được hòa thành hỗn

dịch với dung dịch muối và cho mỗi con chuột uống với lượng là $2,0 \times 10^9$ CFU. Vào ngày sau khi kết thúc quá trình điều trị, các con chuột bị giết chết bằng cacbon dioxit, và một phần ruột từ manh tràng đến vị trí ngay trước hậu môn được cắt và sử dụng. Trong khi đó, các động vật thí nghiệm của nhóm bình thường được cho uống dung dịch muối thay cho các chủng vi khuẩn lactic. Thêm vào đó, các động vật thí nghiệm của nhóm đối chứng âm được cho uống dung dịch muối thay cho các chủng vi khuẩn lactic sau khi bị viêm đại tràng do TNBS. Hơn nữa, các động vật thí nghiệm của nhóm đối chứng dương được cho sử dụng 50 mg/kg sulfasalazin, một loại thuốc điều trị viêm đại tràng, thay cho vi khuẩn lactic.

(3) Phân tích đại tràng bằng mắt thường

Chiều dài và hình dáng của phần đại tràng được cắt ra được quan sát, và hình dáng được phân tích bằng cách ghi điểm theo các tiêu chí (Hollenbach và cộng sự, 2005, tiêu chuẩn về cấp độ viêm đại tràng) được trình bày trên bảng 9 dưới đây. Sau khi loại bỏ hoàn toàn các chất bên trong đại tràng, mô đại tràng được rửa bằng dung dịch muối. Một phần của mô đại tràng sạch được đặt trong dung dịch formandehit 4% để sử dụng nó như một mẫu mô bệnh và phần còn lại được sử dụng để phân tích sinh học phân tử trong điều kiện bảo quản đông lạnh ở -80°C .

Bảng 9

Điểm số quan sát	Tiêu chí
0	Bất kỳ vết loét và viêm nào đều được nhận thấy.
1	Có sự xung huyết nhưng không nhận thấy sự chảy máu.
2	Sự viêm loét có kèm sự xung huyết được nhận thấy.
3	Sự viêm được nhận thấy ở một vị trí.
4	Sự loét và viêm được nhận thấy ở hai hoặc nhiều vị trí.
5	Vết loét có kích thước tăng lên trên 2 cm.

(4) Đánh giá hoạt độ của myeloperoxidaza

100 mg mô đại tràng được hòa đồng thể trong 200 μ l đệm kali phosphat 10 mM (pH 7,0) có chứa 0,5% hexadecyl trimetyl amoni bromua. Mô đồng thể được ly tâm với tốc độ 10.000 g ở 4°C trong 10 phút, và dịch nổi được thu lấy. 50 μ l dịch nổi được thêm vào 0,95 ml dung dịch phản ứng (chứa 1,6mM tetrametyl benzidin và 0,1mM H₂O₂) và phản ứng xảy ra ở 37°C, và đo sự hấp thụ ở bước sóng 650 nm tại các thời điểm khác nhau trong suốt thời gian phản ứng. Để tính toán hoạt độ của myeloperoxidaza, 1 μ mol/ml peroxit tạo ra bởi phản ứng này được sử dụng làm 1 đơn vị.

(5) Đánh giá dấu hiệu viêm

Sử dụng phương pháp Western blott, các dấu hiệu viêm như p-p65, p65, iNOS, COX-2 và β -actin được đo. Cụ thể, dịch nổi được thu theo như thí nghiệm đo hoạt độ của myeloperoxidaza. 50 μ g dịch nổi được thu và điện di trên gel polyacrylamit SDS 10% (w/v) trong 1 giờ 30 phút. Mẫu sau điện di được chuyển lên màng nitroxenluloza ở 100 V và 400 mA trong 1 giờ 10 phút. Màng nitroxenluloza đã lai mẫu được xử lý với sữa gầy 5% trong 30 phút, và sau đó được rửa 3 lần với PBS-Tween, 5 phút mỗi lần và được ủ với dung dịch pha loãng 1:100 của kháng thể sơ cấp (Santa Cruz Biotechnology, Mỹ) qua đêm. Tiếp theo, màng được rửa 3 lần, 10 phút mỗi lần và ủ với dung dịch pha loãng 1: 1000 của kháng thể thứ cấp (Santa Cruz Biotechnology, Mỹ) trong 1 giờ 20 phút. Tiếp theo, màng được rửa ba lần, 15 phút mỗi lần, và được gắn với chất huỳnh quang và được hiển thị.

Ngoài ra, các xytokin liên quan đến sự viêm như TNF- α , IL-1 β và các chất tương tự được đo bằng kit ELISA.

(6) Kết quả thí nghiệm

Fig.8 thể hiện hình dáng của đại tràng hoặc hoạt độ của myeloperoxidaza cho biết hiệu quả của *Bifidobacterium longum* CH57 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra; Fig.9 là hình ảnh mô học của đại tràng, cho thấy hiệu quả của *Bifidobacterium longum* CH57 đối với những động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra; và Fig.10 thể hiện các mức độ xytokin liên quan đến sự viêm cho thấy hiệu quả của *Bifidobacterium longum* CH57 đối với những động vật bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra. Trên các Fig.8-10, "NOR" biểu thị cho nhóm bình thường; "TNBS" biểu thị cho nhóm đối chứng âm; "CH57" biểu thị cho nhóm được cho

sử dụng *Bifidobacterium longum* CH57; và "SS50" biểu thị cho nhóm được cho sử dụng sulfasalazin. Như được thể hiện trên các Fig.8-10, *Bifidobacterium longum* CH57 làm giảm viêm đại tràng hiệu quả vì xem xét trọng lượng của các động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra, các dấu hiệu viêm đại tràng, độ dài đại tràng, hoạt độ của myeloperoxidaza và các chất tương tự, và cho thấy hiệu quả trong việc làm giảm viêm đại tràng tốt hơn so với sulfasalazin. Ngoài ra, *Bifidobacterium longum* CH57 ức chế sự sản sinh xytokin gây viêm và làm tăng sản xuất xytokin kháng viêm IL-10 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra.

Fig.11 thể hiện hình dáng của đại tràng hoặc hoạt độ của myeloperoxidaza cho biết hiệu quả của *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra; Fig.12 là hình ảnh mô học của đại tràng, cho thấy hiệu quả của *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra; Fig.13 thể hiện các dạng biệt hóa của tế bào T cho thấy hiệu quả của *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra; và Fig.14 thể hiện các mức độ xytokin liên quan đến sự viêm cho thấy hiệu quả của *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra. Trên các Fig.11-14, "N" biểu thị cho nhóm bình thường; "TNBS" biểu thị cho nhóm đối chứng âm; "CH23" biểu thị cho nhóm được cho sử dụng *Lactobacillus brevis* CH23; và "SS" biểu thị cho nhóm được cho sử dụng sulfasalazin. Như được thể hiện trên các Fig.11-14, *Lactobacillus brevis* CH23 làm giảm viêm đại tràng hiệu quả vì xem xét trọng lượng của các động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra, các dấu hiệu viêm đại tràng, độ dài đại tràng, hoạt độ của myeloperoxidaza và các chất tương tự, và cho thấy hiệu quả trong việc làm giảm viêm đại tràng tốt hơn so với sulfasalazin. Ngoài ra, *Lactobacillus brevis* CH23 ức chế sự biệt hóa của tế bào T thành các tế bào Th17 và cảm ứng cho sự biệt hóa của tế bào T thành tế bào Treg trong những động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra. Hơn nữa, *Lactobacillus brevis* CH23 ức chế sự sản sinh xytokin gây viêm và làm tăng sản xuất xytokin kháng viêm IL-10 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra.

Fig.15 thể hiện hình dáng của đại tràng hoặc hoạt độ của myeloperoxidaza cho biết hiệu quả của hỗn hợp *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra; Fig.16 là hình ảnh mô

học của đại tràng, cho thấy hiệu quả của hỗn hợp *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra; và Fig.17 thể hiện các mức độ xytokin liên quan đến sự viêm cho thấy hiệu quả của hỗn hợp *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra. Trên các Fig.15-17, "NOR" biểu thị cho nhóm bình thường; "TNBS" biểu thị cho nhóm đối chứng âm; "BL" biểu thị cho nhóm được cho sử dụng hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 với cùng một lượng; và "SS50" biểu thị cho nhóm được cho sử dụng sulfasalazin. Như được thể hiện trên các Fig.15-17, hỗn hợp vi khuẩn lactic của *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 cải thiện đáng kể hiệu quả chống lại sự suy giảm trọng lượng của những động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra, chống lại sự gia tăng mức độ của dấu hiệu viêm đại tràng, sự ngăn lại của chiều dài ruột già và chống lại sự tăng hoạt độ của myeloperoxidaza, và hiệu quả của hỗn hợp đối với việc làm giảm viêm đại tràng tốt hơn đáng kể so với sulfasalazin. Ngoài ra, hỗn hợp vi khuẩn lactic *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 ức chế sự sản sinh xytokin gây viêm và làm tăng mạnh mẽ sự sản xuất xytokin kháng viêm IL-10 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra.

7. Đánh giá *in vivo* về hiệu quả chống viêm và làm giảm bớt chứng béo phì của các chủng vi khuẩn lactic

(1) Phương pháp thí nghiệm

Tổng cộng 24 con chuột C57BL6/J được mua từ Công ty TNHH RaonBio và được thích nghi với chế độ ăn chứa dưỡng chất cần thiết (Purina) trong điều kiện nhiệt độ $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $50 \pm 10\%$ và chu kỳ 12 giờ sáng/12 giờ tối trong 1 tuần. Tiếp theo, động vật thí nghiệm được chia thành 3 nhóm (LFD, HFD, và HFD + BL), mỗi nhóm gồm 8 cá thể, nhóm LFD được cho ăn với chế độ ăn bình thường (LFD, 10% calo từ chất béo, Research, NJ, Mỹ) trong 4 tuần, và nhóm HFD và nhóm HFD + BL được cho ăn thức ăn giàu chất béo (HFD, 60% calo từ chất béo, Research, NJ, Mỹ) trong 4 tuần. Tiếp theo, nhóm LFD được cho uống PBS trong khi được cho ăn với chế độ ăn bình thường trong 4 tuần. Tiếp theo, nhóm HFD được cho uống PBS trong khi được cho ăn với chế độ ăn nhiều chất béo trong 4 tuần. Ngoài ra, nhóm HFD + BL được cho uống cùng với

PBS hỗn dịch 2×10^9 CFU của hỗn hợp vi khuẩn lactic trong khi ăn với chế độ ăn giàu chất béo trong 4 tuần. Hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 với cùng một lượng.

(2) Phân tích hiệu quả chống béo phì và hiệu quả chống viêm của hỗn hợp vi khuẩn lactic

Hiệu quả chống béo phì của hỗn hợp vi khuẩn lactic được phân tích thông qua sự thay đổi trọng lượng của những động vật thí nghiệm. Ngoài ra, hiệu quả chống viêm của hỗn hợp vi khuẩn lactic được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong thí nghiệm trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra.

(3) Kết quả thí nghiệm

Fig.18 thể hiện sự thay đổi trọng lượng cho thấy hiệu quả của hỗn hợp *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp do TNBS gây ra; Fig.19 thể hiện hình dáng của đại tràng, hoạt độ của myeloperoxidaza, hình ảnh mô học của đại tràng, và tương tự, cho thấy hiệu quả của hỗn hợp *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình mắc chứng béo phì; Fig.20 thể hiện mức độ xytokin liên quan đến sự viêm cho thấy hiệu quả của hỗn hợp của *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 đối với động vật mô hình mắc chứng béo phì; và Fig.21 thể hiện các dấu hiệu của phản ứng viêm cho thấy hiệu quả của hỗn hợp của *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 trên động vật mô hình mắc chứng béo phì. Như được thể hiện trên các Fig.18-21, hỗn hợp vi khuẩn lactic *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 làm giảm đáng kể sự tăng trọng lượng, sự tăng mức độ viêm đại tràng và sự tăng hoạt độ của myeloperoxidaza trên động vật mô hình bị béo phì gây ra bởi chế độ ăn nhiều chất béo và ức chế sự phát triển của viêm đại tràng. Ngoài ra, hỗn hợp vi khuẩn lactic *Bifidobacterium longum* CH57 và *Lactobacillus brevis* CH23 ức chế sự sản sinh xytokin gây viêm và làm tăng sự sản xuất xytokin kháng viêm IL-10 trên động vật mô hình bị béo phì do chế độ ăn nhiều chất béo gây ra.

II. Thí nghiệm thứ hai để sàng lọc vi khuẩn lactic và đánh giá các hiệu quả của nó

1. Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn lactic

(1) Phân lập các chủng vi khuẩn lactic từ kim chi

Kim chi cải bắp Trung Quốc, kim chi củ cải và kim chi hành tây được ép, và dịch ép được hòa thành hỗn dịch trong môi trường MRS lỏng (MRS Broth, Difco, Mỹ). Tiếp theo, phần dịch nổi được thu lấy, được chuyển sang môi trường MRS thạch (Difco, USA), và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong khoảng 48 giờ, và sau đó các chủng *Bifidobacterium longum* mà hình thành các khuẩn lạc được phân lập dựa theo hình dạng của nó.

(3) Định danh các chủng vi khuẩn lactic được sàng lọc

Các đặc tính nhuộm gram, đặc tính sinh lý và trình tự 16S rADN của các chủng được phân lập từ kim chi hoặc phân người đã được phân tích để định danh loài của các chủng, và đưa ra tên cho các chủng. Bảng 10 dưới đây thể hiện các số tham chiếu và tên chủng của các vi khuẩn lactic được phân lập từ kim chi cải bắp Trung Quốc, kim chi củ cải và kim chi hành lá, và Bảng 11 dưới đây thể hiện các số tham chiếu và tên chủng của các vi khuẩn lactic được phân lập từ phân người.

Bảng 10

Số tham chiếu	Tên chủng	Số tham chiếu	Tên chủng
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC1	26	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC26
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC2	27	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC27
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC3	28	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC28
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC4	29	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC29
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC5	30	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC30
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC6	31	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC31
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC7	32	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Số tham chiếu	Tên chủng	Số tham chiếu	Tên chủng
			LC32
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC8	33	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC33
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC9	34	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC34
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC10	35	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC35
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC11	36	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC36
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC12	37	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC37
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC13	38	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC38
14	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC14	39	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC39
15	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC15	40	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC40
16	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC16	41	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC41
17	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC17	42	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC42
18	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC18	43	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC43
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC19	44	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC44
20	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC20	45	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC45
21	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC21	46	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC46
22	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC22	47	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC47

Số tham chiếu	Tên chủng	Số tham chiếu	Tên chủng
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC23	48	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC48
24	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC24	49	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC49
25	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC25	50	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC50

Bảng 11

Số tham chiếu	Tên chủng	Số tham chiếu	Tên chủng
51	<i>Bifidobacterium longum</i> LC51	76	<i>Bifidobacterium longum</i> LC76
52	<i>Bifidobacterium longum</i> LC52	77	<i>Bifidobacterium longum</i> LC77
53	<i>Bifidobacterium longum</i> LC53	78	<i>Bifidobacterium longum</i> LC78
54	<i>Bifidobacterium longum</i> LC54	79	<i>Bifidobacterium longum</i> LC79
55	<i>Bifidobacterium longum</i> LC55	80	<i>Bifidobacterium longum</i> CH80
56	<i>Bifidobacterium longum</i> LC56	81	<i>Bifidobacterium longum</i> LC81
57	<i>Bifidobacterium longum</i> LC57	82	<i>Bifidobacterium longum</i> LC82
58	<i>Bifidobacterium longum</i> LC58	83	<i>Bifidobacterium longum</i> LC83
59	<i>Bifidobacterium longum</i> LC59	84	<i>Bifidobacterium longum</i> LC84
60	<i>Bifidobacterium longum</i> CH60	85	<i>Bifidobacterium longum</i> LC85

Số tham chiếu	Tên chủng	Số tham chiếu	Tên chủng
61	<i>Bifidobacterium longum</i> LC61	86	<i>Bifidobacterium longum</i> LC86
62	<i>Bifidobacterium longum</i> LC62	87	<i>Bifidobacterium longum</i> LC87
63	<i>Bifidobacterium longum</i> LC63	88	<i>Bifidobacterium longum</i> LC88
64	<i>Bifidobacterium longum</i> LC64	89	<i>Bifidobacterium longum</i> LC89
65	<i>Bifidobacterium longum</i> LC65	90	<i>Bifidobacterium longum</i> LC90
66	<i>Bifidobacterium longum</i> LC66	91	<i>Bifidobacterium longum</i> LC91
67	<i>Bifidobacterium longum</i> LC67	92	<i>Bifidobacterium longum</i> LC92
68	<i>Bifidobacterium longum</i> LC68	93	<i>Bifidobacterium longum</i> LC93
69	<i>Bifidobacterium longum</i> LC69	94	<i>Bifidobacterium longum</i> LC94
70	<i>Bifidobacterium longum</i> LC70	95	<i>Bifidobacterium longum</i> LC95
71	<i>Bifidobacterium longum</i> LC71	96	<i>Bifidobacterium longum</i> LC96
72	<i>Bifidobacterium longum</i> LC72	97	<i>Bifidobacterium longum</i> LC97
73	<i>Bifidobacterium longum</i> LC73	98	<i>Bifidobacterium longum</i> LC98
74	<i>Bifidobacterium longum</i> LC74	99	<i>Bifidobacterium longum</i> LC99
75	<i>Bifidobacterium longum</i> LC75	100	<i>Bifidobacterium longum</i> LC100

Biết rằng chủng *Lactobacillus plantarum* LC5 được trình bày trên bảng 10 ở trên là vi khuẩn kỵ khí gram dương và 16S rADN của nó có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 4. Trình tự nucleotit 16S rADN của *Lactobacillus plantarum* LC5 đã được tìm kiếm bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), và kết quả là, không tìm thấy chủng *Lactobacillus plantarum* nào có cùng trình tự nucleotit 16S rADN với *Lactobacillus plantarum* LC5, và *Lactobacillus plantarum* LC5 cho thấy sự tương đồng 99% với trình tự 16S rADN của chủng *Lactobacillus plantarum* KF9. Hơn nữa, biết rằng chủng *Lactobacillus plantarum* LC27 được trình bày trên bảng 10 ở trên là vi khuẩn kỵ khí gram dương và 16S rADN của nó có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 5. Trình tự nucleotit 16S rADN của *Lactobacillus plantarum* LC27 đã được tìm kiếm bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), và kết quả là, không tìm thấy chủng *Lactobacillus plantarum* nào có cùng trình tự nucleotit 16S rADN với *Lactobacillus plantarum* LC27, và *Lactobacillus plantarum* LC27 cho thấy sự tương đồng 99% với trình tự 16S rADN của chủng *Lactobacillus plantarum* JL18. Ngoài ra, biết rằng chủng *Lactobacillus plantarum* LC28 được trình bày trên bảng 10 ở trên là vi khuẩn kỵ khí gram dương và 16S rADN của nó có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 6. Trình tự nucleotit 16S rADN của *Lactobacillus plantarum* LC28 đã được tìm kiếm bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), và kết quả là, không tìm thấy chủng *Lactobacillus plantarum* nào có cùng trình tự nucleotit 16S rADN với *Lactobacillus plantarum* LC28, và *Lactobacillus plantarum* LC28 cho thấy sự tương đồng 99% với trình tự 16S rADN của chủng *Lactobacillus plantarum* USIM01.

Biết rằng chủng *Bifidobacterium longum* LC67 được trình bày trên bảng 11 ở trên là vi khuẩn kỵ khí gram dương và 16S rADN của nó có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 7. Trình tự nucleotit 16S rADN của *Bifidobacterium longum* LC67 đã được tìm kiếm bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), và kết quả là, không tìm thấy chủng *Bifidobacterium longum* nào có cùng trình tự nucleotit 16S rADN với *Bifidobacterium longum* LC67, và *Bifidobacterium longum* LC67 cho thấy sự tương đồng 99% với trình tự 16S rADN của chủng *Bifidobacterium longum* CBT-6. Hơn nữa, biết rằng chủng *Bifidobacterium longum* LC68 được trình bày trên bảng 11 ở trên là vi khuẩn kỵ khí gram dương và 16S rADN của nó có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 8. Trình tự nucleotit 16S rADN của *Bifidobacterium longum* LC68 đã được tìm kiếm bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), và kết

quả là, không tìm thấy chủng *Bifidobacterium longum* nào có cùng trình tự nucleotit 16S rADN với *Bifidobacterium longum* LC68, và *Bifidobacterium longum* LC68 cho thấy sự tương đồng 99% với trình tự 16S rADN của chủng *Bifidobacterium longum* IMAUFB067.

Ngoài ra, trong số các đặc điểm sinh lý của *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Bifidobacterium longum* LC67 và *Bifidobacterium longum* LC68, việc sử dụng nguồn cacbon cũng được phân tích bằng cách sử dụng một quá trình lên men đường bằng bộ kit API (phiên bản: API 50 CHL; được sản xuất bởi BioMerieux's, Mỹ). Bảng 12 dưới đây thể hiện các kết quả phân tích việc sử dụng nguồn cacbon của *Lactobacillus plantarum* LC5 and *Lactobacillus plantarum* LC27, và Bảng 13 dưới đây thể hiện các kết quả phân tích việc sử dụng nguồn cacbon của *Bifidobacterium longum* LC67 và *Bifidobacterium longum* LC68. Trên bảng 12 và 13 dưới đây, "+" cho biết trường hợp sử dụng nguồn cacbon là dương tính; "-" cho biết trường hợp sử dụng nguồn cacbon là âm tính; và "±" chỉ ra trường hợp sử dụng nguồn cacbon là không xác định. Như được thể hiện trong các Bảng 12 và 13 dưới đây, các chủng *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Bifidobacterium longum* LC67 và *Bifidobacterium longum* LC68 cho thấy sự sử dụng nguồn cacbon khác với các chủng khác cùng loài đã biết tương ứng với một số nguồn cacbon.

Bảng 12

Nguồn cacbon	Tên chủng		Nguồn cacbon	Tên chủng	
	<i>L. plantarum</i> LC5	<i>L. plantarum</i> LC27		<i>L. plantarum</i> LC5	<i>L. plantarum</i> LC27
glyxerol	-	-	salixin	+	+
erythritol	-	-	xenlobioza	+	+
D-arabinoza	-	-	mantoza	+	+
L-arabinoza	-	+	lactoza	-	+
D-riboza	+	+	melibioza	+	+
D-xyloza	-	-	saccaroza	+	+

L-xyloza	-	-	trehaloza	+	+
D-adonitol	-	-	inulin	-	-
metyl- β -D-xylopyranozit	-	-	melezitoza	+	+
D-galactoza	+	$\pm$	raffinoza	$\pm$	-
D-glucoza	+	+	Tinh bột	-	-
D-fructoza	+	+	Glycogen	-	-
D-mannoza	+	+	Xylitol	-	-
L-sorboza	-	-	gentiobioza	+	+
L-rhamnoza	-	$\pm$	D-turanoza	-	+
dulxitol	-	-	D-lyxoza	-	-
inositol	-	-	D-tagatoza	-	-
mannitol	+	+	D-fucoza	-	-
sorbitol	+	+	L-fucoza	-	-
α -metyl-D-mannozit	-	$\pm$	D-arabitol	-	-
α -metyl-D-glucozit	-	-	L-arabitol	-	-
N-axetyl-glucosamin	+	+	gluconat	-	-
amygdalin	+	+	2-keto-gluconat	-	-
arbutin	+	+	5-keto-gluconat	-	-
esculin	+	+			

Bảng 13

Nguồn cacbon	Tên chủng		Nguồn cacbon	Tên chủng	
	<i>B. longum</i> LC67	<i>B. longum</i> LC68		<i>B. longum</i> LC67	<i>B. longum</i> LC68

glyxerol	-	-	salixin	-	-
erythritol	-	-	xenlobioza	-	-
D-arabinoza	-	-	mantoza	+	+
L-arabinoza	+	+	lactoza	+	+
D-riboza	-	-	melibioza	+	+
D-xyloza	+	±	saccaroza	+	±
L-xyloza	-	-	trehaloza	-	±
D-adonitol	-	-	inulin	-	-
metyl-β-D-xylopyranozit	-	-	melezitoza	-	+
D-galactoza	±	+	raffinoza	+	+
D-glucoza	+	+	Tinh bột	-	-
D-fructoza	+	+	Glycogen	-	-
D-mannoza	-	-	Xylitol	-	-
L-sorboza	-	-	gentiobioza	+	±
L-rhamnoza	-	-	D-turanoza	±	±
dulcitol	-	-	D-lyxoza	-	-
inositol	-	-	D-tagatoza	-	-
mannitol	±	+	D-fucoza	-	-
sorbitol	±	+	L-fucoza	-	-
α-metyl-D-mannozit	-	-	D-arabitol	-	-
α-metyl-D-glucozit	±	±	L-arabitol	-	-
N-axetyl-glucosamin	-	-	gluconat	-	-
amygdalin	-	±	2-keto-gluconat	-	-
arbutin	-	-	5-keto-gluconat	-	-

esculin	+	+			
---------	---	---	--	--	--

(4) Thông tin về việc đăng ký các chủng vi khuẩn lactic

Các tác giả sáng chế đã đăng ký chủng *Lactobacillus plantarum* LC5 với Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (địa chỉ: Tòa nhà Yurim, 45, Hongjenae 2ga- gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc), một cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế, vào ngày 11 tháng 1 năm 2016 với mã số truy cập KCCM 11800P. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã đăng ký chủng *Lactobacillus plantarum* LC27 với Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (địa chỉ: Tòa nhà Yurim, 45, Hongjenae 2ga- gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc), một cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế, vào ngày 11 tháng 1 năm 2016 với mã số truy cập KCCM 11801P. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã đăng ký chủng *Bifidobacterium longum* LC67 với Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (địa chỉ: Tòa nhà Yurim, 45, Hongjenae 2ga- gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc), một cơ quan có thẩm quyền lưu trữ quốc tế, vào ngày 11 tháng 1 năm 2016 với mã số truy cập KCCM 11802P.

2. Đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với việc làm giảm tổn thương ruột hoặc tính thấm qua ruột

Để đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ kim chi hoặc phân người trong việc làm giảm bớt tổn thương ruột hoặc tính thấm qua ruột, các thông số về hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS), hoạt tính ức chế β -glucuronidaza (enzym gây hại đường ruột) và hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bít của các chủng vi khuẩn lactic đã được đo.

(1) Phương pháp thí nghiệm

* Hoạt tính chống oxy hoá

DPPH được hòa tan trong etanol tới nồng độ 0,2 mM để tạo ra dung dịch DPPH. Huyền dịch các chủng vi khuẩn lactic (1×10^8 CFU/ml) hoặc dung dịch vitamin C (1 g/ml) được bổ sung vào 0,1 ml dung dịch DPPH và được nuôi cấy ở 37°C trong 20 phút. Sản phẩm nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 3000 rpm (vòng/phút) trong 5 phút, và dịch nổi

được thu lấy. Tiếp theo, độ hấp thụ của dịch nổi ở bước sóng 517 nm được đo, và hoạt tính chống oxy hoá của các chủng vi khuẩn lactic được tính toán.

* Hoạt tính ức chế sản xuất Lipopolysaccarit (LPS)

0,1 g phân người tươi được hòa thành hỗn dịch trong 0,9 ml dung dịch muối sinh lý vô trùng và được pha loãng 100 lần với môi trường vi sinh kỵ khí thông thường để thu được hỗn dịch phân. 0,1 ml hỗn dịch phân và 0,1 ml vi khuẩn lactic (1×10^4 hoặc 1×10^5 CFU) được thêm vào 9,8 ml môi trường vi sinh kỵ khí vô trùng (Công ty Dược phẩm Nissui, Nhật Bản) và được nuôi cấy kỵ khí trong 24 giờ. Tiếp theo, sản phẩm nuôi cấy được nghiền bằng sóng siêu âm trong khoảng 1 giờ để phá vỡ màng tế bào bên ngoài của vi khuẩn, và ly tâm ở tốc độ 5000 g, và thu lấy dịch nổi. Tiếp đó, hàm lượng LPS (lipopolysaccarit) (là một loại nội độc tố) trong dịch nổi được đo bằng một kit định lượng LAL (phép thử dựa vào tính chất ly giải tế bào dạng amip trong máu con sam của lipopolysaccarit) (được sản xuất bởi Cape Cod Inc., Mỹ). Ngoài ra, để đánh giá hoạt tính ức chế sự tăng sinh của *E. coli* của các chủng vi khuẩn lactic, sản phẩm nuôi cấy thu được thông qua thí nghiệm tương tự như được mô tả ở trên được pha loãng 1000 lần và 100000 lần và được nuôi cấy trong môi trường DHL, sau đó đếm số lượng tế bào *E. coli*.

*Hoạt tính ức chế β -glucuronidaza

0,1 ml dung dịch p-nitrophenyl- β -D-glucuronit 0,1 mM, 0,2 ml dung dịch muối đệm phosphat 50 mM và 0,1 ml hỗn dịch vi khuẩn lactic (được tạo ra bằng cách hòa thành hỗn dịch sản phẩm nuôi cấy vi khuẩn lactic vào trong 5 ml dung dịch muối sinh lý) được đặt trong một bình phản ứng và chịu ảnh hưởng của enzym, và 0,5 ml dung dịch NaOH 0,1 mM đã được thêm vào để làm dừng phản ứng. Tiếp theo, dung dịch phản ứng được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút, và dịch nổi được thu lấy. Sau đó, độ hấp thụ của dịch nổi ở bước sóng 405 nm được đo.

* Hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bọt

Tế bào Caco2 được lấy từ Ngân hàng tế bào Hàn Quốc được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 trong 48 giờ, và sau đó các tế bào Caco2 đã nuôi cấy được chia vào mỗi giếng của đĩa nuôi cấy 12 giếng với mật độ 2×10^6 tế bào/giếng. Tiếp theo, mỗi giếng được xử lý với 1 μ g LPS (lipopolysaccarit) hoặc kết hợp 1 μ g LPS

(lipopolysaccarit) và 1×10^3 CFU hỗn hợp vi khuẩn lactic, sau đó được ủ trong 24 giờ. Tiếp theo, thu lấy các tế bào được nuôi cấy từ mỗi giếng, và mức biểu hiện của protein liên kết vòng bọt ZO-1 trong tế bào được đo bằng phương pháp thấm miễn dịch.

(2) Kết quả thí nghiệm

Hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccarit (LPS), hoạt tính ức chế β -glucuronidaza và hoạt tính cảm ứng sự biểu hiện protein liên kết vòng bọt của các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ kim chi hoặc phân người đã được đo và kết quả đo được trình bày trên bảng 14 đến 16 dưới đây. Như được thể hiện trong các Bảng 14 đến 16 dưới đây, *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC15, *Lactobacillus plantarum* LC17, *Lactobacillus plantarum* LC25, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Lactobacillus plantarum* LC28, *Bifidobacterium longum* LC55, *Bifidobacterium longum* LC65, *Bifidobacterium longum* LC67 and *Bifidobacterium longum* LC68 có hoạt tính chống oxy hóa tốt, hoạt tính ức chế mạnh sự sản xuất lipopolysaccarit (LPS) và β -glucuronidaza, và kích thích mạnh sự biểu hiện của protein liên kết vòng bọt. Cụ thể, *Bifidobacterium longum* LC67 cho thấy hoạt tính kích thích sự biểu hiện protein liên kết vòng bọt tốt nhất. Các chủng vi khuẩn lactic này có hiệu quả chống oxy hoá tốt, có hiệu quả tốt trong việc ức chế hoạt động enzym của vi khuẩn gây bệnh đường ruột có liên quan đến chứng viêm và gây ung thư, ức chế sự sản sinh nội độc tố LPS (lipopolysaccarit) của hệ vi khuẩn gây bệnh đường ruột và cảm ứng sự biểu hiện của protein liên kết vòng bọt. Vì vậy, các chủng vi khuẩn lactic này có thể cải thiện các hội chứng liên quan tới trao đổi chất qua thành ruột.

Bảng 14

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC1	++	+	+	-
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC2	++	++	+	-
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC3	+++	++	+	-
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC4	+++	++	+	+
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC5	+++	+++	++	++
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC6	++	+++	+	-
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC7	+++	++	+	-
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC8	++	+++	+	-
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC9	++	++	+	+
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC10	++	+++	+	+
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC11	++	++	+	-
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC12	++	+++	+	+
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC13	++	++	+	+
14	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC14	++	++	+	-
15	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC15	+++	+++	++	++

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
16	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC16	+	+++	+	-
17	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC17	+++	+++	++	++
18	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC18	++	++	+	+
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC19	++	+++	+	+
20	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC20	++	++	+	-
21	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC21	++	++	+	-
22	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC22	++	+++	-	-
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC23	+++	++	-	-
24	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC24	+++	+	-	-
25	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC25	+++	+++	++	++
26	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC26	++	+	+	+
27	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC27	+++	+++	++	++
28	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC28	+++	+++	++	++
29	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC29	++	+	-	-
30	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC30	++	+	+	-

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
31	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC31	+++	++	+	-
32	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC32	+++	++	+	-
33	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC33	+++	++	+	-
34	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC34	++	++	+	+
35	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC35	++	++	+	+

Bảng 15

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
36	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC36	++	++	++	-
37	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC37	+++	++	+	+
38	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC38	++	++	+	-
39	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC39	++	+	+	-
40	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC40	+++	+	-	-
41	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC41	++	++	-	+
42	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC42	+++	+	-	+

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
43	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC43	++	+	-	+
44	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC44	++	+	-	+
45	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC45	++	++	-	+
46	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC46	++	+	-	+
47	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC47	+++	+	-	+
48	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC48	++	++	-	+
49	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC49	++	+++	+	+
50	<i>Lactobacillus plantarum</i> LC50	+++	++	+	-
51	<i>Bifidobacterium longum</i> LC51	++	++	+	-
52	<i>Bifidobacterium longum</i> LC52	+++	+++	+	-
53	<i>Bifidobacterium longum</i> LC53	++	+++	-	+
54	<i>Bifidobacterium longum</i> LC54	+++	++	+	+
55	<i>Bifidobacterium longum</i> LC55	+++	+++	++	++
56	<i>Bifidobacterium longum</i> LC56	+++	++	+	+
57	<i>Bifidobacterium longum</i> LC57	++	+	-	+

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
58	<i>Bifidobacterium longum</i> LC58	+++	+	-	+
59	<i>Bifidobacterium longum</i> LC59	++	+	-	-
60	<i>Bifidobacterium longum</i> CH60	+++	+	-	-
61	<i>Bifidobacterium longum</i> LC61	++	+	+	-
62	<i>Bifidobacterium longum</i> LC62	+++	+	+	-
63	<i>Bifidobacterium longum</i> LC63	++	++	++	-
64	<i>Bifidobacterium longum</i> LC64	+++	+	-	-
65	<i>Bifidobacterium longum</i> LC65	+++	+++	++	++
66	<i>Bifidobacterium longum</i> LC66	++	+	+	+
67	<i>Bifidobacterium longum</i> LC67	+++	+++	++	+++
68	<i>Bifidobacterium longum</i> LC68	+++	+++	++	++
69	<i>Bifidobacterium longum</i> LC69	+++	+	-	-
70	<i>Bifidobacterium longum</i> LC70	++	+	-	+

Bảng 16

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
71	<i>Bifidobacterium longum</i> LC71	++	+	-	+
72	<i>Bifidobacterium longum</i> LC72	+++	++	-	+
73	<i>Bifidobacterium longum</i> LC73	++	++	+	-
74	<i>Bifidobacterium longum</i> LC74	++	+++	+	-
75	<i>Bifidobacterium longum</i> LC75	+++	+	-	+
76	<i>Bifidobacterium longum</i> LC76	++	+	-	+
77	<i>Bifidobacterium longum</i> LC77	++	++	+	+
78	<i>Bifidobacterium longum</i> LC78	++	+	+	+
79	<i>Bifidobacterium longum</i> LC79	+++	+	+	+
80	<i>Bifidobacterium longum</i> CH80	++	+	+	+
81	<i>Bifidobacterium longum</i> LC81	++	+	+	+
82	<i>Bifidobacterium longum</i> LC82	++	++	-	+
83	<i>Bifidobacterium longum</i> LC83	+++	+	-	+
84	<i>Bifidobacterium longum</i> LC84	++	++	-	-
85	<i>Bifidobacterium longum</i> LC85	+++	++	-	+

Số tham chiếu	Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hoá	Hoạt tính ức chế Beta- glucuronidaza	Hoạt tính ức chế sản xuất LPS	Hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt
86	<i>Bifidobacterium longum</i> LC86	++	+	+	-
87	<i>Bifidobacterium longum</i> LC87	++	++	+	-
88	<i>Bifidobacterium longum</i> LC88	++	+++	+	+
89	<i>Bifidobacterium longum</i> LC89	++	++	+	+
90	<i>Bifidobacterium longum</i> LC90	++	++	+	+
91	<i>Bifidobacterium longum</i> LC91	+++	+++	+	+
92	<i>Bifidobacterium longum</i> LC92	+++	++	+	+
93	<i>Bifidobacterium longum</i> LC93	++	++	+	+
94	<i>Bifidobacterium longum</i> LC94	++	++	-	+
95	<i>Bifidobacterium longum</i> LC95	++	+++	-	-
96	<i>Bifidobacterium longum</i> LC96	++	+	-	-
97	<i>Bifidobacterium longum</i> LC97	++	+	-	-
98	<i>Bifidobacterium longum</i> LC98	++	++	-	-
99	<i>Bifidobacterium longum</i> LC99	++	++	-	-
100	<i>Bifidobacterium longum</i> LC100	++	++	-	+

* Nồng độ cuối của các chủng vi khuẩn lactic trong đánh giá hoạt tính chống oxy hoá: 1×10^4 CFU/ml; nồng độ của các chủng vi khuẩn lactic được cho vào để đo hoạt tính ức chế beta-glucuronidaza và hoạt tính ức chế sản xuất lipopolysaccharit (LPS): 1×10^4 CFU/ml; nồng độ của các chủng vi khuẩn lactic trong đánh giá hoạt tính cảm ứng biểu hiện protein liên kết vòng bọt: 1×10^4 CFU/ml.

* Các tiêu chuẩn trong đánh giá các hoạt tính khác nhau của các chủng vi khuẩn lactic: rất mạnh (+++; > 90%); mạnh (++; >60-90%); yếu (+; >20-60%); không hoặc ít hơn 20% (-; <20%).

3. Đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với việc làm giảm sự tổn thương gan

Dựa trên sự đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với việc làm giảm tổn thương ruột hoặc các hội chứng liên quan tới trao đổi chất qua thành ruột, bảy chủng vi khuẩn dưới đây đã được lựa chọn: *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC15, *Lactobacillus plantarum* LC17, *Lactobacillus plantarum* LC25, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Lactobacillus plantarum* LC28, *Bifidobacterium longum* LC55, *Bifidobacterium longum* LC65, *Bifidobacterium longum* LC67, và *Bifidobacterium longum* LC68. Hiệu quả của mỗi chủng vi khuẩn lactic được lựa chọn này hoặc của hỗn hợp các chủng được lựa chọn này trong việc làm giảm bớt tổn thương gan được đánh giá bằng cách sử dụng những động vật mô hình bị tổn thương gan khác nhau do tert-butylperoxit gây ra.

1) Phương pháp thí nghiệm

Chuột (C57BL/6, giống đực) được chia thành nhiều nhóm, mỗi nhóm gồm 6 cá thể. Tert-butylperoxit được tiêm trong màng bụng cho các cá thể được thí nghiệm ở các nhóm với liều 2,5 mmol/kg và một nhóm bình thường không tiêm để gây tổn thương gan. Sau 2 giờ tiêm tert-butylperoxit, 2×10^9 CFU các chủng vi khuẩn lactic được cho các cá thể thí nghiệm của các nhóm thí nghiệm uống qua đường miệng mỗi ngày một lần trong 3 ngày và nhóm bình thường không tổn thương gan và nhóm đối chứng âm không sử dụng vi khuẩn. Ngoài ra, các cá thể thí nghiệm của nhóm đối chứng dương được cho uống silymarin thay cho các chủng vi khuẩn lactic với liều lượng 100 mg/kg, mỗi ngày một lần trong 3 ngày. Sau 6 giờ sau khi dùng thuốc lần cuối, tiến hành lấy máu từ tim.

Máu được lấy được để ở nhiệt độ phòng trong 60 phút, và ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 15 phút để tách huyết thanh. Mức GPT và mức GOT trong huyết thanh đã phân tách được đo bằng kit định lượng máu (kit đo ALT & AST, Công ty Dược phẩm Asan, Hàn Quốc). Ngoài ra, 1 g mô gan được cắt ra từ mỗi động vật được thí nghiệm được bổ sung dung dịch muối và hòa đồng thể bằng cách sử dụng máy đồng hóa, và dịch nổi được phân tích bằng kit ELISA để đo nồng độ TNF- α .

(2) Kết quả thí nghiệm

Bảng 17 dưới đây thể hiện sự thay đổi trong giá trị GOT, GPT và TNF- α khi các chủng vi khuẩn lactic được sử dụng cho động vật mô hình bị tổn thương gan do tert-butylperoxit gây ra. Như được trình bày trên bảng 17 dưới đây, *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Lactobacillus plantarum* LC28, *Bifidobacterium longum* LC67 và *Bifidobacterium longum* LC68 cho thấy hiệu quả tốt việc trong làm giảm tổn thương gan so với silymarin, và hỗn hợp của các chủng vi khuẩn lactic đã cho thấy hiệu quả tốt hơn trong việc làm giảm nhẹ tổn thương gan.

Bảng 17

Nhóm thí nghiệm	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	TNF- α (pg/g)
Nhóm bình thường	42,4	6,2	140,4
Nhóm đối chứng âm	103,1	28,0	298,0
Nhóm được cho sử dụng LC5	36,9	5,4	115,7
Nhóm được cho sử dụng LC15	60,3	6,2	154,3
Nhóm được cho sử dụng LC17	65,8	6,8	136,7
Nhóm được cho sử dụng LC25	64,6	11,3	132,4
Nhóm được cho sử dụng LC27	35,3	3,3	157,1
Nhóm được cho sử dụng LC28	42,0	1,0	185,7

Nhóm được cho sử dụng LC55	55,6	17,6	251,4
Nhóm được cho sử dụng LC65	61,4	17,3	127,6
Nhóm được cho sử dụng LC67	50,8	3,8	150,5
Nhóm được cho sử dụng LC68	40,8	5,7	82,4
Nhóm được cho sử dụng LC5+LC67	32,7	3,1	115,9
Nhóm được cho sử dụng LC5+LC68	36,8	5,6	105,4
Nhóm được cho sử dụng LC27+LC67	30,5	2,3	121,2
Nhóm được cho sử dụng LC27+LC68	35,4	3,2	112,8
Nhóm được cho sử dụng LC28+LC67	32,5	2,8	128,2
Nhóm được điều trị với silymarin	52,9	5,9	93,8

Trên bảng 17 ở trên, "LC5" biểu thị cho *Lactobacillus plantarum* LC5; "LC15" biểu thị cho *Lactobacillus plantarum* LC15; "LC17" biểu thị cho *Lactobacillus plantarum* LC17; "LC25" biểu thị cho *Lactobacillus plantarum* LC25; "LC27" biểu thị cho *Lactobacillus plantarum* LC27; "LC28" biểu thị cho *Lactobacillus plantarum* LC28; "LC55" biểu thị cho *Bifidobacterium longum* LC55; "LC65" biểu thị cho *Bifidobacterium longum* LC65; "LC67" biểu thị cho *Bifidobacterium longum* LC67; "LC68" biểu thị cho *Bifidobacterium longum* LC68; "LC5 + LC67" biểu thị cho hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Lactobacillus plantarum* LC5 và *Bifidobacterium longum* LC67 với cùng một lượng; "LC5 + LC68" biểu thị cho hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Lactobacillus plantarum* LC5 và *Bifidobacterium longum* LC68 với cùng một lượng; "LC27 + LC67" biểu thị cho hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Lactobacillus plantarum* LC27 và *Bifidobacterium longum* LC67 với cùng một lượng; "LC27 + LC68" biểu thị cho một

hỗn hợp vi khuẩn axit lactic được điều chế bằng cách trộn *Lactobacillus plantarum* LC27 và *Bifidobacterium longum* LC67 với cùng một lượng; và "LC28 + LC67" biểu thị cho hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Lactobacillus plantarum* LC28 và *Bifidobacterium longum* LC67 với cùng một lượng. Trong các bảng sau đây thể hiện các kết quả thí nghiệm, các ký hiệu tương tự được sử dụng cho các chủng vi khuẩn lactic đơn lẻ hoặc hỗn hợp vi khuẩn lactic.

4. Đánh giá hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với việc làm giảm sự dị ứng

(1) Đánh giá việc ức chế sự thoát bọt của các chủng vi khuẩn lactic

Dòng tế bào RBL-2H3 (dòng tế bào mast của chuột, Ngân hàng tế bào Hàn Quốc, Cat. No.22256) được nuôi cấy trong môi trường DMEM (môi trường nuôi cấy Dulbeccos cải tiến, Sigma, 22256) chứa 10% FBS (huyết thanh thai bò) và L-glutamin trong tủ ẩm vi sinh được làm ẩm với nồng độ 5% CO₂ ở 37°C. Các tế bào chứa trong môi trường nuôi cấy được làm nổi lên bằng dung dịch trypsin-EDTA, và các tế bào nổi lên được phân lập, được thu thập và được sử dụng trong thí nghiệm. Các tế bào RBL-2H3 đã được thu thập được đưa vào đĩa 24 giếng với mật độ 5×10⁵ tế bào/giếng và được cảm ứng bằng cách ủ với 0,5 µg/ml kháng thể đơn dòng IgE của chuột trong 12 giờ. Các tế bào đã được cảm ứng được rửa sạch với 0,5 ml đệm siragani (119mM NaCl, 5mM KCl, 0,4mM MgCl₂, 25mM PIPES, 40mM NaOH, pH 7,2) và sau đó được ủ với 0,16 ml dung dịch đệm Siracangan (bổ sung 5,6mM glucoza, 1 mM CaCl₂, 0,1% BSA) ở 37°C trong 10 phút. Tiếp đó, các chủng vi khuẩn lactic với vai trò thuốc thí nghiệm đã được thêm vào môi trường chứa tế bào được nuôi cấy với nồng độ 1×10⁴ CFU/ml, hoặc 0,04 ml DSCG (natri cromoglycat) với vai trò thuốc đối chứng đã được bổ sung vào môi trường chứa tế bào được nuôi cấy và sau 20 phút, các tế bào được hoạt hóa với 0,02 ml kháng nguyên (1 µg/ml DNP-BSA) ở 37°C trong 10 phút. Tiếp theo, môi trường chứa tế bào được nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút, và dịch nổi được thu lấy. 0,025 ml dịch nổi thu được được đưa vào đĩa 96 giếng, sau đó 0,025 ml p-NAG 1mM (dung dịch p-nitrophenyl-N-axetyl-β-D-glucosamin trong đệm xitrat 0,1M, pH 4,5) được bổ sung vào, và sau đó hỗn hợp được để phản ứng ở 37°C trong 60 phút. Tiếp đó, phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 0,2 ml Na₂CO₃/NaHCO₃ 0,1M và đo sự hấp thụ ở bước sóng 405 nm bằng máy phân tích ELISA.

(2) Kết quả thí nghiệm

Bảng 18 dưới đây thể hiện kết quả đo tỷ lệ ức chế (%) sự thoát bọt của các chủng vi khuẩn lactic. Như được trình bày trên bảng 18, *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Lactobacillus plantarum* LC28, *Bifidobacterium longum* LC67, *Bifidobacterium longum* LC68, và các hỗn hợp của nó ức chế có hiệu quả sự thoát bọt của các bạch cầu ái kiềm. Do đó, các chủng vi khuẩn lactic này hoặc hỗn hợp của nó có thể làm giảm rất hiệu quả các bệnh liên quan tới dị ứng, bệnh hen, viêm họng, viêm da mãn tính hoặc các bệnh tương tự.

Bảng 18

Thuốc	Tỷ lệ ức chế sự thoát bọt (%)
Không	0
LC5	65
LC15	45
LC17	43
LC25	48
LC27	52
LC28	54
LC55	38
LC65	42
LC67	65
LC68	61
LC5+LC67	65
LC5+LC68	60
LC27+LC67	65
LC27+LC68	59

LC28+LC67	62
DSCG (natri cromoglycat)	62

5. Đánh giá *in vitro* về hiệu quả chống viêm và hiệu quả điều hòa miễn dịch của các chủng vi khuẩn lactic

(1) Phân lập các đại thực bào và đánh giá dấu hiệu viêm

Các con chuột đực 6 tuần tuổi C57BL/6J (nặng 20-23g) được mua từ Công ty TNHH RaonBio. 2 ml dung dịch thioglycolat vô trùng 4% được tiêm vào khoang bụng của mỗi con chuột, và sau 96 giờ, chuột được gây mê, và 8 ml môi trường RPMI 1640 được đưa vào khoang bụng của mỗi cá thể chuột. Sau 5 đến 10 phút, môi trường RPMI (có chứa các đại thực bào) trong khoang bụng của chuột được lấy ra, ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 10 phút, và sau đó được rửa hai lần với môi trường RPMI 1640. Các đại thực bào được tra trên đĩa 24 giếng với mật độ $0,5 \times 10^6$ tế bào/giếng và được xử lý với các chủng vi khuẩn lactic thí nghiệm và chất gây viêm LPS (lipopolysaccarit) trong 2 giờ hoặc 24 giờ, và sau đó dịch nổi và các tế bào được thu thập. Trong trường hợp này, các chủng vi khuẩn lactic được sử dụng với nồng độ 1×10^4 CFU/ml để xử lý với các tế bào. Các tế bào được thu thập được hòa đồng thể trong dung dịch đệm (Gibco). Sử dụng dịch nổi thu được để đo mức độ biểu hiện của các xytokin như TNF- α bằng kit ELISA. Ngoài ra, sử dụng các tế bào thu được để đo mức biểu hiện p65 (NF-kappa B), p-p65 (phospho-NF-kappa B) và β -actin được đo bằng phương pháp thấm miễn dịch. Cụ thể, 50 μ g dịch nổi được thu và điện di trên gel polyacrylamit SDS 10% (w/v) trong 1 giờ 30 phút. Mẫu sau điện di được chuyển lên màng nitroxenluloza ở 100 V và 400 mA trong 1 giờ 10 phút. Màng nitroxenluloza đã lai mẫu được xử lý với sữa gầy 5% trong 30 phút, và sau đó được rửa 3 lần với PBS-Tween, 5 phút mỗi lần và được ủ với dung dịch pha loãng 1:100 của kháng thể sơ cấp (Santa Cruz Biotechnology, Mỹ) qua đêm. Tiếp theo, màng được rửa 3 lần, 10 phút mỗi lần và ủ với dung dịch pha loãng 1: 1000 của kháng thể thứ cấp (Santa Cruz Biotechnology, Mỹ) trong 1 giờ 20 phút. Tiếp theo, màng được rửa ba lần, 15 phút mỗi lần, và được gắn với chất huỳnh quang và được hiển thị. Mật độ của các băng được đo, và sau đó tỷ lệ ức chế (%) được tính bằng cách sử dụng phương trình sau. Trong phương trình sau, nhóm bình thường biểu thị nhóm mà trong đó các đại thực bào được xử lý với dung dịch muối đơn lẻ; nhóm xử lý với LPS biểu thị

nhóm mà trong đó các đại thực bào được xử lý với LPS đơn lẻ; và nhóm được xử lý bằng vi khuẩn lactic biểu thị nhóm mà trong đó các đại thực bào được xử lý bằng cả vi khuẩn lactic và LPS.

Tỷ lệ ức chế (%) = (mức độ biểu hiện ở nhóm được xử lý với LPS - mức độ biểu hiện ở nhóm được xử lý với vi khuẩn lactic/mức độ biểu hiện ở nhóm được xử lý với LPS - mức độ biểu hiện ở nhóm bình thường)

Bảng 19 dưới đây thể hiện sự ức chế việc hoạt hóa NF-kappa B và sự ức chế biểu hiện của TNF- α khi các đại thực bào được cảm ứng viêm bằng LPS (lipopolysaccarit) được xử lý với vi khuẩn lactic. Như được trình bày trên bảng 19 dưới đây, *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Lactobacillus plantarum* LC28, *Bifidobacterium longum* LC67, *Bifidobacterium longica* LC68, và các hỗn hợp của nó ức chế có hiệu quả sự viêm do LPS (lipopolysaccarit) gây ra.

Bảng 19

Chủng vi khuẩn lactic được sử dụng để xử lý	Tỷ lệ ức chế (%) sự biểu hiện của TNF- α	Tỷ lệ ức chế (%) sự hoạt hóa p-p65/p65
LC5	71	73
LC15	54	55
LC17	61	55
LC25	52	65
LC27	70	72
LC28	74	71
LC55	63	62
LC65	65	68
LC67	76	77
LC68	75	71
LC5+LC67	78	72
LC5+LC68	76	72

LC27+LC67	81	75
LC27+LC68	77	73
LC28+LC67	77	73

(2) Phân lập các tế bào T từ lá lách và đánh giá sự biệt hóa của tế bào T thành tế bào Th17 hoặc tế bào Treg (tế bào T điều hòa)

Lá lách được lấy ra từ chuột C56BL/6J, được nghiền, và được hòa thành hỗn dịch trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FCS và các tế bào T CD4 được phân lập bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào T CD4 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức). Các tế bào T CD4 được phân lập được tra vào đĩa 12 giếng với mật độ 5×10^5 tế bào/giếng và bổ sung vào kháng thể anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức) và kháng thể anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức), hoặc bổ sung kháng thể anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức), kháng thể anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức), kháng thể tái tổ hợp IL-6 (20 ng/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức) và nhân tố tăng trưởng chuyển hóa beta tái tổ hợp (1 ng/ml, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức). Trong khi nuôi cấy các tế bào T, tiến hành bổ sung 1×10^3 hoặc 1×10^5 CFU các chủng vi khuẩn lactic vào môi trường nuôi cấy, và các tế bào này được nuôi cấy trong 4 ngày. Tiếp theo, các tế bào của sản phẩm nuôi cấy được nhuộm với kháng thể anti-FoxP3 hoặc anti-IL-17A, và sự phân bố của các tế bào Th17 và Treg được phân tích bằng hệ thống FACS (sàng lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang) (C6 Flow Cytometer® System, San Jose, CA, Mỹ).

Bảng 20 dưới đây thể hiện mức độ biệt hóa của tế bào T (được phân lập từ lá lách) thành tế bào Th17 khi các tế bào T được xử lý với kháng thể anti-CD3, anti-CD28, IL-6 và TGF- β , và Bảng 21 dưới đây thể hiện mức độ biệt hóa của tế bào T (được phân lập từ lá lách) thành tế bào Treg khi tế bào T được xử lý với kháng thể anti-CD3 và anti-CD28. Trên bảng 20 và 21 dưới đây, *Lactobacillus plantarum* LC5, *Lactobacillus plantarum* LC27, *Lactobacillus plantarum* LC28, *Bifidobacterium longum* LC67, *Bifidobacterium longum* LC68 và các hỗn hợp của nó đã ức chế sự biệt hóa của tế bào T thành tế bào Th17 (tế bào T trợ giúp17) và thúc đẩy sự biệt hóa tế bào T thành tế bào Treg. Những kết quả này cho thấy các chủng vi khuẩn lactic hoặc hỗn hợp của nó có thể làm giảm bớt một cách hiệu quả các bệnh viêm như viêm đại tràng hoặc viêm khớp.

Bảng 20

Phương pháp xử lý tế bào T		Tỷ lệ biệt hóa tế bào T (%) thành tế bào Th17
Xử lý với kháng thể anti-CD3, anti-CD28, IL-6 và TGF- β	Xử lý với các chủng vi khuẩn lactic	
Không được xử lý	Không được xử lý	12,2
Được xử lý	Không được xử lý	25,6
Được xử lý	Được xử lý với LC5	14,2
Được xử lý	Được xử lý với LC15	19,6
Được xử lý	Được xử lý với LC17	17,9
Được xử lý	Được xử lý với LC25	18,2
Được xử lý	Được xử lý với LC27	15,1
Được xử lý	Được xử lý với LC28	14,9
Được xử lý	Được xử lý với LC55	18,8
Được xử lý	Được xử lý với LC65	17,9
Được xử lý	Được xử lý với LC67	15,9
Được xử lý	Được xử lý với LC68	15,7
Được xử lý	Được xử lý với LC5+LC67	14,2
Được xử lý	Được xử lý với LC5+LC68	14,5
Được xử lý	Được xử lý với LC27+LC67	13,9
Được xử lý	Được xử lý với LC27+LC68	14,4
Được xử lý	Được xử lý với LC28+LC67	14,1

Bảng 21

Phương pháp xử lý tế bào T		Tỷ lệ biệt hóa tế bào T (%) thành tế bào Treg
Xử lý với kháng thể anti-CD3 và anti-CD28	Xử lý với các chủng vi khuẩn lactic	
Không được xử lý	Không được xử lý	9,1
Được xử lý	Không được xử lý	11,4
Được xử lý	Được xử lý với LC5	22,9
Được xử lý	Được xử lý với LC15	15,8
Được xử lý	Được xử lý với LC17	16,9
Được xử lý	Được xử lý với LC25	18,4
Được xử lý	Được xử lý với LC27	21,8
Được xử lý	Được xử lý với LC28	21,4
Được xử lý	Được xử lý với LC55	19,5
Được xử lý	Được xử lý với LC65	19,2
Được xử lý	Được xử lý với LC67	21,6
Được xử lý	Được xử lý với LC68	20,5
Được xử lý	Được xử lý với LC5+LC67	21,8
Được xử lý	Được xử lý với LC5+LC68	21,8
Được xử lý	Được xử lý với LC27+LC67	22,0
Được xử lý	Được xử lý với LC27+LC68	21,5
Được xử lý	Được xử lý với LC28+LC67	21,9

6. Đánh giá *in vivo* về hiệu quả chống viêm và hiệu quả làm giảm bớt chứng viêm đại tràng của các chủng vi khuẩn lactic

(1) Động vật thí nghiệm

Chuột đực C57BL/6 5 tuần tuổi được mua từ OrientBio (nặng 24-27g) và được nuôi trong điều kiện môi trường được kiểm soát (độ ẩm: $50 \pm 10\%$, nhiệt độ: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, chu kỳ sáng tối 12 giờ/12 giờ) và sau đó được sử dụng trong thí nghiệm. Các loại thức ăn chăn nuôi thí nghiệm tiêu chuẩn (Samyang, Hàn Quốc) để sử dụng làm thức ăn và các động vật mô hình được uống nước tùy thích. Trong tất cả các thí nghiệm, một nhóm bao gồm 6 cá thể.

(2) Gây viêm đại tràng bằng TNBS và cho sử dụng mẫu

Một nhóm động vật thí nghiệm được sử dụng làm nhóm bình thường, và các cá thể động vật thí nghiệm của các nhóm khác được xử lý với axit 2,4,6-trinitrobenzensulfonic (TNBS) để gây viêm đại tràng cấp tính. Cụ thể, các động vật thí nghiệm được gây mê nhẹ bằng ete, và sau đó một dung dịch hỗn hợp chứa 2,5 g TNBS (axit 2,4,6-trinitrobenzensulfonic) trong 100 ml 50% etanol được tiêm vào đại tràng thông qua hậu môn với lượng 0,1 ml mỗi lần bằng cách sử dụng ống tiêm 1 ml, và con chuột được dựng thẳng lên và duy trì trong 30 giây, qua đó gây viêm. Mặt khác, nhóm bình thường được cho uống 0,1 ml dung dịch muối. Vào ngày hôm sau, các chủng vi khuẩn lactic hoặc hỗn hợp vi khuẩn lactic dưới dạng mẫu thí nghiệm được hòa thành hỗn dịch với dung dịch muối và cho mỗi con chuột uống với lượng là $2,0 \times 10^9$ CFU. Vào ngày sau khi kết thúc quá trình điều trị, các con chuột bị giết chết bằng cacbon dioxit, và một phần ruột từ manh tràng đến vị trí ngay trước hậu môn được cắt và sử dụng. Trong khi đó, các động vật thí nghiệm của nhóm bình thường được cho uống dung dịch muối thay cho các chủng vi khuẩn lactic. Thêm vào đó, các động vật thí nghiệm của nhóm đối chứng âm được cho uống dung dịch muối thay cho các chủng vi khuẩn lactic sau khi bị viêm đại tràng do TNBS. Hơn nữa, các động vật thí nghiệm của nhóm đối chứng dương được cho sử dụng 50 mg/kg sulfasalazin, một loại thuốc điều trị viêm đại tràng, thay cho vi khuẩn lactic.

(3) Phân tích đại tràng bằng mắt thường

Chiều dài và hình dáng của phần đại tràng được cắt ra được quan sát, và hình dáng được phân tích bằng cách ghi điểm theo các tiêu chí (Hollenbach và cộng sự, 2005, Tiêu chuẩn về cấp độ viêm đại tràng) được trình bày trên bảng 22 dưới đây. Sau khi loại

bỏ hoàn toàn các chất bên trong đại tràng, mô đại tràng được rửa bằng dung dịch muối. Một phần của mô đại tràng sạch được đặt trong dung dịch formandehit 4% để sử dụng nó như một mẫu mô bệnh và phần còn lại được sử dụng để phân tích sinh học phân tử trong điều kiện bảo quản đông lạnh ở -80°C .

Bảng 22

Điểm số quan	Tiêu chí
0	Bất kỳ vết loét và viêm nào đều được nhận thấy.
1	Có sự xung huyết nhưng không nhận thấy sự chảy máu.
2	Sự viêm loét có kèm sự xung huyết được nhận thấy.
3	Sự viêm được nhận thấy ở một vị trí.
4	Sự loét và viêm được nhận thấy ở hai hoặc nhiều vị trí.
5	Vết loét có kích thước tăng lên trên 2 cm.

(4) Đánh giá hoạt độ của myeloperoxidaza

100 mg mô đại tràng được hòa đồng thể trong 200 μl đệm kali phosphat 10 mM (pH 7,0) có chứa 0,5% hexadecyl trimetyl amoni bromua. Mô đồng thể được ly tâm với tốc độ 10.000 g ở 4°C trong 10 phút, và dịch nổi được thu lấy. 50 μl dịch nổi được thêm vào 0,95 ml dung dịch phản ứng (chứa 1,6 mM tetrametyl benzidin và 0,1mM H_2O_2) và phản ứng xảy ra ở 37°C , và đo sự hấp thụ ở bước sóng 650 nm tại các thời điểm khác nhau trong suốt thời gian phản ứng. Để tính toán hoạt độ của myeloperoxidaza, 1 $\mu\text{mol/ml}$ peroxit tạo ra bởi phản ứng này được sử dụng làm 1 đơn vị.

(5) Đánh giá dấu hiệu viêm

Sử dụng phương pháp Western blott, các dấu hiệu của sự viêm như p-p65, p65, iNOS, COX-2 và β -actin được đo. Cụ thể, dịch nổi được thu theo như thí nghiệm đo hoạt độ của myeloperoxidaza. 50 μg dịch nổi được thu và điện di trên gel polyacrylamit SDS 10% (w/v) trong 1 giờ 30 phút. Mẫu sau điện di được chuyển lên màng nitroxenluloza ở 100V và 400mA trong 1 giờ 10 phút. Màng nitroxenluloza đã lai mẫu được xử lý với sữa gầy 5% trong 30 phút, và sau đó được rửa 3 lần với PBS-Tween, 5 phút mỗi lần và được

ủ với dung dịch pha loãng 1:100 của kháng thể sơ cấp (Santa Cruz Biotechnology, Mỹ) qua đêm. Tiếp theo, màng được rửa 3 lần, 10 phút mỗi lần và ủ với dung dịch pha loãng 1: 1000 của kháng thể thứ cấp (Santa Cruz Biotechnology, Mỹ) trong 1 giờ 20 phút. Tiếp theo, màng được rửa ba lần, 15 phút mỗi lần, và được gắn với chất huỳnh quang và được hiển thị.

Ngoài ra, các xytokin liên quan đến sự viêm như TNF- α , IL-17, IL-10 và các chất tương tự được đo bằng kit ELISA.

(6) Phân tích các dấu hiệu điều hòa miễn dịch

Đại tràng đã cắt được rửa sạch hai lần với dung dịch EDTA 2,5 mM. Đại tràng đã rửa sạch được khuấy trộn trong môi trường RPMI chứa 1 mg/ml collagenaza tuýp VIII (Sigma) ở 30°C trong 20 phút và được lọc để tách riêng màng mô liên kết. Tiếp theo, màng mô liên kết được xử lý với dung dịch percoll 30-100% và được ly tâm phân tách lấy tế bào T. Các tế bào T đã được phân tách được nhuộm với kháng thể anti-FoxP3 hoặc anti-IL-17A, và sự phân bố của các tế bào Th17 và Treg được phân tích bằng hệ thống FACS (sàng lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang) (C6 Flow Cytometer® System, San Jose, CA, Mỹ).

(7) Kết quả thí nghiệm

Bảng 23 dưới đây thể hiện hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với trọng lượng của đại tràng, hình dáng của đại tràng, hoạt độ của myeloperoxidaza và lượng xytokin liên quan đến viêm khi các chủng vi khuẩn lactic được tiêm cho những động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra. Như được trình bày trên bảng 23 dưới đây, những động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra bị giảm trọng lượng, giảm điểm số đánh giá bằng mắt thường của đại tràng, giảm chiều dài đại tràng và tăng hoạt độ của mPO. Tuy nhiên, khi các chủng vi khuẩn lactic được sử dụng cho những động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra, thì tất cả các dấu hiệu này đã được cải thiện. Cụ thể, việc cho sử dụng *Bifidobacterium longum* LC67 đơn lẻ hoặc cho sử dụng hỗn hợp *Bifidobacterium longum* LC67 và *Lactobacillus plantarum* LC5 cho thấy hiệu quả tốt trong việc làm giảm viêm đại tràng. Ngoài ra, những động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra cho thấy sự tăng lên của TNF- α và IL-17 và sự giảm đi của IL-10. Tuy nhiên, khi các chủng vi khuẩn lactic

được sử dụng cho những động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra, thì tất cả các dấu hiệu này đã được cải thiện. Cụ thể, khi cho sử dụng *Bifidobacterium longum* LC67 đơn lẻ hoặc cho sử dụng hỗn hợp *Bifidobacterium longum* LC67 và *Lactobacillus plantarum* LC5, thì có sự giảm đáng kể TNF- α và IL-17, và tăng lên đáng kể IL-10.

Bảng 23

Nhóm thí nghiệm	Trọng lượng tăng thêm (g)	Điểm số quan sát	Chiều dài đại tràng (cm)	Hoạt độ của MPO (μ U/mg)	TNF- α (pg/mg)	IL-17 (pg/mg)	IL-10 (pg/mg)
Nhóm bình thường	0,64	5,9	0,14	0,42	35,1	18,4	61,2
Nhóm đối chứng âm	-2,46	4,2	2,32	1,54	95,5	65,2	30,7
Nhóm được cho sử dụng LC5	-1,90	4,65	1,30	0,91	75,5	52,8	43,9
Nhóm được cho sử dụng LC27	-1,0	4,56	1,08	0,82	67,2	50,4	44,0
Nhóm được cho sử dụng LC67	-0,28	4,92	0,50	0,43	48,5	38,5	54,6
Nhóm được cho sử dụng LC68	-1,02	4,5	1,34	1,04	54,4	50,5	48,1
Nhóm được cho sử dụng LC5+LC67	-0,3	5,08	0,84	0,42	45,1	37,3	55,3
Nhóm được cho sử dụng LC27+LC68	-1,15	4,8	1,17	0,78	59,8	45,0	50,0
Nhóm đối chứng dương	-0,91	4,58	1,43	0,95	58,2	48,5	45,5

Fig.22 thể hiện các dạng biệt hóa của tế bào T thành các tế bào Th17, cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra, và Fig.23 thể hiện các dạng biệt hóa của tế bào T thành tế bào Treg, cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra. Trên các Fig.22 và 23, "NOR" biểu thị cho nhóm bình thường; "TNBS" biểu thị cho nhóm đối chứng âm; "LC5" biểu thị cho nhóm được xử lý với *Lactobacillus plantarum* LC5; "LC27" biểu thị cho nhóm được xử lý với *Lactobacillus plantarum* LC27, "LC67" biểu thị cho nhóm được xử lý với *Bifidobacterium longum* LC67; "LC68" biểu thị cho nhóm được xử lý với *Bifidobacterium longum* LC68; "LC5 + LC67" biểu thị cho nhóm được xử lý với hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Lactobacillus plantarum* LC5 và *Bifidobacterium longum* LC67 với cùng một lượng; "LC27 + LC68" biểu thị cho nhóm được xử lý với hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Lactobacillus plantarum* LC27 và *Bifidobacterium longum* LC68 với cùng một lượng; và "SS" biểu thị cho nhóm được xử lý với sulfasalazin. Như được thể hiện trên các Fig.22 và 23, trong trường hợp động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra, sự biệt hóa tế bào T thành tế bào Th17 được thúc đẩy, và sự biệt hóa tế bào T thành tế bào Treg bị ức chế. Tuy nhiên, khi các chủng vi khuẩn lactic được sử dụng cho động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra, thì sự biệt hóa tế bào T thành tế bào Th17 bị ức chế, và sự biệt hóa tế bào T thành tế bào Treg được thúc đẩy. Đặc biệt, khi cho sử dụng *Bifidobacterium longum* LC67 đơn lẻ hoặc hỗn hợp *Bifidobacterium longum* LC67 và *Lactobacillus plantarum* LC5, sự biệt hóa tế bào T thành tế bào Th17 bị ức chế đáng kể và sự biệt hóa tế bào T thành tế bào Treg được thúc đẩy đáng kể.

Fig.24 thể hiện các dấu hiệu đáp ứng viêm cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic trên động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp tính do TNBS gây ra. Trên Fig.24, "NOR" biểu thị cho nhóm bình thường; "T" biểu thị cho nhóm đối chứng âm; "LC5" biểu thị cho nhóm được xử lý với *Lactobacillus plantarum* LC5; "LC27" biểu thị cho nhóm được xử lý với *Lactobacillus plantarum* LC27, "LC67" biểu thị cho nhóm được xử lý với *Bifidobacterium longum* LC67; "LC68" biểu thị cho nhóm được xử lý với *Bifidobacterium longum* LC68; "LC5 + LC67" biểu thị cho nhóm được xử lý với hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Lactobacillus plantarum* LC5 và *Bifidobacterium longum* LC67 với cùng một lượng; "LC27 + LC68" biểu thị cho nhóm

được xử lý với hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Lactobacillus plantarum* LC27 và *Bifidobacterium longum* LC68 với cùng một lượng; và "SS" biểu thị cho nhóm được xử lý với sulfasalazin. Như được thể hiện trên Fig.24, trong trường hợp động vật mô hình bị viêm đại tràng cấp do TNBS gây ra, NF- κ B đã được hoạt hóa (p-p65) và mức độ biểu hiện của COX-2 và iNOS tăng lên. Tuy nhiên, khi được cho sử dụng các chủng vi khuẩn lactic, sự hoạt hóa của NF- κ B (p-p65) đã bị ức chế, và mức độ biểu hiện của COX-2 và iNOS cũng giảm. Đặc biệt, việc cho sử dụng *Bifidobacterium longum* LC67 đơn lẻ hoặc cho sử dụng hỗn hợp *Bifidobacterium longum* LC67 và *Lactobacillus plantarum* LC5 có hiệu quả tốt đối với sự ức chế việc hoạt hóa NF- κ B (p-p65) và ức chế sự biểu hiện COX-2 và iNOS.

7. Đánh giá *in vivo* hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với việc làm giảm viêm loét dạ dày do rượu

(1) Động vật thí nghiệm

Chuột đực C57BL/6 5 tuần tuổi được mua từ OrientBio (nặng 24-27g) và được nuôi trong điều kiện môi trường được kiểm soát (độ ẩm: $50 \pm 10\%$, nhiệt độ: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, chu kỳ sáng tối 12 giờ/12 giờ) và sau đó được sử dụng trong thí nghiệm. Các loại thức ăn chăn nuôi thí nghiệm tiêu chuẩn (Samyang, Hàn Quốc) để sử dụng làm thức ăn và các động vật mô hình được uống nước tùy thích. Trong tất cả các thí nghiệm, một nhóm bao gồm 6 cá thể.

(2) Gây viêm loét dạ dày bằng rượu và sử dụng mẫu

Một nhóm thí nghiệm được cho uống 1×10^9 CFU hỗn dịch chủng *Lactobacillus plantarum* LC27 trong dung dịch muối mỗi ngày một lần trong 3 ngày. Một nhóm thí nghiệm khác được cho uống 1×10^9 CFU hỗn dịch chủng *Bifidobacterium longum* LC67 trong dung dịch muối mỗi ngày một lần trong 3 ngày. Một nhóm thí nghiệm khác được cho uống 1×10^9 CFU hỗn dịch là hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Lactobacillus plantarum* LC27 và *Bifidobacterium longum* LC67 trong dung dịch muối mỗi ngày một lần trong 3 ngày. Ngoài ra, nhóm bình thường và nhóm đối chứng âm được cho uống 0,2 ml dung dịch muối mỗi ngày một lần trong 3 ngày. Sau khi mẫu được cho uống trong 3 ngày, những cá thể chuột thí nghiệm bị bỏ đói và không cho uống nước trong 18 giờ. Vào ngày thứ 4 của thí nghiệm, 1 giờ sau khi cho uống dung dịch muối, 0,2

ml etanol tinh khiết 99% được cho uống ở các cá thể chuột của tất cả các nhóm thí nghiệm so với nhóm bình thường để gây viêm loét dạ dày. Ngoài ra, đối với nhóm bình thường, 0,2 ml dung dịch muối được cho uống thay cho etanol.

(3) Đánh giá dấu hiệu nhìn thấy bằng mắt thường liên quan đến viêm loét dạ dày

3 giờ sau khi cho dùng etanol, cá thể chuột thí nghiệm được giết, và cắt mô dạ dày theo chiều dọc, và rửa bằng dung dịch muối đệm PBS, và sau đó mức độ tổn thương dạ dày đã được quan sát trực tiếp hoặc qua kính hiển vi và được ghi lại (xem Park, S.W., Oh, T.Y., Kim, Y.S., Sim, H. và cộng sự, Chiết xuất từ *Artemisia asiatica* bảo vệ chống lại thương tổn do etanol gây ra trên niêm mạc dạ dày của chuột. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008, 23, 976-984).

(4) Đánh giá hoạt độ của Myeloperoxidaza

100 mg dạ dày được hòa đồng thể trong 200 μ l đệm kali phosphat 10 mM (pH 7,0) có chứa 0,5% hexadecyl trimetyl amoni bromua. Sau đó, dung dịch mô được ly tâm với tốc độ 10.000 g ở 4°C trong 10 phút, và dịch nổi được thu lấy. 50 μ l dịch nổi được thêm vào 0,95 ml dung dịch phản ứng (chứa 1,6mM tetrametyl benzidin và 0,1mM H_2O_2) và phản ứng xảy ra ở 37°C, và đo sự hấp thụ ở bước sóng 650 nm tại các thời điểm khác nhau trong suốt thời gian phản ứng. Để tính toán hoạt độ của myeloperoxidaza, 1 μ mol/ml peroxit tạo ra bởi phản ứng này được sử dụng làm 1 đơn vị.

(5) Đánh giá dấu hiệu viêm

2 μ g mRNA đã được phân lập từ mô dạ dày bằng một kit Mini Qiagen RNeasy và được tổng hợp thành cADN bằng việc sử dụng enzym Takara Prime Script Rtase. Tiếp theo, sử dụng rtPCR (phản ứng kéo dài chuỗi bằng enzym polymeraza thời gian thực để định lượng trực tiếp) (Máy Qiagen Thermal Cycler, tác nhân phản ứng Takara SYBER, các điều kiện nhiệt cho chu trình: hoạt hóa enzym ADN polymeraza ở 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ khuếch đại: 95°C trong 10 giây và 60°C trong 45 giây), đo mức độ biểu hiện của CXCL4 [chemokin (CXC motif) 4 phối tử] và TNF- α (nhân tố hoại tử khối u-alpha). Bảng 24 dưới đây thể hiện trình tự các môi được sử dụng để phân tích từng xytokin trong phản ứng kéo dài chuỗi bằng enzym polymeraza thời gian thực để định lượng trực tiếp.

Bảng 24

Xytokin được phân tích	Loại môi	Trình tự nucleotit môi
TNF- α	Môi xuôi	5'-CTGTAGCCCCACGTCGTAGC-3'
	Môi ngược	5'-TTGAGATCCATGCCGTTG-3'
CXCL4	Môi xuôi	5'-AGTCCTGAGCTGCTGCTTCT-3'
	Môi ngược	5'-GATCTCCATCGCTTTCTTCG-3'

(6) Kết quả thí nghiệm

Fig.25 là hình ảnh cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày của những cá thể chuột bị viêm loét dạ dày do etanol gây ra trong thí nghiệm thứ hai của sáng chế; Fig.26 thể hiện mức độ tổn thương trên toàn bộ dạ dày được tính theo điểm số cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày của chuột bị viêm loét dạ dày do etanol gây ra trong thí nghiệm thứ hai của sáng chế; Fig.27 thể hiện chỉ số loét cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày của chuột bị viêm loét dạ dày do etanol gây ra trong thí nghiệm thứ hai của sáng chế; và Fig.28 thể hiện chỉ số hoạt động mô học cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày của chuột bị viêm loét dạ dày do etanol gây ra trong thí nghiệm thứ hai của sáng chế. Hơn nữa, Fig.29 thể hiện hoạt động của enzym myeloperoxidaza cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày chuột bị viêm loét dạ dày được cảm nhiễm bởi etanol trong thí nghiệm thứ hai của sáng chế. Ngoài ra, Fig.30 thể hiện mức độ biểu hiện của CXCL4 cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với niêm mạc dạ dày của chuột bị loét dạ dày gây ra bởi etanol trong thí nghiệm thứ hai của sáng chế, và Fig.31 cho thấy mức độ biểu hiện của TNF- α cho thấy hiệu quả của các chủng vi khuẩn axit lactic đối với niêm mạc dạ dày của những cá thể chuột bị viêm loét dạ dày do etanol gây ra trong thí nghiệm thứ hai của sáng chế. Trên Fig.30 và 31, mức độ biểu hiện CXCL4 và mức độ biểu hiện TNF- α trong các nhóm thí nghiệm so với nhóm bình thường là sự thay đổi xoắn gấp một cách rõ ràng liên quan đến mức độ biểu hiện ở nhóm bình thường. Trên các Fig.25 đến 31, "NOR" biểu thị cho nhóm bình thường; "Etanol" biểu thị cho nhóm đối chứng âm bị viêm loét dạ dày do etanol gây ra và được cho sử dụng nước muối; "Etanol + Ranitidin" biểu thị cho

nhóm thí nghiệm bị viêm loét dạ dày do etanol gây ra và được cho sử dụng Ranitidin; "Etanol + LC27" biểu thị cho nhóm thí nghiệm bị viêm loét dạ dày do etanol gây ra và được cho sử dụng *Lactobacillus plantarum* LC27; "Etanol + LC67" biểu thị cho nhóm thí nghiệm bị viêm loét dạ dày do etanol gây ra và được cho sử dụng *Bifidobacterium longum* LC67; và "Etanol + LC27/LC67" biểu thị cho nhóm thí nghiệm bị viêm loét dạ dày do etanol gây ra và được cho sử dụng hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Lactobacillus plantarum* LC27 và *Bifidobacterium longum* LC67 với cùng một lượng. Như được thể hiện trên các Fig.25-29, *Bifidobacterium longum* LC67, *Lactobacillus plantarum* LC27 hoặc hỗn hợp của nó làm giảm có hiệu quả tổn thương dạ dày hoặc viêm loét dạ dày do etanol gây ra. Hơn nữa, như được thể hiện trên Fig.30 và 31, *Bifidobacterium longum* LC67, *Lactobacillus plantarum* LC27 hoặc một hỗn hợp của nó làm giảm đáng kể mức độ viêm ở những cá thể chuột bị tổn thương dạ dày hoặc viêm loét dạ dày do etanol gây ra.

8. Đánh giá *in vivo* hiệu quả của các chủng vi khuẩn lactic đối với việc làm giảm sự tổn thương gan do rượu

(1) Động vật thí nghiệm

Chuột đực C57BL/6 5 tuần tuổi được mua từ OrientBio (nặng 24-27g) và được nuôi trong điều kiện môi trường được kiểm soát (độ ẩm: 50±10%, nhiệt độ: 25 ± 2°C, chu kỳ sáng tối 12 giờ/12 giờ) và sau đó được sử dụng trong thí nghiệm. Các loại thức ăn chăn nuôi thí nghiệm tiêu chuẩn (Samyang, Hàn Quốc) để sử dụng làm thức ăn và các động vật mô hình được uống nước tùy thích. Trong tất cả các thí nghiệm, một nhóm bao gồm 6 cá thể.

(2) Gây tổn thương bằng rượu và việc cho sử dụng các mẫu

Một nhóm thí nghiệm được cho uống 1×10^9 CFU hỗn dịch chủng *Lactobacillus plantarum* LC27 trong dung dịch muối mỗi ngày một lần trong 3 ngày. Một nhóm thí nghiệm khác được cho uống 1×10^9 CFU hỗn dịch chủng *Bifidobacterium longum* LC67 trong dung dịch muối mỗi ngày một lần trong 3 ngày. Một nhóm thí nghiệm khác được cho uống 1×10^9 CFU hỗn dịch là hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn *Lactobacillus plantarum* LC27 và *Bifidobacterium longum* LC67 trong dung dịch muối mỗi ngày một lần trong 3 ngày. Đối với nhóm đối chứng dương, silymarin, tác nhân

thương mại dùng để điều trị tổn thương gan, được cho uống mỗi ngày một lần trong 3 ngày với lượng 50 mg/kg. Ngoài ra, nhóm bình thường và nhóm đối chứng âm được cho uống 0,1 ml dung dịch muối mỗi ngày một lần trong 3 ngày. 3 giờ sau 3 ngày cho uống mẩu hoặc dung dịch muối, etanol được tiêm vào trong màng bụng của chuột ở tất cả các nhóm thí nghiệm với liều 6 mg/kg để gây tổn thương gan. Ngoài ra, đối với nhóm bình thường, dung dịch muối thay cho etanol được tiêm vào trong màng bụng với liều 6 mg/kg. Tiếp theo, chuột thí nghiệm được bỏ đói và không cho uống nước trong 12 giờ, và sau đó được giết, và máu được lấy từ tim.

(3) Đánh giá các dấu hiệu chức năng gan và kết quả

Mẫu máu đã lấy được để ở nhiệt độ phòng trong 60 phút, và ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 15 phút để tách huyết thanh. Mức GPT và mức GOT trong huyết thanh đã phân tách được đo bằng bộ cung cụ (kit) định lượng máu (kit đo ALT & AST, Công ty Dược phẩm Asan Co., Korea), và kết quả đo được trình bày trên bảng 25 dưới đây. Như được trình bày trên bảng 25 dưới đây, *Bifidobacterium longum* LC67, *Lactobacillus plantarum* LC27 hoặc hỗn hợp của nó làm giảm một cách có hiệu quả tổn thương gan do etanol gây ra. Cụ thể là, *Bifidobacterium longum* LC67 cho thấy hiệu quả tốt hơn silymarin vốn là tác nhân thương mại dùng để điều trị tổn thương gan.

Bảng 25

Nhóm thí nghiệm	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)
Nhóm bình thường	52,1	42,2
Nhóm đối chứng âm	107,7	156,3
Nhóm được sử dụng etanol và LC27	82,3	95,4
Nhóm được sử dụng etanol và LC67	62,5	65,8
Nhóm được sử dụng etanol và LC27/LC67	71,4	78,3
Nhóm được sử dụng etanol và silymarin	79,5	87,5

* LC27: *Lactobacillus plantarum* LC27

* LC67: *Bifidobacterium longum* LC67

* LC27/LC67: hỗn hợp vi khuẩn lactic được tạo ra bằng cách trộn chủng *Lactobacillus plantarum* LC27 và *Bifidobacterium longum* LC67 với cùng một lượng.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả ở trên thông qua các ví dụ tham chiếu, nhưng phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này, và có thể có nhiều biến thể khác nhau mà không nằm ngoài phạm vi và ý tưởng của sáng chế. Do đó, phạm vi bảo hộ của sáng chế chỉ được xác định bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi khuẩn *Bifidobacterium longum* LC67 với mã số truy cập là KCCM 11802P, hoặc sản phẩm nuôi cấy của chúng.
2. Dược phẩm dùng để điều trị một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm tổn thương ruột, tổn thương gan, bệnh dị ứng, bệnh viêm, trong đó dược phẩm chứa vi khuẩn *Bifidobacterium longum* LC67 với mã số truy cập là KCCM 11802P, hoặc sản phẩm nuôi cấy của chúng.
3. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó còn bao gồm một hay nhiều vi khuẩn lactic được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus brevis* CH23 với mã số truy cập là KCCM 11762P, *Bifidobacterium longum* CH57 với mã số truy cập là KCCM 11764P, *Lactobacillus plantarum* LC5 với mã số truy cập là KCCM 11800P.
4. Thực phẩm chứa vi khuẩn *Bifidobacterium longum* LC67 với mã số truy cập là KCCM 11802P, hoặc sản phẩm nuôi cấy của chúng theo điểm 1.

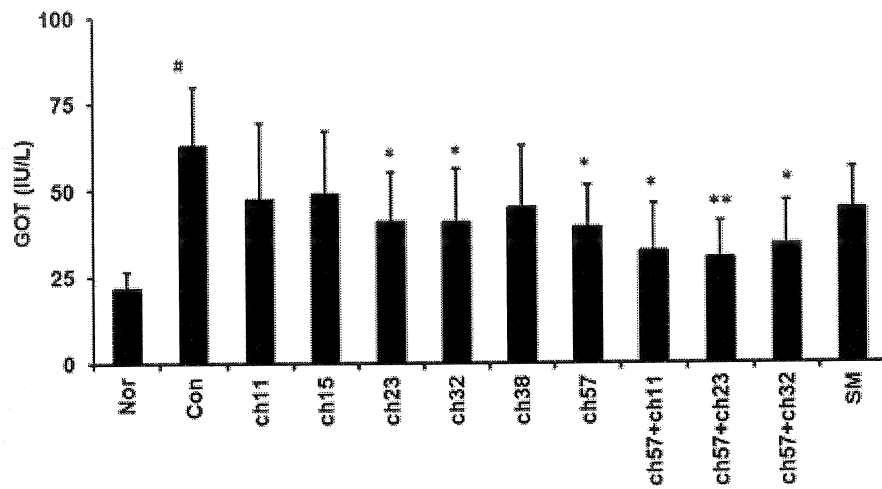


Fig.1

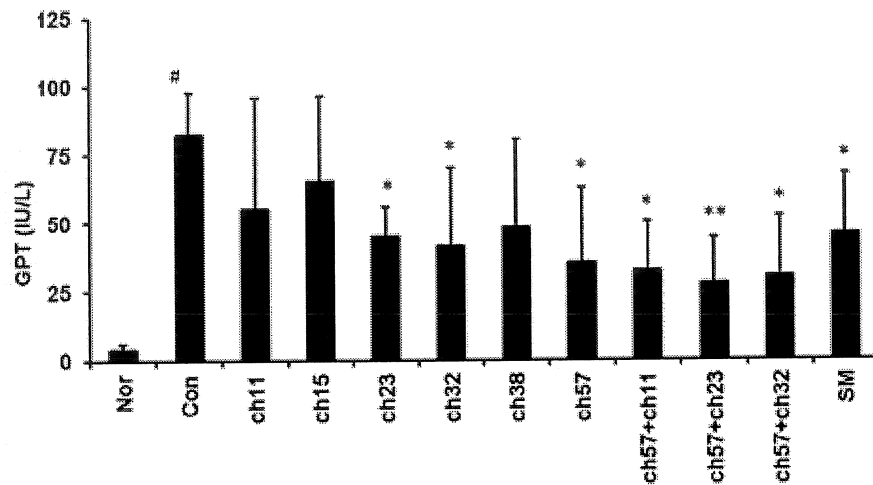


Fig.2

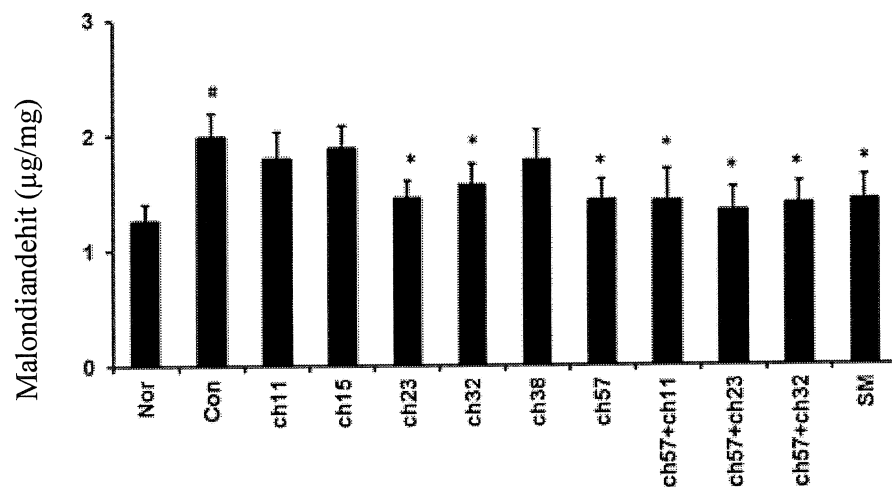


Fig.3

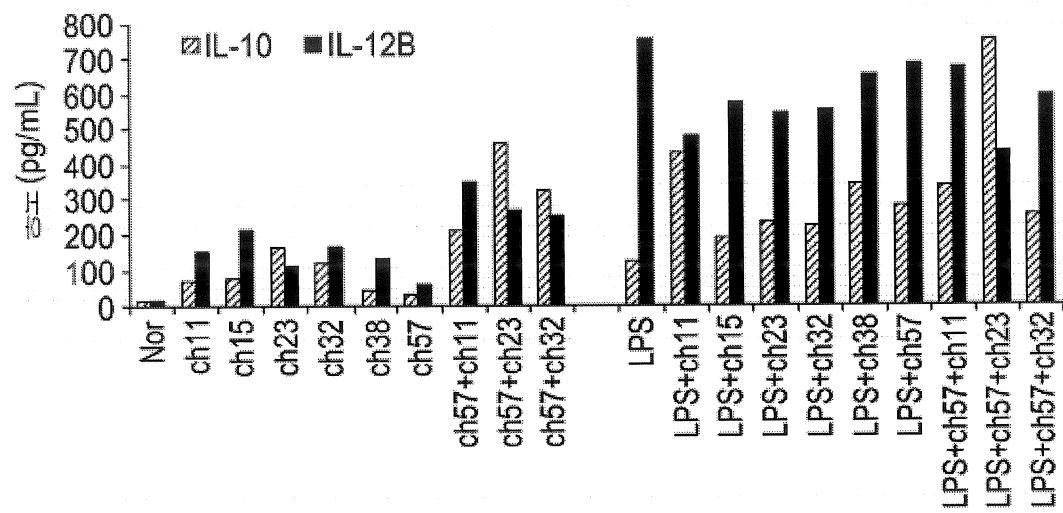


Fig. 4

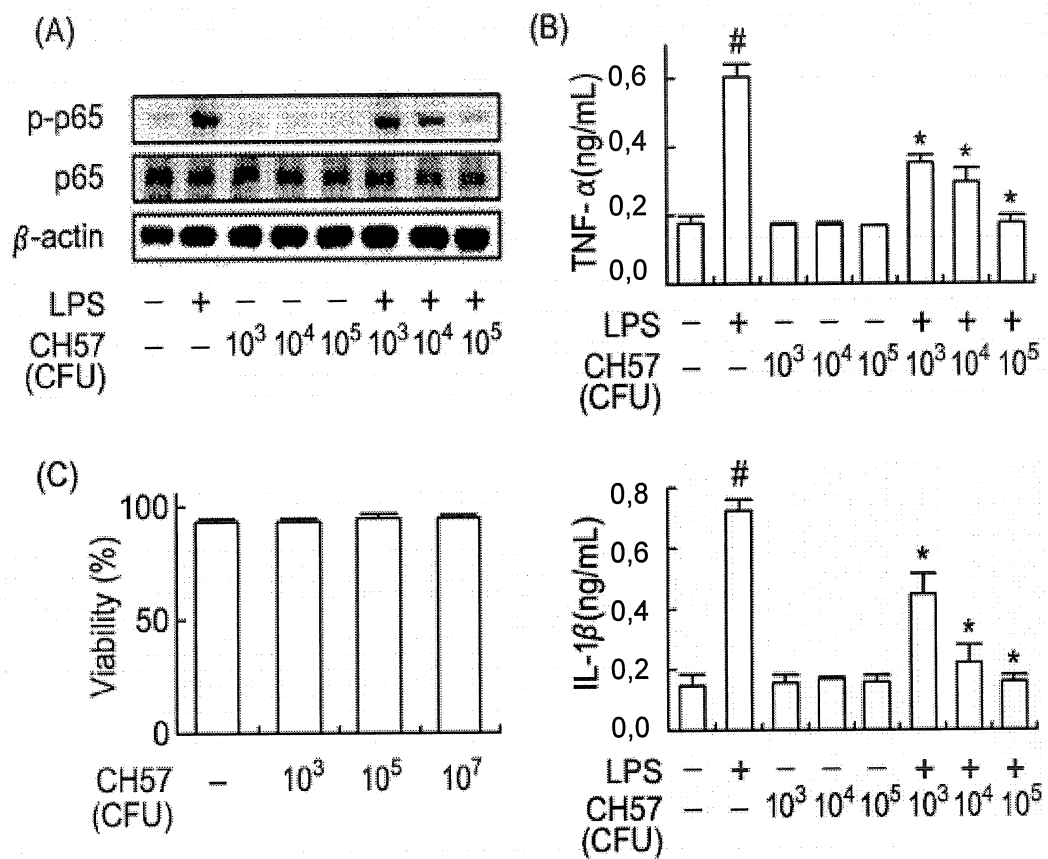


Fig. 5

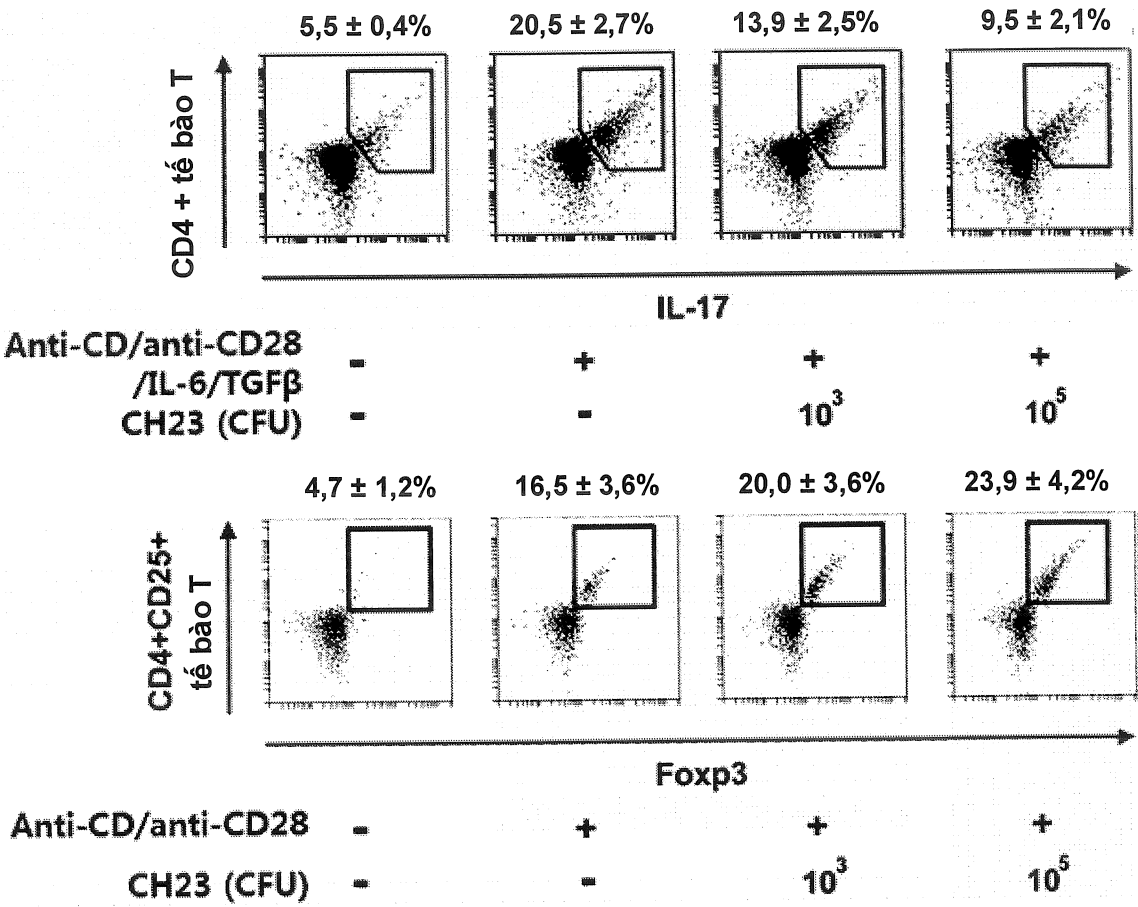


Fig.6

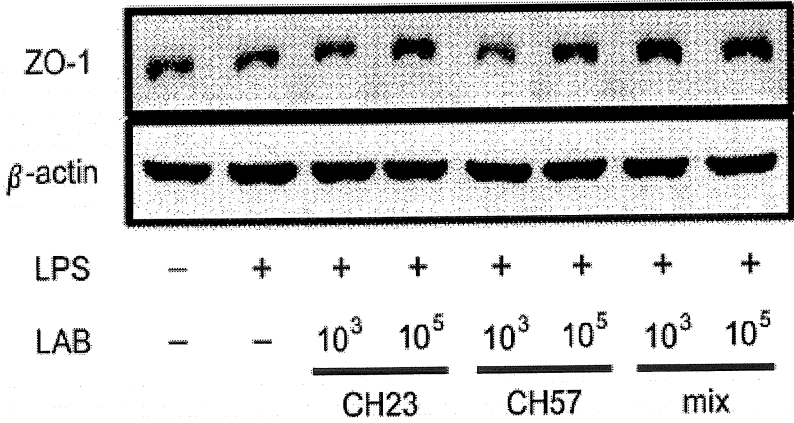


Fig.7

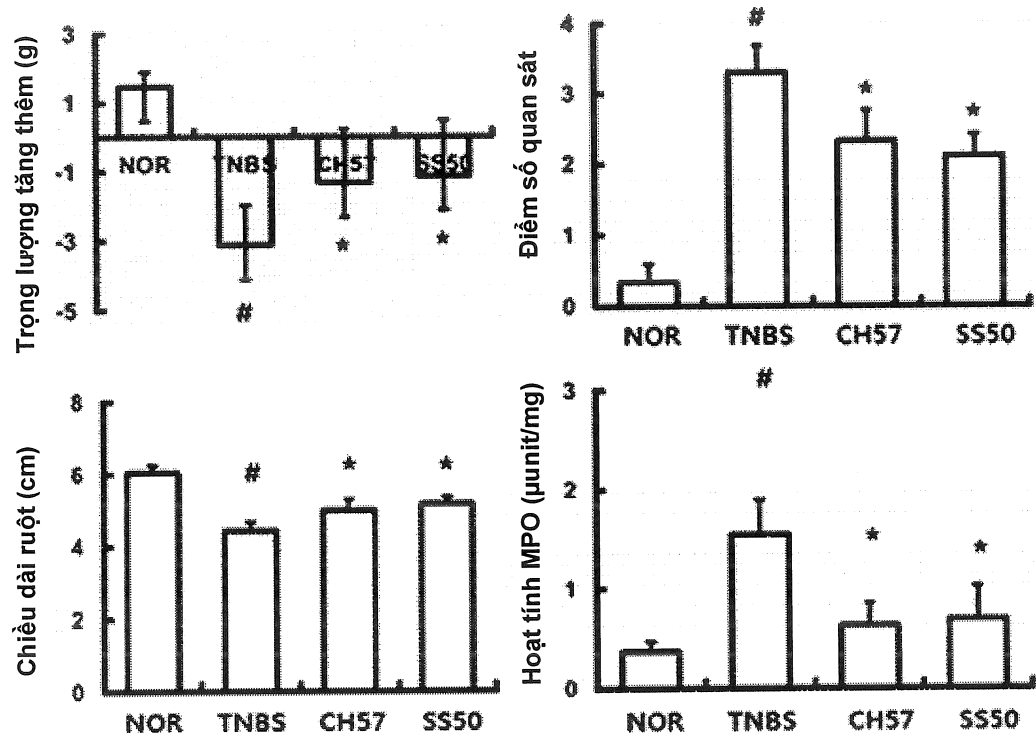


Fig.8

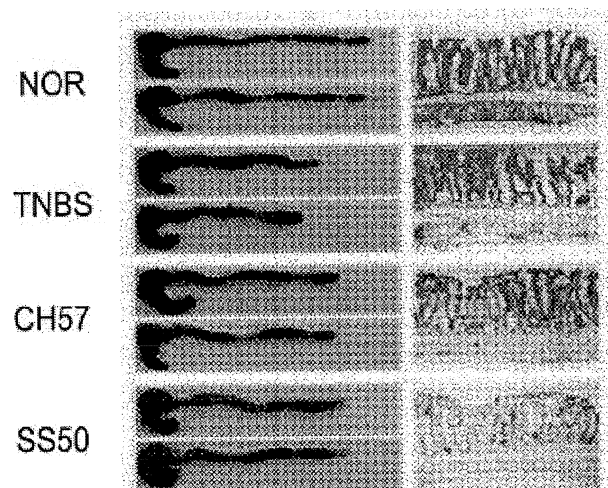


Fig.9

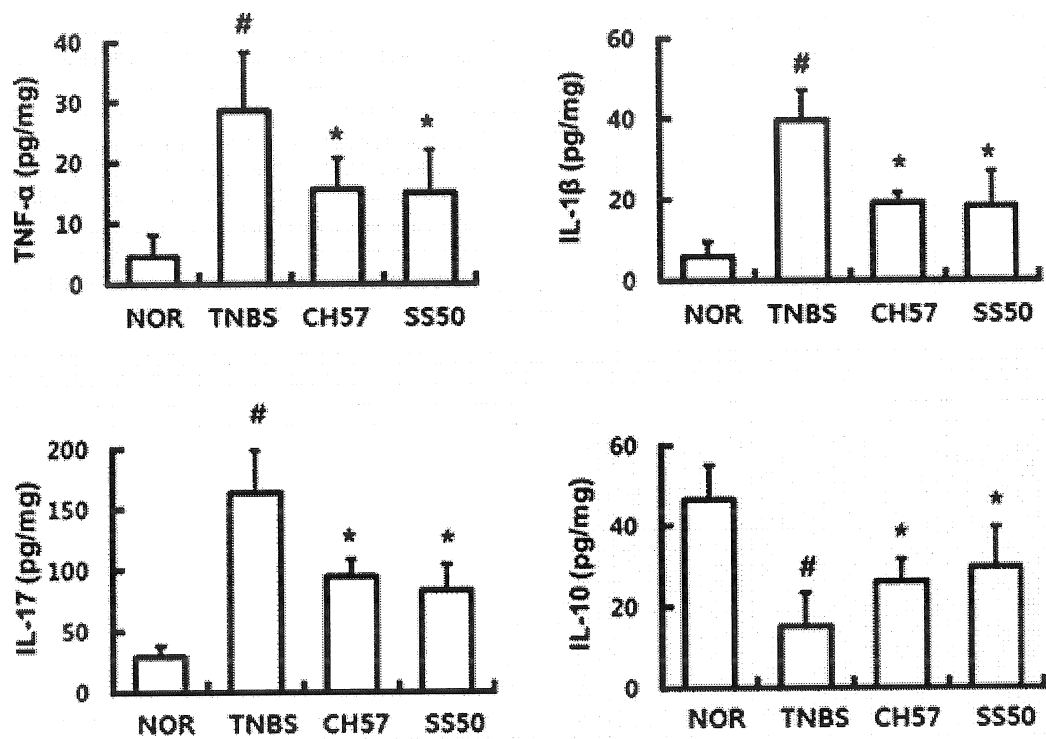


Fig.10

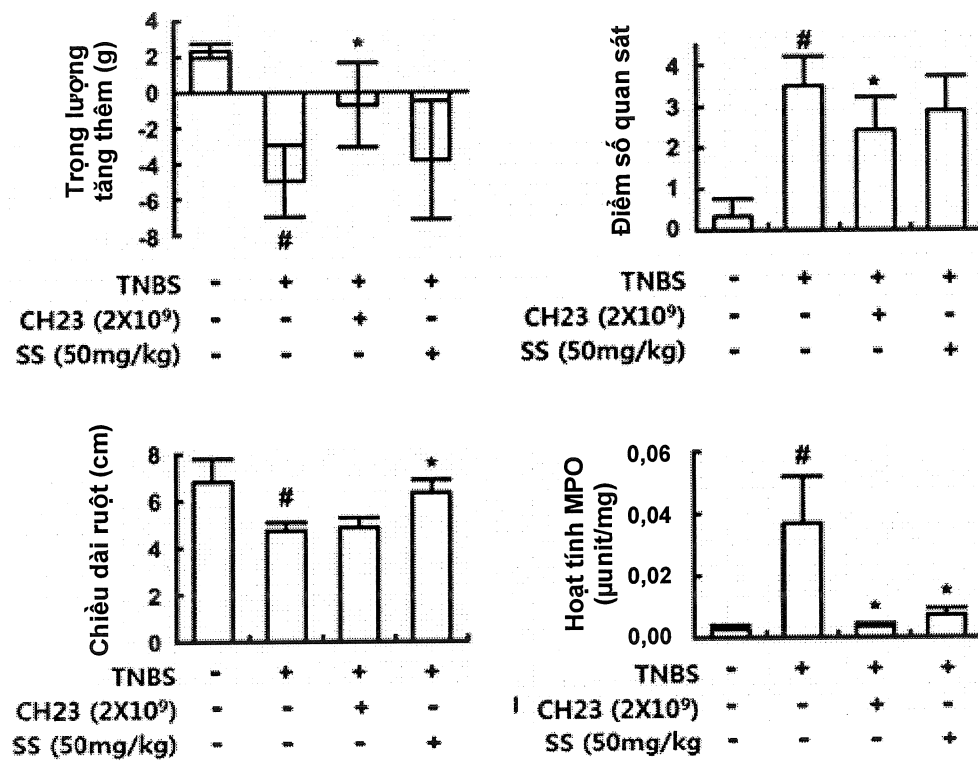


Fig.11

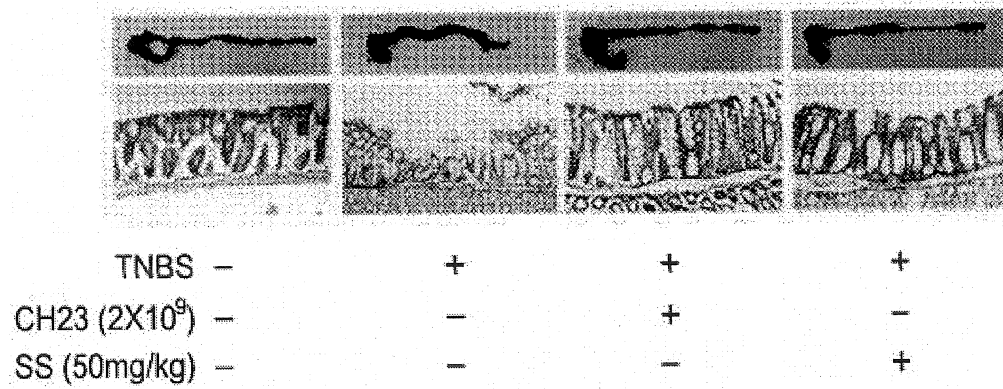


Fig.12

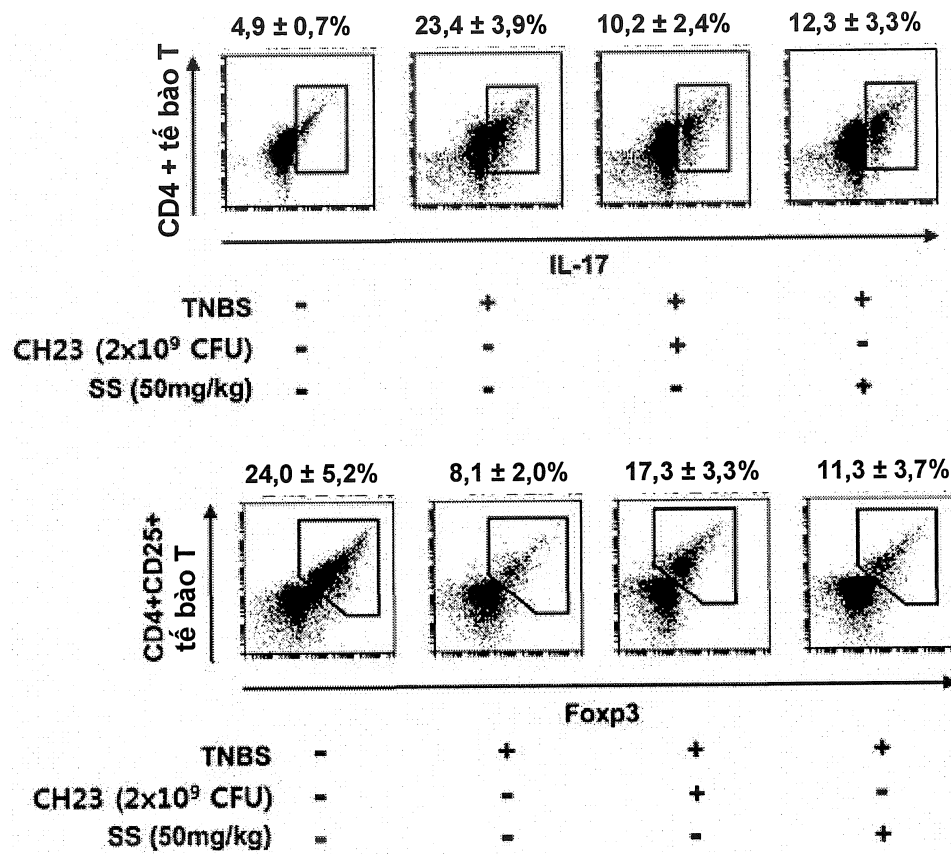


Fig.13

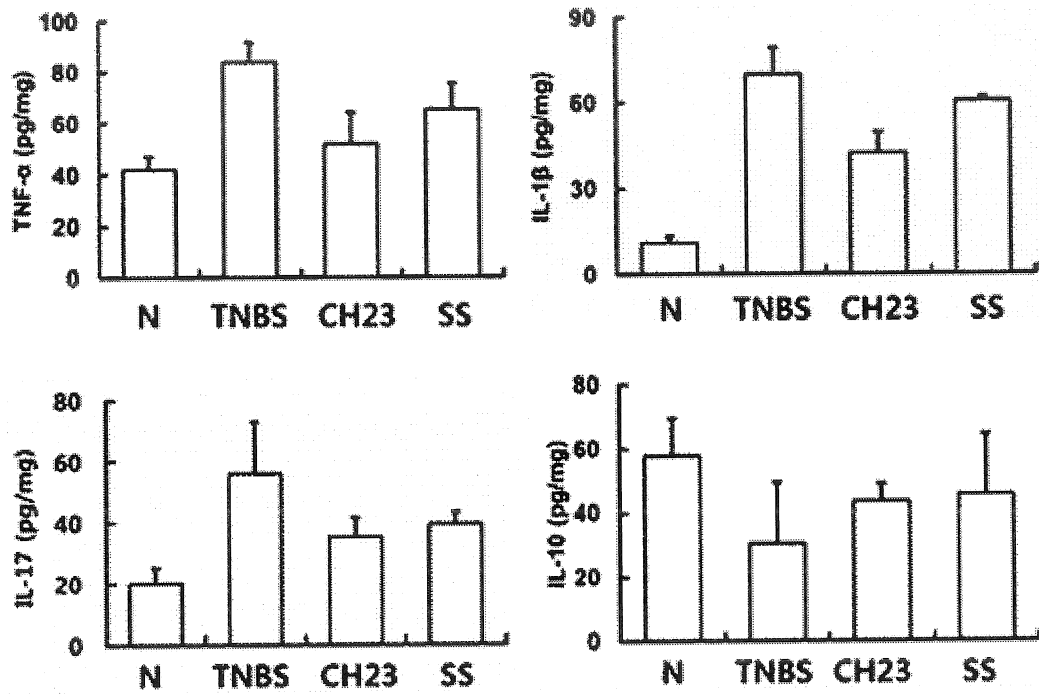


Fig.14

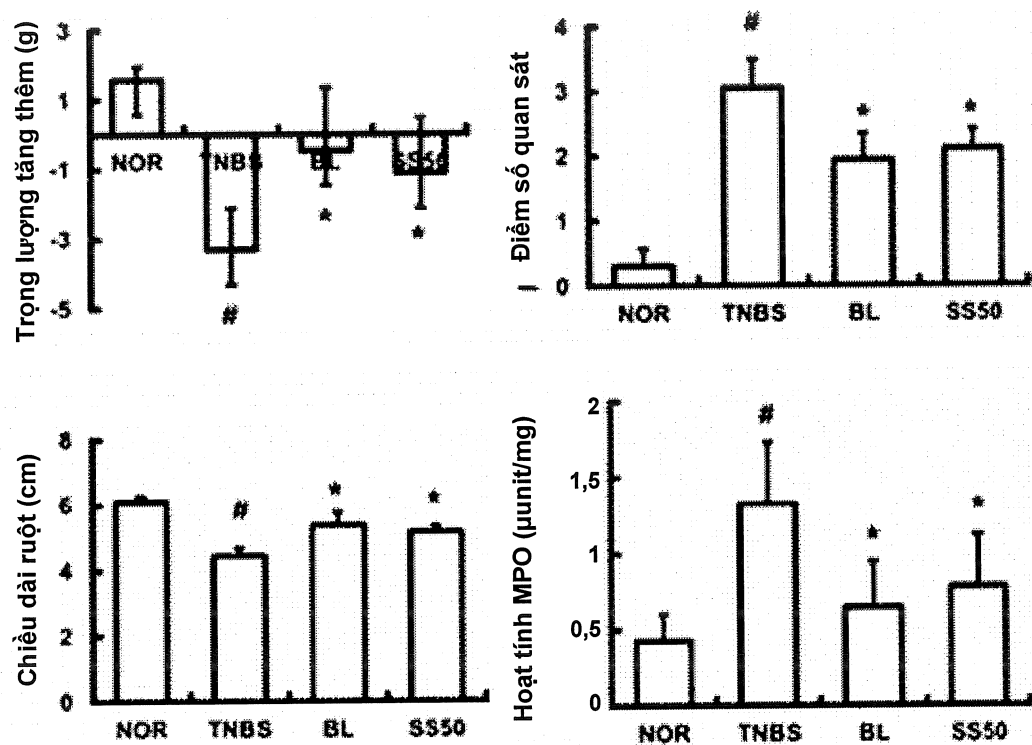


Fig.15

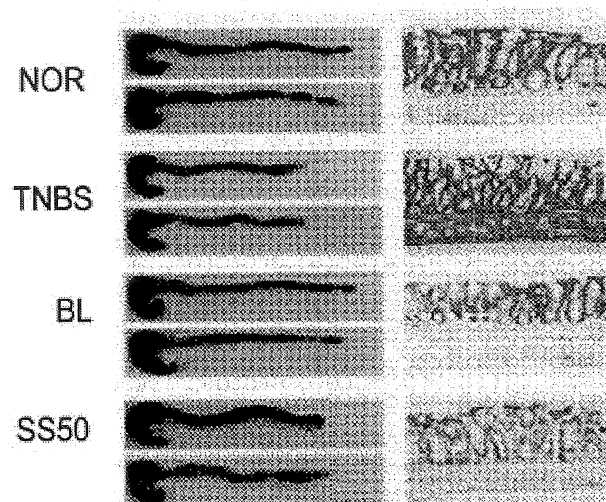


Fig.16

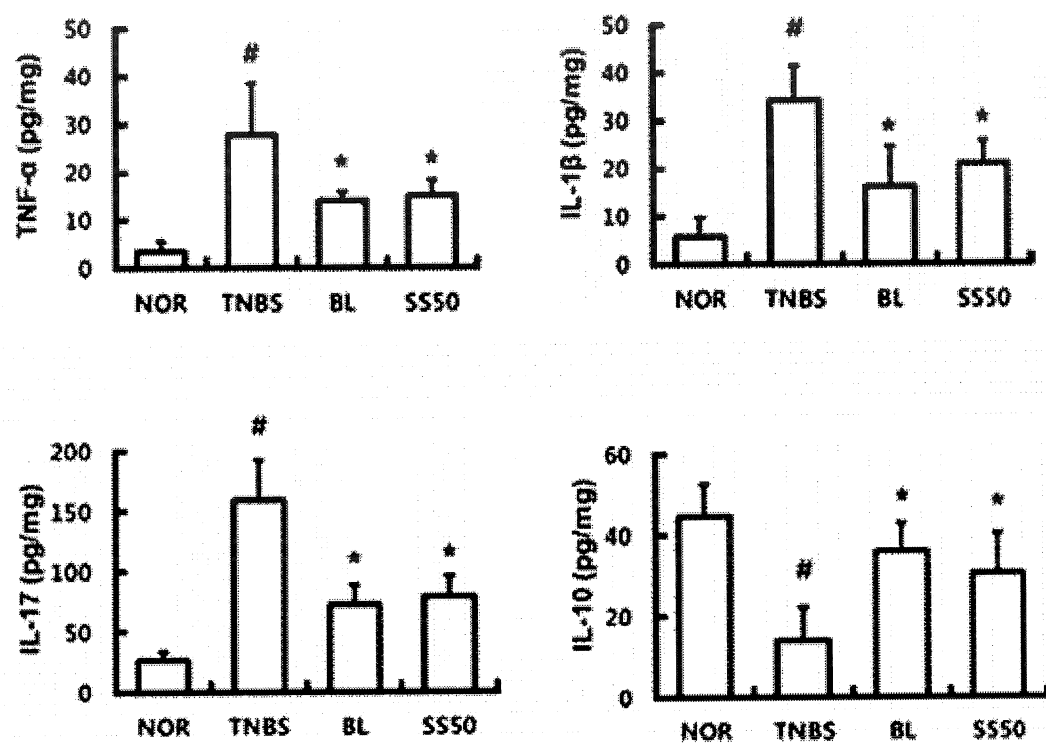


Fig.17

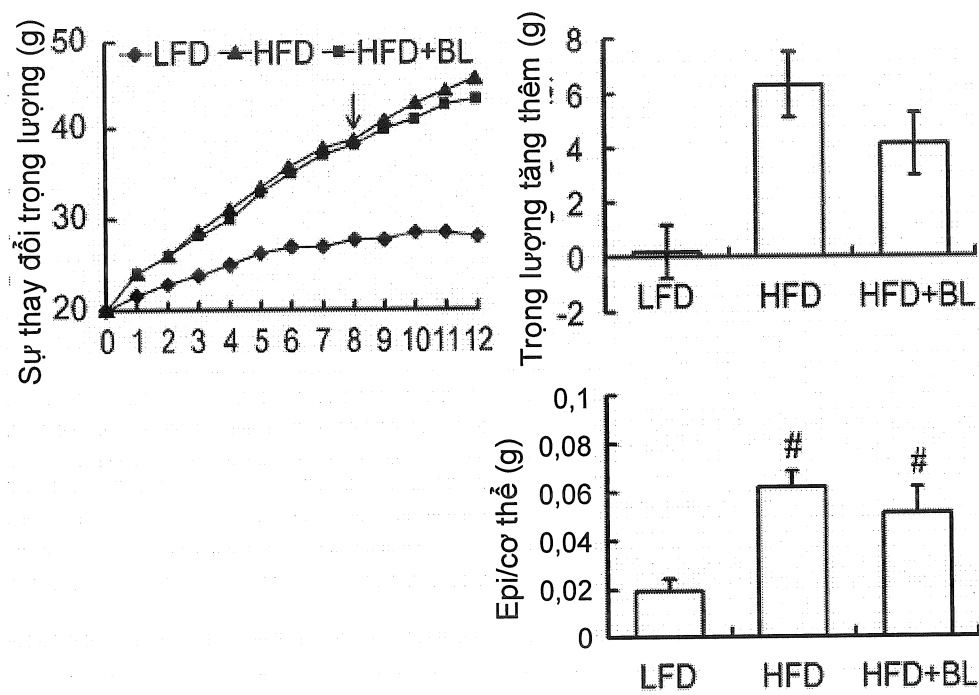


Fig.18

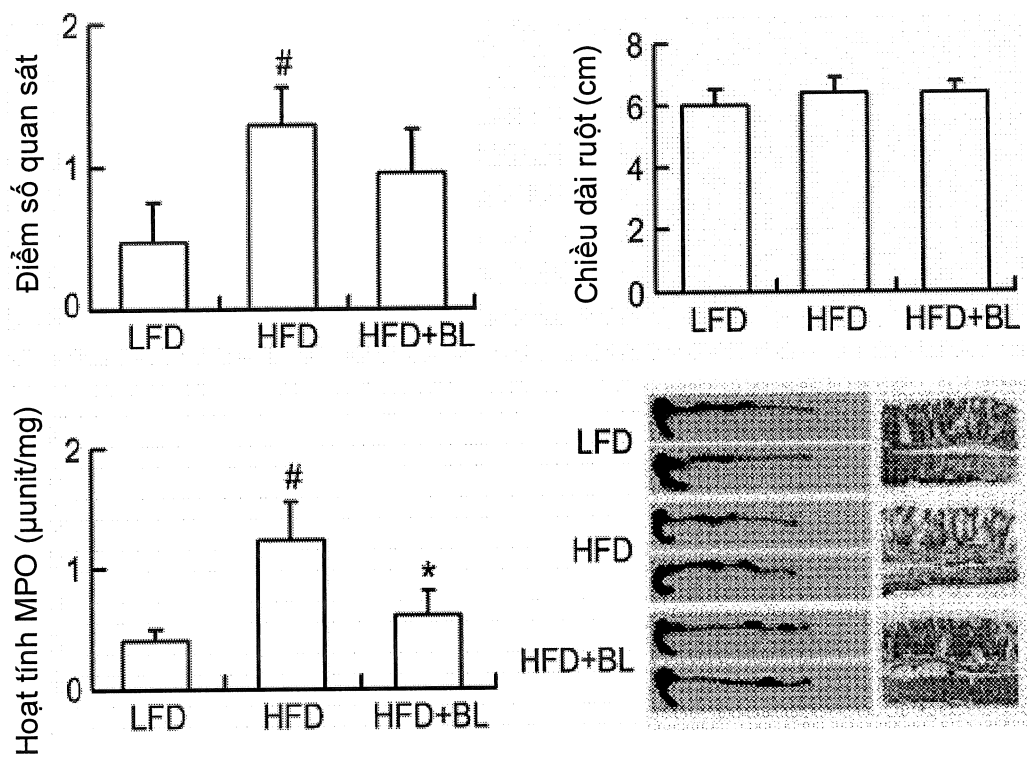


Fig.19

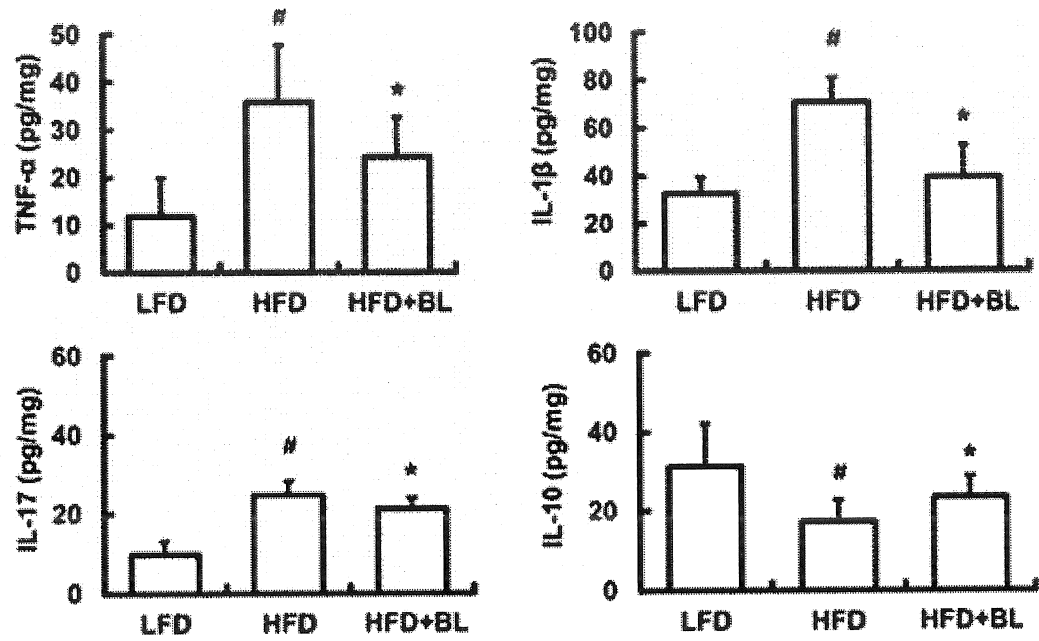


Fig.20

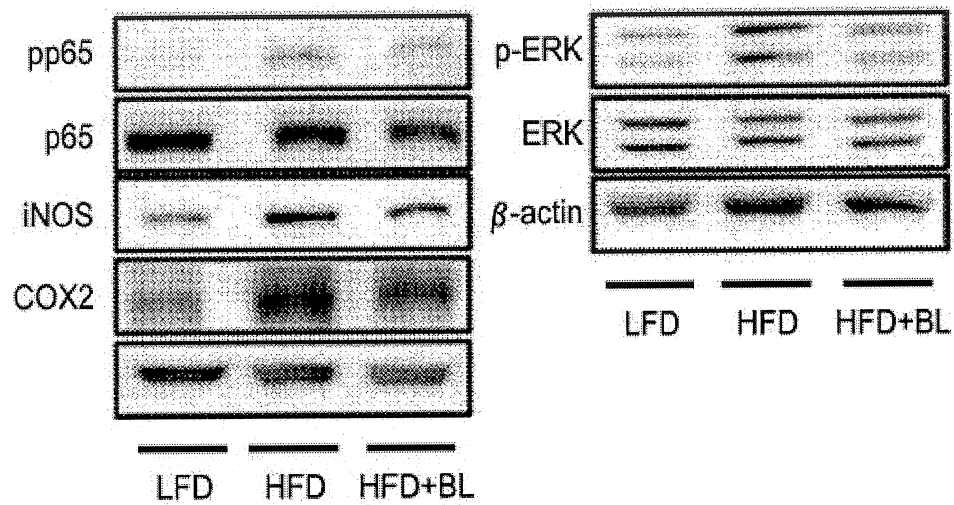


Fig.21

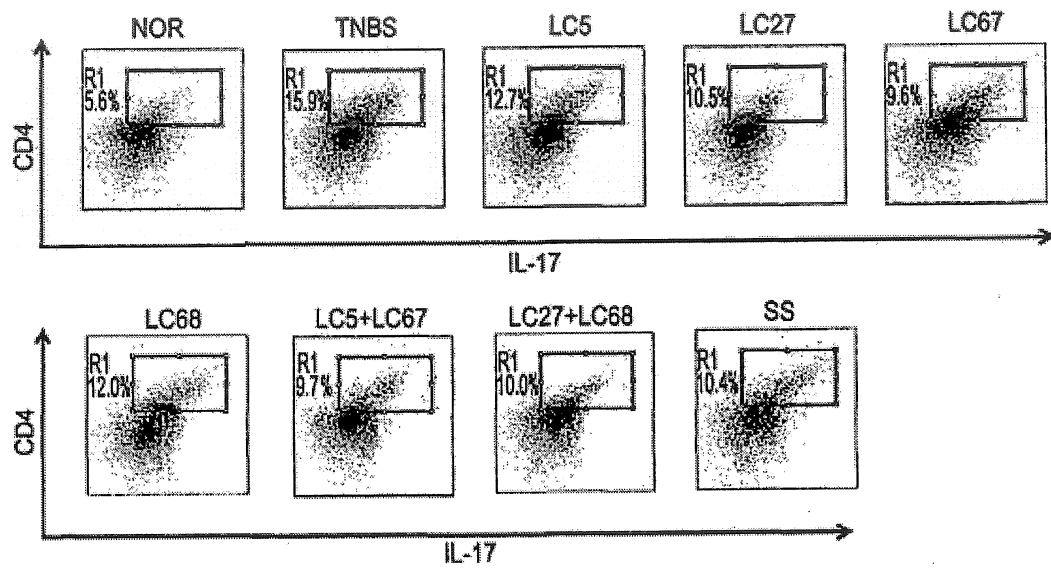


Fig.22

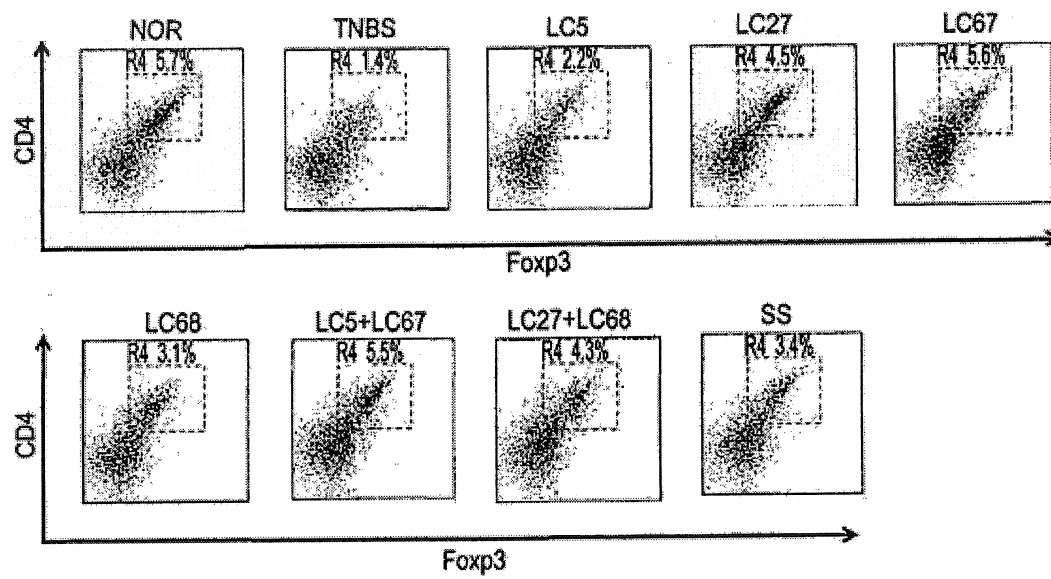


Fig.23

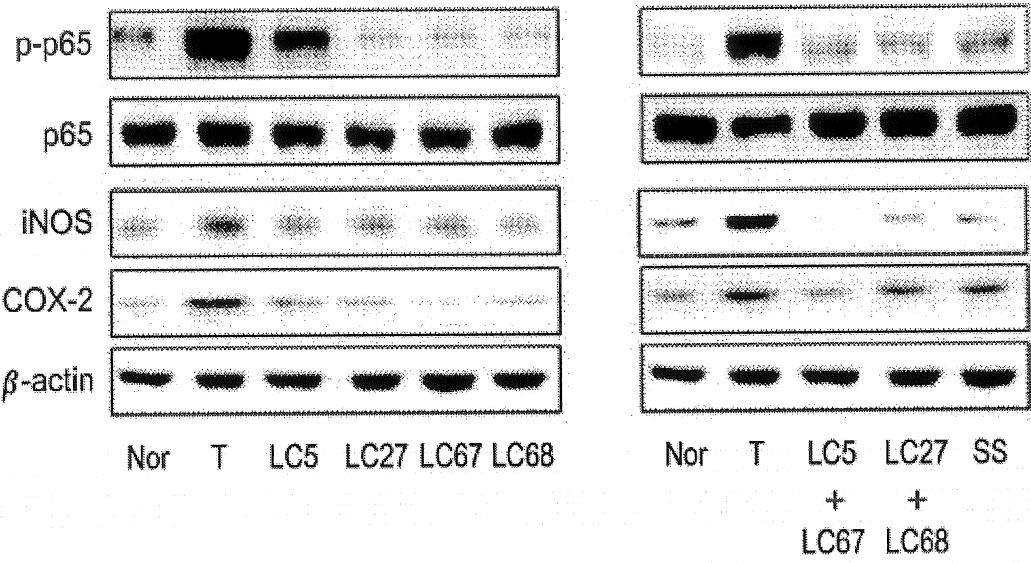


Fig.24

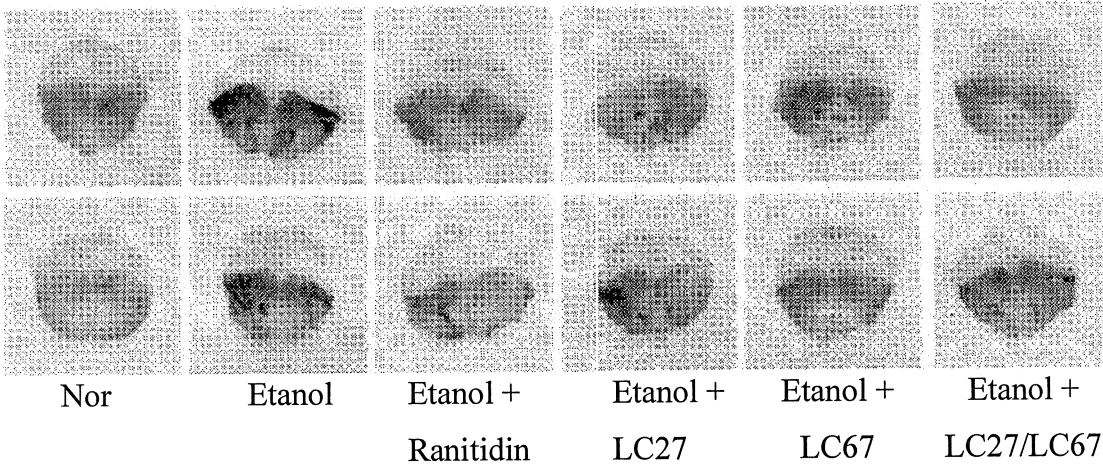


Fig.25

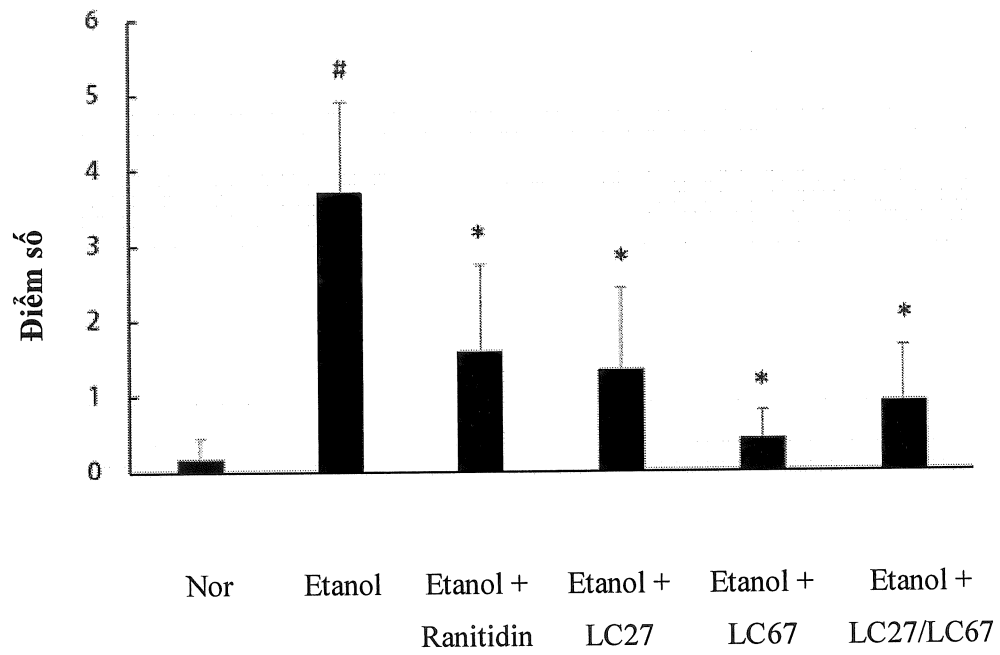


Fig.26

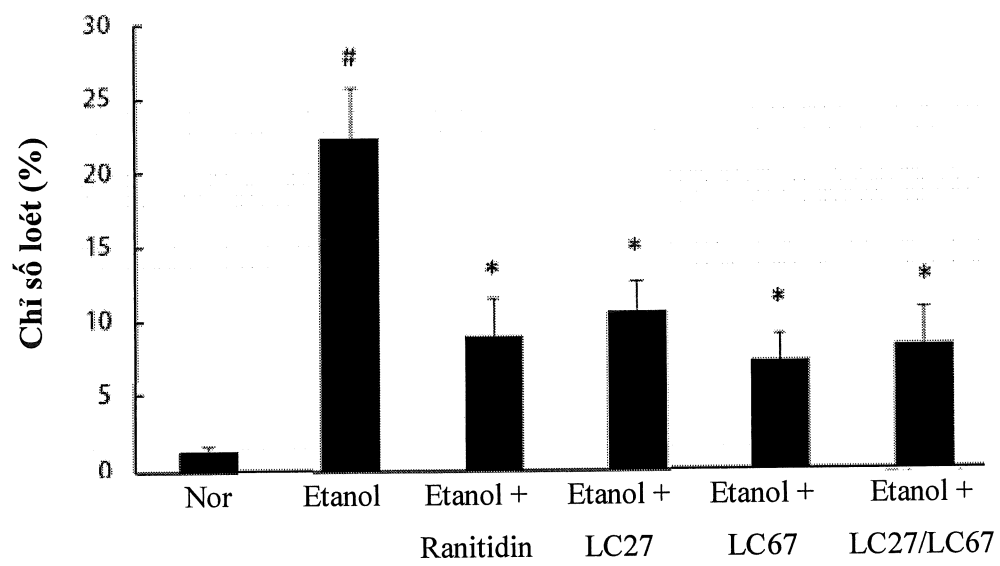


Fig.27

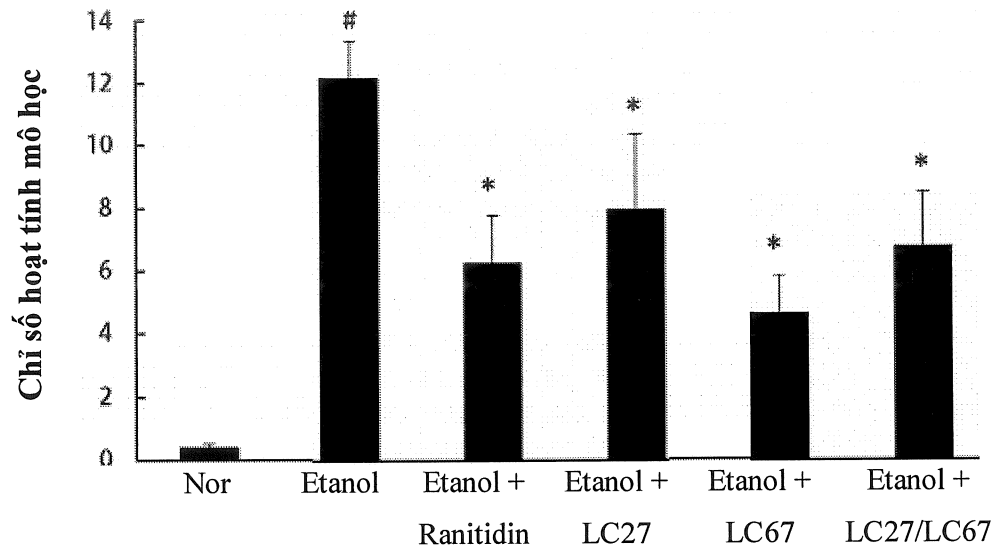


Fig.28

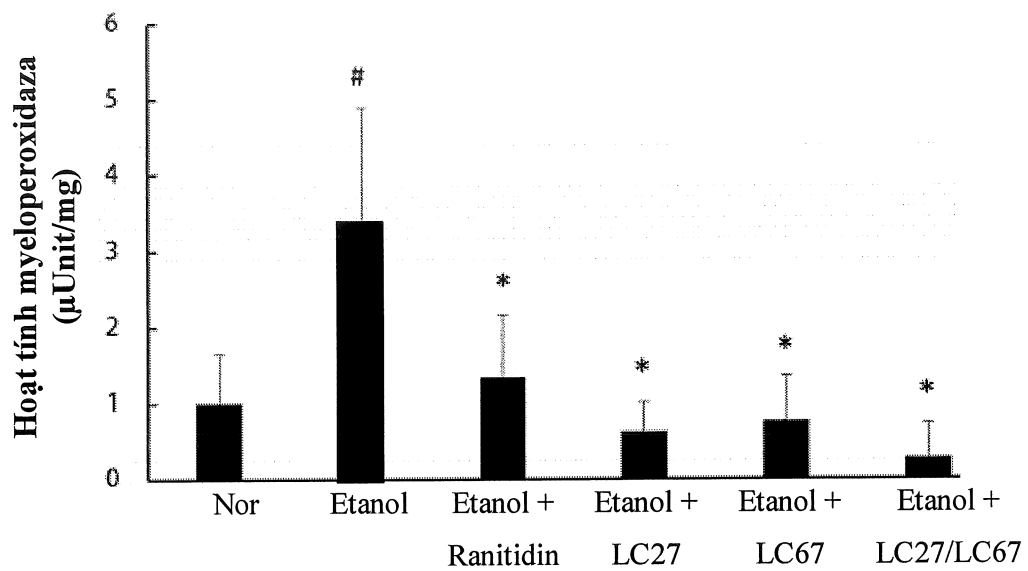


Fig.29

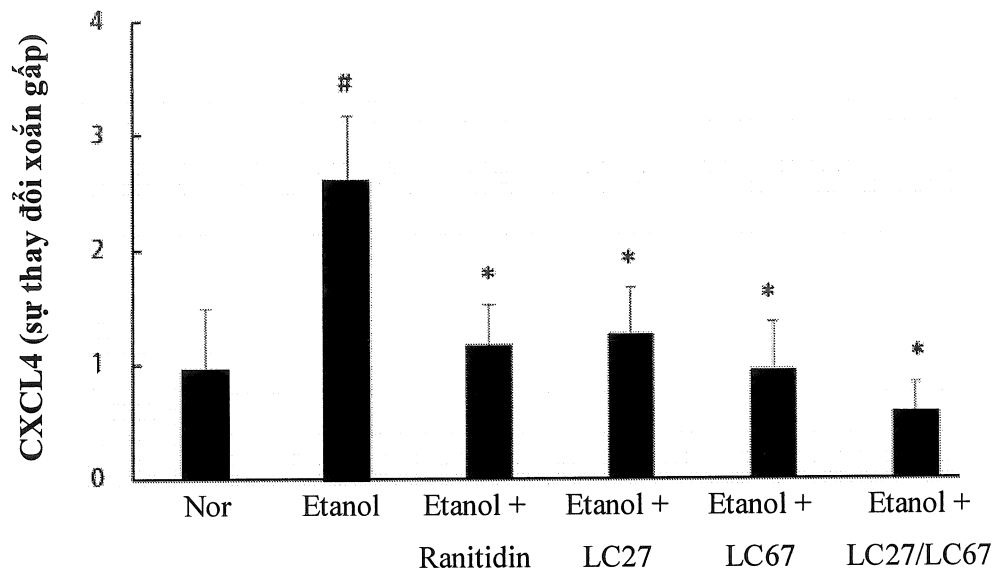


Fig.30

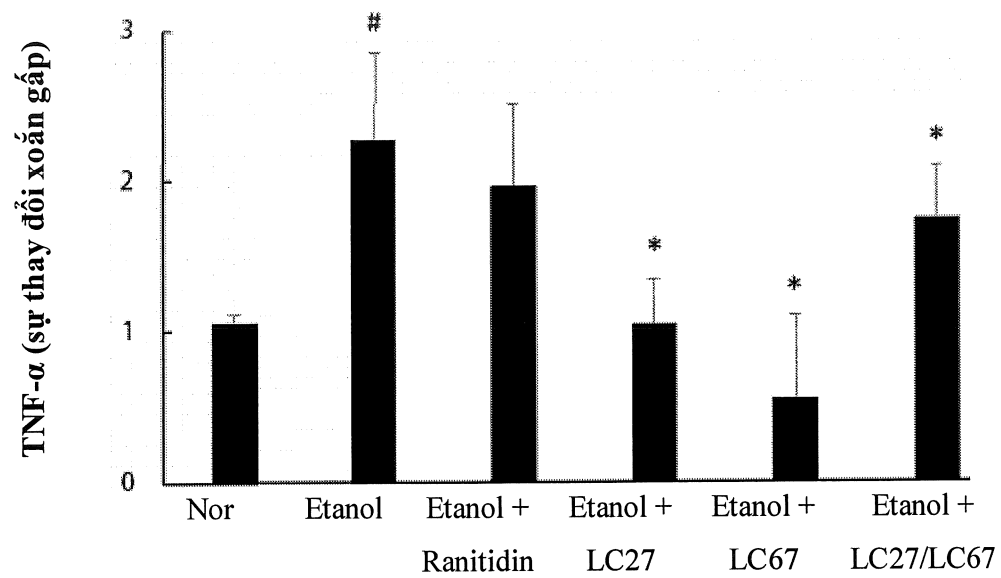


Fig.31

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 <120> Vi khuẩn *Bifidobacterium*, được phẩm và thực phẩm chứa chúng
 <130> PCT-16-130
 <150> KR 10-2015-0130124
 <151> 2015-09-15
 <150> KR 10-2016-0005018
 <151> 2016-01-15
 <160> 8
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 1132
 <212> ADN
 <213> Không xác định
 <220>
 <223> Trình tự 16S rADN của *Lactobacillus brevis* CH23
 <400> 1

agggataaca	cttggaacaa	ggtgctaata	ccgtataaca	acaaaatccg	catggatttt	60
gtttgaaagg	tggttcgggc	tatcacttct	ggatgatccc	gcggcgtatt	agttagttgg	120
tgaggtaaag	gcccaccaag	acgatgatac	gtagccgacc	tgagagggtta	atcgccacaca	180
ttgggactga	gacacggccc	aaactcctac	gggaggcagc	agtagggaat	cttcacaaat	240
ggacgaaagt	ctgatggagc	aatgccgcgt	gagtgaagaa	gggtttcggc	tcgtaaaact	300
ctgttggtta	agaagaacac	ctttgagagt	aactgttcaa	gggttgacgg	tatttaacca	360
gaaagccacg	gctaactacg	tgccagcagc	cgcggtaata	cgtaggtggc	aagcgttgtc	420
cggatttatt	gggcgtaaag	cgagcgcagg	cggtttttta	agtctgatgt	gaaagccttc	480
ggettaaccg	gagaagtgea	tcggaaactg	ggagacttga	gtgcagaaga	ggacagtggg	540
actccatgtg	tagcgggtgga	atgcgtagat	atatggaaga	acaccagtgg	cgaaggcggc	600
tgtctagtct	gtaactgacg	ctgaggctcg	aaagcatggg	tagcgaacag	gattagatac	660
cctgstagtc	catgccgtaa	acgatgagtg	ctaagtgttg	gagggtttcc	gcccttcagt	720
gctgcagcta	acgcattaag	cactccgcct	ggggagtagc	accgcaaggt	tgaaactcaa	780
aggaattgac	gggggccccg	acaagcgggt	gagcatgtgg	tttaattcga	agctacgcga	840
agaaccttac	caggtcttga	catcttctgc	caatcttaga	gataagacgt	tcccttcggg	900
gacagaatga	caggtggtgc	atggttgctg	tcagctcgtg	tcgtgagatg	ttgggttaag	960
tcccgcacag	agcgcaaccc	ttattatcag	ttgccagcat	tcagttgggc	actctggtga	1020
gactgccggt	gacaaaccgg	aggaaggtgg	ggatgacgtc	aaatcatcat	gccccttatg	1080

acctgggcta cacacgtgct acaatggacg gtacaacgag tcgcaagtc gt 1132

<210> 2

<211> 1258

<212> ADN

<213> Không xác định

<220>

<223> Trình tự 16S rADN của *Bifidobacterium longum* CH57

<400> 2

```

cgggctttgc ttggtggtga gagtggcgaa cgggtgagta atgcgtgacc gacctgcccc 60
atacaccgga atagctcctg gaaacgggtg gtaatgccgg atgctccagt tgatcgcatt 120
gtcttctggg aaagctttcg cggatatgga tggggtcgcg tcctatcagc ttgacggcgg 180
ggtaacggcc caccgtggct tcgacgggta gccggcctga gagggcgacc ggccacattg 240
ggactgagat acggcccaga ctctacggg aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg 300
cgcaagcctg atgcagcgac gccgcgtgag ggatggaggc ctcgggttg taaacctctt 360
ttatcgggga gcaagcgaga gtgagttac ccgttgaata agcaccggct aactacgtgc 420
cagcagccgc ggtaatacgt aggggtgcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagggc 480
tcgtaggcgg ttcgtcgct cccgtgtgaa agtccatcgc ttaacggtgg atccgcgccg 540
ggtagcggcg ggcttgagt cggtagggga gactggaatt cccggtgtaa cggtggaatg 600
ttagatatac gggaagaaca ccaatggcga aggcaggtct ctgggccgtt actgacgctg 660
aggagcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataacct ggtagtccac gccgtaaacg 720
gtggatgctg gatgtggggc ccgttcacag ggttcctgt cggagctaac gcgttaagca 780
tcccgcctgg gggagtacgg ccgaaggct aaaactcaaa gaaattgacg ggggcccgcg 840
caagcggcgg agcatgcgga ttaattcgat gcaacgcgaa gaaccttacc tgggcttcac 900
atgttccga cggtcgtaga gatacggctt ccctcgggg cgggttcaca ggtggtgcat 960
ggtcgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctc 1020
gccccgtgtt gccagcggat tatgccggga actcacgggg gaccgccggg gttaactcgg 1080
aggaaggtgg ggatgacgtc agatcatcat gccccttacg tccagggtt cacgcatgct 1140
acaatggccg gtacaacggg atgcgacgcg gcgacgcgga gcggatccct gaaaaccggg 1200
ctcagttcgg atcgcagtct gcaactcgac tgcgtgaagg cggagtcgct agtaatcgcg 1260
aatcagcaac gtcgcggtga atgcgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcaagtcat 1320
gaaagtgggc agcaccgaa gccggtgg 1348

```

<210> 3

<211> 1348

<212> ADN

<213> Không xác định

<220>

<223> Trình tự 16S rADN của *Bifidobacterium longum* CH57

<400> 3

```

cgggctttgc ttggtggtga gagtggcgaa cgggtgagta atgcgtgacc gacctgcccc 60
atacaccgga atagctcctg gaaacgggtg gtaatgccgg atgctccagt tgatcgcatg 120
gtcttctggg aaagctttcg cggtatggga tggggtcgcg tcctatcagc ttgacggcgg 180
ggtaacggcc caccgtggct tcgacgggta gccggcctga gagggcgacc ggccacattg 240
ggactgagat acggcccaga ctctacggg aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg 300
cgcaagcctg atgcagcgac gccgcgtgag ggatggaggc ctcgggttg taaacctctt 360
ttatcgggga gcaagcgaga gtgagttac ccgtgaata agcaccggct aactacgtgc 420
cagcagccgc ggtaatacgt agggtgcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagggc 480
tcgtaggcgg ttcgtcgcgt ccggtgtgaa agtccatcgc ttaacggtgg atccgcgccg 540
ggtagggcgg ggcttgagtg cggtagggga gactggaatt cccggtgtaa cggtggaatg 600
ttagatatac gggaagaaca ccaatggcga aggcaggctt ctgggccgtt actgacgtg 660
aggagcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg 720
gtggatgctg gatgtggggc ccgtccacg ggttcctgt cggagtaac gcgtaagca 780
tcccgcctgg gggagtacgg ccgcaaggct aaaactcaaa gaaattgacg ggggcccgcg 840
caagcggcgg agcatgcgga ttaattcgat gcaacgcgaa gaaccttacc tgggcttcac 900
atgttccga cggtcgtaga gatacggctt cccttcgggg cgggttcaca ggtggtgcat 960
ggtcgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctc 1020
gccccgtgtt gccagcggat tatgccggga actcacgggg gaccgccggg gttaactcgg 1080
aggaaggtgg ggatgacgtc agatcatcat gccccttacg tccagggtt cacgcatgct 1140
acaatggccg gtacaacggg atgcgacgcg gcgacgcgga gcggatccct gaaaaccggt 1200
ctcagtcgg atcgagctt gcaactcgac tgcgtgaagg cggagtcgct agtaatcgcg 1260
aatcagcaac gtcgcggtga atgcgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcaagtcat 1320
gaaagtgggc agcacccgaa gccggtgg 1348

```

<210> 4

<211> 1421

<212> ADN

<213> Không xác định

<220>

<223> Trình tự 16S rADN của *Lactobacillus plantarum* LC5

<400> 4

ctggtattga	ttggtgcttg	catcatgatt	tacatttgag	tgagtggcga	actggtgagt	60
aacacgtggg	aaacctgccc	agaagcgggg	gataacacct	ggaaacagat	gctaataccg	120
cataacaact	tggaccgcat	ggtccgagct	tgaagatgg	cttcggctat	cacttttgga	180
tggccccg	gcgtattagc	tagatggtgg	ggtaacggct	caccatggca	atgatacgta	240
gccgacctga	gagggtaatc	ggccacattg	ggactgagac	acggcccaaa	ctcctacggg	300
aggcagcagt	agggaatctt	ccacaatgga	cgaaagtctg	atggagcaac	gccgcgtgag	360
tgaagaaggg	tttcggctcg	taaaactctg	ttgttaaaga	agaacataatc	tgagagtaac	420
tgttcaggta	ttgacgggtat	ttaaccagaa	agccacggct	aactacgtgc	cagcagccgc	480
ggtaatacgt	aggtggcaag	cgttgctcgg	gatttattgg	gcgtaaagcg	agcgcaggcg	540
gtttttaag	tctgatgtga	aagccttcgg	ctcaaccgaa	gaagtgcatac	ggaaactggg	600
aaacttgagt	gcagaagagg	acagtggaaac	tccatgtgta	gcggtgaaat	gcgtagatat	660
atggaagaac	accagtggcg	aaggcggctg	tctggtctgt	aactgacgct	gaggctcgaa	720
agtatgggta	gcaaacagga	ttagataccc	tggtagtcca	taccgtaaac	gatgaatgct	780
aagtgttgga	gggtttccgc	ccttcagtgc	tgcagctaac	gcattaagca	ttccgcctgg	840
ggagtacggc	cgcaaggctg	aaactcaaag	gaattgacgg	gggcccgcac	aagcggtgga	900
gcatgtgggt	taattcgaag	ctacgcgaag	aaccttacca	ggtcttgaca	tactatgcaa	960
atctaagaga	ttagacgttc	ccttcgggga	catggataca	ggtggtgcat	ggtgtcgtc	1020
agctcgtgtc	gtgagatggt	gggttaagtc	ccgcaacgag	cgcaaccctt	attatcagtt	1080
gccagcatta	agttgggcac	tctggtgaga	ctgccggtga	caaaccggag	gaagggtggg	1140
atgacgtcaa	atcatcatgc	cccttatgac	ctgggctaca	cacgtgctac	aatggatggt	1200
acaacgagtt	gcgaactcgc	gagagtaagc	taatctctta	aagccattct	cagttcggat	1260
tgtaggctgc	aactcgccta	catgaagtcg	gaatcgctag	taatcgcgga	tcagcatgcc	1320
gcggtgaata	cgttcccggg	cctgtacac	accgcccgtc	acaccatgag	agtttgtaac	1380
acccaaagtc	ggtggggtaa	ccttttagga	accagccgcc	t		1421

<210> 5

<211> 1356

<212> ADN

<213> Không xác định

<220>

<223> Trình tự 16S rADN của *Lactobacillus plantarum* LC27

<400> 5

tttacatttg	attgagtggc	gaactggtga	gtaacacgtg	ggaaacctgc	ccagaagcgg	60
gggataacac	ctggaaacag	atgctaatac	cgcataacaa	cttggaaccgc	atggtccgag	120

```

tttгаааgаt  ggcttcggct  atcacttttg  gatgggtccc  cggcgtatta  gctagatggt  180
ggggtaacgg  ctccatgg  caatgatacg  tagccgacct  gagagggtaa  tcggccacat  240
tgggactgag  acacggccca  aactcctacg  ggaggcagca  gtagggaatc  ttccacaatg  300
gacгаааgtc  tgatggagca  acgccgcgtg  agtгаааgag  ggtttcggct  cgтаааactc  360
tgttgтааа  gaааacata  tctgagagta  actgttcagg  tattgacggt  аттаaccag  420
aaagccacgg  cтаactacgt  gccagcagcc  gcgгтаатaс  gtaggtggca  agcgttgтсс  480
ggatttattg  ggcгтаааgс  gagcgcaggc  ggttttttaa  gtctgatgtg  aaagccttcg  540
gctcaaccga  агаagtgcат  cggaaactgg  gaaacttgag  tgcаааgag  gacagtggaa  600
ctccatgtgt  agcгgtгaaа  tgcгtagata  tatггааgaa  caccagtggc  gaaggcggct  660
gtctggtctg  таactgacgc  tgaggctcga  aagtatgggt  agcaaacagg  attagatacc  720
ctggtagtcc  атаccгтааа  cgatгаатgc  таagtgttg  agggtttcg  cccttcagtг  780
ctgcagctaa  cgcаттааgс  атccgcctg  gggagtacgg  ccгaaaggct  gaaactcaaa  840
ggaattgacg  ggggcccгca  caagcгgtгg  agcatgtggt  tтаатгcaа  gctacгcгaa  900
gaaccttacc  aggtcttgac  атаctatgca  аатctaagag  attagacgtt  cccttcgggg  960
acatggatac  aggtggtгca  tggttgтсgt  cagctcgtgt  cгtgagatgt  tgggtтаagt  1020
cccgcaacga  gcгcaaccct  tattatcagt  tgccagcatt  аagtgggca  ctctggtgag  1080
actgccggtg  аcaaaaccгga  gгаagggtggg  gatgacгtca  аатcatcatg  ccccttatga  1140
cctgggctac  acacгtgcta  caatggatgg  tacaacgagt  tgcgaaactг  cgagagтааg  1200
ctaатctctt  aaagccattc  tcagtгcгga  ttgtaggctg  caactгcct  аcatгааgtc  1260
gгаатгcta  gтаатгcгgg  atcagcatgc  cгcгgtгаат  acgttcccgg  gccttgтаca  1320
cacгcccгt  cacacatga  gagttгтаa  caccca  1356

```

<210> 6

<211> 1325

<212> ADN

<213> Không xác định

<220>

<223> Trình tự 16S rADN của *Lactobacillus plantarum* LC28

<400> 6

```

catcatgatt  tacatttgag  tgagtggcga  actggtgagt  aacacgtggg  aaacctgccc  60
agaagcgggg  gataacacct  ggaaacagat  gctaataccg  cataacaact  tggaccgcat  120
ggtccgagtt  tgaaagatgg  ctccggctat  cacttttgga  tgggtcccгcг  gcгtattagc  180
tagatggtgg  ggтаacggct  caccatggca  atgatacгta  gccgacctga  gagggтаatc  240
ggccacattg  ggactgagac  acggcccaaa  ctctacggg  aggcagcagt  aggгаатctt  300

```

```

ccacaatgga cgaaagtctg atggagcaac gccgcgtgag tgaagaaggg ttccggctcg 360
taaaactctg ttgttaaaga agaacatata tgagagtaac tgttcaggta ttgacgggat 420
ttaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag 480
cgttgtccgg atttattggg cgtaaagcga gcgcaggcgg tttttaagt ctgatgtgaa 540
agccttcggc tcaaccgaag aagtgcacg gaaactggga aacttgagtg cagaagagga 600
cagtggaaact ccatgtgtag cgggtgaaat cgtagatata tggaagaaca ccagtggcga 660
aggcggctgt ctggtctgta actgacgctg aggctcgaaa gtatgggtag caaacaggat 720
tagataccct ggtagtccat accgtaaacg atgaatgcta agtggtggag ggtttccgcc 780
cttcagtgtc gcagctaacg cattaagcat tccgcctggg gagtacggcc gcaaggctga 840
aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag catgtggtt aattcgaagc 900
tacgcgaaga accttaccag gtcttgacat actatgcaaa tctaagagat tagacgttcc 960
cttcggggac atggatacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg 1020
ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta ttatcagttg ccagcattaa gttgggcact 1080
ctggtgagac tgccgggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaaa tcacatgcc 1140
ccttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggatggta caacgagttg cgaactcgcg 1200
agagtaagct aatctcttaa agccattctc agttcggatt gtaggctgca actcgcctac 1260
atgaagtcgg aatcgctagt aatcgcggat cagcattccg cggtgaatac gttcccgggc 1320
cttgt 1325

```

<210> 7

<211> 1342

<212> ADN

<213> Không xác định

<220>

<223> Trình tự 16S rADN của *Bifidobacterium longum* LC67

<400> 7

```

ggctttgctt ggtggtgaga gtggcgaacg ggtgagtaat gcgtgaccga cctgccccat 60
acaccggaat agctcctgga aacgggtggt aatgccggat gctccagttg atcgcatggt 120
cttctgggaa agctttcgcg gtatgggatg gggtcgcgtc ctatcagctt gacggcgggg 180
taacggccca ccgtggcttc gacgggtagc cggcctgaga gggcgaccgg ccacattggg 240
actgagatac ggcccagact cctacgggag gcagcagtg ggaatattgc acaatgggcg 300
caagcctgat gcagcgacgc cgcgtagagg atggaggcct tcgggttgta aacctctttt 360
atcgggggagc aagcgagagt gagtttaccg gttgaataag caccggctaa ctacgtgcca 420
gcagccgcgg taatacgtag ggtgcaagcg ttatcccga attattgggc gtaaagggct 480

```

```

cgtaggcggt tcgtcgctc cgggtgtaaa gtccatcgct taacggtgga tccgcgccgg 540
gtacgggcgg gcttgagtgc ggtaggggag actggaattc ccggtgtaac ggtggaatgt 600
gtagatatcg ggaagaacac caatggcgaa ggcaggtctc tgggccgtta ctgacgctga 660
ggagcgaaag cgtgggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacgg 720
tggatgctgg atgtggggcc cgtccacgg gttccgtgtc ggagctaacg cgtaagcat 780
cccgctggg ggagtacggc cgcaaggcta aaactcaaag aaattgacgg gggcccgcac 840
aagcggcgga gcatgcggat taattcgatg caacgcgaag aaccttacct gggcttgaca 900
tgttcccgac ggtcgtagag atacggcttc ccttcggggc gggttcacag gtggtgcatg 960
gtcgtcgta gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctcg 1020
ccccgtgttg ccagcggatt atgccgggaa ctacggggg accgccgggg ttaactcgga 1080
ggaaggtggg gatgacgtca gatcatcatg ccccttacgt ccagggttc acgcatgcta 1140
caatggccgg tacaacggga tgcgacggc cgacgcggag cggatccctg aaaaccggtc 1200
tcagtccga tcgcagtctg caactcgact gcgtgaaggc ggagtcgcta gtaatcgga 1260
atcagcaacg tcgcggtgaa tgcgttcccg ggccttgtag acaccgcccg tcaagtcatg 1320
aaagtgggca gcacccgaag cg 1342

```

<210> 8

<211> 1343

<212> ADN

<213> Không xác định

<220>

<223> Trình tự 16S rADN của *Bifidobacterium longum* LC68

<400> 8

```

cggcttcggg tgctgcccac ttcatgact tgacgggcgg tgtgtacaag gcccgggaac 60
gcattcaccg cgacgttgct gattcgcat tactagcgac tccgccttca cgcagtcgag 120
ttgcagactg cgatccgaac tgagaccggt ttccaggat ccgctccgag tcgccgcgtc 180
gcatcccggt gtaccggcca tttagcatg cgtgaagccc tggacgtaag gggcatgatg 240
atctgacgtc atccccacct tcctccgagt taaccccggc ggtccccgt gagttccgg 300
cataatccgc tggcaacacg gggcgagggt tgcgtcgtt gcgggactta acccaacatc 360
tcacgacag agetgacgac gaccatgcac cactgtgaa cccgccccga agggaagccg 420
catctctacg accgtcggga acatgtcaag cccaggtgag gttcttcgag ttgcatcgaa 480
ttaatccgca tgctccggcg cttgtgcggg ccccgctcaa tttcttgag ttttagcctt 540
gcggccgtac tccccaggcg ggatgcttaa cgcgttagct ccgacacgga accgtggaa 600
cgggccccac atccagcatc caccgtttac ggcgtggact accagggtat ctaatcctgt 660

```

tcgctcccca	cgttttcgct	cctcagcgtc	agtaacggcc	cagagacctg	ccttcgccat	720
tggtgttctt	cccgatatct	acacattcca	ccgttacacc	gggaattcca	gttccccta	780
ccgcactcaa	gcccggccgt	acccggcgcg	gatccaccgt	taagcgatgg	actttcacac	840
cggacgcgac	gaaccgccta	cgagcccttt	acgccaata	attccggata	acgcttgac	900
cctacgtatt	accgcggctg	ctggcacgta	gtagccggt	gcttattcaa	cgggtaaact	960
cactctcgct	tgtcccccga	taaaagaggt	ttacaaccgc	aaggcctcca	tccctcacgc	1020
ggcgtcgctg	catcaggctt	gcgcccattg	tgcaatattc	cccactgctg	cctcccgtag	1080
gagtctgggc	cgtatctcag	tccaatgtg	gccggtcgcc	ctctcaggcc	ggctaccgt	1140
cgaagccacg	gtgggcccgt	accccgccgt	caagctgata	ggacgcgacc	ccatcccata	1200
ccgcgaaagc	ttcccagaa	gaccatgcga	tcaactggag	catccggcat	taccaccgt	1260
ttcaggagc	tattccggtg	tatggggcag	gtcggtcacg	cattactcac	ccgttcgcca	1320
ctctcaccac	caagcaaagt	ctc				1343