



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

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



1-0053027

(51)¹⁹ C12N 1/20; A23L 33/135; A61K 35/747; (13) B
C12R 1/25; A61P 31/14; A23K 10/16;
A61K 8/99

-
- | | |
|---|--------------------------------|
| (21) 1-2020-00073 | (22) 12/07/2019 |
| (86) PCT/KR2019/008683 12/07/2019 | (87) WO 2020/013672 16/01/2020 |
| (30) 10-2018-0081910 13/07/2018 KR | |
| (45) 25/11/2025 452 | (43) 27/07/2020 388A |
| (73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 04560, Republic of Korea | |
| (72) KIM, Hee-Yeon (KR); MOON, Ho Jin (KR); SON, Kyu Yeol (KR); LEE, Kyung Min (KR); JANG, Yoon Tack (KR); KIM, Sung Hun (KR); BAE, Gi Duk (KR); KIM, Bong Joon (KR). | |
| (74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED) | |
-

(54) CHẾ PHẨM CHỨA CHỦNG LACTOBACILLUS PLANTARUM CJLP475 VÀ CHỦNG LACTOBACILLUS PLANTARUM CJLP243, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM PROBIOTIC

(21) 1-2020-00073

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P; và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM11045P, và phương pháp điều chế chế phẩm probiotic.

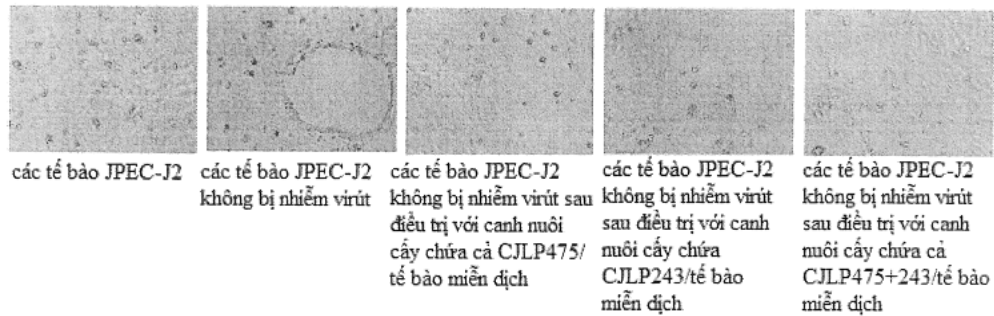


FIG.6

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có hoạt tính kháng axit, chịu dịch mật, kháng virus và tăng cường miễn dịch. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều chế phẩm probiotic.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong ngành chăn nuôi hiện nay, vật nuôi bị chết do các bệnh truyền nhiễm gây ra bởi virus rất cao, và điều này thường dẫn đến thiệt hại kinh tế cho các trang trại. Đặc biệt, trong ngành chăn nuôi lợn, các bệnh truyền nhiễm gây ra bởi virus và vi trùng gây ra như bệnh hô hấp phức hợp trên lợn, hội chứng còi cọc sau cai sữa lợn con, hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn, bệnh tiêu chảy cấp ở lợn, là bốn loại bệnh gây hại chủ yếu đã gây ra thiệt hại lớn về kinh tế.

Trong số các bệnh trên, bệnh tiêu chảy trên lợn là bệnh về đường tiêu hóa trên lợn gây ra bởi sự lây nhiễm virus gây bệnh tiêu chảy trên lợn (porcine epidemic diarrhea virus: PEDV), là chi thuộc họ virus corona. Virus tăng sinh trong các nhung mao của ruột non và ruột già và gây viêm ruột cấp tính, nôn mửa và tiêu chảy ở lợn thuộc mọi lứa tuổi, đặc biệt là lợn con. Cụ thể là, thiệt hại nghiêm trọng chủ yếu vào mùa đông từ tháng 11 đến tháng 4, và được biết đến tỷ lệ tử vong của lợn con trước cai sữa trong vòng 1 tuần tuổi là khoảng 50%, và trong trường hợp nghiêm trọng, tỷ lệ tử vong có thể đạt gần 100% do mất nước trầm trọng.

Virus PED được xác nhận đầu tiên ở châu Âu vào năm 1971, PEDV CV777 thuộc nhóm G1a đã được xác định và phân lập tại Bỉ năm 1976. Virus đã lan rộng khắp châu Âu trong những năm 1980, và bùng phát dịch ở các nước Đông Á bao gồm Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản và Đài Loan trong những năm 1990. Hơn nữa, PEDV thuộc nhóm G2b có độc tính cao hơn nhóm G1a, xuất hiện đầu tiên ở Trung Quốc vào năm 2010. PEDV nhóm mới đã lan rộng tới Bắc Mỹ (Hoa Kỳ và Canada) và còn tới cả Đông Nam Á và châu Âu gây ra thiệt hại nghiêm trọng. Trong những năm 2013, thiệt hại ước tính

khoảng 2,2 nghìn tỷ won do mất năng suất trong ngành chăn nuôi lợn Mỹ. Ở Hàn Quốc, đã có báo cáo rằng bùng phát của PEDV hàng năm xảy ra ở 20% đến 40% các trang trại lợn, làm chết 6% tổng đàn lợn. Cũng có báo cáo khác cho thấy tỷ lệ nhiễm bệnh qua các phương tiện giao thông ra vào các lò mổ lên đến khoảng 60% (Viện kinh tế nông thôn Hàn Quốc, Hiệp hội bác sỹ thú y cho lợn Hàn Quốc).

Cho đến nay, cách duy nhất để ngăn chặn virus PED loại G2b là bằng khử trùng triệt để. Nhiều trang trại sử dụng phương pháp lây nhiễm nhân tạo hoặc vắc xin PEDV nhóm G1a đã có để ngăn ngừa thiệt hại gây ra bởi các bệnh do virus, nhưng bị hạn chế trong việc ngăn ngừa lây nhiễm PEDV loại G2b. Ngoài ra, vắc xin PEDV nhóm G2b bất hoạt mới được phát triển cũng đang được sử dụng. Tuy nhiên, một số vấn đề đã được đặt ra liên quan đến các biện pháp phòng ngừa PEDV, như thể hiện sự hạn chế trong phòng ngừa các bệnh về tiêu hóa của vắc xin bất hoạt vì vắc xin bất hoạt chỉ được sử dụng thay vì phát triển vắc xin sống. Để khắc phục các vấn đề này, sự phát triển của các tác nhân phòng ngừa và điều trị virus PED (vắc xin, v.v.) và điều trị (IgY, tinh dầu, axit hữu cơ, probiotic, v.v.) được tích cực thực hiện. Cụ thể là, phương pháp tăng cường miễn dịch bằng cách sử dụng vật liệu chức năng để kích thích hệ thống miễn dịch trong cơ thể trong khi có tác dụng chống virus đã được nghiên cứu gần đây.

Miễn dịch thường được chia thành miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng. Miễn dịch bẩm sinh là hệ thống để bảo vệ ngay lập tức sự lây nhiễm mầm bệnh từ tuyến đầu tiên, tác động trực tiếp lên các đối tượng xâm nhập (các kháng nguyên) hoặc gây miễn dịch thích ứng. Miễn dịch thích ứng là hệ thống phức tạp và chính xác hơn để xác nhận và loại bỏ các đối tượng xâm nhập, hoặc hoạt động như bộ nhớ cho các đối tượng xâm nhập tương ứng, nhờ đó cung cấp các chức năng miễn dịch vĩnh viễn hơn so với miễn dịch bẩm sinh. Các tế bào tua (Dendritic cells: DCs), các đại thực bào, và các tế bào tiêu diệt tự nhiên là những tế bào trình diện kháng nguyên liên quan đến miễn dịch bẩm sinh, trực tiếp đảm nhiệm các chức năng miễn dịch bẩm sinh và có các thụ thể của các tế bào T, nhờ đó tiết ra các cytokin. Miễn dịch thích ứng là hệ thống phòng thủ thứ cấp chống lại các kháng nguyên đã xâm nhập vào cơ thể, và là đáp ứng miễn dịch đặc hiệu được thực hiện bởi các tế bào lympho B và tế bào lympho T. Các đáp ứng miễn dịch được kiểm soát bởi các tế bào T kích hoạt kháng nguyên bao gồm đáp ứng tế bào T độc tính và đáp ứng tế bào T hỗ trợ. Các tế bào tua, các đại thực bào, và các tế bào tiêu diệt tự nhiên liên quan đến miễn dịch bẩm sinh cũng nhận ra các chất xâm nhập từ

bên ngoài và tiết ra các loại cytokin khác nhau như là IL-12 và IL-4 để từ đó tạo ra đáp ứng thay đổi thích hợp khả năng miễn dịch của động vật chủ, và do đó có thể cung cấp cơ chế bảo vệ miễn dịch theo hướng phù hợp. Các tế bào T-CD4 nguyên vẹn, hoạt động như là tiền thân của các tế bào T, được phân biệt bởi các cytokin chính. Ví dụ, nếu IL-12 (interleukin-12) hiện diện ở nồng độ cao, các tế bào T-CD4 thúc đẩy quá trình biệt hóa của các tế bào Th1 (tế bào T hỗ trợ 1), từ đó tạo ra đáp ứng CTL (tế bào lympho T độc tính) để tiêu diệt các mầm bệnh nội bào, trong khi, nếu IL-4 (interleukin-4) hiện diện ở nồng độ cao, chúng gây ra đáp ứng đặc hiệu tiêu diệt các mầm bệnh ngoại bào (tiết kháng thể của các tế bào B). Ngoài ra, các tế bào miễn dịch được liệt kê ở trên đáp ứng theo cách thích hợp với những đối tượng xâm nhập đã đi vào cơ thể thông qua quá trình phức tạp và tinh vi bằng cách tiết ra TGF-beta (biến đổi yếu tố tăng trưởng Beta) và IL-10 để ngăn chặn các đáp ứng miễn dịch quá mức như là phản ứng viêm, sự tiết TGF-beta để ức chế đáp ứng miễn dịch quá mức và do đó kích hoạt các tế bào T điều tiết, kích thích sản xuất kháng thể bằng cách biến đổi các tế bào B thành các tế bào plasma để đáp ứng với việc tiết của TGF-beta và IL-6 (interleukin-6), hoặc gây ra phản ứng miễn dịch (Th17) để loại bỏ khả năng tự miễn dịch lỗi và các mầm bệnh ngoại bào. Tuy nhiên, các đáp ứng miễn dịch như vậy đôi khi cần chất tăng cường miễn dịch bổ sung và thích hợp do phản ứng miễn dịch mất cân bằng hoặc kém.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã hoàn thành sáng chế bằng cách phân lập và định danh các vi sinh vật mới có khả năng kích hoạt hệ thống miễn dịch trong khi thể hiện hoạt tính ức chế kháng các virus nói trên, và xác nhận các hoạt tính của nó.

Mục đích của sáng chế đề xuất chế phẩm chứa:

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

(b) chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM11045P.

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

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

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất thực phẩm bao gồm chế phẩm nêu trên.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất mỹ phẩm chứa chế phẩm nêu trên.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa chế phẩm nêu trên.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Mỗi chế chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 của sáng chế có khả năng chịu axit và chịu dịch mật cao và có thể được cung cấp như probiotic. Chế phẩm kích hoạt các tế bào miễn dịch trong cơ thể và do đó cho phép điều hòa các chức năng miễn dịch, và đặc biệt thể hiện hoạt tính ức chế rất tốt chống lại nhiễm virus gây bệnh tiêu chảy trên lợn (PEDV). Ngoài ra, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có thể thấy rằng khi cho lợn mẹ ăn chế phẩm của sáng chế, và lợn con đã được tách từ lợn mẹ bị thử thách với virus PED, tỷ lệ tử vong của lợn con có thể giảm đáng kể, và phát tán virus cũng có thể được giảm, do tác dụng điều hòa miễn dịch. Theo đó, sáng chế có thể đề xuất chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP47, và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có hoạt tính chống lại virus PED, hoạt tính tăng cường miễn dịch, và cải thiện tăng cân hiệu quả và giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy ở vật nuôi, do đó, chế phẩm có thể có hiệu quả dùng như là thành phần thức ăn hoặc thành phần cho phụ gia thức ăn chăn nuôi, thành phần thực phẩm, thành phần mỹ phẩm hoặc thành phần dược phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình ảnh của đĩa thạch máu xác nhận không có hoạt tính của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243;

Fig.2 là đồ thị thể hiện không có độc tính tế bào của chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243;

Fig.3 là đồ thị thể hiện tác dụng thúc đẩy tiết IL-12 của chế phẩm;

Fig.4 là đồ thị thể hiện tác dụng thúc đẩy tiết IL-10 của chế phẩm;

Fig.5 là đồ thị thể hiện tác dụng thúc đẩy tiết TGF-beta của chế phẩm;

Fig.6 là hình ảnh dưới kính hiển vi minh họa tác dụng ức chế chống lại sự nhiễm virus PED bởi chế phẩm;

Fig.7 là đồ thị thể hiện tác dụng của chế phẩm dùng qua đường miệng trên giá trị trung bình của sinh trưởng tuyệt đối bình quân (average daily gain: ADG) ở lợn cai sữa;

Fig.8 là đồ thị thể hiện tác dụng của chế phẩm dùng qua đường miệng lên tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy trong lợn cai sữa;

Fig.9 là đồ thị thể hiện tổng hàm lượng kháng thể IgG trong huyết thanh của lợn nái được cho ăn chế phẩm;

Fig.10 là đồ thị thể hiện tổng hàm lượng kháng thể IgA trong huyết thanh của lợn nái được cho ăn chế phẩm;

Fig.11 là đồ thị thể hiện tổng hàm lượng kháng thể IgG trong sữa non của lợn nái được cho ăn chế phẩm;

Fig.12 là đồ thị thể hiện tổng số hàm lượng kháng thể IgA trong huyết thanh lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn chế phẩm;

Fig.13 là đồ thị thể hiện sự thay đổi nhiệt độ cơ thể lợn con sau khi bị nhiễm PEDV được sinh ra từ lợn nái được cho ăn chế phẩm;

Fig.14 là đồ thị thể hiện tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy sau khi bị nhiễm PEDV trong lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn chế phẩm;

Fig.15 là đồ thị thể hiện tỷ lệ sống sau khi bị nhiễm PEDV của lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn chế phẩm;

Fig.16 là đồ thị thể hiện hàm lượng PEDV trong cơ quan tiêu hóa sau khi bị nhiễm PEDV trong lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn chế phẩm;

Fig.17 là đồ thị thể hiện hàm lượng kháng thể trung hòa chống lại PEDV trong huyết thanh của lợn nái được cho ăn chế phẩm và lợn con được sinh ra từ lợn nái; và

Fig.18 là đồ thị thể hiện hàm lượng kháng thể trung hòa chống lại PEDV trong sữa non của lợn nái được cho ăn chế phẩm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ ở đây có thể được áp dụng cho các phần mô tả và các phương án khác,

tương ứng. Tức là, tất cả các sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ trong phần mô tả nằm trong phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể được bộc lộ dưới đây.

Một khía cạnh của sáng chế đề đạt được các mục đích nêu trên là đề xuất chế phẩm chứa:

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

(b) chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM11045P.

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

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “*Lactobacillus*” là vi sinh vật *bacillus* gram dương ưa khí hoặc kỵ khí không bắt buộc được phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Vi sinh vật thuộc chi *Lactobacillus* gồm *Lactobacillus plantarum*, v.v. Nó tương ứng với chủng probiotic vô hại đối với cơ thể con người và có thể được sử dụng mà không có các tác dụng phụ.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “các probiotic” đề cập đến vi khuẩn sống xâm nhập vào cơ thể và mang lại lợi ích tốt cho sức khỏe. Hầu hết các probiotic được biết đến cho đến nay đã được tiêu thụ thông qua các sản phẩm sữa lên men làm từ vi khuẩn axit lactic như là *Lactobacillus*. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, các probiotic có sẵn trên thị trường dưới dạng sữa lên men, hạt, bột và các loại tương tự có chứa một số vi khuẩn như là *Bifidobacterium* và *Enterococcus* ngoài *Lactobacillus*. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 của sáng chế cũng có thể được sử dụng dưới dạng sữa lên men, hạt, bột và tương tự, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “chịu axit” đề cập đến hoạt tính chịu được tính axit cao. Nếu các probiotic có hoạt tính chịu axit, chúng có thể được ngăn chặn khỏi bị thoái hóa hoặc hư hỏng ngay cả khi tiếp xúc với các điều kiện axit mạnh trong dạ dày bằng cách tiêu thụ thông qua các đường dùng khác nhau bao gồm sử dụng qua đường miệng.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “chịu dịch mật” đề cập đến sự đề kháng với các enzym tiêu hóa trong mật. Dịch mật được tạo ra từ gan và được lưu trữ trong túi mật, và chất lỏng màu nâu xanh có tính kiềm yếu giúp tiêu hóa chất béo trong tá tràng của ruột non. Nó nhũ hóa chất béo để giúp tiêu hóa và hấp thụ. Dịch mật là một trong những nguyên nhân chính làm giảm tác dụng của việc sử dụng probiotic khi chúng tác động lên probiotic được ăn vào qua nhiều con đường khác nhau bao gồm cả sử dụng qua đường miệng và tương tự.

Cụ thể, trong số các chế phẩm của sáng chế, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được phân lập từ nước tương, thực phẩm lên men truyền thống, và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được thu được từ kim chi, thực phẩm lên men truyền thống. Các đặc điểm hình thái của các chủng theo sáng chế là chủng *bacillus* gram dương, và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được đặc trưng bởi trình tự nucleotit 16s rADN được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1, và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được đặc trưng bởi trình tự nucleotit 16s rADN được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2. Mỗi trình tự nucleotit được phân tích và được tìm thấy sự tương đồng khoảng 99% với *Lactobacillus plantarum*.

Để duy trì ổn định chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 của sáng chế trong khoảng thời gian dài, các chủng có thể được lưu trữ bằng cách hòa tan các tế bào trong dung dịch lưu trữ được điều chế bằng cách trộn lượng glyxerol trong nước ở nhiệt độ -70°C, hoặc có thể được đông khô bằng cách ngưng các tế bào trong sữa tách béo 10% đã tiệt trùng, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây, và có thể được lưu trữ trong khoảng thời gian dài bằng nhiều phương pháp đã biết khác nhau.

Chế phẩm của sáng chế có thể không biểu hiện hoạt tính tán huyết chống lại các tế bào hồng cầu. Tán huyết đề cập đến sự phá hủy các tế bào hồng cầu và giải phóng huyết sắc tố ra khu vực xung quanh, và là hoạt động mà các tế bào hồng cầu bị ly giải bởi các enzym được sản xuất từ vi khuẩn có hại trong cơ thể. Do đó, ngay cả khi chế phẩm được sử dụng trong cơ thể, nó có thể không gây tán huyết trong mạch máu.

Ngoài ra, chế phẩm của sáng chế có thể có tính kháng yếu hoặc không có tính kháng các loại kháng sinh. Các loại kháng sinh cụ thể bao gồm nhưng không giới hạn ở ampicillin, clindamycin, gentamycin, kanamycin, erythromycin, ampicillin/sulbactam,

chloramphenicol, hoặc streptomycin. Theo đó, ngay cả khi chế phẩm được sử dụng trong dược phẩm, thực phẩm chức năng, các phụ gia thức ăn, hoặc loại tương tự, nó không có tính kháng kháng sinh, và do đó, khả năng gây ra tác dụng dược lý có liên quan hoặc các vấn đề môi trường là thấp.

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

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “các tế bào miễn dịch” đề cập đến tất cả các tế bào đóng vai trò trong chức năng miễn dịch trong cơ thể, và có thể được chia thành tế bào T và tế bào B. Các tế bào miễn dịch có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở các tế bào Th1 hoặc Th2. Chế phẩm của sáng chế có thể có hoạt tính để kích thích các tế bào miễn dịch, và do đó tăng tiết các cytokin như là IL-12, IL-10, hoặc TGF-beta.

Trong các bệnh do virus thường có tỷ lệ tử vong cao, hoại tử các tế bào hoặc các mô do virus có thể dẫn đến lây nhiễm thứ cấp, và nhiễm trùng máu gây ra bởi các vi khuẩn khác, bệnh viêm do phản ứng miễn dịch được kích hoạt quá mức, hoặc giảm ngon miệng và mất nước. Do đó, khi hiệu quả kháng virus (liên quan đến Th1 và Th2), ức chế nhiễm virus, và phản ứng miễn dịch (Th2, chống viêm), điều chỉnh lây nhiễm thứ cấp và phản ứng viêm quá mức, đồng thời có thể đạt được hiệu quả tăng cường, ngăn ngừa hiệu quả và điều trị cho các bệnh do virus gây ra. Như vậy, phương pháp để đồng thời tăng cường Th1 và Th2 liên quan đến việc cung cấp tăng cường hiệu quả miễn dịch thông qua các probiotic chưa được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, và phương pháp mới như vậy đã được phát hiện bởi các tác giả của sáng chế. Ngoài ra, chế phẩm của sáng chế có khả năng điều hòa miễn dịch để điều chỉnh sự mất cân bằng Th1/Th2.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “cytokin” đề cập đến glycoprotein được sử dụng như chất tín hiệu để kiểm soát và kích thích hệ thống phòng vệ cơ thể, và có thể là, ví dụ, IL-12, IL-10 hoặc TGF-beta, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Chế phẩm có thể thúc đẩy sự tăng trưởng của đối tượng hoặc giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy bằng cách sử dụng cho đối tượng.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “đối tượng” có thể đề cập đến tất cả các loài động vật bao gồm cả con người trong đó khả năng miễn dịch bị suy yếu hoặc có khả năng bị suy yếu. Ví dụ, đối tượng có thể bao gồm các loài động vật ngoại trừ con người hoặc bao gồm cả con người. Động vật có thể bao gồm không chỉ con người, mà

còn tất cả các động vật cần có hiệu quả như mô tả nêu trên được bộc lộ, và có thể cụ thể là động vật có vú như là bò, ngựa, cừu, lợn, dê, lạc đà, linh dương, chó, mèo và các động vật tương tự, hoặc động vật khác có thể là gia súc hoặc vật nuôi.

Phương pháp sử dụng trên không có giới hạn cụ thể nào, nhưng có thể được sử dụng thông qua các con đường khác nhau bao gồm cả đường miệng hoặc đường tiêm miễn là nó có thể đến được các mô đích. Các ví dụ về phương pháp sử dụng có thể là sử dụng qua đường miệng.

Chế phẩm có thể làm tăng kháng thể trong cơ thể. Khả năng miễn dịch của đối tượng có thể được cải thiện bằng cách tăng tiết các kháng thể được tham gia vào chức năng miễn dịch. Chế phẩm có thể được sử dụng cho đối tượng, và phương pháp sử dụng không có giới hạn cụ thể nào, nhưng có thể được sử dụng thông qua các con đường khác nhau bao gồm cả đường miệng hoặc đường tiêm miễn là nó có thể đến các mô đích. Các ví dụ của phương pháp sử dụng này có thể là sử dụng qua đường miệng. Chất lỏng của cơ thể như là máu hoặc sữa non, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây. Kháng thể có thể là IgG, IgA, hoặc kháng thể trung hòa, nhưng sáng chế không được giới hạn ở đây.

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

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

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

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “kháng-virus” đề cập đến đặc tính ức chế lây nhiễm virus. Các probiotic không thể tự vô hiệu hóa virus, nhưng có thể làm tăng khả năng miễn dịch của đối tượng bị nhiễm virus bằng hoạt động miễn dịch, do đó cho phép chống lại nhiễm virus.

Virut gây bệnh tiêu chảy trên lợn là loại virut corona lây nhiễm vào các tế bào niêm mạc ruột non của lợn, gây ra bệnh tiêu chảy trên lợn mà dẫn đến tiêu chảy và mất nước nghiêm trọng. Virut có thể là bất kỳ loại virut nào, lây nhiễm của chúng có thể được ức chế bởi chế phẩm của sáng chế, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Các chủng tương ứng với chủng (a) và (b) tương tự như trong chế phẩm của sáng chế có thể ở dạng nguyên chủng, sản phẩm phân giải của chúng, môi trường nuôi cấy của chúng, sản phẩm cô đặc của chúng hoặc dạng sấy khô của chúng. Khi các chủng được xử lý trên đối tượng, hoạt tính và sự lây nhiễm của virut PED có thể bị ức chế đáng kể. Vì thế, chế phẩm có thể được sử dụng như là chế phẩm kháng virut chống lại virut PED, hoặc được phẩm, chế phẩm thực phẩm chức năng, chế phẩm thuốc, hoặc chế phẩm thức ăn chăn nuôi để ngăn ngừa hoặc cải thiện bệnh tiêu chảy cấp ở lợn.

Theo một phương án của sáng chế, chủng (a) và (b) trong chế phẩm của sáng chế có thể là ở dạng nguyên chủng, sản phẩm phân giải của chúng, môi trường nuôi cấy của chúng, sản phẩm cô đặc của chúng hoặc dạng sấy khô của chúng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây. Các chi tiết liên quan đến chế phẩm có thể được tham chiếu đến phần mô tả ở trên.

Các chủng của sáng chế có thể được nuôi cấy bằng phương pháp thông thường để nuôi cấy các chủng *Lactobacillus*. Đối với môi trường nuôi cấy, môi trường tự nhiên hoặc môi trường tổng hợp có thể được sử dụng. Đối với nguồn cacbon của môi trường như là, ví dụ glucoza, sucroza, dextrin, glyxerol, tinh bột, và các loại tương tự có thể được sử dụng. Đối với nguồn nitơ, pepton, dịch chiết thịt, dịch chiết nấm men, men khô, đậu tương, muối amoni, nitrat và các hợp chất chứa nitơ hữu cơ hoặc vô cơ khác có thể được sử dụng, nhưng sáng chế không giới hạn ở các nguồn này. Đối với các muối vô cơ có trong môi trường nuôi cấy, magie, mangan, canxi, sắt, kali và loại tương tự có thể được sử dụng, nhưng sáng chế không giới hạn ở các nguồn này. Axit amin, vitamin, axit nucleic và các hợp chất liên quan có thể được bổ sung vào môi trường ngoài nguồn cacbon, nguồn nitơ và các thành phần của muối vô cơ. Chủng mới được phân lập của sáng chế có thể được nuôi cấy trong 12 giờ đến 4 ngày trong phạm vi nhiệt độ từ 20°C đến 40°C.

Trong sáng chế, canh nuôi cấy có thể được đề cập đến chế phẩm sau khi hoàn thành nuôi cấy, và cụ thể hơn, canh nuôi cấy có thể hoặc không bao gồm các tế bào. Do đó,

canh nuôi cấy có thể gồm dịch nổi nuôi cấy, chế phẩm trong đó dịch nổi nuôi cấy được loại bỏ, hoặc chế phẩm được cô đặc của chúng. Chế phẩm của canh nuôi cấy ngoài ra có thể chứa không chỉ các thành phần cần thiết cho nuôi cấy thông thường của chủng *Lactobacillus*, mà còn các thành phần hoạt động hợp lực với sự phát triển của *Lactobacillus*, và các chế phẩm của nó có thể dễ dàng được lựa chọn bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Ngoài ra, chủng có thể ở dạng lỏng hoặc dạng sấy khô, và phương pháp sấy khô có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở sấy khô bằng khí, sấy khô tự nhiên, sấy phun khô, và đông khô.

Chế phẩm có thể là điều chế hỗn hợp chứa hai loại của chủng, trong đó (a) chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P; và đồng thời chứa (b) chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM11045P. Theo đó, chế phẩm có thể chỉ bao gồm hai loại chủng tương ứng với các chủng (a) và (b), sản phẩm phân giải của chúng, môi trường nuôi cấy của chúng, sản phẩm cô đặc hoặc sấy khô của chúng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây. Trong trường hợp này, hai loại của chủng tương ứng với các chủng (a) và (b) ở trên có thể không nhất thiết phải ở cùng dạng trong chế phẩm, và có thể ở dạng kết hợp, nếu cần thiết, chủng (a) có thể ở dạng nguyên chủng của nó, và chủng (b) có thể ở dạng sản phẩm phân giải của chủng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây.

Trong chế phẩm, sản phẩm cô đặc có thể là hỗn hợp của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243, nhưng không bị giới hạn ở 10^5 CFU/mL đến 10^{10} CFU/mL, 10^5 CFU/mL đến 10^9 CFU/mL, 10^5 CFU/mL đến 10^8 CFU/mL, 10^5 CFU/mL đến 10^7 CFU/mL, 10^5 CFU/mL đến 10^6 CFU/mL, 10^6 CFU/mL đến 10^{10} CFU/mL, 10^7 CFU/mL đến 10^{10} CFU/mL, 10^8 CFU/mL đến 10^{10} CFU/mL, 10^9 CFU/mL đến 10^{10} CFU/mL, 10^6 CFU/mL đến 10^9 CFU/mL, 10^6 CFU/mL đến 10^8 CFU/mL, 10^6 CFU/mL đến 10^7 CFU/mL, 10^7 CFU/mL đến 10^9 CFU/mL, 10^7 CFU/mL đến 10^8 CFU/mL, hoặc 10^8 CFU/mL đến 10^9 CFU/mL.

Chế phẩm có thể còn bao gồm chất bảo quản lạnh hoặc tá dược. Chất bảo quản lạnh hoặc tá dược có thể là chất không tự nhiên hoặc chất tự nhiên, nhưng sáng chế không giới hạn ở đây. Trong phương án khác, chất bảo quản lạnh hoặc tá dược có thể là chất không tiếp xúc tự nhiên với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng

Lactobacillus plantarum CJLP243, hoặc chất không tự nhiên chứa đồng thời với chủng này, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Trong phương án khác nữa, chế phẩm có thể còn bao gồm ít nhất một chất bảo quản lạnh được chọn từ nhóm bao gồm glyxerol, trihaloza, maltodextrin, sữa bột tách kem và tinh bột, và/hoặc ít nhất một tá dược được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, dextrin và sữa tách béo. Chất bảo quản lạnh của sáng chế có thể có hàm lượng 0,01% đến 20% theo trọng lượng và 0,01% đến 10% theo trọng lượng dựa trên tổng trọng lượng của chế phẩm. Cụ thể, glyxerol có thể có hàm lượng 5% đến 20% theo trọng lượng, trihaloza có thể có hàm lượng 2% đến 10% theo trọng lượng, maltodextrin có thể có hàm lượng 2% đến 10% theo trọng lượng, sữa bột tách kem có thể có hàm lượng 0,5% đến 2% theo trọng lượng, và tinh bột có thể có hàm lượng 0,1% đến 1% theo trọng lượng của chế phẩm. Ngoài ra, tá dược có thể có hàm lượng 75% đến 95% theo trọng lượng hoặc 85% đến 95% trọng lượng dựa trên tổng trọng lượng của chế phẩm.

Hơn nữa, phương pháp điều chế chế phẩm có thể chứa hỗn hợp của hai chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và *Lactobacillus plantarum* CJLP243, sản phẩm phân giải của chúng, môi trường nuôi cấy của chúng, sản phẩm cô đặc của chúng, hoặc sản phẩm sấy khô của chúng với chất phụ gia. Chất phụ gia có thể là chất bảo quản lạnh hoặc tá dược nêu trên.

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

Chế phẩm có thể được sử dụng để tăng cường khả năng miễn dịch.

Chế phẩm có thể được sử dụng để cung cấp hoạt tính kháng virus.

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

Các probiotic được cố định trên các vách của đường tiêu hóa trong ruột để ngăn chặn sự hình thành của vi khuẩn gây hại và ức chế sự tăng sinh của virus. Ngoài ra, các enzym tiêu hóa có lợi được sản xuất bởi các probiotic thúc đẩy sinh trưởng bằng cách cải thiện sự hấp thụ và sử dụng các chất dinh dưỡng.

Phương pháp điều chế chế phẩm probiotic có thể bao gồm điều chế từng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng

ký KCCM12287P và chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM11045P; và hỗn hợp chế phẩm chứa chủng CJLP475 và chế phẩm chứa chủng CJLP243.

Trong một phương án, phương pháp điều chế có thể còn bao gồm chất phụ gia vào ít nhất một của các chế phẩm nêu trên, như là chế phẩm chứa chủng CJLP475, chế phẩm chứa chủng CJLP243, hoặc chế phẩm probiotic.

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

Ở đây, vi khuẩn trong chế phẩm đông khô có thể ở trạng thái sống.

Trong phương án khác nữa, phương pháp điều chế có thể bao gồm chuẩn bị định lượng trước của chế phẩm vào trong bao gói sau bước trộn.

Ở đây, trong bước đóng gói, chế phẩm có thể được đưa vào trong bao gói sao cho hàm lượng tổng của chủng bao gồm chủng CJLP475 và chủng CJLP243 là 10^6 CFU/g hoặc nhiều hơn.

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

Chế phẩm đã được mô tả bên trên. Cụ thể, chế phẩm của sáng chế có thể được bổ sung cho chất phụ gia thực phẩm hoặc chế phẩm thực phẩm chứa chất phụ gia thực phẩm nhằm mục đích thúc đẩy sự tăng trưởng, giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy, và ức chế hoạt tính của virus.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “phụ gia thức ăn chăn nuôi” đề cập đến chất bổ sung cho thức ăn chăn nuôi để nhằm mục đích cung cấp các hiệu quả khác nhau, như là bổ sung các chất dinh dưỡng và ngăn ngừa giảm cân, thúc đẩy tiêu hóa xenluloza trong thức ăn chăn nuôi, nâng cao chất lượng của sữa, ngăn ngừa rối loạn sinh sản và nâng cao tỷ lệ mang thai, và ngăn ngừa căng thẳng nhiệt độ cao trong mùa hè. Phụ gia thức ăn chăn nuôi của sáng chế thuộc danh mục thức ăn bổ sung theo Luật kiểm soát thức ăn chăn nuôi cho cá và gia súc và có thể còn bao gồm các khoáng chất như natri hydro cacbonat, bentonit, magie oxit, các hợp chất khoáng, và các chất khoáng vi lượng bao gồm kẽm, đồng, coban, và selen, các vitamin như caroten, vitamin E, các vitamin A, D, E, axit nicotinic, và phức hợp vitamin B; các chất bảo vệ axit amin như

methionin và lysin; các chất bảo vệ axit béo như canxi axit béo; và các vi khuẩn sống và các chế phẩm nấm men như probiotic (vi khuẩn axit lactic), dịch nuôi cấy nấm men, và sản phẩm lên men nấm.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “thức ăn chăn nuôi” đề cập đến bất kỳ chế độ ăn uống tự nhiên hoặc nhân tạo cho động vật ăn, nuốt và tiêu hóa hoặc thích hợp để cho ăn, nuốt và tiêu hóa. Thức ăn chăn nuôi bao gồm chế phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh chuyển hóa theo sáng chế như thành phần hoạt tính có thể được điều chế thành các dạng khác nhau của thức ăn chăn nuôi được biết đến trong kỹ thuật, và cụ thể có thể bao gồm thức ăn đậm đặc, thức ăn chăn nuôi thô và/hoặc thức ăn đặc biệt.

Các đối tượng được nuôi có thể bao gồm bất kỳ sinh vật có thể ăn thức ăn chăn nuôi của sáng chế, và có thể bao gồm lợn theo mục đích của sáng chế.

Hàm lượng của chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được kiểm soát phù hợp tùy thuộc vào loại và độ tuổi của đối tượng được áp dụng, các dạng áp dụng, hiệu quả mong muốn và tương tự. Ví dụ, chế phẩm có thể có hàm lượng 0,01% đến 20% trọng lượng, 0,01% đến 15% trọng lượng, 0,01% đến 10% trọng lượng, 0,01% đến 5% trọng lượng, 0,01% đến 1% trọng lượng, 1% đến 20% trọng lượng, 1% đến 15% trọng lượng, 1% đến 10% trọng lượng, 1% đến 5% trọng lượng, 5% đến 20% trọng lượng, 5% đến 15% trọng lượng, 5% đến 10% trọng lượng, 10% đến 20% trọng lượng, 10% đến 15% trọng lượng, hoặc 15% đến 20% trọng lượng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Để sử dụng, chế phẩm thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể còn bao gồm hỗn hợp của một hoặc nhiều axit hữu cơ như axit xitric, axit fumaric, axit adipic, axit lactic, và tương tự; phosphat như kali phosphat, natri phosphat, poly phosphat, và tương tự; và chất chống oxy hóa tự nhiên như polyphenol, catechin, tocopherol, vitamin C, chiết xuất trà xanh, chitosan, axit tannic, và tương tự. Nếu cần thiết, các phụ gia điển hình khác như chất chống cặn, chất đệm, tác nhân kìm hãm vi khuẩn, và tương tự có thể được bổ sung. Hơn nữa, chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất liên kết, hoặc chất bôi trơn có thể được bổ sung để tạo chế phẩm thành chế phẩm có thể tiêm như dung dịch nước, huyền phù, và tương tự, viên nang, hạt, hoặc viên.

Hơn nữa, chế phẩm thức ăn chăn nuôi của sáng chế có thể được sử dụng cùng với chất bổ sung dinh dưỡng, chất tăng trưởng, chất tăng hấp thụ tiêu hóa, và tác nhân phòng bệnh, ngoài ra các chất phụ gia khác như là axit amin, muối vô cơ, các vitamin, chất

chống oxy hóa, các tác nhân chống nấm, chất chống vi trùng, và tương tự, như các thành phần phụ gia, và các thành phần chính bao gồm các thức ăn protein thực vật như lúa mì nghiền hoặc lúa mì vỡ hạt, lúa mạch, ngô, và tương tự, các thức ăn protein động vật như bột huyết, bột thịt, bột cá, và tương tự, mỡ động vật và mỡ thực vật.

Khi chế phẩm thức ăn chăn nuôi của sáng chế được sử dụng như phụ gia thức ăn chăn nuôi, chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể được bổ sung một mình hoặc được sử dụng kết hợp cùng với các chế phẩm khác, và có thể được sử dụng thích hợp theo phương pháp thông thường. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể được điều chế ở dạng sử dụng giải phóng ngay lập tức hoặc công thức giải phóng lâu dài liên tục, kết hợp với chất mang được dụng, không độc. Chất mang có thể là chất không tự nhiên hoặc chất tự nhiên, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Theo phương án khác, chất mang có thể là chất không tiếp xúc tự nhiên với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243, hoặc chất mà không tự nhiên chứa đồng thời với chủng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Chất mang ăn được có thể là tinh bột ngô, lactoza, sucroza, hoặc propylen glycol. Chất mang rắn có thể sử dụng ở dạng viên, bột, viên ngậm, và tương tự, và chất mang dạng lỏng có thể sử dụng ở dạng sirô, huyền phù lỏng, nhũ tương, dung dịch, và tương tự. Ngoài ra, tác nhân để uống có thể bao gồm chất bảo quản, chất bôi trơn, chất tăng hòa tan, hoặc chất ổn định, và có thể còn bao gồm các tác nhân khác để cải thiện các bệnh viêm và các chất hữu ích để ngăn ngừa virus.

Chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được trộn với thức ăn chăn nuôi với hàm lượng khoảng 10 g đến 500 g, cụ thể 10 g đến 100 g trên 1 kg trên cơ sở trọng lượng khô của thức ăn chăn nuôi. Sau khi trộn lẫn hoàn toàn, chế phẩm thức ăn chăn nuôi có thể được cung cấp dưới dạng nghiền, hoặc có thể còn trải qua quá trình ép viên, kéo dài, hoặc ép đùn, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất thực phẩm hoặc thực phẩm chức năng chứa chế phẩm.

Cụ thể, chế phẩm của sáng chế có thể được bổ sung cho thực phẩm nhằm mục đích thúc đẩy tăng trưởng, thúc đẩy khả năng miễn dịch, giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy, và ức chế hoạt tính của virus. Chế phẩm đã được mô tả bên trên. Thực phẩm có thể bao gồm chất mang nhận dinh dưỡng. Chất mang có thể là chất xuất hiện không tự nhiên hoặc chất xuất hiện tự nhiên, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Trong phương án

khác, chất mang có thể là chất không tiếp xúc tự nhiên với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243, hoặc chất không được chứa tự nhiên đồng thời với hai chủng, nhưng sáng chế không được giới hạn ở đó.

Chế phẩm thực phẩm của sáng chế bao gồm tất cả các dạng của thực phẩm chức năng, bổ sung dinh dưỡng, các thực phẩm sức khỏe, và các phụ gia thực phẩm, và các loại chế phẩm thực phẩm có thể được điều chế ở các dạng khác nhau theo các phương pháp thông thường.

Khi chế phẩm được sử dụng như là chất phụ gia thực phẩm, chế phẩm có thể được bổ sung một mình hoặc được sử dụng ở dạng kết hợp với các thực phẩm khác hoặc các thành phần thực phẩm khác, và có thể được sử dụng thích hợp theo phương pháp thông thường. Hàm lượng của các thành phần hoạt chất được trộn có thể được xác định thích hợp tùy thuộc vào mục đích sử dụng (phòng ngừa, tăng sức khỏe, hoặc điều trị). Thông thường, tại thời điểm điều chế thực phẩm hoặc đồ uống, chế phẩm được bổ sung với lượng 0,0001% đến 1% trọng lượng, tốt hơn là 0,0001% đến 0,1% trọng lượng dựa trên thành phần nguyên liệu thô chứa chế phẩm. Tuy nhiên, trong trường hợp sử dụng trong thời gian dài cho mục đích sức khỏe và vệ sinh hoặc cho mục đích kiểm soát sức khỏe, hàm lượng có thể ít hơn phạm vi nêu trên.

Sáng chế không giới hạn cụ thể ở loại thực phẩm nào. Các ví dụ về thực phẩm có thể được bổ sung chế phẩm bao gồm thịt, xúc xích, bánh mì, sôcôla, kẹo, đồ ăn nhẹ, bánh kẹo, pizza, mì ăn liền, các loại mì khác, kẹo cao su, các sản phẩm từ sữa bao gồm kem, các loại súp, nước giải khát, trà, đồ uống, đồ uống có cồn, phức hợp vitamin, và tương tự, và tất cả các loại thực phẩm chức năng cho sức khỏe theo nghĩa thông thường.

Chế phẩm đồ uống cho sức khỏe của sáng chế có thể còn chứa các thành phần bổ sung, các chất tạo hương vị khác nhau hoặc cacbohydrat tự nhiên, như trong đồ uống thông thường. Các cacbohydrat tự nhiên nêu trên có thể bao gồm các monosacarit như glucoza, fructoza, và tương tự; các đisacarit như maltoza, sucroza và các loại tương tự; polysacarit như dextrin, xyclodextrin, và tương tự; và rượu đường như xylitol, sorbitol, erytritol, và tương tự. Các chất tạo ngọt tự nhiên như thaumatin, chiết xuất stevia, và tương tự; và các chất tạo ngọt tổng hợp như sacarin, aspartam, và tương tự có thể được sử dụng làm chất tạo ngọt. Tỷ lệ của các thành phần bổ sung có thể nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,04 phần trọng lượng, cụ thể là 0,02 đến 0,03 phần trọng lượng dựa trên

100 phần trọng lượng của chế phẩm của sáng chế.

Ngoài các thành phần nêu trên, chế phẩm của sáng chế có thể còn chứa các chất bổ sung dinh dưỡng khác, các vitamin, các chất điện giải, chất tạo hương, chất tạo màu, axit pectic và muối của chúng, axit alginic và muối của chúng, axit hữu cơ, chất làm đặc keo bảo vệ, chất điều chỉnh độ pH, chất ổn định, chất bảo quản, glyxerin, rượu, chất có ga được sử dụng trong các đồ uống có ga và tương tự. Tỷ lệ của các chất phụ gia không quan trọng, nhưng thường được chọn trong khoảng từ 0,01 đến 0,1 phần trọng lượng dựa trên 100 phần trọng lượng chế phẩm của sáng chế. Hơn nữa, chế phẩm của sáng chế có thể bao gồm thịt quả để điều chế nước ép trái cây tự nhiên, đồ uống trái cây hoặc đồ uống thực vật. Tỷ lệ thịt quả không quan trọng, nhưng thường được chọn trong khoảng từ 0,01 đến 10 phần trọng lượng, dựa trên 100 phần trọng lượng chế phẩm của sáng chế. Các thành phần có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất mỹ phẩm chứa chế phẩm.

Cụ thể, chế phẩm của sáng chế có tác dụng kháng viêm và tác dụng ức chế hoạt tính kháng virus thông qua kích thích miễn dịch, và có thể được sử dụng như mỹ phẩm. Chế phẩm được mô tả bên trên.

Khi chế phẩm theo sáng chế được sử dụng như mỹ phẩm, chế phẩm có thể được điều chế thành các loại mỹ phẩm khác nhau theo các công thức thông thường được biết đến trong lĩnh vực mỹ phẩm. Sau khi điều chế thành từng công thức, nó có thể được điều chế bằng cách bổ sung chất mang hoặc tá dược được chấp nhận và cần thiết trong sản xuất mỹ phẩm cho từng công thức. Chất mang có thể là chất xuất hiện không tự nhiên hoặc xuất hiện tự nhiên, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Trong phương án khác, chất mang có thể là không tiếp xúc tự nhiên với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243, hoặc chất không tự nhiên chứa đồng thời với hai chủng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

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

Khi chế phẩm theo sáng chế được sử dụng như là dược phẩm, chế phẩm có thể được điều chế thành công thức được thông thường được biết đến trong kỹ thuật. Dược

phẩm có thể được điều chế đặc biệt thành các công thức dùng qua đường miệng như chất lỏng, huyền phù, bột, hạt, viên nén, viên nang, thuốc viên hoặc chiết xuất. Sau khi điều chế thành từng công thức, có thể được điều chế bằng cách bổ sung chất mang hoặc tá dược được chấp nhận và cần thiết trong sản xuất mỹ phẩm cho mỗi công thức. Chất mang có thể là chất không tự nhiên hoặc chất tự nhiên, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Trong phương án khác, chất mang có thể là chất không tiếp xúc tự nhiên với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243, hoặc chất không tự nhiên chứa đồng thời với hai chủng, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó. Thông thường, khi chế phẩm được điều chế thành công thức dùng qua đường miệng, ít nhất một chất mang được chọn từ nhóm từ chất pha loãng, chất bôi trơn, chất kết dính, chất làm tan, chất tạo ngọt, chất ổn định và chất bảo quản có thể được sử dụng, và ít nhất một phụ gia được chọn từ chất tạo hương vị, vitamin và chất chống oxy hóa có thể được sử dụng. Bất kỳ tá dược hoặc chất phụ gia được dùng có thể được sử dụng. Cụ thể, có thể sử dụng lactoza, tinh bột ngô, dầu đậu tương, xenluloza vi tinh thể, hoặc manitol làm chất pha loãng; magie stearat hoặc talc làm chất bôi trơn; và polyvinyl pyrrolidon hoặc hydroxypropyl xenluloza làm chất kết dính. Ngoài ra, có thể sử dụng canxi cacboxymetylxenluloza, natri tinh bột glycolat, kali polacrilin, hoặc crospovidon làm chất phân rã; đường trắng, fructoza, sorbitol, hoặc aspartam làm chất tạo ngọt; natri cacboxymetylxenluloza, β -xyclođextrin, sáp trắng, hoặc gôm xanthan làm chất ổn định; và methyl paraoxybenzoat, propyl paraoxybenzoat, hoặc kali sorbat làm chất bảo quản.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất bước sử dụng chế phẩm của sáng chế cho đối tượng. Chế phẩm và đối tượng được mô tả bên trên.

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

Liều lượng sử dụng có thể là nhưng không giới hạn ở 10^6 CFU/ngày hoặc nhiều hơn, 10^7 CFU/ngày hoặc nhiều hơn, 10^8 CFU/ngày hoặc nhiều hơn, 10^9 CFU/ngày hoặc nhiều hơn, 10^{10} CFU/ngày hoặc nhiều hơn, hoặc 10^{11} CFU/ngày hoặc nhiều hơn dựa trên hỗn hợp của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất phương pháp để tăng cường khả năng miễn dịch của đối tượng, bao gồm sử dụng chế phẩm cho đối tượng cần sử dụng.

Chế phẩm và đối tượng được miêu tả bên trên.

Như sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “sử dụng” nghĩa là đưa chế phẩm của sáng chế cho đối tượng bằng bất kỳ phương pháp phù hợp nào, và đường sử dụng của chế phẩm có thể bao gồm các đường khác nhau như sử dụng qua đường miệng hoặc tiêm miễn là có thể đến được mô đích.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị đối tượng bị nhiễm virus, bao gồm cho đối tượng cần sử dụng với chế phẩm. Chế phẩm được mô tả bên trên.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “ngăn ngừa” hoặc “việc ngăn ngừa” nghĩa là các tác động nhằm ức chế, chặn, hoặc làm chậm bệnh bị nhiễm virus bằng cách sử dụng chế phẩm của sáng chế. Ngoài ra, như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “điều trị” hoặc “việc điều trị” nghĩa là các tác động nhằm cải thiện hoặc thay đổi theo hướng tích cực của bệnh bị nhiễm virus bằng cách sử dụng của chế phẩm nhằm cải thiện hoặc thay đổi triệu chứng theo hướng tích cực của bệnh nhiễm virus bằng cách sử dụng chế phẩm của sáng chế.

Ví dụ của sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1. Phân lập và lựa chọn các chủng

Ví dụ 1-1. Thu mẫu và phân lập chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP475.

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP45 được phân lập từ nước tương được cấy ria trên môi trường MRS đặc (Difco, Mỹ) chứa 1,5% thạch và được ủ ở nhiệt độ 37°C hoặc 24 giờ. Các chủng được phân lập hoàn toàn từ mỗi mẫu bằng cách cấy chuyển chúng sang môi trường mới, và các chủng đã được phân lập được lưu giữ trong môi trường dinh dưỡng được bổ sung với 20% glyxerol ở nhiệt độ -70°C hoặc thấp hơn. Kết quả là, tổng cộng 1.552 chủng đã thu được, và các chủng có hoạt tính kháng virus rất tốt được chọn thông qua các ví dụ dưới đây.

Kết quả của phân tích trình tự 16S rADN, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 đã cho thấy độ tương đồng cao nhất (99,9%) với chủng *Lactobacillus*

plantarum chuẩn (NBRC1589, số đăng ký tại Ngân hàng gen AB326351) và do đó được định danh là *Lactobacillus plantarum* và được đặt tên là “*Lactobacillus plantarum* CJLP475”, và được ký gửi tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc, Cơ quan lưu chủng quốc tế theo Hiệp ước Budapest vào ngày 11 tháng 7 năm 2018, với số đăng ký KCCM12287P. Kết quả là, trình tự nucleotit 16S rADN của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được biểu thị tương ứng bằng SEQ ID NO: 1.

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

Bảng 1

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

Tên chủng	CJLP475	Tên chủng	CJLP475
Đối chứng	-	Esculin	+
Glyxerol	-	Salixin	+
Erytritol	-	Cellobioza	+
D-Arabinoza	-	Maltoza	+
L-Arabinoza	+	Lactoza	+
Riboza	+	Melibioza	+
D-Xyloza	-	Sacaroza	+
L-Xyloza	-	Trihaloza	+
Adonitol	-	Inulin	-
β Metyl-xylosit	-	Melezitoza	+
Galactoza	+	D-Raffinoza	+
D-Glucoza	+	Amidon	-
D-Fructoza	+	Glycogen	-
D-Mannoza	+	Xylitol	-
L-sorboza	-	β -Gentiobioza	+
Rhamnoza	+	D-Turanoza	+
Dulcitol	-	D-Lyxzoza	-
Inositol	-	D-Tagatoza	-
Manitol	+	D-Fucoza	-
Sorbitol	+	L-Fucoza	-
α Metyl-D-mannosit	+	D-Arabitol	-

α Metyl-D-glucosit	-	L-Arabitol	-
N Axetyl glucosamin	+	Gluconat	+
Amygdalin	+	2-xeto-gluconat	-
Arbutin	+	5-xeto-gluconat	-

+: Dương tính, -: Âm tính

Ví dụ 1-2. Thu mẫu và phân lập chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243

Chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 được công bố ở Công bố đơn patent Hàn Quốc không xét nghiệm số. 10-2011-0046020 (KR 10-2011-0046020 A) đã thu được. Trong công bố đơn patent nêu trên, chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 đã thu được bằng phương pháp dưới đây.

Các chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 được phân lập từ kim chi được cấy ria trên môi trường MRS đặc (Difco, Mỹ) chứa 1,5% thạch, và được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc được chứng minh là tinh sạch được thu bằng cách sử dụng vòng tròn của que cấy và được ủ trong môi trường lỏng MRS (Difco, Mỹ) ở 37°C trong 18 đến 24 giờ, và các chủng sau đó được giữ ở nhiệt độ -70°C hoặc thấp hơn.

Kết quả của phân tích trình tự của 16S rADN, chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 cho thấy độ tương đồng cao nhất (99,9%) với chủng *Lactobacillus plantarum* chuẩn (NBRC15891, số đăng ký ở Ngân hàng gen là AB326351) và được định danh là *Lactobacillus plantarum* và được đặt tên là “*Lactobacillus plantarum* CJLP243”, và được ký gửi tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc, Cơ quan lưu chủng quốc tế theo Hiệp ước Budapest vào ngày 14 tháng 10 năm 2009, với số đăng ký KCCM11045P. Kết quả là, trình tự nucleotit 16S rADN của chủng *Lactobacillus plantarum* KCCM11045P được biểu thị tương ứng bằng SEQ ID NO: 2.

Ví dụ 2. Đánh giá tính chịu axit và chịu dịch mật của các chủng

Để lựa chọn các chủng có thể được sử dụng như là các probiotic, hoạt tính chịu axit và chịu dịch mật của các chủng thu được sẽ được đánh giá.

Môi trường dịch vị nhân tạo được điều chế để đánh giá tính chịu axit. Cụ thể hơn, môi trường dịch vị nhân tạo được điều chế bằng cách bổ sung pepsin vào môi trường MRS lỏng để điều chỉnh độ pH đến 2,5, sau đó được hấp tiệt trùng.

Các chủng của Ví dụ 1 được nuôi cấy tĩnh trong môi trường MRS lỏng ở nhiệt độ

37°C trong 18 giờ sau khi nuôi cấy thứ cấp lần hai. 1% của các chủng đã nuôi trước được cấy môi trường dịch vị nhân tạo và được nuôi cấy tĩnh ở nhiệt độ 37°C, và canh nuôi cấy được lấy mẫu tại thời điểm 0 giờ và 3 giờ. Canh nuôi cấy đã lấy mẫu lần lượt được pha loãng và cấy ria trên môi trường MRS đặc, và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ để đo số lượng các tế bào sống.

Môi trường dịch mật nhân tạo được điều chế để đánh giá tính chịu dịch mật. Cụ thể hơn, môi trường dịch mật nhân tạo được điều chế bằng cách bổ sung 0,5% mật bò (dịch mật bò) vào môi trường MRS lỏng, sau đó được hấp tiệt trùng.

Các chủng của Ví dụ 1 được nuôi cấy tĩnh trong môi trường MRS lỏng ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ sau khi nuôi cấy thứ cấp lần hai. 1% các chủng đã được nuôi cấy được cấy vào môi trường dịch mật nhân tạo và được nuôi cấy tĩnh ở nhiệt độ 37°C, và canh nuôi cấy được lấy mẫu lúc 0 giờ và 24 giờ. Canh nuôi cấy đã được lấy mẫu lần lượt được pha loãng và cấy ria trên môi trường MRS đặc, và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ để đo số lượng tế bào sống.

Thông qua các đánh giá nêu trên, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 thể hiện tính chịu axit và chịu dịch mật cao nhất được lựa chọn. Để so sánh khả năng chịu axit và chịu dịch mật của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 với các chủng thông thường đã biết, tính chịu axit và chịu dịch mật của chủng mẫu *Lactobacillus plantarum* (KCCM12116) thu được từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hàn Quốc được đánh giá theo cách tương tự như phương pháp nêu trên.

Bảng 2. Đánh giá tính chịu axit (đơn vị: CFU/mL)

	0 giờ	3 giờ
<i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP243 (KCCM11045P)	$4,5 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$
<i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP475 (KCCM12287P)	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$
<i>Lactobacillus plantarum</i> (KCCM12116)	$2,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$

Bảng 3. Đánh giá tính chịu dịch mật (đơn vị: CFU/mL)

	0 giờ	24 giờ
<i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP243 (KCCM11045P)	$3,2 \times 10^7$	$7,3 \times 10^8$
<i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP475 (KCCM12287P)	$1,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$
<i>Lactobacillus plantarum</i> (KCCM12116)	$2,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^6$

Theo các Bảng 2 và Bảng 3, số lượng các tế bào của chủng *Lactobacillus plantarum* chuẩn (KCCM12116) trong môi trường dịch vị nhân tạo và môi trường dịch mật nhân tạo bị giảm xuống. Kết quả là, có thể thấy rằng không phải tất cả các *Lactobacillus plantarum* thông thường đã biết có tính chịu axit và chịu dịch mật.

Ngược lại, trong đánh giá chịu axit, số lượng tế bào của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được tăng lên, và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 có số lượng tế bào giảm ít hơn so với chủng *Lactobacillus plantarum* chuẩn (KCCM12116), chỉ ra rằng cả hai chủng có tính chịu axit rất tốt.

Hơn nữa, trong đánh giá chịu dịch mật, số lượng tế bào của chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 được tăng lên, và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có số lượng tế bào giảm ít hơn so với chủng *Lactobacillus plantarum* (KCCM12116) chuẩn, chỉ ra rằng cả hai chủng có tính chịu dịch mật rất tốt.

Ngoài ra, vì mỗi chủng có tính chịu axit và chịu dịch mật rất tốt, nó có thể được hiểu rằng chế phẩm chứa cả hai chủng có tính chịu axit và chịu dịch mật.

Ví dụ 3. Đánh giá tính an toàn của các chủng

Ví dụ 3-1. Xác nhận hoạt tính tán huyết của các chủng

Tan máu β (β -Hemolysis) là hiện tượng trong đó các photpholipit được cấp bởi các tế bào hồng cầu bị thủy phân bởi các enzym photpholipit được sản xuất bởi vi khuẩn có hại, dẫn đến tán huyết của các tế bào hồng cầu. Để xác định hoạt tính tán huyết của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243, đĩa thạch máu (thạch máu cừu 5%, Hanilkomed, Hàn Quốc) được sử dụng. Các chủng được cấy rìa vào trong các đĩa thạch máu đã được chuẩn bị và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ để xác nhận tán huyết.

Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.1, xác nhận rằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 không thể hiện tán huyết. Những kết quả này cho thấy hai chủng này không hoạt động như vi khuẩn có hại trong cơ thể.

Ví dụ 3-2. Đánh giá tính nhạy cảm kháng sinh

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 được cấy chuyển độc lập vào trong môi trường MRS lỏng và được nuôi cấy

tĩnh ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Vi khuẩn được nuôi cấy này được thấm vào các tấm bông đã tiệt trùng và được cấy ria trên môi trường Mueller Hinton II đặc, và sau đó các đĩa kháng sinh được đặt trên môi trường và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Các đĩa Ampixillin, clindamycin, gentamixin, kanamycin, erythromycin, ampicillin/sulbactam, chloramphenicol, và streptomycin (Oxoid, UK) được sử dụng như là các đĩa kháng sinh để xét nghiệm kháng sinh.

Kết quả xét nghiệm tính kháng kháng sinh của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243, cả hai chủng không kháng với các kháng sinh trên (Bảng 4). Do đó, có thể thấy rằng ngay cả khi chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 được sử dụng trong thực phẩm chức năng sức khỏe, phụ gia thức ăn chăn nuôi, v.v., các vấn đề có thể phát sinh liên quan đến các vấn đề sức đề kháng và môi trường ít xảy ra, xem xét rằng chúng không có tính kháng kháng sinh.

Bảng 4. Ước chế sinh trưởng vi khuẩn theo kháng sinh

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

Ví dụ 4. Đánh giá độc tính tế bào

Để đánh giá ảnh hưởng của các chủng đến sự sống của các tế bào, xét nghiệm MTS được thực hiện bằng cách sử dụng (3-(4,5-dimetyl-2-yl)-5-(3-cacboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, (promega, Mỹ) để đánh giá mức độ độc lên các tế bào IPEC-J2 (các tế bào biểu mô ruột lợn). Mỗi tế bào được ủ trên đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng, và sau khi được xử lý với chế phẩm, trong đó các chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được trộn với tỷ lệ 1:1, ở các

nồng độ khác nhau (10^5 đến 10^7 CFU/mL) và được nuôi cấy thêm. Tỷ lệ trộn của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 là 1:1 trong tất cả các ví dụ dưới đây. Để đánh giá độ độc tế bào, dung dịch MTS đã được bổ sung vào canh nuôi cấy tế bào sau 24 giờ, và các tế bào được ủ trong 2 giờ, tỷ lệ sống sót của các tế bào (%) được tính toán bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 490 nm với máy đọc vi đĩa.

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

Ví dụ 5. Đánh giá hoạt tính tăng cường miễn dịch

Để xác nhận hiệu quả tăng cường miễn dịch của chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243, các tế bào IPEC-J2 được nuôi trong môi trường DMEM/F-12 (Môi trường Dulbecco's Modified Eagle: Hỗn hợp dinh dưỡng F-12). Ngoài ra, các tế bào máu đơn nhân ngoại vi (PBMC) được lấy từ lợn cai sữa 21 ngày tuổi.

Máu được thu thập được trộn với PBS ở tỷ lệ 1:1 và được ly tâm với Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, NJ, Mỹ) để tách lớp hỗn hợp WBC (white blood cell: tế bào bạch cầu), và các tế bào máu đơn nhân ngoại vi thu được từ lớp đã tách ra.

Để đánh giá hiệu quả tăng cường miễn dịch, chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 được trộn với các tế bào máu đơn nhân ngoại vi với tỷ lệ 10:1, và hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 37°C trong tủ nuôi cấy tế bào chứa 5% CO_2 trong 20 giờ. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, các tế bào được ly tâm, và hiệu quả hoạt tính miễn dịch của dịch nổi đã nuôi cấy được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp cytokin ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay: phương pháp miễn dịch được liên kết với enzym). Cụ thể hơn, ELISA (R&D Systems, USA) được thực hiện cho IL-12 (interleukin-12), kích hoạt cơ chế miễn dịch liên quan đến Th1 (các tế bào T hỗ trợ 1) bảo vệ chống lại các yếu tố xâm lấn bên ngoài (mầm bệnh), IL-10 (interleukin-10) được liên quan đến Th2 (các tế bào T hỗ trợ 2) điều chỉnh phản ứng viêm quá mức, và TGF-beta ức chế viêm.

Các đồ thị thể hiện kết quả đo của IL-12, IL-10 và TGF-beta được thể hiện trên

các Fig.3 đến Fig.5, tương ứng. Trong mỗi đồ thị, mẫu đối chứng được sử dụng như là đối chứng âm của chủng không được điều trị.

Kết quả là, như thể hiện trên các Fig.3, Fig.4, và Fig.5, được xác nhận rằng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 được thể hiện hoạt tính tăng tiết IL-12, IL-10 và TGF-beta bằng cách kích thích các tế bào miễn dịch. Do đó, có thể thấy rằng chế phẩm thể hiện tác dụng đồng thời tăng cường cơ chế miễn dịch Th2 cũng như cơ chế miễn dịch Th1 và chống viêm.

Ví dụ 6. Tác dụng ức chế chống nhiễm virus

Để đo tác dụng ức chế của chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 chống nhiễm virus, virus gây bệnh tiêu chảy trên lợn (chủng PEDV, SM98 hoặc KPEDV9) được điều chế. Cụ thể, virus được tăng sinh trong các tế bào Vero (CCL-81, các tế bào biểu mô thận được tách chiết từ *Chlorocebus*), và MEM (Môi trường chủ yếu tối thiểu để cấy tế bào của Eagle, Gibco BRL, USA), 10% FBS được bất hoạt bằng nhiệt (huyết thanh thai bò, v/v) và 1% (v/v) penixilin/streptomycin là môi trường để nuôi cấy các tế bào Vero. Các tế bào Vero được nuôi đơn lớp, được rửa hai lần với môi trường, và sau đó tất cả dung dịch được loại bỏ. Virus được trộn với 0,1 MOI (bội nhiễm) trong MEM không có FBS chứa trypsin được xử lý với 5 µg/ml TPCK (N-tosyl-L-phenylalanin chloroMetyl keton), được xử lý với thể tích tối thiểu của các tế bào nuôi cấy đã chuẩn bị, và sau đó được ủ ở nhiệt độ 37°C trong tủ nuôi cấy tế bào chứa 5% CO₂ trong 2 đến 3 ngày

Nhiễm virus được xác định bởi sự hình thành hợp bào virus. Khi hợp bào virus được hình thành, canh nuôi cấy virus được thu trong 3 đến 6 giờ, và các tế bào được loại bỏ bằng cách sử dụng máy ly tâm và lưu trữ ở -80°C. Để tính toán mức độ lây nhiễm của virus, các tế bào Vero được ủ trong đĩa 96 giếng ở mật độ 2×10^4 tế bào/0,1 ml, và các tế bào được rửa với PBS. Sau đó, các tế bào được bổ sung với canh nuôi cấy, trong đó virus được pha loãng tuần tự 2 lần, và được ủ trong 24 đến 48 giờ để xác nhận nhiễm virus, và mức độ virus được tính toán bằng phương pháp Reed & Muench.

Để đo tác dụng ức chế của chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 chống nhiễm virus, chế phẩm và các tế bào máu đơn nhân ngoại vi (PBMC) đã phản ứng trong 20 đến 24 giờ để thu canh nuôi cấy. Canh nuôi cấy được xử lý trên đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng, trong đó IPEC-J2

được ủ, và ủ ở nhiệt độ 37°C trong tủ nuôi cấy tế bào chứa 5% CO₂ trong 2 đến 4 giờ. Virut PED (SM98 hoặc KPEDV9) với liều 100 TCID₅₀/mL (50% liều gây nhiễm tế bào) được chia ra từng đĩa và được ủ trong 48 giờ. Để xác nhận nhiễm virut, đĩa nuôi cấy được cố định với metanol sau khi hoàn thành nuôi cấy, nhuộm màu tím tinh thể, và sau đó các giếng chứa các tế bào bị biến tính được kiểm tra bằng kính hiển vi, nhờ đó xác nhận nhiễm virut. Tác dụng ức chế của mỗi chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 chống nhiễm virut được đánh giá theo cách tương tự như mô tả ở trên.

Kết quả là, như thể hiện trên Fig.6, xác nhận rằng khi các chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được xử lý với các tế bào miễn dịch của lợn, các tế bào miễn dịch được kích hoạt bởi các chủng, và nhiễm virut bị ức chế trong tất cả các nhóm thử nghiệm.

Ví dụ 7. Xác nhận tác dụng kháng virut trong đó tăng cường khả năng miễn dịch trong lợn cai sữa khi cho ăn chế phẩm.

Để xác nhận hiệu quả của chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 và chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 lên khả năng miễn dịch khi cho ăn, thử nghiệm được thực hiện như sau:

Ba mươi hai lợn con cai sữa 21 ngày tuổi được mua và nuôi lớn ở trang trại trong 3 tuần. Thức ăn chăn nuôi được cho ở dạng thức ăn thông thường không có kháng sinh. Chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 được sản xuất ở dạng bột đông khô và được trữ trong tủ lạnh, và mỗi con lợn con được cho ăn với lượng 10¹⁰ CFU mỗi ngày. Sau 3 tuần cho dùng qua đường miệng, bốn con lợn con trên mỗi nhóm xử lý được khám nghiệm để thu lấy mẫu máu và mẫu mô để xác định ảnh hưởng của chế phẩm đến khả năng miễn dịch của lợn con.

Để thu được các tế bào miễn dịch từ lá lách (Spln) và các hạch bạch huyết mạc treo ruột (mLN), các mô đã cắt nhỏ được nghiền nhỏ bằng pit tông của ống tiêm và bộ lọc tế bào 70 µm (BD Falcon), và sau đó các tế bào được rửa bằng cách sử dụng môi trường RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640, Gibco BRL, Grand Island, NY, Mỹ). Các RBCs còn lại (các tế bào hồng cầu) được loại bỏ bằng cách sử dụng đệm

ly giải RBC (eBioscience, USA) trước bước rửa cuối cùng. Các tế bào miễn dịch thu được sau bước rửa cuối cùng được nhuộm màu xanh da trời Trypan và được tính bằng máy đo huyết sắc tố được sử dụng.

Để đánh giá tác dụng ức chế chống nhiễm virus, virus PED được ủ theo cách tương tự như trong Ví dụ 6 được mô tả ở trên, và hàm lượng của chúng đã được đo. Các tế bào miễn dịch thu được từ lợn cai sữa không được cho ăn chế phẩm được sử dụng như là đối chứng âm.

Bảng 5. Tác dụng ức chế chống nhiễm virus PED (chủng SM98/KPEDV9) bởi các tế bào miễn dịch được kích hoạt do sử dụng chế phẩm.

	mLN		Spln	
	SM98	KPEDV9	SM98	KPEDV9
Đối chứng âm	-	-	-	-
CJLP475	++	++	++	++
CJLP243	+	++	++	++
CJLP475 and CJLP243	++	++	++	++

++: ức chế hoàn toàn, +: ức chế một phần, -: bị nhiễm

Kết quả là, như thể hiện trong Bảng 5, tất cả dịch nuôi cấy được thu bằng cách nuôi cấy các tế bào miễn dịch của lá lách hoặc các hạch bạch huyết màng treo ruột (mLN) trong lợn cai sữa được cho ăn thức ăn chăn nuôi chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP47, chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243, và chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 được kháng virus PED. Cụ thể, xác nhận rằng dịch nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy các tế bào miễn dịch của lá lách hoặc các hạch bạch huyết màng treo ruột (mLN) trong lợn cai sữa được cho ăn thức ăn chăn nuôi chứa riêng chủng CJLP475 và chế phẩm chứa cả hai chủng có chức năng miễn dịch tốt chống cả các virus PED của SM98 và KPEDV9. Do đó, xác nhận rằng chủng CJLP475 và chế phẩm chứa cả hai chủng cho phép lợn con ở trạng thái kích hoạt miễn dịch tạm thời có thể bảo vệ chúng chống virus PED khi chúng được cho ăn với chủng CJLP475 hoặc chế phẩm. Trong Bảng 5, tổng số lượng các chủng trong ba nhóm thử nghiệm (CJLP475, CJLP243, CJLP475 và CJLP243) là như nhau.

Ví dụ 8. Xác nhận tác dụng đến sự tăng trưởng và tiêu chảy trong lợn cai sữa

Để xác nhận hiệu quả của chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475

và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 đến hiệu suất tăng trưởng và tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy trong lợn cai sữa khi được cho ăn chế phẩm, thử nghiệm được thực hiện tương tự như trong Ví dụ 7 đã được mô tả.

Tác dụng của chế phẩm đến năng suất và tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy/phân nhọt trong lợn cai sữa được thể hiện trên các Fig.7 và Fig.8, tương ứng.

Kết quả là, xác nhận rằng giá trị trung bình của ADG của lợn cai sữa được cho ăn thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm là vượt trội so với đối chứng (Fig.7). Ngoài ra, xác nhận rằng tác dụng cải thiện tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy đã được quan sát trong nhóm lợn cai sữa cho ăn thức ăn chăn nuôi chứa chế phẩm so với nhóm đối chứng (Fig.8).

Do đó, đã tìm thấy trong nhóm thử nghiệm cho ăn cùng với chế phẩm chứa cả hai chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243, không chỉ cho thấy sự gia tăng đáng kể trong sự tăng trưởng của vật nuôi, tức là, năng suất, nhưng cũng thể hiện tác dụng giảm đáng kể tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy, so với nhóm đối chứng và các nhóm thử nghiệm được cho ăn mỗi chủng.

Ví dụ 9. Xác nhận tác dụng đến khả năng miễn dịch và sữa non của lợn nái

Thử nghiệm được thực hiện để xác nhận tác dụng của chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 đến khả năng miễn dịch và sữa non của lợn nái khi chế phẩm được sử dụng cho lợn nái, được thực hiện như sau: mười lăm con lợn nái lúc 6 tuần trước khi sinh trong cùng thời gian sinh được chọn ngẫu nhiên cho mỗi nhóm thử nghiệm từ các trang trại trong đó đã có virus PED. Tất cả lợn nái được sử dụng trong thử nghiệm được tiêm với vắc xin phòng virus PED tại thời điểm 5 tuần và 2 tuần trước khi sinh. Thử nghiệm được thực hiện trong tổng số bốn nhóm thử nghiệm, tức là, nhóm đối chứng trong đó không có chủng nào được cho ăn, nhóm được cho ăn với một mình chủng CJLP475, CJLP243, và nhóm cho ăn cùng với chế phẩm chứa cả chủng CJLP475 và CJLP243. Thức ăn được cho ở dạng thức ăn thông thường không có kháng sinh, và nước được sử dụng tự do. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475, chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243, và chế phẩm được sản xuất ở dạng bột đông khô và được trữ trong tủ lạnh, và sau đó được bổ sung vào đầu nguồn thức ăn chăn nuôi khi cho lợn nái ăn để mỗi con lợn nái được cho ăn với lượng 10^{10} đến 10^{11} CFU mỗi ngày theo các điều kiện điều trị. Lợn nái được cho ăn trong tổng 4 tuần, và sau đó huyết thanh và sữa non của lợn nái được xét nghiệm

bằng cách sử dụng bộ dụng cụ IgA và IgG ELISA. Tác dụng của các chủng đến khả năng miễn dịch và sữa non của lợn nái được thể hiện trên các Fig.9, Fig.10, và Fig.11.

Kết quả là, như thể hiện trên Fig.9 và Fig.10, tổng hàm lượng IgG và IgA trong huyết thanh của lợn nái được cho ăn chủng CJLP475, chủng CJLP243, và chế phẩm là cao hơn so với tổng hàm lượng IgG và IgA trong nhóm đối chứng không được cho ăn các chủng. Cụ thể, tổng hàm lượng IgG và IgA trong huyết thanh của lợn nái được cho ăn chế phẩm là cao hơn đáng kể so với lợn nái trong nhóm đối chứng hoặc lợn nái được cho ăn các chủng đơn.

Như được thể hiện trên Fig.11, sự thay đổi trong tổng hàm lượng kháng thể IgA trong sữa non trong khi sinh theo chế độ ăn đã được quan sát, và kết quả là, tổng hàm lượng kháng thể IgA đã được tìm thấy là cao hơn trong các nhóm thử nghiệm được cho ăn một mình chủng CJLP475 và chế phẩm trong nhóm đối chứng. Cụ thể, hàm lượng kháng thể được cải thiện nhiều hơn ở nhóm thử nghiệm được nuôi bằng chế phẩm so với nhóm được nuôi bằng chủng đơn.

Do đó, khi cho lợn nái ăn cùng với chế phẩm chứa cả hai chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243, khả năng miễn dịch của lợn nái được cải thiện đáng kể so với nhóm đối chứng hoặc các nhóm được cho ăn với mỗi chủng đơn, và tương tự, hàm lượng kháng thể trong sữa non được tăng đáng kể.

Ví dụ 10. Tác dụng cải thiện khả năng miễn dịch của lợn con bằng cách cho lợn nái ăn chế phẩm

Để xác nhận tác dụng của chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 đối với khả năng miễn dịch của lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn chế phẩm, thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng lợn nái ở Ví dụ 9. Ngoài ra, máu được thu từ lợn con được sinh ra từ lợn nái 4 ngày sau khi ăn sữa non để thực hiện phân tích miễn dịch bằng bộ dụng cụ IgA ELISA. Fig.12 thể hiện ảnh hưởng của việc cho ăn với chế phẩm đến khả năng miễn dịch của lợn con được sinh ra từ lợn nái trong tổng cộng 4 tuần.

Kết quả là, tổng hàm lượng IgA trong huyết thanh của lợn con được tìm thấy là cao hơn trong các nhóm cho ăn với chủng CJLP475 và chế phẩm so với nhóm đối chứng. Cụ thể, tổng số hàm lượng IgA được tìm thấy là rất cao trong lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn với chế phẩm. Kết quả như vậy chỉ ra rằng lợn con được nhận hàm

lượng kháng thể IgA cao từ sữa non của lợn nái, và do vậy, có thể tìm thấy khả năng miễn dịch của lợn con có thể được cải thiện bằng cách cho lợn nái ăn với chế phẩm.

Do đó, có thể thấy rằng khi cho lợn nái ăn với chế phẩm chứa cả hai chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243, khả năng miễn dịch của lợn con có thể được cải thiện đáng kể so với nhóm đối chứng hoặc lợn nái cho ăn với từng chủng đơn.

Ví dụ 11. Tác dụng của việc cải thiện các triệu chứng lâm sàng của lợn con bằng cách cho lợn nái ăn với chế phẩm

Để xác nhận tác dụng của chế phẩm đến việc cải thiện các triệu chứng lâm sàng khi lợn con được sinh ra từ lợn cái cho ăn với chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 bị nhiễm virus PED, thử nghiệm được thực hiện như sau. Vì thử nghiệm này được yêu cầu thử thách kiểm tra lợn con với virus PED, các nhóm thử nghiệm được giảm thiểu theo lời khuyên của ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật, theo cách như vậy nhóm thử nghiệm dùng chủng đơn không được kiểm tra và chỉ nhóm dùng chế phẩm được kiểm tra.

Mười lăm con lợn nái lúc 6 tuần trước khi sinh trong cùng thời gian sinh được chọn ngẫu nhiên cho mỗi nhóm thử nghiệm từ các trang trại trong đó có virus PED. Tất cả lợn nái được sử dụng trong thử nghiệm được tiêm vắc xin chống virus PED tại thời điểm 3 tuần và 8 tuần trước sinh. Thử nghiệm được thực hiện trong tổng hai nhóm thử nghiệm, tức là, nhóm đối chứng trong đó chế phẩm không được cho ăn, và nhóm cho ăn với chế phẩm. Thức ăn được cho ở dạng thức ăn thông thường không có kháng sinh, và nước được sử dụng tự do. Chế phẩm được sản xuất ở dạng bột đông khô và được trữ trong tủ lạnh, và sau đó được bổ sung vào vào đầu nguồn thức ăn chăn nuôi khi cho lợn nái ăn để mỗi con lợn nái được cho ăn với lượng 10^{10} hoặc nhiều hơn mỗi ngày.

Hai mươi con lợn con được sinh ra từ lợn nái có trọng lượng trung bình 1,49 kg được chọn từ mỗi nhóm thử nghiệm. Lợn con 3 ngày tuổi được đặt vào trong lồng ấp được điều chỉnh nhiệt độ và độ ẩm cho mỗi nhóm thử nghiệm. Lợn con được thuần hóa trong khi được thay thế sữa ba lần một ngày. Sau khi xác nhận lợn con được ổn định bằng cách kiểm tra phân của tất cả lợn con 4 ngày tuổi, PEDV được cho uống với liều $100LD_{50}/ml$, và nhiệt độ cơ thể, điểm tiêu chảy, tỷ lệ sống và phát hiện phân chứa PEDV được xét nghiệm trong 7 ngày. Sau đó xác lợn con chết được khám nghiệm, và các cơ

quan tiêu hóa được thu thập để xét nghiệm hàm lượng của virus PED. Hiệu quả của chế phẩm cho lợn con ăn sau khi được thử thách với PEDV được thể hiện trên các Fig.13 đến Fig.16.

Kết quả của xét nghiệm thay đổi nhiệt độ cơ thể của lợn con sau khi thử thách với PEDV, được xác nhận rằng nhiệt độ cơ thể được duy trì nằm trong phạm vi bình thường thuộc nhóm thử nghiệm so với nhóm đối chứng (Fig.13).

Kết quả của xác nhận điểm tiêu chảy (điểm ý nghĩa lâm sàng) của lợn con được gây ra bởi PEDV, điểm tiêu chảy trong nhóm thử nghiệm được cho ăn chế phẩm là thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng tại 5, 6, và 7 dpi (Fig.14).

Tỷ lệ sống được theo dõi cho đến ngày 7 sau khi thử thách lợn con 4 ngày tuổi với PEDV. Kết quả là, tỷ lệ sống của nhóm đối chứng là 55%, và tỷ lệ sống của lợn con được sinh ra từ lợn nái bị nhiễm PEDV mà được cho ăn chế phẩm là 82%, do đó thể hiện sự vượt trội kháng so với nhóm đối chứng (Fig.15).

Bảng 6 thể hiện kết quả của real-time PCR (phản ứng tổng hợp chuỗi thời gian thực) cho lượng virus được giải phóng ra từ lợn con sau khi thử thách với PEDV. Lượng virus được giải phóng vào trong phân của lợn con được sinh ra từ lợn nái được cho ăn chế phẩm vào ngày 3, 5 và 7 sau khi được thử thách với PEDV được giảm so với đối chứng.

Bảng 6. Lượng PEDV được giải phóng vào trong phân của lợn con được sinh ra từ lợn nái cho ăn với chế phẩm ($\log_{10}/\text{ml}$)

	0 dpi	3 dpi	5 dpi	7 dpi
Đối chứng	0	1,913 $\pm$ 1,601	4,920 $\pm$ 0,514	3,183 $\pm$ 1,726
Cho ăn chế phẩm	0	1,576 $\pm$ 1,792	4,551 $\pm$ 1,016	2,444 $\pm$ 1,381

dpi: ngày sau khi cho ăn chế phẩm

Các cơ quan tiêu hóa của lợn con sống sót trong 7 ngày sau khi thử thách với PEDV được khám để xét nghiệm lượng PEDV trong mỗi cơ quan bằng real-time PCR (phản ứng tổng hợp chuỗi thời gian thực). Kết quả là, lượng nhỏ PEDV được phát hiện trong các cơ quan tiêu hóa như là tá tràng, hỗng tràng, hồi tràng, manh tràng, và đại tràng của lợn con được sinh ra từ lợn nái cho ăn với chế phẩm (Fig.16).

Như thể hiện trong các kết quả thử nghiệm trên, điểm tiêu chảy của lợn con được

sinh ra từ lợn cái cho ăn với chế phẩm là giảm so với nhóm đối chứng được gây ra bởi sự giảm nhiệt độ cơ thể, cuối cùng dẫn đến giảm tỷ lệ tử vong ở ngày thứ 7. Ngoài ra, vì lượng PEDV trong phân và các mô của lợn con được sinh ra từ lợn nái cho ăn với chế phẩm được tìm thấy là thấp hơn so với lượng PEDV của đối chứng đã chứng minh rằng chế phẩm có tác dụng kháng virus.

Ví dụ 12. Tác dụng của việc cải thiện khả năng trung hòa lượng kháng thể của lợn nái và lợn con bằng cách cho lợn nái ăn chế phẩm.

Để chứng minh nguyên nhân cải thiện triệu chứng lâm sàng như trong Ví dụ 11 khi lợn con được sinh ra từ lợn nái cho ăn với chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 và chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243, lượng kháng thể trung hòa PEDV được xét nghiệm trong lợn nái và lợn con.

Việc kiểm tra lượng kháng thể trung hòa PEDV được dựa trên nguyên tắc là PEDV- kháng thể đặc hiệu có trong huyết thanh hoặc sữa non liên kết với epitope (quyết định kháng nguyên) bên ngoài của PEDV và loại bỏ sự lây nhiễm virus. Do đó, kiểm tra thực chất cho phép để đánh giá khả năng phòng thủ chống lại PEDV. Cụ thể, huyết thanh hoặc sữa non được thu từ Ví dụ 11 được pha loãng tuần tự 2 lần ở mức 50 μ L/giếng bằng cách sử dụng MEM (môi trường chủ yếu tối thiểu để cấy tế bào, Gibco BRL, Grand Island, NY, Mỹ) từ dịch ban đầu lên đến 2.048 lần trong đĩa 96 giếng, và được trộn với PEDV với liều 200 TCID₅₀/ml theo tỷ lệ 1:1. Sau đó, các tế bào được trung hòa trong 1 giờ trong tủ nuôi cấy CO₂ ở nhiệt độ 37°C, được bổ sung với 100 μ L có nồng độ 2×10^4 tế bào/0,1 mL tế bào Vero đã được chuẩn bị trước như là tế bào đơn, và nuôi cấy trong tủ nuôi cấy CO₂ ở nhiệt độ 37°C trong 3 đến 5 ngày để quan sát hiệu ứng tế bào học (CPE). Lượng kháng thể trung hòa là hệ số pha loãng tối đa mà tại đó không tìm thấy CPE. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trên các Fig.17 và Fig.18.

Sau khi cho lợn nái ăn chế phẩm, lượng kháng thể trung hòa PEDV được tìm thấy là cao hơn trong nhóm cho ăn chế phẩm so với nhóm đối chứng được thể hiện trên Fig.17. Cụ thể, lượng trung hòa kháng thể là thấp hơn so với nhóm đối chứng mà lợn nái trước khi cho ăn chế phẩm được tăng lên đáng kể sau khi cho ăn chế phẩm. Tương tự, kháng thể trung hòa PEDV trong sữa non được tìm thấy là cao hơn trong lợn nái được cho ăn chế phẩm so với nhóm đối chứng như thể hiện trên Fig.18. Ngoài ra, lượng kháng thể trung hòa PEDV trong huyết thanh của lợn con cũng được tìm thấy là cao hơn trong lợn

con được sinh ra từ lợn nái cho ăn với chế phẩm như thể hiện trên Fig.17.

Như được mô tả ở trên, lợn con được cho ăn sữa non của lợn nái cho ăn với chế phẩm có lượng kháng thể trung hòa PEDV cao, và dựa trên những phát hiện này, có thể giải thích tác dụng của việc cải thiện các triệu chứng lâm sàng so với nhóm đối chứng trong kiểm tra thử thách trong Ví dụ 11.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả bằng cách tham chiếu đến các phương án minh họa cụ thể, cần hiểu rằng người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế có thể thực hiện theo các hình thức cụ thể khác mà không tách rời khỏi nguyên lý kỹ thuật hoặc đặc điểm cơ bản của sáng chế. Do đó, các phương án được mô tả bên trên được coi là minh họa toàn bộ các khía cạnh và không nhằm giới hạn sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ hơn là mô tả chi tiết, và cần hiểu rằng toàn bộ các cải biến hoặc thay đổi xuất phát từ nguyên lý và phạm vi của sáng chế và các đương lượng của nó đều nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa:

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

(b) chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM11045P.

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

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

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

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

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

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

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

8. Phương pháp điều chế chế phẩm probiotic bao gồm:

điều chế từng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP475 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM12287P; và chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus Plantarum* CJLP243 được lưu giữ dưới số đăng ký KCCM11045P; và

trộn chế phẩm chứa chủng CJLP475 và chế phẩm chứa chủng CJLP243.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm bổ sung chất phụ gia vào ít nhất một trong các chế phẩm chứa chủng CJLP475, chế phẩm chứa chủng CJLP243 hoặc chế phẩm probiotic.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó phụ gia là chất bảo quản lạnh, và phương pháp còn bao gồm bước làm đông khô sau khi bổ sung phụ gia.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó chủng trong chế phẩm đông khô ở trạng thái sống.
12. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm chuẩn bị lượng định trước của chế phẩm vào bao gói sau bước trộn.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó ở bước đóng gói, chế phẩm được chuẩn bị cho vào bao gói sao cho tổng số chủng bao gồm chủng CJLP475 và chủng CJLP243 là 10^6 CFU/g hoặc cao hơn.

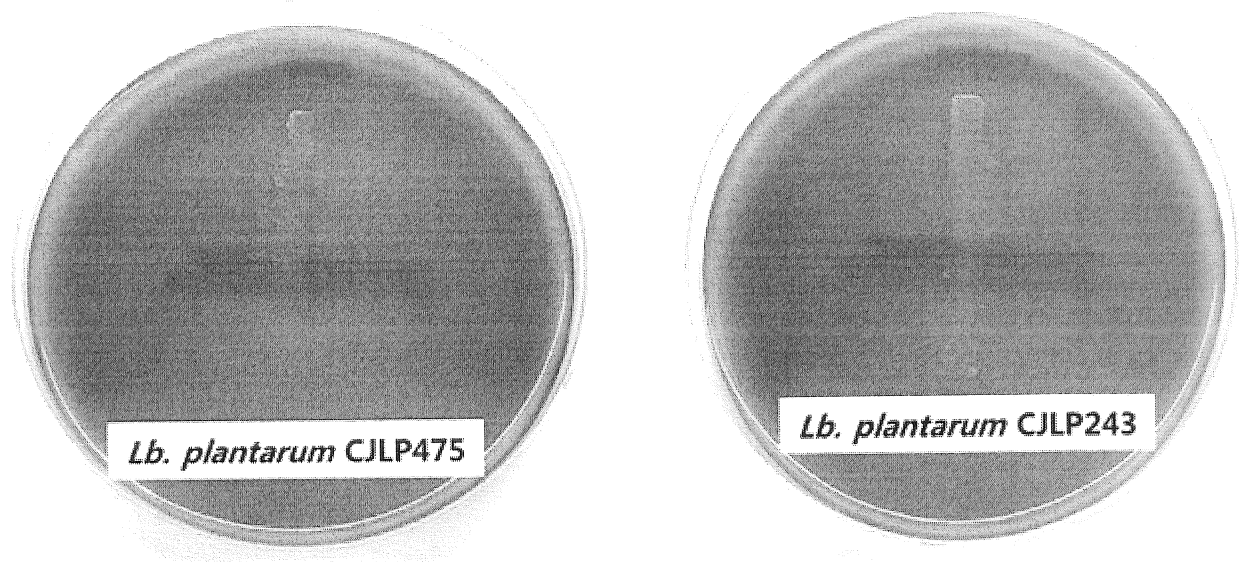


FIG.1

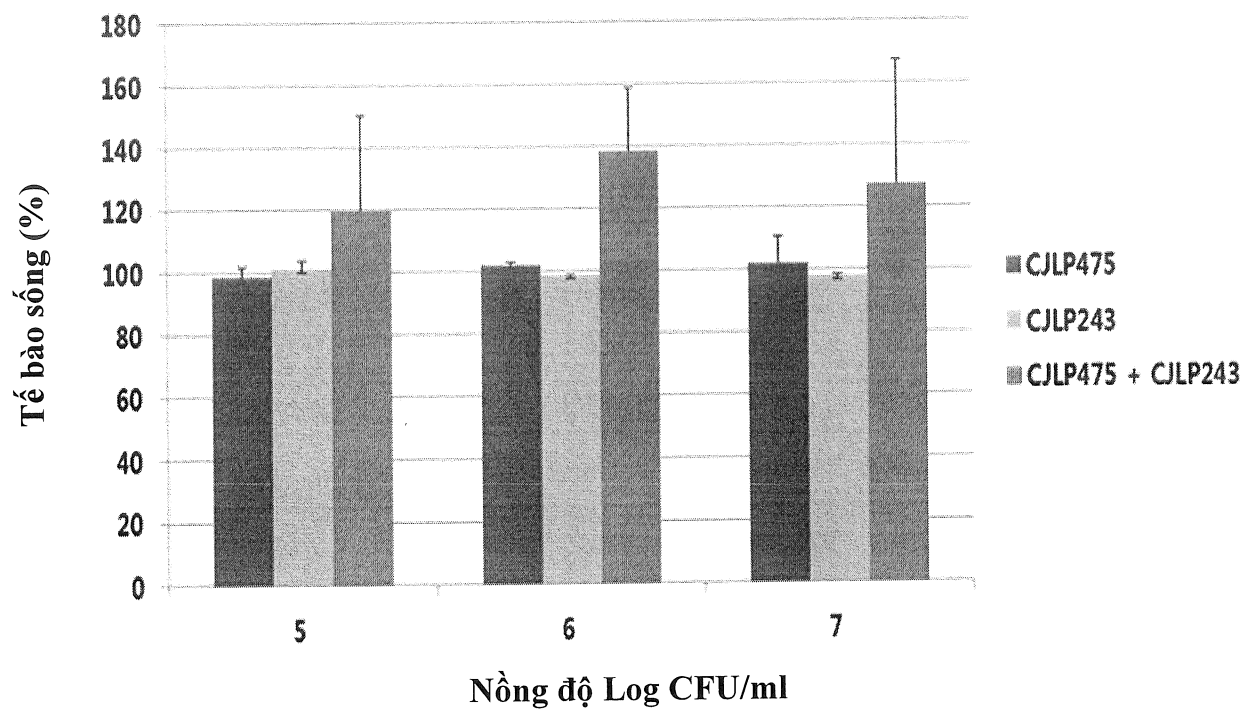


FIG.2

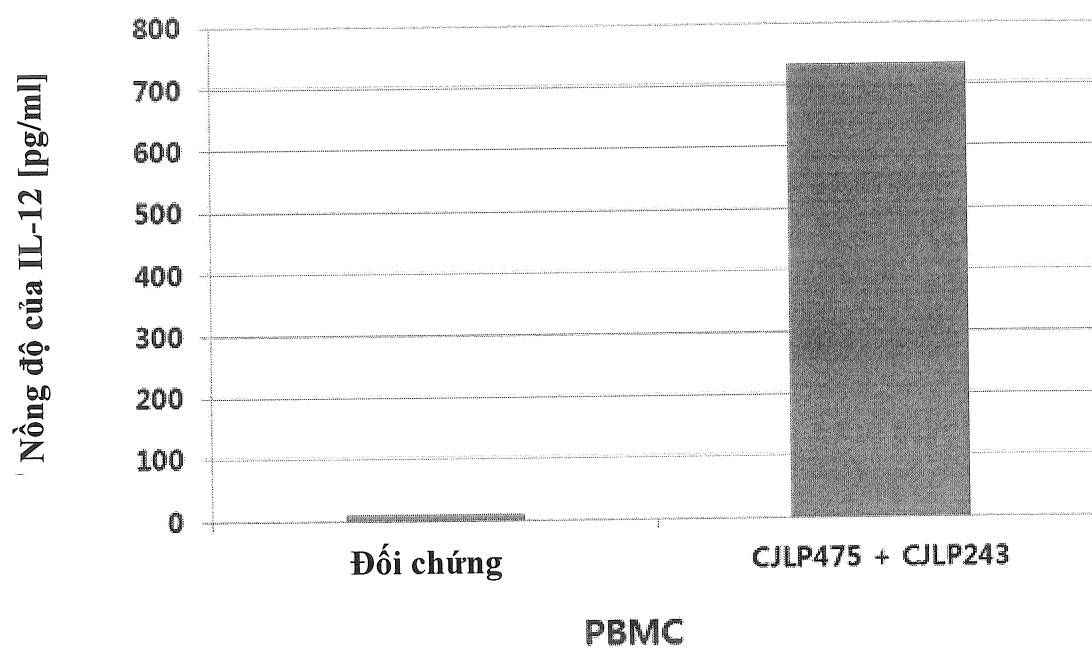


FIG.3

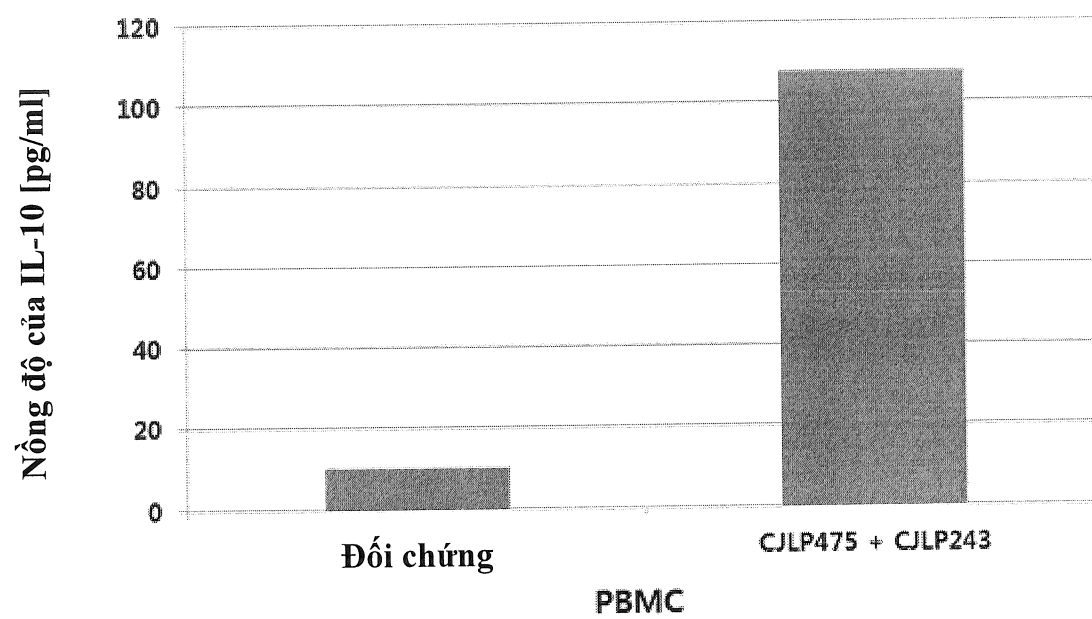


FIG.4

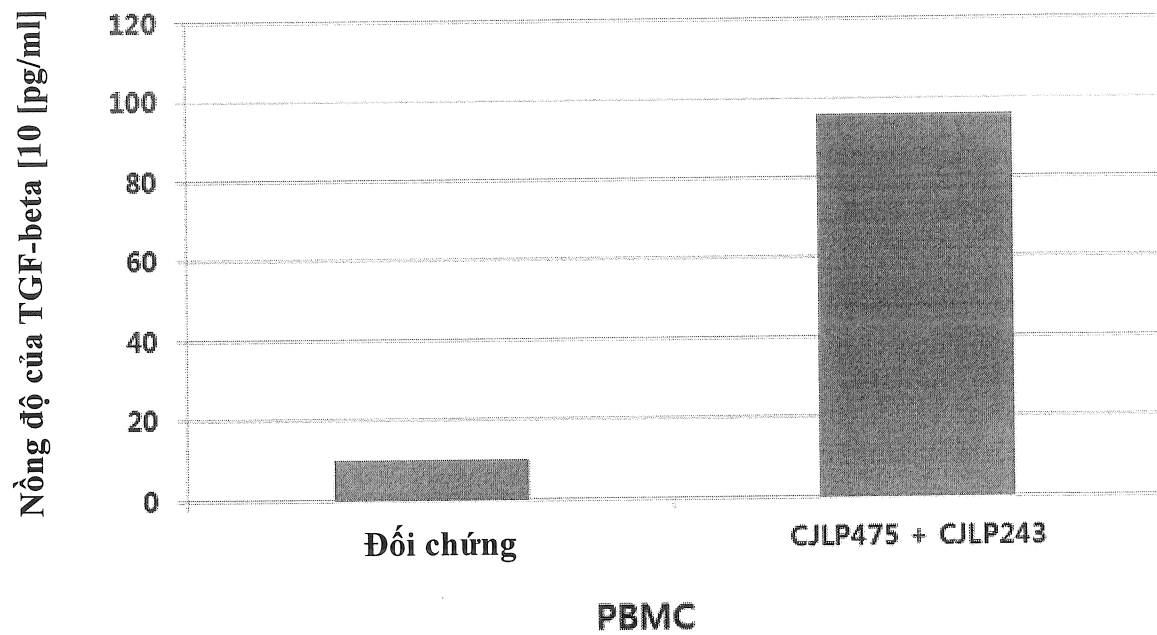


FIG.5

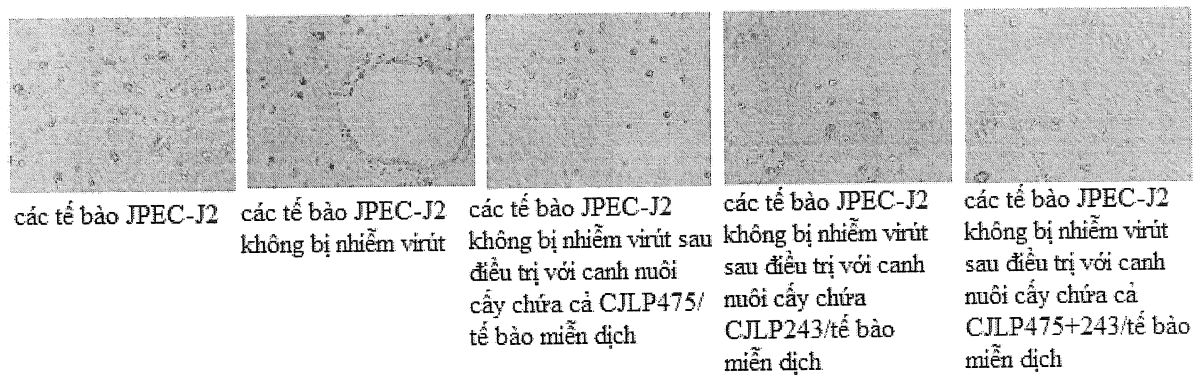


FIG.6

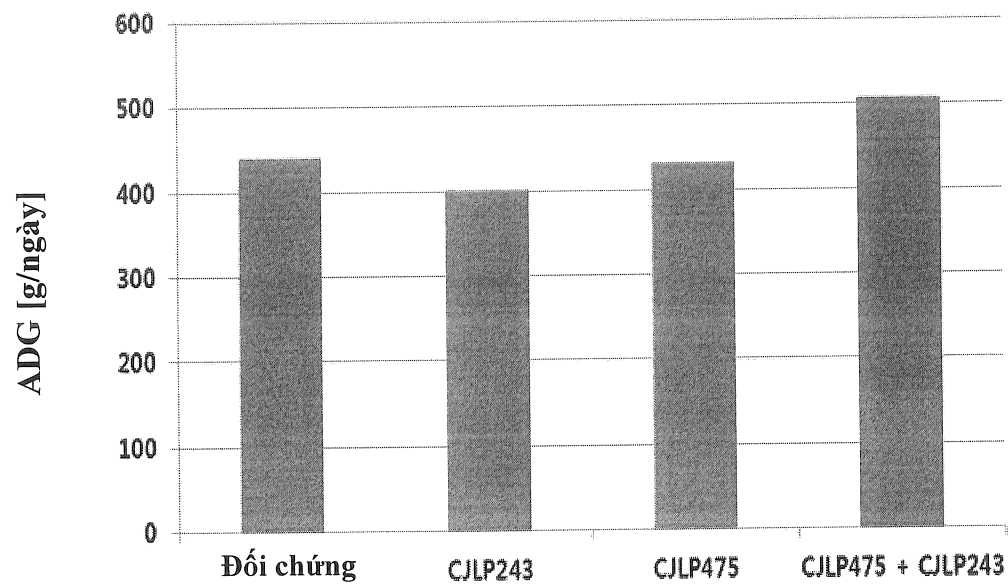


FIG.7

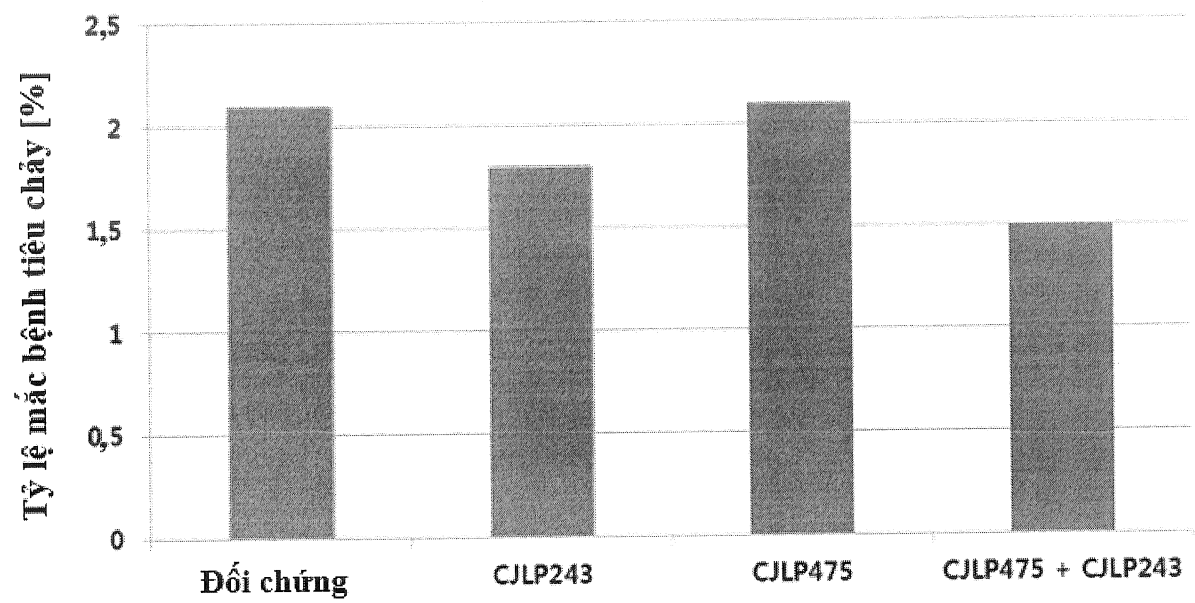


FIG. 8

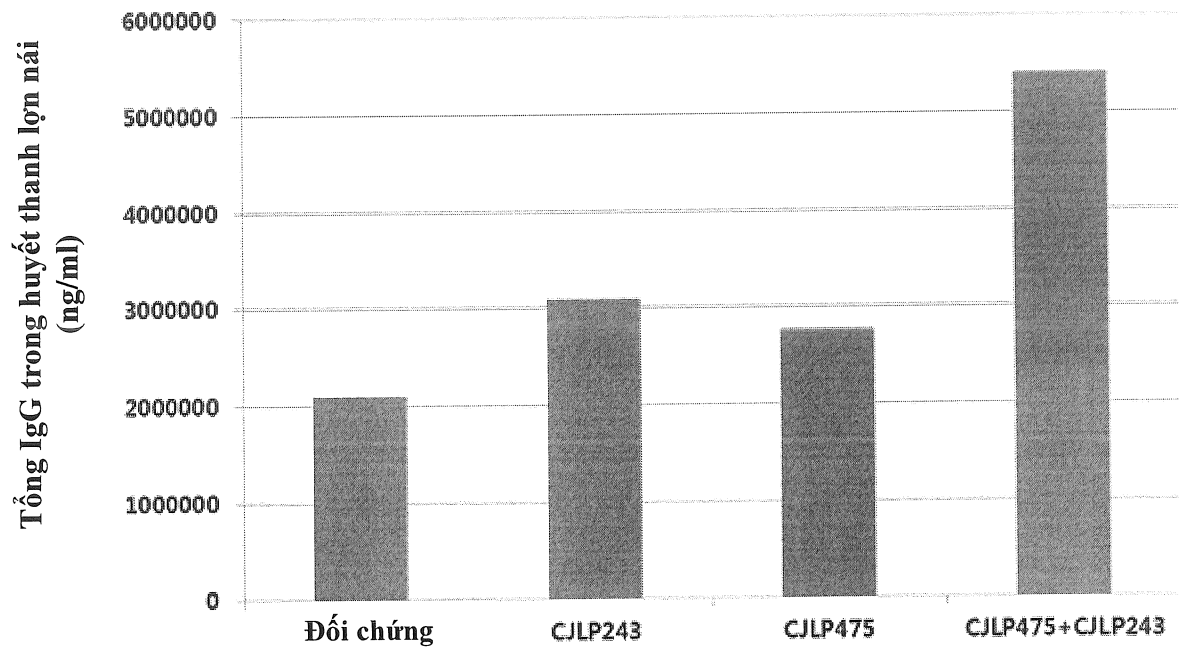


FIG.9

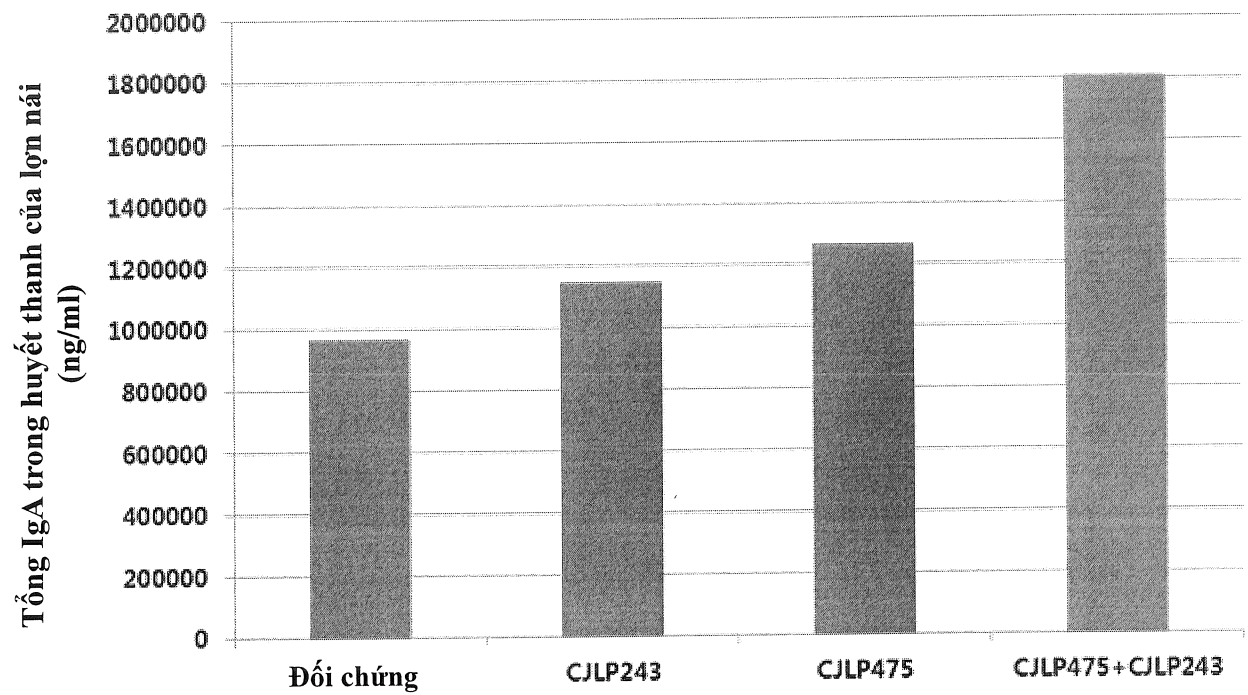


FIG.10

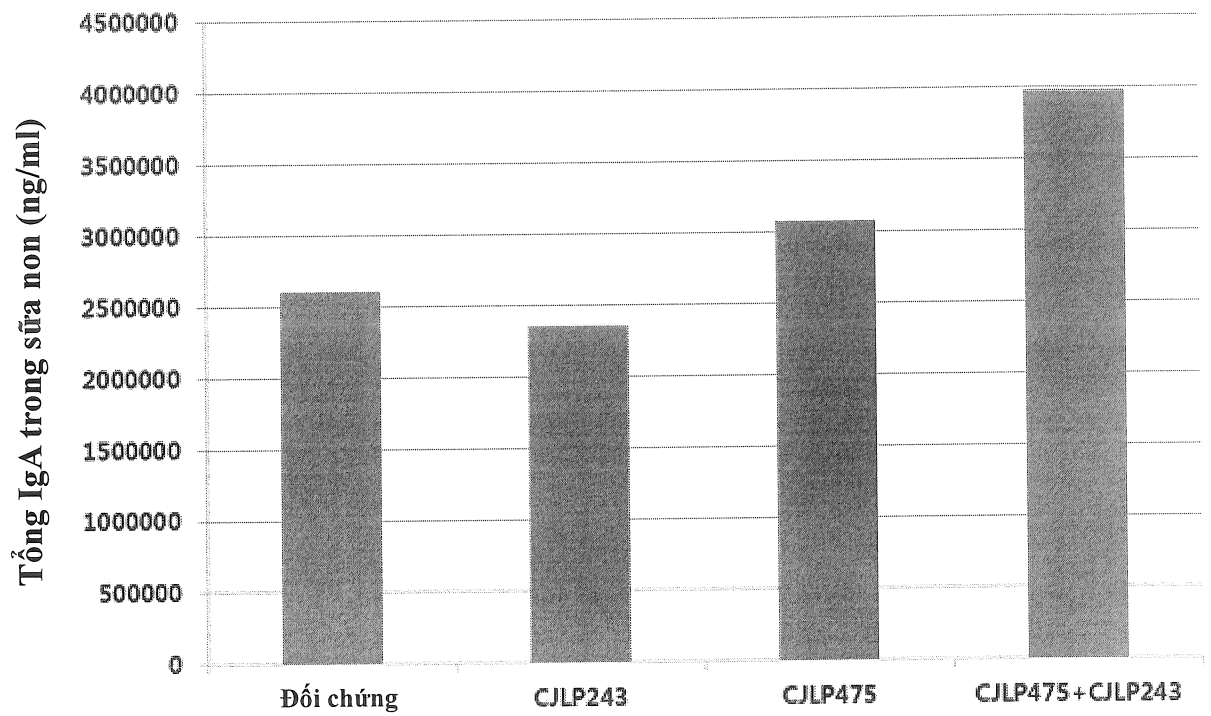


FIG.11

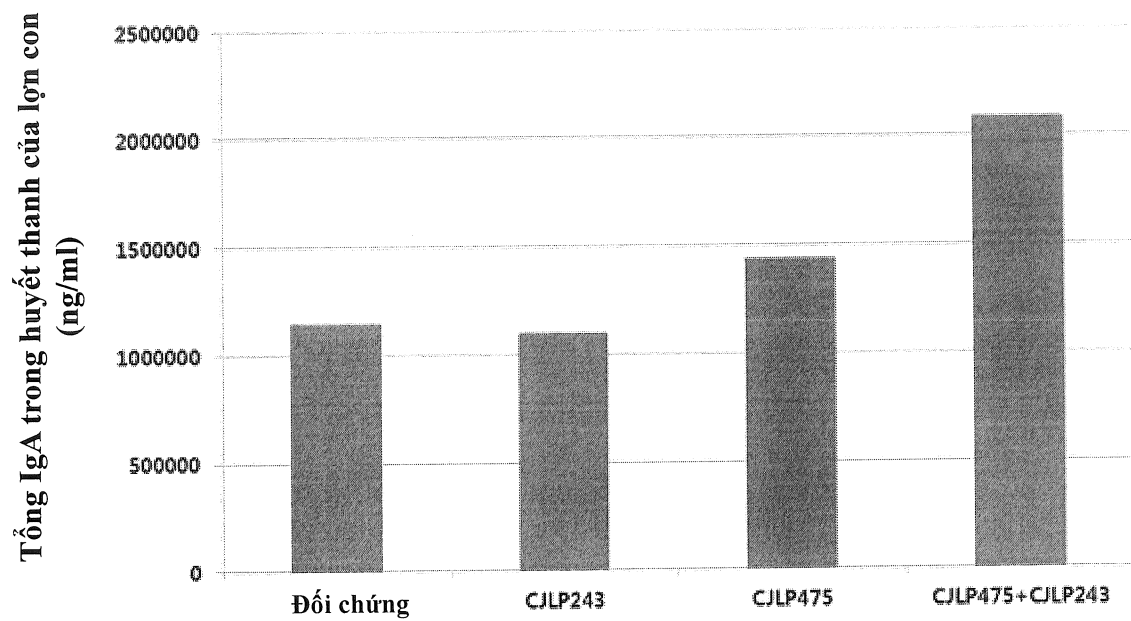


FIG.12

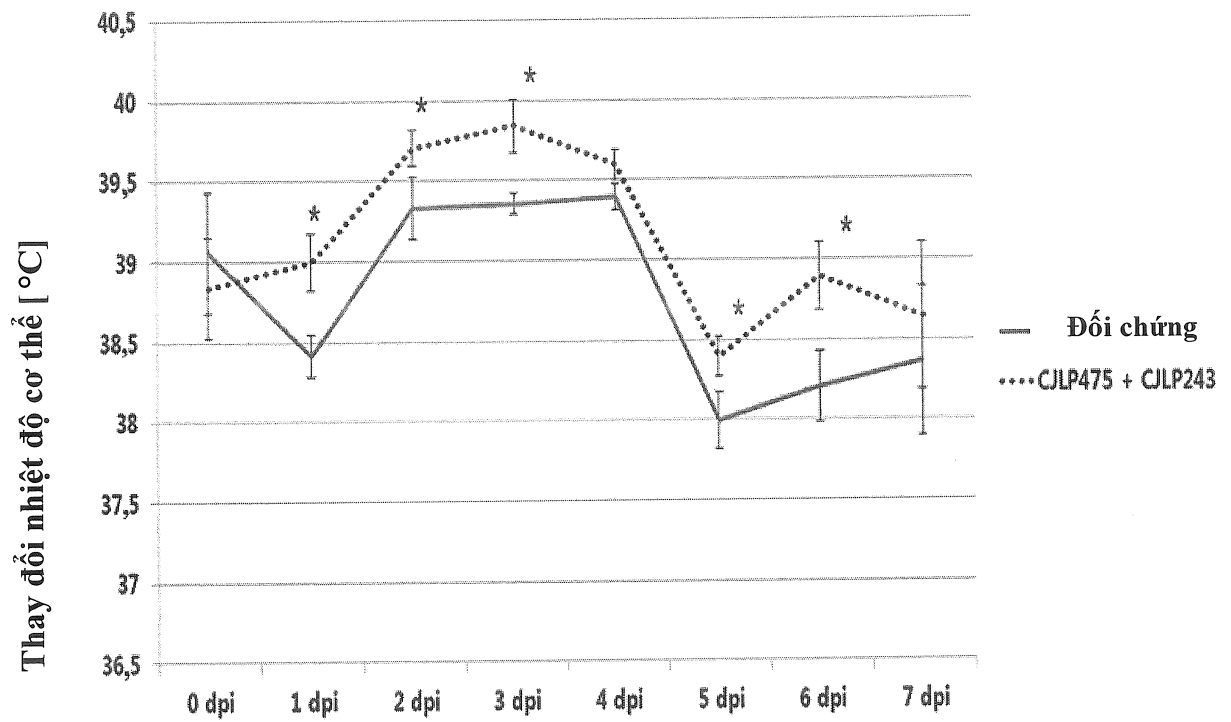


FIG.13

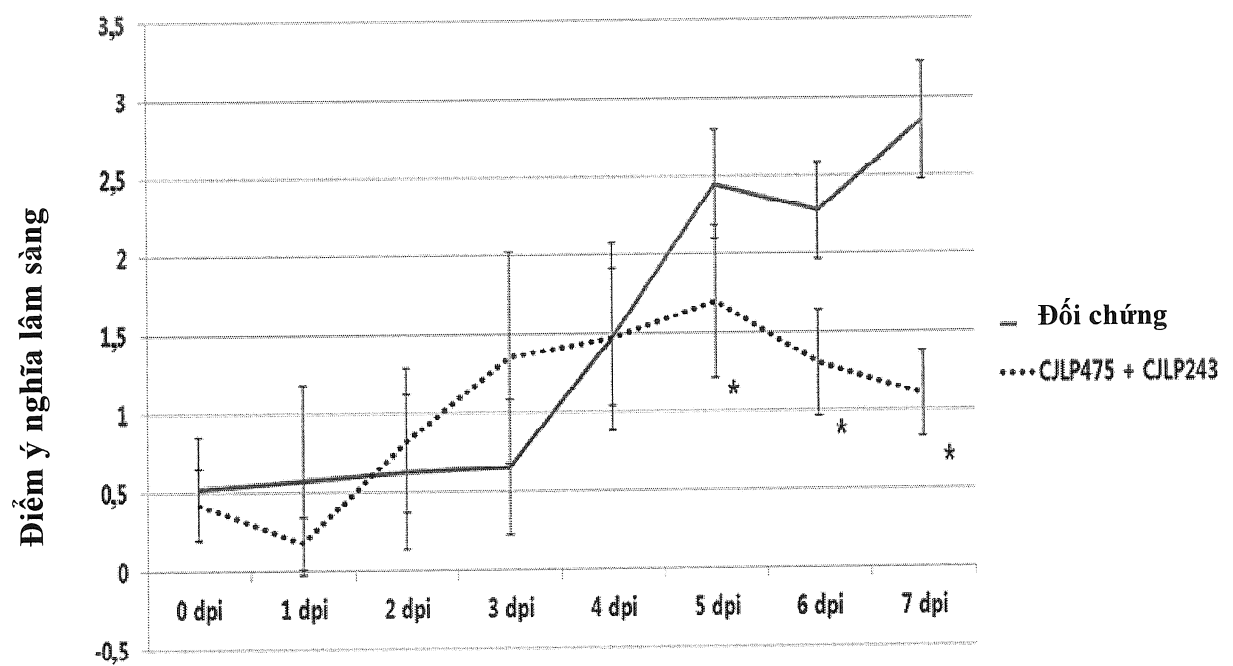


FIG.14

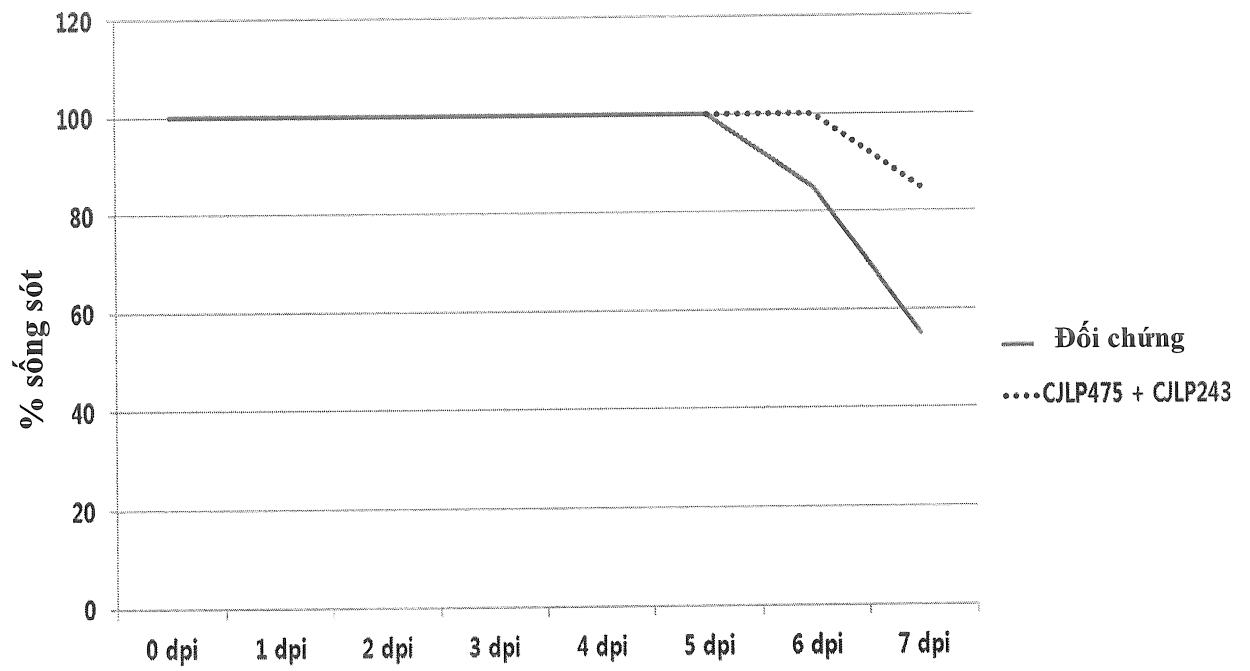


FIG.15

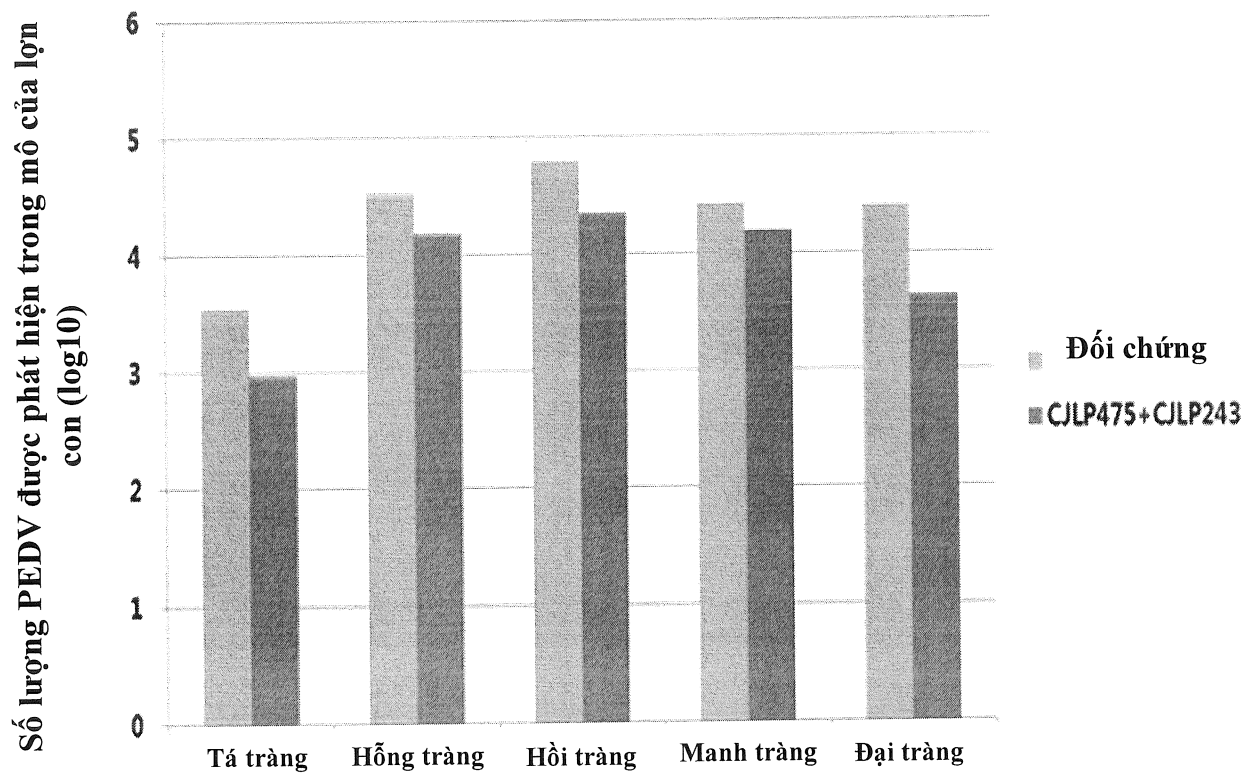


FIG.16

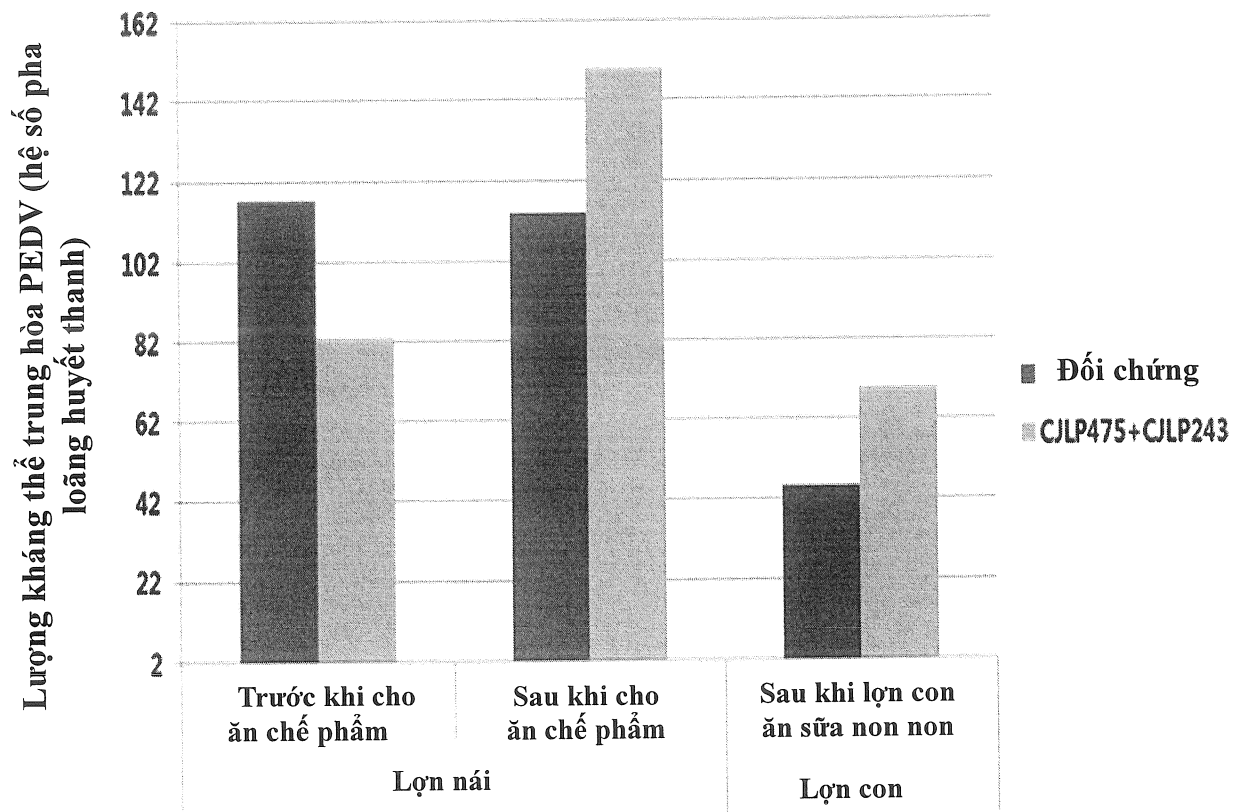


FIG.17

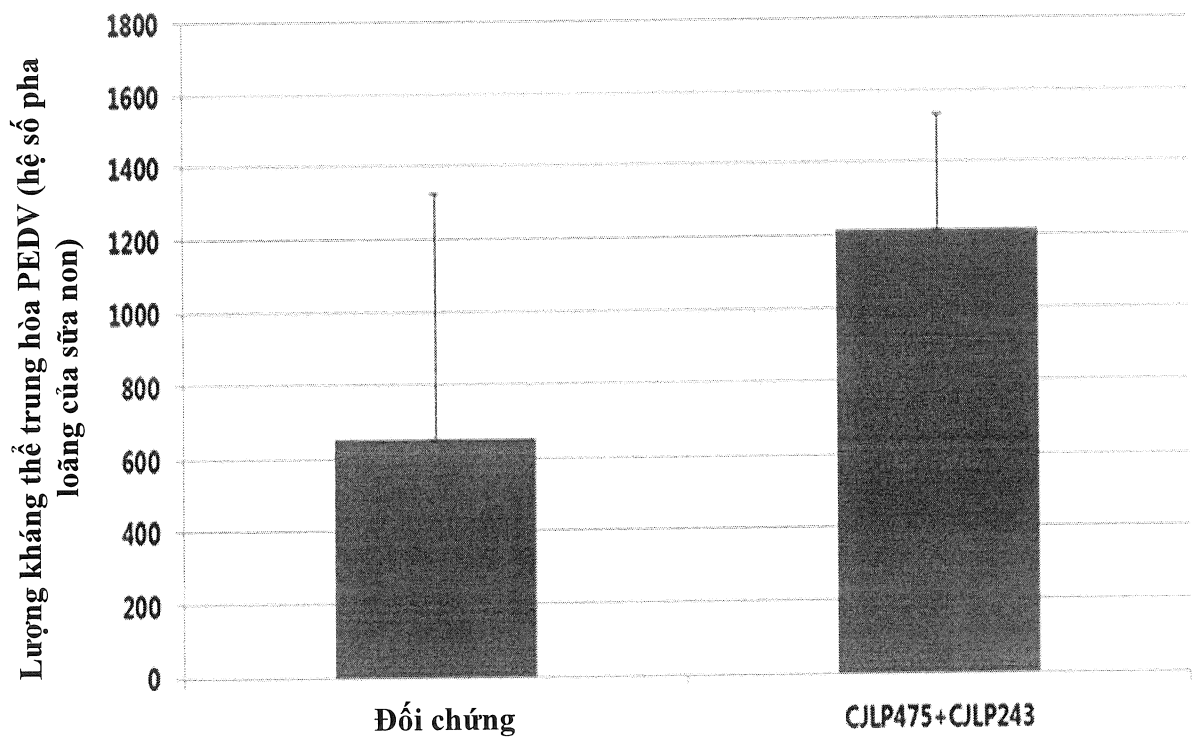


FIG.18

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CheilJedang Corporation
 <120> CHẾ PHẨM CHỨA CHỦNG *LACTOBACILLUS PLANTARUM* CJLP475 VÀ CHỦNG *LACTOBACILLUS PLANTARUM* CJLP243, VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM PROBIOTIC
 <130> OPA19038
 <150> KR 10-2018-0081910
 <151> 2018-07-13
 <160> 2
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 1454
 <212> ADN
 <213> Chưa biết
 <220>
 <223> *Lactobacillus plantarum* CJLP475

 <400> 1
 acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60
 ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120
 aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagtttga aagatggctt cggctatcac 180
 ttttgatggt tcccgcggcg tattagctag atggtgggggt aacggctcac catggcaatg 240
 atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300
 ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420
 gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480
 cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccgatt tattgggct aaagcgagcg 540
 caggcggttt tttaagtctg atgtgaaagc cttcggctca accgaagaag tgcacgga 600
 actgggaaac ttgagtgcag aagaggacag tggaactcca tgtgtagcgg tgaaatgcgt 660
 agatatatgg aagaacacca gtggcgaagg cggctgtctg gtctgtaact gacgctgagg 720
 ctcgaaagta tgggtagcaa acaggattag ataccctggt agtccatacc gtaaaccgatg 780
 aatgctaagt gttggagggt ttccgccctt cagtgtctga gctaacgcat taagcattcc 840
 gcctggggag tacggccgca aggctgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc 900
 ggtggagcat gtggtttaat tcgaagctac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatact 960
 atgcaaactc aagagattag acgttccctt cggggacatg gatacagggtg gtgcatggtt 1020

gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccg c aacgagcgca acccttatta 1080
tcagttgcc a gcattaagtt gggcactctg gtgagactgc cggtgacaaa ccggaggaag 1140
gtggggatga cgtcaaatca tcatgccctt tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg 1200
gatggtacaa cgagttgcga actcgcgaga gtaagctaatt ctcttaaagc cattctcagt 1260
tcggattgta ggctgcaact cgcctacatg aagtcggaat cgctagtaat cgcggatcag 1320
catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgagagtt 1380
tgtaacaccc aaagtcggtg gggtaacctt ttaggaacca gccgcctaag gtgggacaga 1440
tgattagggt gaag 1454

<210> 2
<211> 1461
<212> ADN
<213> Chưa biết

<220>
<223> Lactobacillus plantarum CJLP243

<400> 2
agtcgaacga actctggtat tgattgggtgc ttgcatcatg atttacattt gagtgagtgg 60
cgaactggtg agtaacacgt gggaaacctg cccagaagcg ggggataaca cctggaaaca 120
gatgctaata ccgcataaca acttggaccg catggtccga gcttgaaaga tggcttcggc 180
tatcactttt ggatggtccc gcggcgtatt agctagatgg tggggtaacg gctcaccatg 240
gcaatgatac gtagccgacc tgagagggta atcggccaca ttgggactga gacacggccc 300
aaactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccacaat ggacgaaagt ctgatggagc 360
aacgccgcgt gagtgaagaa gggtttcggc tcgtaaaact ctggtgttaa agaagaacat 420
atctgagagt aactgttcag gtattgacgg tatttaacca gaaagccacg gctaactacg 480
tgccaacagc cgcggtata cgtaggtggc aagcgttgct cggatttatt gggcgtaaag 540
cgagcgcagg cggtttttta aatctgatgt gaaagccttc ggctcaaccg aagaagtgca 600
tcggaaactg ggaaacttga gtgcagaaaa agacaatgga actccatgtg tagcggtgaa 660
aatgcgtaat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc tgtctggtct gtaactgacg 720
ctgaggctcg aaagtatggg tagcaaacag gattagatac cctggtagtc cataccgtaa 780
acgatgaatg ctaagtgttg gagggtttcc gcccttcagt gctgcagcta acgcattaag 840
cattccgcct ggggagtacg gccgcaaggc tgaaactcaa aggaattgac gggggccccg 900
acaagcggtg gagcatgttg tttaattcga agctacgcga agaacttac caggtcttga 960
catactatgc aaatctaaga gattagacgt tcccttcggg gacatggata caggtggtgc 1020

atggttgctg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc	1080
ttattatcag ttgccagcat taagttgggc actctggtga gactgccggt gacaaaccgg	1140
aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat gccccttatg acctgggcta cacacgtgct	1200
acaatggatg gtacaacgag ttgcgaactc gcgagagtaa gctaattctt taaagccatt	1260
ctcagttcgg attgtaggct gcaactcgcc tacatgaagt cggaatcgct agtaatcgcg	1320
gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag acaccgcccg tcacaccatg	1380
agagtttgta acacccaaag tcggtggggg aaccttttag gaaccagccg cctaaggtgg	1440
gacagatgat tagggtgaag t	1461