



(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) 
1-0020874

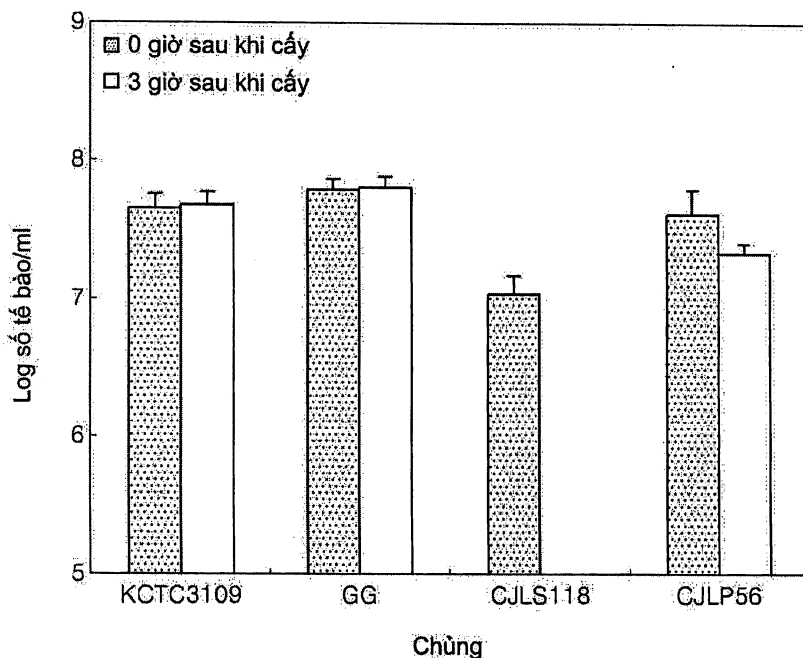
(51)⁷ **C12N 1/20**

(13) **B**

- (21) 1-2011-01747 (22) 01.09.2009
(86) PCT/KR2009/004913 01.09.2009 (87) WO2010/064777A1 10.06.2010
(30) 10-2008-0122047 03.12.2008 KR
(45) 27.05.2019 374 (43) 26.12.2011 285
(73) CJ CHEILJEDANG CORP. (KR)
CJ Bldg. 500, Namdaemunno 5-ga, Jung-gu, Seoul 100-749, Republic of Korea
(72) KIM, Bong-Joon (KR), JUNG, Heon Woong (KR), SEO, Sang-Hyun (KR), LEE,
Kang-Pyo (KR), HWANG, Kwang-Woo (KR), WON, Tae-Joon (KR)
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)

(54) **VI KHUẨN LACTOBACILLUS PLANTARUM VÀ CHẾ PHẨM ĐỂ PHÒNG
NGỪA HOẶC ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐƯỜNG RUỘT CHỨA VI KHUẨN NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 KCTC 11402BP, chế phẩm chứa vi khuẩn này để điều trị bệnh đường ruột và tăng cường miễn dịch.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể mới của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* và chế phẩm chứa biến thể này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến biến thể mới của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có thể dùng để phòng và điều trị bệnh đường ruột, bệnh miễn dịch và chế phẩm chứa biến thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn axit lactic có nhiều trong thực phẩm lên men như Kimchi và thường trú ngụ ở đường tiêu hóa, có tác dụng phân hủy chất xơ và các protein phức hợp thành sản phẩm chuyển hóa có ích. Do đó, các vi sinh vật sống đem lại lợi ích cho sức khỏe của vật chủ nhờ cải thiện môi trường vi sinh vật trong ruột thường được gọi là men vi sinh. Để hoạt động như men vi sinh sau khi sử dụng qua đường miệng, vi sinh vật phải còn sống khi đến ruột và phải lưu lại trên bề mặt ruột. Vì thế, về cơ bản chúng phải có khả năng đề kháng với axit và axit mật và có khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột.

Men vi sinh đại diện là vi sinh vật *Lactobacillus* sp. có nhiều trong thực phẩm lên men thông thường của Hàn Quốc như Kimchi. Vi sinh vật *Lactobacillus* sp. là các vi khuẩn axit lactic Bacillus lên men đồng chất hoặc dị chất có thể được phát hiện dễ dàng trong ruột của người và động vật hoặc trong quá trình lên men các sản phẩm sữa hoặc rau. Vi sinh vật *Lactobacillus* sp. đã được biết là có tác dụng có lợi là tổng hợp vitamin, có hoạt tính trị ung thư và giảm mức cholesterol trong máu, ngoài tác dụng duy trì độ pH axit của ruột để ức chế sự phát triển quá mức của các vi khuẩn có hại, như *E. coli*, hoặc *Clostridium* và cải thiện tình trạng tiêu chảy và chứng táo bón. Axidophilin được tạo ra bởi vi khuẩn lên men axit lactic có thể tác dụng như chất kháng sinh và ức chế sự phát triển của trực khuẩn lỵ, Salmonella, tụ cầu khuẩn, *E. coli*, v.v.. Chất kháng sinh tự nhiên này được thông báo là có thể bám vào ruột bằng cách ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy và làm bình thường hóa môi trường vi sinh trong ruột (Michael và Philippe, *Probiotics and prebiotics: Effects on*

diarrhea, The journal of nutrition, Volume 137, tháng 3 năm 2007, trang 803S-811S; Roberfroid, *Prebiotics and Probiotics: Are they functional foods?*, *American journal of clinical nutrition*, Volume 71, tháng 6 năm 2000, trang 1682S-1687S).

Nghiên cứu tích cực đã được thực hiện để lợi dụng vi sinh vật *Lactobacillus sp.* trong việc phát triển men vi sinh và thức ăn động vật. Bệnh tiêu chảy do vi khuẩn làm cho vật nuôi giảm cân và thậm chí bị chết. Để tăng sản lượng vật nuôi bằng cách ngăn ngừa sự khởi phát bệnh, chất kháng sinh thường được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Tuy nhiên, do việc sử dụng chất kháng sinh dẫn đến các vi khuẩn kháng thuốc và dư lượng chất kháng sinh trong các sản phẩm từ vật nuôi, dư lượng này được pháp luật quy định và do đó phương pháp hữu cơ để nuôi vật nuôi được khuyến cáo (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 1998-78358) (McEwen và Fedorka-Cray, *Antimicrobial use and resistance in animals, Clinical infectious Diseases*, Volume 34, tháng 6 năm 2002, trang S93-S106).

Ngoài ra, vi khuẩn axit lactic như vi sinh vật *Lactobacillus sp.* đã được biết là có hoạt tính tăng cường miễn dịch. Với sự ô nhiễm môi trường trầm trọng trên thế giới và việc sử dụng thực phẩm ăn liền gia tăng, bệnh dị ứng và bệnh thể tạng dị ứng liên quan đến sự điều biến miễn dịch bất thường ngày càng tăng nhanh trên thế giới, kể cả Hàn Quốc. Ở châu Âu, liệu pháp vi khuẩn rất được chú ý trong đó vi sinh vật gây bệnh được thay bằng vi sinh vật có lợi bằng cách sử dụng vi khuẩn axit lactic qua đường miệng, nhờ đó điều trị hoặc làm giảm nhẹ bệnh.

Có thông báo rằng việc sử dụng *Lactobacillus rhamnosus* GG có tác dụng làm giảm một nửa sự khởi phát bệnh dị ứng ở trẻ em (Kalliomäki *et. al.*, *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial, Lancet*, Volume 357, tháng 4 năm 2001, trang 1076-1079). Ngoài ra, trẻ em bị viêm da tạng dị ứng được thông báo là giảm cả phạm vi và mức độ viêm da khi được cho sử dụng *Lactobacillus rhamnosus* và *L. reuteri* (Rosenfeldt *et. al.*, *Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis, Dermatologic and ocular diseases*, Volume 111, tháng 2 năm 2003, trang 389-395).

Cơ chế tăng cường miễn dịch của vi khuẩn axit lactic đã được nghiên cứu kỹ và

vẫn chưa được chứng minh. Nói chung, sau khi sử dụng qua đường miệng, vi khuẩn axit lactic được cho là khu trú và sống ở ruột, có ảnh hưởng tích cực đến hệ miễn dịch của ruột. Ví dụ, việc bổ sung vi khuẩn axit lactic cùng với sữa chua được thông báo là làm tăng hoạt tính kháng khuẩn của lymphô bào mảng Peyer. Thử nghiệm trên động vật và người cho thấy rằng vi khuẩn axit lactic làm gia tăng mức độ đáp ứng của IgA. Ngoài ra, vi khuẩn axit lactic ảnh hưởng đến cả miễn dịch tự nhiên và miễn dịch thích ứng. Trong hệ miễn dịch của ruột, tế bào tạo miễn dịch tự nhiên bảo vệ vật chủ khỏi bị nhiễm tác nhân gây bệnh bằng cách nhận biết và tiêu diệt chúng. Trong hệ miễn dịch thích ứng, đại thực bào, đóng vai trò trong việc thực bào tác nhân gây bệnh và trình diện kháng nguyên, sẽ được hoạt hóa để kích thích sự sản sinh các xytokin khác nhau, như IL-12 và IL-18, không kể các xytokin khác. Về mặt này, một số thành phần của thành tế bào của vi khuẩn axit lactic đã được biết là hoạt hóa con đường truyền tín hiệu NF- κ B và STAT trong đại thực bào và do đó kích thích sự sản sinh xytokin. Ngoài ra, vi khuẩn axit lactic làm gia tăng mức độ sản sinh IL-12, IL-18, và TNF- α trong tế bào đuôi gai, đây là tế bào trình diện kháng nguyên chuyên biệt được phát hiện nhiều trong các hạch bạch huyết và màng nhầy của đường tiêu hóa, cũng như sự biểu hiện các phân tử bề mặt hoạt hóa lymphô bào T như MHC nhóm II và B7-2 (Cross *et. al.*, *Anti-Allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?*, *International Immunopharmacology*, Volume 1, tháng 5 năm 2001, trang 891-901).

Lymphô bào T đóng vai trò trung tâm trong miễn dịch thích ứng. Trong miễn dịch thích ứng, đáp ứng Th1 dẫn đến sự miễn dịch qua trung gian tế bào và còn có đáp ứng Th2 dẫn đến miễn dịch dịch thể. Các xytokin do tế bào trình diện kháng nguyên tạo ra là khác nhau giữa đáp ứng Th1 và đáp ứng Th2. IL-12, IL-18 và interferon (IFN) chủ yếu được tạo ra trong đáp ứng Th1 trong đó đáp ứng Th2 chủ yếu dẫn đến sự sản sinh PGE2, IL-4, và IL-10. Để nội cân bằng hệ miễn dịch, cần có sự cân bằng thích hợp giữa đáp ứng Th1 và Th2. Sự phá vỡ cân bằng Th1/Th2 dẫn đến bệnh trung gian do miễn dịch. Nói chung, tế bào Th1 có hiệu quả hơn đối với bệnh nhiễm trùng, trong khi tế bào Th2 chủ yếu chịu trách nhiệm đối với đáp ứng dị ứng và đáp ứng viêm. Khi hoạt động bình thường, tế bào Th2 bảo vệ cơ thể khỏi bụi và các chất không

mong muốn khác. Khi bị hoạt hóa quá mức, tế bào Th2 làm gia tăng mức độ sản sinh kháng thể IgE, gây ra phản ứng dị ứng với các protein không phải là kháng nguyên bình thường (ví dụ, phấn hoa, thực phẩm). Đáp ứng Th1 phải cân bằng với đáp ứng Th2. Sự thừa hoặc thiếu các đáp ứng này đều gây ra bệnh. Tình trạng stress mãn tính làm giải phóng liên tục cortisol, gây ra sự giảm đáp ứng Th2 nhưng lại làm gia tăng đáp ứng Th1, dẫn đến bệnh ung thư, tạng dị ứng, bệnh dị ứng, và bệnh tự miễn (Elenkov và Chrousos, *Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease, Trends in Endocrinology and Metabolism*, Volume 10, tháng 11 năm 1999, trang 359-368).

Vi khuẩn axit lactic kích thích sự sản sinh xytokin IFN- γ Th1, nhưng ức chế sự giải phóng xytokin IL-4 và IL-5 Th2 trong lymphô bào T như được chứng minh trong thử nghiệm *in vivo* (Matsuzaki *et. al.*, *The effect of oral feeding of Lactobacillus casei strain Shirota on immunoglobulin E production in mice, Journal of Dairy Science*, Volume 81, tháng 1 năm 1998, trang 48-53). Thử nghiệm khác cho thấy rằng khi chuột đã mẫn cảm sơ bộ với albumin trứng thiên về đáp ứng Th2 được cho sử dụng vi khuẩn axit lactic qua đường miệng, mức IFN- γ của tế bào đơn nhân lách tăng lên nhưng mức IL-4, IL-5 và IgE giảm đi và việc ủ tế bào đơn nhân lách phân lập được từ chuột đã mẫn cảm sơ bộ với albumin trứng thiên về Th2, cùng với vi khuẩn axit lactic, dẫn đến sự thay đổi mức xytokin và IgE phù hợp với kết quả thử nghiệm sử dụng qua đường miệng. Tuy nhiên, do việc chỉ ủ lymphô bào T cùng với vi khuẩn axit lactic không dẫn đến làm gia tăng đáng kể mức IFN- γ , lymphô bào T được cho là cần đến tế bào trình diện kháng nguyên như đại thực bào và tế bào đuôi gai trong quá trình sản sinh IFN- γ của chúng (Kato *et. al.*, *Lactic acid bacterium potently induces production interleukin-12 and interferon-gamma by mouse splenocytes, International Journal of Immunopharmacology*, Volume 21, tháng 2 năm 1999, trang 121-131). IL-12 và IL-18 là các xytokin đóng vai trò quan trọng trong sự biệt hóa lymphô bào Th0 thành lymphô bào Th1, được tạo ra trong đại thực bào hoặc tế bào đuôi gai. Khi được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic, tế bào đơn nhân lách hoặc tiểu thực bào đã được biết là làm gia tăng mức độ sản sinh IL-12, IL-18 và IFN- α theo cách phụ thuộc liều. Do đó, vi khuẩn axit lactic làm gia tăng mức độ sản sinh IL-12, IL-18 và IFN- α trong đại thực

bào, nhờ đó thúc đẩy sự biệt hóa thành tế bào Th1 đồng thời kích thích sự sản sinh IFN- γ , nên chúng có thể có tác dụng điều chỉnh tình trạng có Th2 chiếm ưu thế về tình trạng cân bằng Th1/Th2 (Cross *et. al.*, *Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?*, *International Immunopharmacology?*, Volume 1, tháng 5 năm 2001, trang 891-901). Do đó, vi khuẩn axit lactic được thông báo là hữu ích để phòng hoặc điều trị bệnh trung gian do miễn dịch như bệnh ung thư, tạng dị ứng, bệnh dị ứng và bệnh tự miễn, do sự phá vỡ cân bằng Th1/Th2 gây bởi đáp ứng Th2 quá mức.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để dẫn đến sáng chế, tác giả sáng chế đã thực hiện nghiên cứu sâu và tỉ mỉ về men vi sinh, và đã phát hiện được rằng chủng *Lactobacillus sp.* mới phân lập được từ thực phẩm lên men truyền thống của Hàn Quốc và được xác định là có tác dụng điều chỉnh rất tốt sự mất cân bằng Th1/Th2 thiên về đáp ứng Th2 hoặc trung gian bởi tế bào Th2.

Do đó, một mục đích của sáng chế là đề xuất chủng *Lactobacillus sp.* mới có thể dùng làm men vi sinh có tác dụng tăng cường miễn dịch rất tốt, đặc biệt là tác dụng điều biến miễn dịch đối với sự mất cân bằng Th1/Th2 thiên về Th2 cũng như có khả năng đề kháng axit và axit mật và bám vào tế bào biểu mô ruột rất tốt.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh đường ruột chứa chủng *Lactobacillus sp.* mới.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm tăng cường miễn dịch chứa chủng *Lactobacillus sp.* mới.

Để thực hiện các mục đích trên, sáng chế đề xuất vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 (được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc vào ngày 16 tháng 10 năm 2008 với mã số lưu giữ là KCTC 11402BP).

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh đường ruột chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm tăng cường miễn dịch chứa vi khuẩn

Lactobacillus plantarum CJLP56.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện tính đề kháng axit của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56.

Fig.2 là đồ thị thể hiện tính đề kháng axit mật của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56.

Fig.3 là đồ thị thể hiện khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56.

Fig.4 là đồ thị thể hiện nồng độ của xytokin IL-12 gây đáp ứng Th1 được tạo ra trong tế bào đơn nhân lách của chuột đã miễn cảm sơ bộ với albumin trứng thiên về đáp ứng Th2 sau khi chuột được điều trị bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 và các vi khuẩn axit lactic so sánh khác.

Fig.5 là đồ thị thể hiện nồng độ của xytokin IL-4 gây đáp ứng Th2 được tạo ra trong tế bào đơn nhân lách của chuột đã miễn cảm sơ bộ với albumin trứng thiên về đáp ứng Th2 sau khi chuột được điều trị bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 và các vi khuẩn axit lactic so sánh khác.

Fig.6 là đồ thị thể hiện nồng độ IL-12 và IL-10 được tạo ra trong dòng tế bào đại thực bào RAW264.7 được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 và các vi khuẩn so sánh khác được xác định bằng ELISA.

Fig.7 là đồ thị thể hiện nồng độ IL-12 và IL-10 được tạo ra trong dòng tế bào đuôi gai JAWSII được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 và các vi khuẩn so sánh khác được xác định bằng ELISA.

Fig.8 là đồ thị thể hiện mức độ biểu hiện mARN của IL-12p40 và IL-18 trong dòng tế bào đại thực bào RAW264.7 được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 và các vi khuẩn so sánh khác được xác định bằng RT-PCR.

Fig.9 là đồ thị thể hiện mức độ biểu hiện mARN của IL-12p40 và IL-18 trong dòng tế bào đuôi gai JAWSII được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 và các vi khuẩn so sánh khác được xác định bằng RT-PCR.

Mô tả chi tiết sáng chế

Lactobacillus plantarum CJLP56 theo sáng chế là chủng *Lactobacillus plantarum* mới phân lập và xác định được từ các thực phẩm lên men truyền thống của Hàn quốc. Ví dụ về thực phẩm lên men truyền thống này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Kimchi, rau lên men, đậu hũ lên men, xì dầu, đậu hũ lên men nhanh, và hải sản muối chua.

Để xác định và phân loại chủng, chủng mới theo sáng chế được giải trình tự bazơ 16S rARN. Do đó, nó được phát hiện là có mối liên hệ phái sinh loài ở cấp độ phân tử cao nhất với chủng đối chiếu *Lactobacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum* NBRC15891^T, mã số lưu giữ tại Ngân hàng gen là AB326351) do mức độ tương đồng cao nhất giữa chúng (99,9%). Do đó, chủng mới theo sáng chế được xác định là chủng *Lactobacillus plantarum*, có tên là *Lactobacillus plantarum* CJLP56, và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc ngày 16 tháng 10 năm 2008 (mã số lưu giữ là KCTC 11402BP). Trình tự nucleotit của gen 16S rARN của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được thể hiện bằng trình tự nhận biết số 1 như được đưa ra trong danh mục trình tự sau đây.

Lactobacillus plantarum CJLP56 là vi khuẩn Gram dương và không bắt buộc kỵ khí nên nó có thể phát triển cả trong điều kiện ưa khí và kỵ khí. Vi khuẩn mới này không tạo thành bào tử cũng không di chuyển và có dạng hình que. Đặc tính hình thái và sinh lý cụ thể hơn của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp đã biết rõ và kết quả được nêu tóm tắt trong Bảng 1.

Bảng 1

Đặc tính hình thái, sinh lý và sinh hóa	Kết quả
Hình thái	Bacillus (hình que)
Tính di động	-
Bào tử	-
Catalaza	-
Lên men dị chất nấm men	Lên men dị chất tùy ý
Tăng sinh ở 15°C	+

Tăng sinh ở 45°C	-
Tăng sinh ở 3% NaCl	+
Phát triển kỵ khí	+
Tạo CO ₂ khi sử dụng glucoza	-
Lên men đường	
Glyxerol	-
Erythritol	-
D-arabinoza	-
L-arabinoza	+
Riboza	+
D-xyloza	-
L-xyloza	-
Adonitol	-
Xylosit	-
Galactoza	+
D-glucoza	+
D-fructoza	+
D-manoza	+
L-sorboza	-
Rhamnoza	+
Dulxitol	-
Inositol	-
Manitol	+
Sorbitol	+
D-manosit	+
D-glucosit	-
Glucosamin	+
Amygdalin	+
Albutin	+
Esculin	+
Salixin	+

Xenlobioza	+
Maltoza	+
Lactoza	+
Melibioza	+
Sacaroza	+
Trehaloza	+
Inulin	+
Melizitoza	+
D-rafinoza	+
Amidon	-
Glycogen	-
Xylitol	-
Gentiobioza	+
D-turanoza	+
D-lyxoza	-
D-tagatoza	-
D-fucoza	-
L-fucoza	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
Gluconat	-
2-gluconat	-
5-gluconat	-

+ : dương tính

- : âm tính

Để bảo quản trong thời gian dài, tốt hơn nếu chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 có thể được bảo quản lạnh cùng với dung dịch bảo quản được điều chế từ hỗn hợp gồm nước và glyxerol ở nhiệt độ -70°C hoặc có thể được tạo hỗn dịch trong 10% sữa tách kem vô trùng trước khi làm đông khô nhanh.

Ngoài ra, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 theo sáng chế dùng làm men

vi sinh có hoạt tính bảo vệ dạ dày-ruột và tăng cường miễn dịch.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “men vi sinh” được hiểu là vi sinh vật sống có lợi cho sức khỏe của vật chủ nhờ cải thiện môi trường vi sinh vật trong đường dạ dày-ruột. Men vi sinh, tức là vi sinh vật sống có hoạt tính men vi sinh, có thể là một chủng hoặc các chủng hỗn hợp và có thể ảnh hưởng có lợi đến hệ thực vật đường ruột trong vật chủ sau khi sử dụng chúng ở dạng tế bào khô hoặc sản phẩm lên men. Để dùng làm men vi sinh, trước hết, vi sinh vật phải đi qua dạ dày vào ruột ở tình trạng còn sống và có tính đề kháng với dịch vị và dịch mật. Ngoài ra, chúng phải khu trú và sống ở ruột và có ảnh hưởng có lợi đến hệ thực vật nhỏ đường ruột. Do đó, chúng phải đề kháng với dịch vị và axit mật và còn có thể bám vào tế bào biểu mô ruột. Tiếp theo, vi sinh vật phải an toàn đối với cơ thể. Về mặt này, thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm loại amin của phenylalanin bằng deaminaza, thử nghiệm tạo amoniac, và thử nghiệm tan huyết được thực hiện. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 theo sáng chế được quan sát là âm tính với thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm loại amin của phenylalanin bằng deaminaza, và thử nghiệm tạo amoniac, cũng như có tính đề kháng tốt với axit và axit mật và khả năng bám tốt vào tế bào biểu mô ruột. Ngoài ra, hiện tượng tan huyết α được quan sát cho thấy chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 an toàn đối với cơ thể.

Nhờ khả năng đề kháng rất tốt với axit và axit mật và khả năng bám tốt vào tế bào biểu mô ruột, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 theo sáng chế được cho là có tác dụng bảo vệ dạ dày-ruột rất tốt. Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh đường ruột chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56.

Chế phẩm để điều trị bệnh đường ruột chứa vi sinh vật theo sáng chế có thể dùng để phòng hoặc điều trị bệnh đường ruột ở động vật có vú, kể cả người, như vật nuôi, ví dụ, gia súc, ngựa, và lợn. Thuật ngữ “bệnh đường ruột” như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ bệnh viêm hoặc nhiễm vi khuẩn trong ruột. Ví dụ về bệnh đường ruột bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh tiêu chảy nhiễm trùng do vi sinh vật gây bệnh gây ra (*E. coli*, *Salmonella*, và *Clostridium*), bệnh viêm dạ dày-ruột, bệnh viêm ruột, hội

chứng viêm ruột tâm sinh, tình trạng vi sinh vật phát triển quá mức trong ruột non, bệnh tiêu chảy, và bệnh tương tự. Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được chứa trong chế phẩm để điều trị bệnh đường ruột có thể là vi khuẩn sống hoặc vi khuẩn đã chết, và tốt hơn là vi khuẩn sống. Nói chung, vi khuẩn sống có khả năng điều trị hoặc cải thiện các triệu chứng chung do sự lên men bất thường hệ thực vật đường ruột gây ra, có khả năng sống ở đường ruột với tác dụng đồng thời ngăn không cho vi khuẩn có hại bám vào đường ruột của người và động vật, và tạo ra axit lactic để làm giảm độ pH trong ruột, nhờ đó ức chế sự tăng sinh của vi khuẩn có hại. Ngoài ra, vi khuẩn sống được sử dụng sẽ tạo ra bacterioxin và peroxit để ức chế sự tăng sinh của các tác nhân gây bệnh và làm tăng hoạt tính của nhung mao ruột để hấp thu chất dinh dưỡng. Hơn nữa, vi khuẩn sống có thể tạo ra các chất có lợi cho sự hấp thu và sử dụng chất dinh dưỡng, cải thiện yêu cầu về thức ăn chăn nuôi, và tạo ra các chất trung hòa chất độc của tác nhân gây bệnh.

Tốt hơn, nếu chế phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh đường ruột theo sáng có thể được sử dụng qua đường miệng, nhưng phương pháp sử dụng chế phẩm không chỉ giới hạn ở đó. Liều có thể thay đổi tùy thuộc vào yếu tố khác nhau bao gồm loại và mức độ nặng của bệnh đường ruột, tuổi của bệnh nhân, giới tính và sắc tộc, và mục đích phòng bệnh. Thông thường, vi khuẩn có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 10 triệu đến 100 tỉ tế bào/ngày cho người lớn.

Ngoài tác dụng bảo vệ dạ dày-ruột, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 theo sáng chế có tác dụng tăng cường miễn dịch rất tốt so với vi khuẩn axit lactic thông thường. Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được phát hiện là không những kích thích sự sản sinh IL-12 dẫn đến đáp ứng Th1 mà còn ức chế sự sản sinh IL-4 dẫn đến đáp ứng Th2 trong tế bào đơn nhân lách. Ngoài ra, chủng vi khuẩn theo sáng chế có tác dụng kích thích tế bào điều biến miễn dịch, như đại thực bào và tế bào đuôi gai, đây là các tế bào trình diện kháng nguyên có thể điều biến đáp ứng miễn dịch của tế bào T, tạo ra xytokin cảm ứng lymphô bào Th0 để biệt hóa thành lymphô bào Th1, do đó điều chỉnh sự mất cân bằng Th1/Th2 thiên về đáp ứng Th2 theo hướng làm gia tăng đáp ứng Th1. Phần mô tả chi tiết về tác dụng tăng cường miễn dịch của vi

khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được đưa ra dưới đây.

Trong tế bào đơn nhân lách của chuột thiên về đáp ứng Th2 nhờ sử dụng albumin trứng (OVA), vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 kích thích sự sản sinh IL-12, là một xytokin dẫn đến đáp ứng Th1, ở mức cao gấp 5,8 – 8,4 lần so với mẫu đối chứng âm và ức chế sự sản sinh IL-4, là một xytokin dẫn đến đáp ứng Th2, ở mức cao hơn 10,7 – 12,9% so với mẫu đối chứng âm. Chúng vi khuẩn theo sáng chế được phát hiện là có ưu điểm đáng kể xét về hoạt tính điều biến miễn dịch so với các vi khuẩn axit lactic thông thường khác như *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033), *Lactobacillus casei* (KCTC 3109), và *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC13416). Do đó, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 có khả năng điều biến miễn dịch cao đến mức nó làm gia tăng đáp ứng Th1, đồng thời ức chế đáp ứng Th2, để điều chỉnh sự mất cân bằng Th1/Th2 thiên về Th2.

Hoạt tính tăng cường miễn dịch của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 cũng được chứng minh trong dòng tế bào đại thực bào RAW264.7 và dòng tế bào đuôi gai JAWSII, các dòng tế bào này được nuôi cấy cùng với chủng vi khuẩn theo sáng chế. Khi được điều trị bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56, dòng tế bào đại thực bào RAW264.7 và dòng tế bào đuôi gai JAWSII được cảm ứng để sản sinh IL-12 và IL-18 là các xytokin gây ra sự biệt hóa thành Th1 ở mức cao, và ức chế sự sản sinh IL-10, là một xytokin ức chế sự biệt hóa thành Th1, tới mức thấp hơn so với IL-12, do đó thúc đẩy sự biệt hóa thành Th1. Từ các kết quả này cũng hiểu được rằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 có hoạt tính điều biến miễn dịch để điều chỉnh sự mất cân bằng Th1/Th2 thiên về Th2 bằng cách kích thích đáp ứng Th1 và ức chế đáp ứng Th2.

IL-4 được tạo bởi tế bào Th2 và đóng vai trò trung tâm trong miễn dịch qua trung gian tế bào đặc hiệu Th2. Nó còn hoạt động như xytokin chống viêm, tức là nó ức chế sự sản sinh IL-12, là một xytokin của tế bào Th1. Gần đây, mức độ tổn thương da và máu ngoại vi của bệnh nhân viêm da dị ứng được thông báo là tăng lên đáng kể trong tế bào Th2, các tế bào này chủ yếu chịu trách nhiệm về việc sản sinh IL-4 và IL-5 (Miraglia *et. al*, *Immune dysregulation in atopic dermatitis, Allergy and Asthma*

Proceedings, Volume 27, tháng 11-12 năm 2006, trang 451-455). Do đó, sự mất cân bằng Th1/Th2 thiên về các đáp ứng miễn dịch trung gian bởi Th2 gây ra bệnh như bệnh viêm da tạng dị ứng. Ngoài ra, như được mô tả trên đây, tình trạng thừa hoặc thiếu đáp ứng Th1 hoặc Th2 so với đáp ứng còn lại sẽ gây ra bệnh. Ví dụ, sự giảm tương đối đáp ứng Th1 hoặc sự tăng tương đối đáp ứng Th2 đã được biết là làm khởi phát các bệnh qua trung gian tế bào miễn dịch như bệnh ung thư, bệnh thể tạng dị ứng, bệnh dị ứng, và bệnh tự miễn (Elenkov và Chrousos, *Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease, Trends in Endocrinology and Metabolism*, Volume 10, tháng 11 năm 1999, trang 359-368). Do đó, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được cho là có thể dùng để phòng hoặc điều trị bệnh thể tạng dị ứng và bệnh dị ứng cũng như bệnh ung thư và bệnh tự miễn do vi khuẩn này có thể điều biến sự sản sinh xytokin từ tế bào điều biến miễn dịch như Th1, Th2, đại thực bào và tế bào đuôi gai để điều chỉnh sự mất cân bằng Th1/Th2 thiên về Th2 theo hướng làm gia tăng đáp ứng Th1.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm tăng cường miễn dịch chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56. Chế phẩm tăng cường miễn dịch theo sáng chế có tác dụng làm gia tăng đáp ứng miễn dịch do *Lactobacillus plantarum* CJLP56 là vi khuẩn axit lactic có tác dụng làm gia tăng đáp ứng miễn dịch như được mô tả trên đây. Cụ thể, như được chứng minh trong phần ví dụ thực hiện sáng chế sau đây, chế phẩm tăng cường miễn dịch theo sáng chế là hữu hiệu để phòng hoặc điều trị các bệnh do sự mất cân bằng Th1/Th2 thiên về Th2 gây ra, do vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 có thể kích thích đáp ứng Th1. Do đó, chế phẩm tăng cường miễn dịch theo sáng chế có thể được sử dụng hữu hiệu để phòng hoặc điều trị bệnh thể tạng dị ứng, bệnh dị ứng, bệnh ung thư và bệnh tự miễn. Bệnh tự miễn bao gồm bệnh hen và cảm mạo, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh này.

Chế phẩm làm gia tăng đáp ứng miễn dịch có thể được sử dụng qua đường miệng nhưng phương pháp sử dụng chế phẩm không chỉ giới hạn ở cách này. Liều có thể thay đổi tùy thuộc vào yếu tố khác nhau bao gồm loại bệnh cần tăng cường miễn dịch để điều trị bệnh, mức độ nặng của bệnh, tuổi của bệnh nhân, giới tính, và sắc tộc, và

mục đích điều trị hoặc phòng bệnh. Nói chung, vi khuẩn được sử dụng với lượng 10 triệu đến 100 tỷ tế bào/ngày cho người lớn.

Do chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 có độ an toàn đã được chứng minh, chế phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh đường ruột và chế phẩm tăng cường miễn dịch theo sáng chế có thể được sử dụng cho dược phẩm, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, thức ăn chăn nuôi, hoặc chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi mà không lo ngại bất kỳ về tác dụng phụ.

Khi được sử dụng làm dược phẩm, chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành dược phẩm thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Dược phẩm này có thể ở dạng liều dùng qua đường miệng như chất lỏng, hỗn dịch, bột, hạt, viên nén, viên nang, viên tròn, hoặc chất chiết.

Tá dược hoặc chất phụ gia được dùng thích hợp cho việc bào chế có thể được sử dụng. Ví dụ, chế phẩm thích hợp để sử dụng qua đường miệng có thể bao gồm ít nhất một chất mang được chọn từ nhóm bao gồm chất pha loãng, chất làm trơn, chất kết dính, chất phân rã, chất tạo ngọt, chất ổn định, và chất bảo quản, và ít nhất một chất phụ gia được chọn từ nhóm bao gồm chất điều vị, vitamin, và chất chống oxy hóa.

Tá dược hoặc chất phụ gia bất kỳ có thể được sử dụng, miễn là chúng là chất được chấp nhận sử dụng trong dược phẩm. Ví dụ, chất pha loãng có thể là axit lactic, tinh bột ngô, dầu đậu tương, xenluloza vi tinh thể, hoặc manitol. Ví dụ về chất làm trơn bao gồm magie stearat và bột talc. Polyvinyl pyrrolidon hoặc hydroxypropylxenluloza có thể là thích hợp để làm chất kết dính. Ngoài ra, tốt hơn nếu chất phân rã có thể được chọn từ canxi carboxymetylxenluloza, natri tinh bột glycolat, polacrilin kali, và crospovidon. Chất tạo ngọt có thể là đường trắng, fructoza, sorbitol, hoặc aspartam, chất ổn định có thể là natri carboxymetylxenluloza, β -xyclodextrin, sáp trắng, hoặc gôm xantan, và chất bảo quản có thể là metyl paraoxybenzoat, propyl paraoxybenzoat, hoặc kali sorbat.

Ngoài các chất nêu trên, chất tạo vị tự nhiên như vị mặn, vị chanh, vị dứa, hoặc vị thảo mộc, nước ép trái cây tự nhiên, chất màu tự nhiên như clophylin hoặc flavonoit, chất tạo ngọt như fructoza, mật ong, rượu đường, hoặc đường, hoặc chất tạo

vị chua như axit xitric hoặc natri xitrat, hoặc hỗn hợp của chúng có thể được thêm vào chế phẩm theo sáng chế để cải thiện vị.

Kỹ thuật bào chế, các tá dược và chất phụ gia cần thiết để bào chế được mô tả chi tiết trong tài liệu: *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995).

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm thực phẩm. Trong số chúng có thực phẩm chức năng và thực phẩm hàng ngày. Để sử dụng làm thực phẩm chức năng, chế phẩm theo sáng chế có thể được chế biến thành các chế phẩm khác nhau thường được sử dụng trong lĩnh vực này với tá dược hoặc chất phụ gia được chấp nhận về mặt dinh dưỡng. Ví dụ về thực phẩm chức năng bao gồm bột, hạt, viên nén, viên nang, hỗn dịch, nhũ tương, xiro, chất lỏng, chất chiết, chè, thạch, đồ uống, hoặc sản phẩm tương tự. Tá dược hoặc chất phụ gia chấp nhận được về mặt dinh dưỡng bất kỳ có thể được sử dụng miễn là nó đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Nhờ tác dụng phòng hoặc điều trị bệnh tạng dị ứng, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng trong mỹ phẩm. Chế phẩm được sử dụng trong mỹ phẩm có thể được điều chế thành các mỹ phẩm khác nhau thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Khi chế phẩm này được điều chế, tá dược hoặc chất phụ gia chấp nhận được đối với mỹ phẩm có thể được bổ sung vào.

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

Để sử dụng làm chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi, chế phẩm theo sáng chế có thể được điều chế thành chất lỏng có nồng độ cao nằm trong khoảng từ 20 đến 90% hoặc có thể được điều chế dưới dạng bột hoặc hạt. Chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi có thể bao gồm ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm axit hữu cơ như axit xitric, axit fumaric, axit adipic, axit lactic, hoặc axit malic, muối phosphat như natri phosphat, kali phosphat, pyrophosphat axit, hoặc polyphosphat (phosphat polyme hóa), và chất chống oxy hóa tự nhiên như polyphenol, catechin, α -tocopherol, dịch chiết lá hương thảo, vitamin C, dịch chiết chè xanh, dịch chiết cam thảo, chitosan, axit tanic, hoặc axit phytic. Chế phẩm được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi có thể được điều chế thành các dạng khác nhau thường được sử dụng trong lĩnh vực này cùng

với các thành phần thường được sử dụng trong thức ăn chăn nuôi.

Thức ăn chăn nuôi và chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi có thể bao gồm hạt như bột lúa mì, yến mạch, lúa mạch, ngô, hoặc gạo; thức ăn protein thực vật cho vật nuôi chứa bã nho, đậu, hoặc bã hướng dương làm thành phần chính; thức ăn protein động vật cho vật nuôi như bột huyết, bột thịt, bột xương, hoặc bột cá; đường; và sản phẩm sữa như sữa bột và bột váng sữa. Chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi và thức ăn chăn nuôi có thể còn bao gồm chất bổ sung dinh dưỡng, chất trợ tiêu hóa và hấp thu, chất kích thích tăng trưởng, hoặc chất tương tự.

Chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi có thể được sử dụng cho động vật một mình hoặc kết hợp với chất phụ gia ăn được khác. Ngoài ra, chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi có thể được sử dụng dưới dạng nước sốt cho thức ăn chăn nuôi hoặc dưới dạng hỗn hợp với thức ăn chăn nuôi, hoặc ở dạng riêng rẽ dùng qua đường miệng. Nếu chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi được sử dụng riêng rẽ với thức ăn chăn nuôi, nó được kết hợp với chất mang được dùng để điều chế chế phẩm giải phóng ngay hoặc giải phóng kéo dài. Chất mang ăn được có thể là chất rắn hoặc chất lỏng, như tinh bột ngô, lactoza, sucroza, vụn đậu, dầu lạc, dầu oliu, dầu vừng, hoặc propylen glycol. Nếu chất mang dạng rắn được sử dụng, chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi có thể ở dạng viên nén, viên nang, bột, viên tròn hoặc viên hình thoi, hoặc nước sốt không phân tán. Đối với chất mang dạng lỏng, chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi có thể ở dạng viên nang gelatin mềm, hỗn dịch xirô, nhũ tương, hoặc dung dịch.

Thức ăn chăn nuôi có thể bao gồm bột ngũ cốc hữu cơ chứa protein thường được sử dụng để thỏa mãn nhu cầu ăn của động vật. Bột ngũ cốc chứa protein có thể bao gồm bột ngô, bột đậu, hoặc hỗn hợp bột ngô/đậu.

Ngoài ra, chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi và thức ăn chăn nuôi có thể bao gồm chất bổ sung như chất bảo quản, chất ổn định, chất thấm ướt, chất nhũ hóa, và chất hòa tan. Chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi có thể được thêm vào thức ăn chăn nuôi theo cách thấm lọc, phun, hoặc trộn.

Thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi có thể dùng

cho bữa ăn của các động vật khác nhau như động vật có vú, gia cầm, và cá. Động vật có vú bao gồm lợn, bò, cừu, dê, động vật gặm nhấm để thử nghiệm, và động vật cảnh (ví dụ, chó và mèo). Ví dụ về gia cầm bao gồm gà, gà tây, vịt, ngỗng, gà lôi, và chim cút, và cá bao gồm cá hồi, nhưng không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Có thể hiểu rõ hơn sáng chế thông qua các ví dụ sau đây, các ví dụ này được đưa ra để minh họa sáng chế, nhưng không được hiểu là làm giới hạn sáng chế.

Ví dụ 1: Phân lập và xác định chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 phân lập được từ kimchi được phết lên đĩa MRS phủ 1,5% (Difco, Mỹ), và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Khuẩn lạc tinh khiết được thu hoạch bằng cách sử dụng vòng và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 18 đến 24 giờ trong môi trường MRS lỏng (Difco, Mỹ).

Sau đó, đặc tính hình thái và sinh lý của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được xác định bằng cách sử dụng phương pháp của Kim và các đồng tác giả (Kim *et. al.*, *Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi, *International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology*, Volume 53, July 2003, trang 1123-1126), và kit API50CH và API50CHL (Biomerio). Đặc tính hình thái và sinh lý của *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được tổng kết trong Bảng 1 nêu trên.

Ngoài ra, trình tự bazơ của gen 16S rARN được phân tích để xác định và phân loại vi khuẩn axit lactic. Trình tự bazơ của gen 16S rARN được xác định và phân tích bằng cách sử dụng phương pháp của Kim và các đồng tác giả (Kim *et. al.*, *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology*, Volume 50, tháng 9 năm 2000, trang 1915-1919). Trình tự bazơ của gen 16S rARN của *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được đưa ra trong danh mục trình tự kèm theo (trình tự nhận biết số: 1).

Theo kết quả xác định trình tự bazơ của gen 6S rARN, chủng vi khuẩn nêu trên được phát hiện là có mức độ tương đồng cao nhất (99,9%) với chủng vi khuẩn

Lactobacillus plantarum chuẩn (*Lactobacillus plantarum* NBRC15891^T, mã số lưu giữ trong ngân hàng gen là AB326351), và được xác định là chủng *Lactobacillus plantarum* và có tên *Lactobacillus plantarum* CJLP56, và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc (the Korean Collection for Type Cultures) ngày 16 tháng 10 năm 2008 (mã số lưu giữ là KCTC11402BP).

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tính đề kháng của *Lactobacillus plantarum* CJLP56 đối với axit của dịch vị nhân tạo và axit mật của dịch mật nhân tạo

Thử nghiệm về tính kháng axit được tiến hành với dịch vị nhân tạo được điều chế bằng phương pháp cải biến của Kobayashi và các đồng tác giả (Kobayashi *et. al.*, *Studies on biological characteristics of Lactobacillus: II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance strain, L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Japan Journal of Microbiology*. Volume 29, tháng 7 năm 1974, trang 691-697). Cụ thể, dịch vị nhân tạo được điều chế bằng cách điều chỉnh độ pH của môi trường MRS lỏng tới 2,5 bằng dung dịch HCl 1N, bổ sung pepsin với nồng độ 1000 đơn vị/ml, và tiệt trùng môi trường này.

Lactobacillus plantarum CJLP56 đã được phân lập và xác định trong ví dụ 1 được ủ trong môi trường MRS ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 18 giờ và ly tâm để kết tủa viên vón tế bào. Viên vón này được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối tiệt trùng (NaCl 0,85%) và hỗn dịch tế bào được cấy vào môi trường đối chứng và dịch vị nhân tạo tới nồng độ khoảng 10^7 cfu/ml. Trong khi ủ ở nhiệt độ 37°C, tế bào còn sống được đếm ở thời điểm 0 và 3 giờ sau khi cấy. Tổng số tế bào được xác định bằng cách pha loãng tế bào 10 lần trong dung dịch đệm phosphat (độ pH =6,8) chứa KH₂PO₄, Na₂HPO, L-xystein, HCl, và Tween 80.

Thử nghiệm về tính đề kháng axit mật trong dịch mật nhân tạo được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp của Casey và các đồng tác giả (Casey *et. al.*, *Isolation and characterization of anti-Salmonella lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract*, *Letters in Applied Microbiology*. Volume 39, 2004, trang 431-438). Về mặt này, *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được ủ trong môi trường được điều chế bằng cách bổ sung 0,3% mật bò đực vào môi trường MRS lỏng được sử dụng

trong thử nghiệm về tính đề kháng axit nêu trên. Tế bào được cấy theo cách giống như trong thử nghiệm về tính đề kháng axit nêu trên, và tế bào còn sống được đếm ở thời điểm 0, 12 và 24 giờ sau khi cấy.

Các chủng vi khuẩn axit lactic thông thường *Lactobacillus casei* (KCTC 3109), *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC13416), và *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) được thử nghiệm riêng rẽ trong các thử nghiệm về tính đề kháng axit và axit mật giống như được mô tả trên đây.

Kết quả được thể hiện trên Fig.1 và Fig.2. Fig.1 là đồ thị thể hiện tính đề kháng axit của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56. Fig.2 là đồ thị thể hiện tính đề kháng axit mật của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56.

Theo Fig.1 và Fig.2, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 có tính đề kháng axit và axit mật bằng hoặc cao hơn so với các chủng vi khuẩn axit lactic so sánh. Kết quả này cho thấy rằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 theo sáng chế có thể còn sống khi nó đi qua dịch vị tới ruột và còn sống trong dịch mật trong ruột.

Ví dụ 3: Thử nghiệm về khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56

Để sử dụng trong thử nghiệm về khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột, HT-29 được lấy từ Ngân hàng dòng tế bào của Hàn Quốc (Korean Cell Line Bank: KCLB), và thử nghiệm này được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp của Kim và các đồng tác giả. (Kim *et. al.*, *Probiotic properties of Lactobacillus and Bifidobacterium strains isolated from porcine gastrointestinal tract*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 74, tháng 4 năm 2007, trang 1103-1111) và phương pháp của Hirano và các đồng tác giả (Hirano *et. al.*, *The effect of Lactobacillus rhamnosus on enterohemorrhagic Escherichia coli infection of human intestinal cells in vitro*, *Microbiology and Immunology*, Volume 47, 2003, trang 405-109).

Tế bào HT-29 được ủ trong môi trường RPMI 1640 (Gibco, Mỹ) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (fetal bovine serum: FBS) được bất hoạt bằng nhiệt, 1% L-glutamin, penixilin G (100 IU/ml), và streptomycin (100 mg/ml) ở 37°C trong môi trường 5% CO₂. Để thử nghiệm khả năng bám và khả năng ức chế bám, trước tiên, tế

bào HT-29 được cấy ở mật độ $1,0 \times 10^5$ tế bào/ml cho một lỗ trong các đĩa có 24 lỗ, và nuôi cấy tới khi tạo đơn lớp hoàn toàn, thay môi trường bằng môi trường mới cách ngày. Đơn lớp hoàn toàn của tế bào HT-29 được rửa năm lần bằng dung dịch đệm PBS ở 25°C, sau đó bổ sung thêm 0,5 ml môi trường RPMI 1640 không chứa chất kháng sinh.

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được tạo hỗn dịch trong môi trường RPMI tới nồng độ khoảng $1,0 \times 10^9$ cfu/ml, và hỗn dịch này được cấy vào các đĩa có 24 lỗ và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 2 giờ trong môi trường 5% CO₂. Sau khi ủ xong, đĩa có 24 lỗ được rửa ba lần bằng dung dịch đệm PBS trong khi khuấy ở tốc độ 200 vòng/phút trong thời gian 3 phút để loại bỏ tế bào không bám và xác định khả năng bám tế bào khi rửa. Sau khi rửa, 0,2% trypsin-EDTA được thêm vào các lỗ để làm bong các tế bào đã bám. Các tế bào tách ra được pha loãng trong nước pepton theo cách pha loãng theo bậc và phết lên đĩa MRS-aga, sau đó ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Sau đó, đếm số lượng tế bào.

Trong thử nghiệm riêng biệt, để xác định khả năng bám không hoàn toàn, tấm kính phủ được tiệt trùng hoàn toàn bằng cách ngâm trong rượu 70% trong một ngày được cho lên đáy của đĩa petri trước khi ủ tế bào HT-29 trong đó, cùng với lượng vi khuẩn axit lactic giống như được mô tả trên đây. Vi khuẩn axit lactic không bị rửa trôi và vẫn bám với tế bào HT-29 được làm khô, nhuộm Gram, quan sát dưới kính hiển vi quang học và đếm. *Lactobacillus sakei* CJLS118 và *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) được sử dụng để so sánh trong thử nghiệm này.

Kết quả được thể hiện trên Fig.3. Fig.3 là đồ thị thể hiện khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56.

Theo Fig.3, *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được quan sát là có khả năng bám rất tốt vào tế bào biểu mô ruột sau thời gian 24 giờ so với *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) và *Lactobacillus sakei* CJLS118, cả hai chủng này đều đã được biết rõ trên thị trường là men vi sinh, và cụ thể là so với *Lactobacillus rhamnosus* GG. Các kết quả này cho thấy rằng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 theo sáng chế có khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột và do đó cải thiện môi trường ruột.

Ví dụ 4: Thử nghiệm về độ an toàn của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56

Để đánh giá độ an toàn của các chủng phân lập được trong ví dụ 1, thử nghiệm tan huyết, thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm về sự tạo thành sản phẩm chuyển hóa có hại (amoniac), và thử nghiệm loại amin của phenylalanin bằng deaminaza được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm về độ an toàn theo tiêu chuẩn chung của Hiệp hội kinh doanh trong lĩnh vực sinh học của Hàn Quốc.

Kết quả được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Kết quả thử nghiệm độ an toàn của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56

Chủng	Thử nghiệm			
	Thử nghiệm hóa lỏng gelatin	Loại amin của phenylalanin	Tan huyết α	Tạo amoniac
CJLP56	Âm tính	Âm tính	Tan huyết α , an toàn	Âm tính

Theo các kết quả này, *Lactobacillus plantarum* CJLP56 có kết quả âm tính trong thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm về sự tạo sản phẩm chuyển hóa có hại (amoniac), và thử nghiệm loại amin của phenylalanin, và có hiện tượng tan huyết α , hiện tượng này được coi là không phải tác nhân gây bệnh. Do đó, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được chứng minh là sử dụng an toàn cho cơ thể.

Ví dụ 5: Thử nghiệm về sự sản sinh IL-12 ở tế bào đơn nhân lách của chuột được điều trị

Để thử nghiệm khả năng kích thích sự sản sinh xytokin IL-12 của *Lactobacillus plantarum* CJLP56 do đáp ứng Th1 trong tế bào đơn nhân lách của chuột đã miễn cảm sơ bộ với albumin trứng có xu hướng thiên về đáp ứng Th2 gây ra, thử nghiệm sau đây được tiến hành theo phương pháp của Fujiwara và các đồng tác giả (Fujiwara *et. al.* A double-blind trial of *Lactobacillus paracasei* strain KW3110 administration for immunomodulation in patients with pollen allergy, Allergology International, 2005, volume 54, trang 143-149) và phương pháp của Fujiwara và các đồng tác giả

(Fujiwara *et. al.*, *The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance*, *International Archives of Allergy and Immunology*, 2004, Volume 135, trang 205-215) như sau.

Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp gồm 1,538ml phen hydroxit (Sigma), 13 mg/ml, 10 mg albumin trứng và 0,4615 ml PBS được tiêm trong màng bụng cho chuột cái Balb/c 5-6 tuần tuổi với liều 0,2 ml (1mg OVA + 2mg phen) cho một con chuột, sau đó tiêm trong màng bụng với liều tương tự vào ngày thứ 6 để nhắc lại. Chuột bị giết vào ngày 13 và lá lách được cắt. Tế bào đơn nhân lách thu được được cấy với lượng 100 μ l (4×10^6 tế bào/ml), cùng với 50 μ l tế bào thử nghiệm bị chết và 50 μ l albumin trứng (4 mg/ml) vào đĩa nuôi cấy tế bào dạng lỗ và ủ trong 7 ngày trong DMEM-10 trong môi trường 10% CO₂. Sau đó, dịch nổi được xác định mức IL-12 bằng cách sử dụng kit IL-12 ELISA (Biosource).

Vi khuẩn thử nghiệm đã chết được tạo ra như sau.

Vi khuẩn thử nghiệm được cấy vào môi trường MRS (Difco) và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ, sau đó ly tâm ở tốc độ 13000 vòng/phút trong thời gian 1 phút để thu được tế bào dưới dạng viên vón. Sau đó, tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối sinh lý và thu hoạch. Đối với thử nghiệm cấy tế bào động vật, tế bào vi khuẩn được gia nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 10 phút trong thể tích tương tự của nước cất đã tiệt trùng giống như của môi trường nuôi cấy ban đầu và được thu hoạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 13000 vòng/phút trong thời gian 1 phút. Tế bào được pha loãng trong DMEM để tạo ra nồng độ 50 μ g/ml và 5 μ g/ml môi trường nuôi cấy tế bào. *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được sử dụng làm vi khuẩn thử nghiệm. Thử nghiệm tương tự được thực hiện với *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033), *Lactobacillus casei* (KCTC 3109), và *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416) để so sánh.

Thử nghiệm với IL-12 được thực hiện theo hướng dẫn được cung cấp cho kit ELISA IL-12. Mật độ quang (O.D.) được xác định trên thiết bị đọc ELISA được sử dụng để tính mức IL-12 bằng cách chuẩn hóa theo mẫu IL-12 được cung cấp cho kit

này. Kết quả được thể hiện trên Fig.4.

Fig.4 là đồ thị thể hiện nồng độ của xytokin IL-12 gây đáp ứng Th1 được tạo ra trong tế bào đơn nhân lách của chuột đã miễn cảm sơ bộ với albumin trứng có xu hướng thiên về Th2 sau khi chúng được xử lý bằng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 và vi khuẩn axit lactic so sánh khác.

Như thấy rõ từ dữ liệu nêu trên Fig.4, *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được phát hiện là làm tăng đáng kể mức độ sản sinh xytokin IL-12 gây đáp ứng Th1 so với các vi khuẩn axit lactic khác. Do đó, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 theo sáng chế được xác định là có tác dụng làm tăng đáng kể đáp ứng Th1 ở chuột có xu hướng thiên về đáp ứng Th2.

Ví dụ 6: Thử nghiệm về hoạt tính ức chế đối với sự sản sinh IL-4 ở tế bào đơn nhân lách của chuột được điều trị

Để thử nghiệm hoạt tính ức chế của *Lactobacillus plantarum* CJLP56 đối với sự sản sinh xytokin IL-4 gây đáp ứng Th2 ở tế bào đơn nhân lách của chuột đã miễn cảm sơ bộ với albumin trứng có xu hướng thiên về đáp ứng Th2, quy trình tương tự như trong ví dụ 5 được lặp lại, chỉ khác là kit IL-4 (Biosource) được sử dụng thay cho kit IL-12. Kết quả được thể hiện trên Fig.5.

Fig.5 là đồ thị thể hiện nồng độ xytokin IL-4 gây đáp ứng Th2 được tạo ra trong tế bào đơn nhân lách của chuột đã miễn cảm sơ bộ với albumin trứng có xu hướng thiên về đáp ứng Th2 sau khi chúng được xử lý bằng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 và vi khuẩn axit lactic so sánh khác.

Như được chứng minh trên Fig.5, *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được phát hiện là ức chế sự sản sinh xytokin IL-4 gây đáp ứng Th2 để ức chế tế bào đơn nhân lách của chuột có xu hướng thiên về đáp ứng Th2 trung gian cho đáp ứng Th2.

Ví dụ 7: Thử nghiệm về mức độ biểu hiện xytokin IL-12p40 gây biệt hóa Th1 và IL-18 và xytokin IL-10 ức chế sự biệt hóa Th1 ở đại thực bào và tế bào đuôi gai

Tế bào trình diện kháng nguyên (APC) như đại thực bào và tế bào đuôi gai sản sinh ra IL-12 và IL-18 gây cảm ứng Th0 để biệt hóa thành Th1 trong khi sản sinh ra

IL-10 để ức chế sự biệt hóa thành Th1. Để đánh giá tác dụng của vi khuẩn axit lactic theo sáng chế đối với sự sản sinh IL-12, IL-10, và IL-18 trong đại thực bào và tế bào đuôi gai, thử nghiệm được thực hiện như sau.

Tế bào vi khuẩn thử nghiệm được sử dụng ở mật độ 5×10^7 tế bào/ml cho dòng tế bào đại thực bào RAW264.7, sau đó tế bào này được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 48 giờ trong tủ áp chứa 10% CO₂. Mức IL-12p40 và IL-10 của dịch nổi được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị ELISA.

Vi khuẩn thử nghiệm là *Lactobacillus plantarum* CJLP56, với lipopolysaccharit dùng làm đối chứng dương. Thử nghiệm tương tự được thực hiện trên vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033), *Lactobacillus casei* (KCTC 3109) và *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416) để so sánh.

Nồng độ được xác định bằng cách sử dụng kit IL-12p40 (BD Biosciences, Mỹ) đối với IL-12 và kit IL-10 (BD Biosciences, Mỹ) đối với IL-10 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết quả được thể hiện tương ứng trên Fig.6 và Fig.7.

Fig.6 là đồ thị thể hiện nồng độ IL-12 và IL-10 được tạo ra trong dòng tế bào đại thực bào RAW264.7 được xử lý bằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 và các vi khuẩn so sánh khác được xác định bằng thiết bị ELISA.

Fig.7 là đồ thị thể hiện nồng độ IL-12 và IL-10 được tạo ra trong dòng tế bào đuôi gai JAWSII được xử lý bằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 và các vi khuẩn so sánh khác được xác định bằng thiết bị ELISA.

Như có thể thấy trên Fig.6 và Fig.7, *Lactobacillus plantarum* CJLP56 có tác dụng kích thích sự sản sinh xytokin IL-12 gây biệt hóa Th1, nhưng có mức độ sản sinh xytokin ức chế biệt hóa Th1 thấp hơn đáng kể so với IL-12, và có khả năng sản sinh IL-12 cao hơn so với các vi khuẩn axit lactic khác.

Để biết chắc sự sản sinh IL-12 và IL-18 ở cấp độ gen, trước hết, vi khuẩn thử nghiệm được sử dụng ở mật độ 5×10^7 tế bào/ml cho dòng tế bào đại thực bào RAW264.7, sau đó, tế bào này được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 6 giờ trong tủ áp chứa 10% CO₂. ARN tổng số được phân lập và sử dụng để xác định mức

mARN IL-12 và IL-18 bằng phản ứng RT-PCR. Dòng tế bào đuôi gai JAWSII được cấy cùng với vi khuẩn thử nghiệm, nuôi cấy và tách ARN, sau đó xác định mức mARN của IL-12 và IL-18 bằng phản ứng RT-PCR theo cách giống như trong thử nghiệm với đại thực bào.

Kết quả được thể hiện tương ứng trên Fig.8 và Fig.9.

Fig.8 là đồ thị thể hiện mức độ biểu hiện mARN của IL-12p40 và IL-18 trong dòng tế bào đại thực bào RAW264.7 được xử lý bằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 và các vi khuẩn so sánh khác được xác định bằng RT-PCR.

Fig.9 là đồ thị thể hiện mức độ biểu hiện mARN của IL-12p40 và IL-18 trong dòng tế bào đuôi gai JAWSII được xử lý bằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 và các vi khuẩn so sánh khác được xác định bằng RT-PCR.

Như có thể thấy trên Fig.8 và Fig.9, *Lactobacillus plantarum* CJLP56 có tác dụng thúc đẩy quá trình phiên mã của mARN làm sản sinh cytokin IL-12 và IL-18 gây biệt hóa Th1, và có tác dụng làm tăng đáng kể mức độ biểu hiện mARN của IL-12 so với các vi khuẩn axit lactic khác.

Ví dụ 8: Tạo ra men vi sinh chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56

Men vi sinh *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được xác định trong ví dụ 1 được tạo ra trên quy mô lớn và làm đông khô nhanh để thu được men vi sinh thích hợp để sử dụng làm nguyên liệu của dược phẩm, thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi, hoặc mỹ phẩm.

Vi khuẩn này được ủ trong môi trường MRS (Difco) ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 18 giờ trong khi độ pH của nó được điều chỉnh tới 6,0 bằng dung dịch NaOH 25%, sau đó thu hoạch tế bào bằng cách ly tâm. Tế bào được làm lạnh ở nhiệt độ -40°C cùng với 5% dextrin và 10% sữa tách kem dùng làm chất bảo vệ đông lạnh, và làm khô ở nhiệt độ 37°C. Tế bào được làm đông khô nhanh theo cách này được tạo bột bằng cách sử dụng máy trộn. Bột vi khuẩn sống được trộn với lượng thích hợp của tá dược, như glucoza, axit lactic, và sữa tách kem, để điều chỉnh số lượng vi khuẩn tới mức cần thiết, và bảo quản trong túi nhôm hàn kín.

Để sử dụng trong dược phẩm, thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm v.v., men vi sinh có thể được trộn với bột ngũ cốc làm nguyên liệu của thức ăn chăn nuôi, trộn với tá dược hoặc chất phụ gia cho dược phẩm, như viên nén và viên nang, hoặc với nguyên liệu của mỹ phẩm.

Hiệu quả của sáng chế

Do có tính đề kháng tốt với axit và axit mật và bám chắc với tế bào biểu mô ruột, như được mô tả trên đây, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP56 theo sáng chế có thể được sử dụng làm men vi sinh có tác dụng bảo vệ hữu hiệu dạ dày-ruột. Ngoài ra, *Lactobacillus plantarum* CJLP56 có tác dụng kích thích đáp ứng Th1 nên nó được sử dụng để điều chỉnh sự mất cân bằng Th1/Th2 thiên về Th2. Do đó, *Lactobacillus plantarum* CJLP56 theo sáng chế có thể được sử dụng cho chế phẩm để điều trị bệnh đường ruột và chế phẩm tăng cường miễn dịch. Cụ thể, *Lactobacillus plantarum* CJLP56 là hữu hiệu để điều trị các bệnh do sự mất cân bằng Th1/Th2 thiên về Th2 gây ra.

Danh mục trình tự

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* và chế phẩm chứa vi khuẩn này

<130> pn081723

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1471

<212> ADN

<213> *Lactobacillus plantarum*

<400> 1

aagtcgacga actctggtat tgattggtgc ttgcatcatg atttacattt gaggagtg 60

cgaactggtg agtaacacgt gggaaacctg cccagaagcg ggggataaca cctggaaaca 120

gatgctaata ccgcataaca acttgaccg catggtccga gtttgaaaga tggcttcggc 180

tatactttt ggatgggtccc gcggcgtatt agctagatgg tggggtaacg gctcaccatg 240

gcaatgatac gtagccgacc tgagagggtg atcgccaca ttgggactga gacacggccc 300

aaactcctac gggaggcagc agtagggaat ctccacaat ggacgaaagt ctgatggagc 360

aacgccgct gaggtaaga gggtttcggc tcgtaaaact ctgtgttaa agaagaacat 420

atctgagagt aactgttcag gtattgacgg tatttaacca gaaagccacg gctaactacg 480

tgccagcagc cgcgtaata cgtagggtgc aagcgtgtc cggatttatt gggcgtaaag 540

cgagcgcagg cggttttta agtctgatgt gaaagccttc ggctcaaccg aagaagtgca 600

tcggaaactg ggaaacttga gtgcagaaga ggacagtgga actccatgtg tagcggtgaa 660

atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc tgtctggtct gtaactgacg 720

ctgaggctcg aaagtatggg tagcaaacag gattagatac cctggtatc cataccgtaa 780

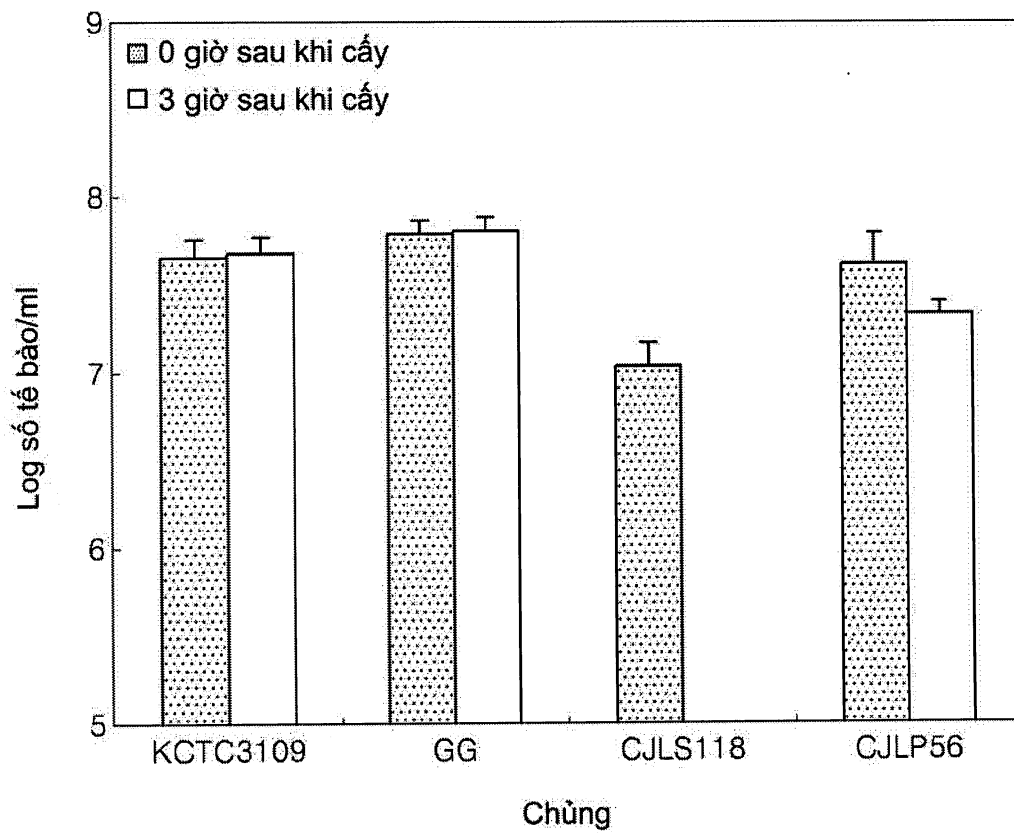
acgatgaatg ctaagtgttg gagggttcc gcccttcagt gctgcagcta acgcattaag 840

cattccgcct ggggagtac gccgcaaggc tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc 900
acaagcgggtg gagcatgtgg ttaattcga agctacgcga agaaccttac caggtcttga 960
catactatgc aaatctaaga gattagacgt tcccttcggg gacatggata caggtggtgc 1020
atggttgcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tccgcaacg agcgcaaccc 1080
ttattatcag ttgccagcat taagttgggc actctggtga gactgccggt gacaaaccgg 1140
aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat gcccttatg acctgggcta cacacgtgct 1200
acaatggatg gtacaacgag ttgcgaactc gcgagagtaa gctaattctt taaagccatt 1260
ctcagttcgg attgtaggct gcaactcgcc tacatgaagt cggaatcgct agtaatcgcg 1320
gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgta acaccgcccg tcacaccatg 1380
agagtttga acacccaaag tcggtggggg aaccttttag gaaccagccg cctaaggtgg 1440
gacagatgat taggtgaag tcgnacaag g 1471

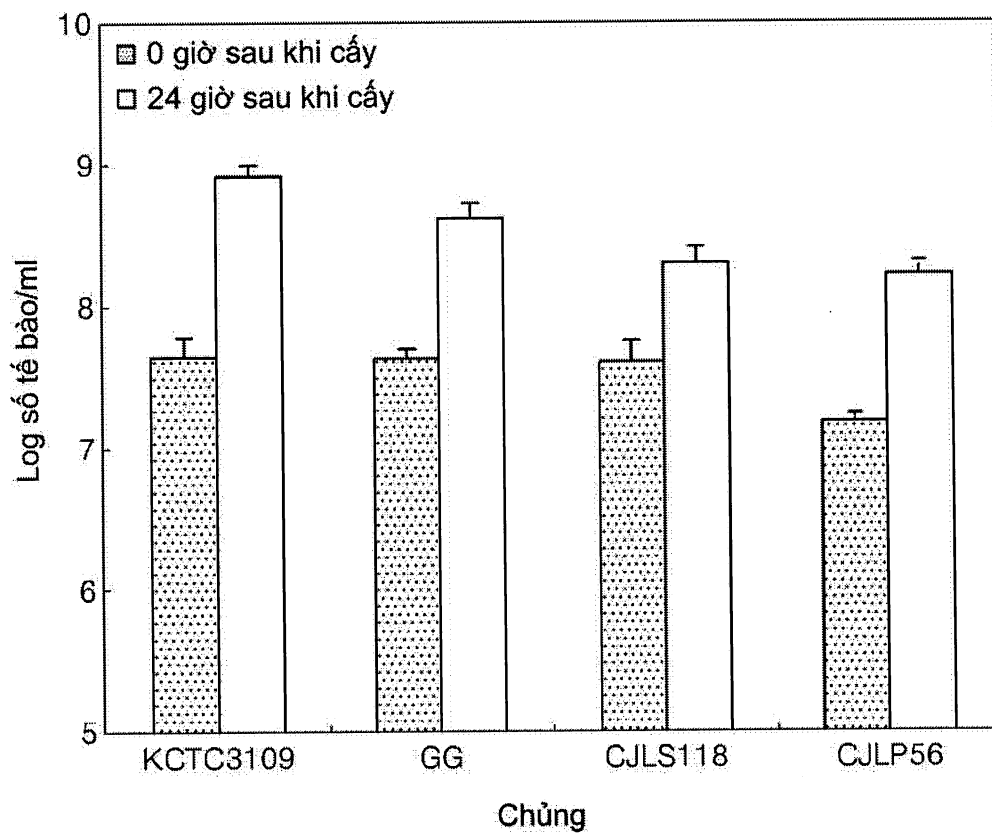
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP56 được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Hàn Quốc vào ngày 16 tháng 10 năm 2008 với mã số lưu giữ là KCTC 11402BP.
2. Chế phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đường ruột, trong đó chế phẩm này có chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* nêu trong điểm 1.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này là thuốc.
4. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này là thực phẩm.
5. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này là thức ăn chăn nuôi hoặc chất phụ gia dùng trong thức ăn chăn nuôi.
6. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này là mỹ phẩm.

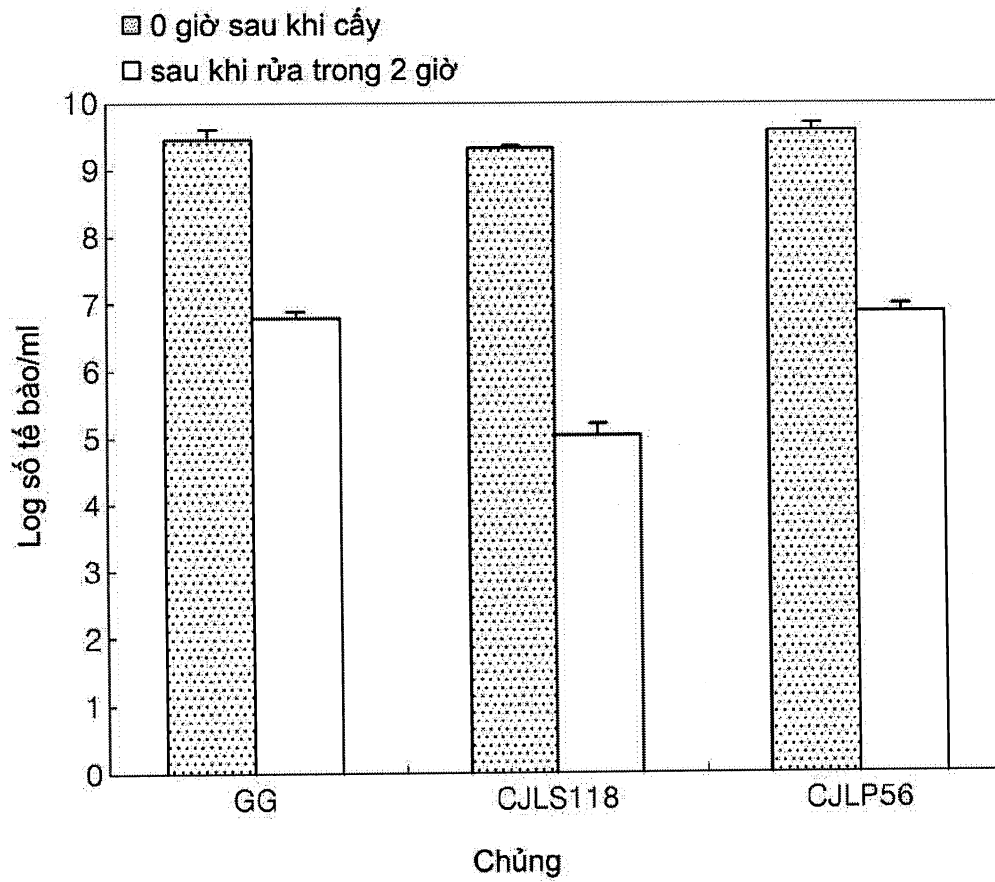
[Fig. 1]



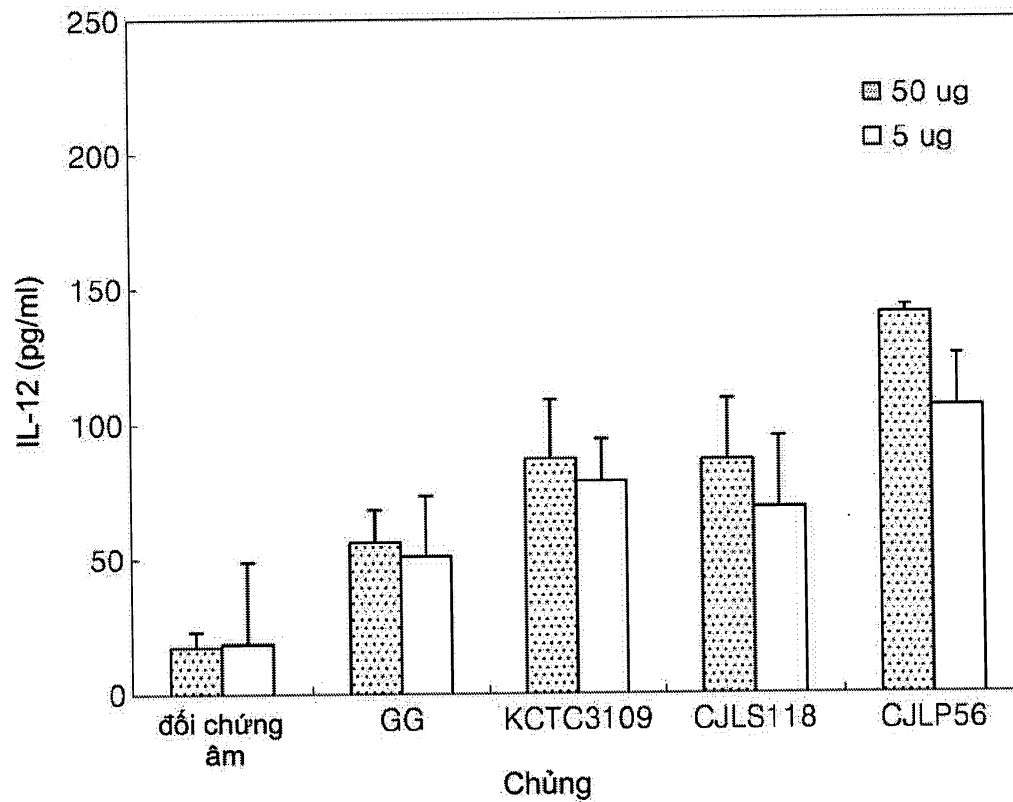
[Fig. 2]



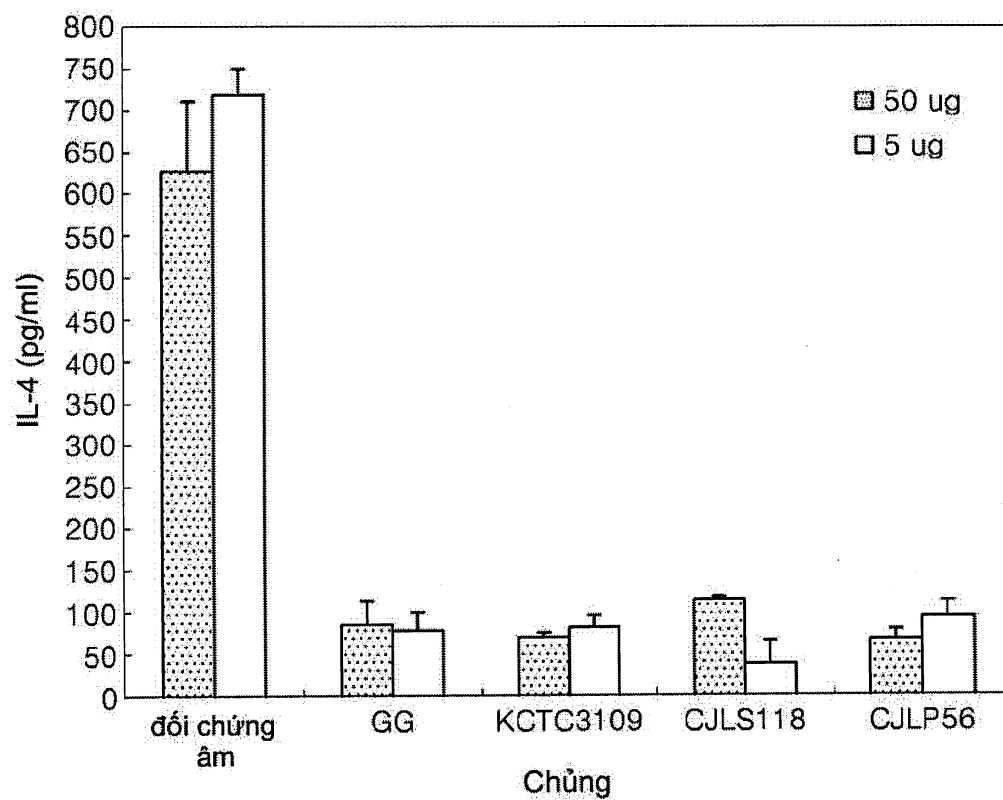
[Fig. 3]



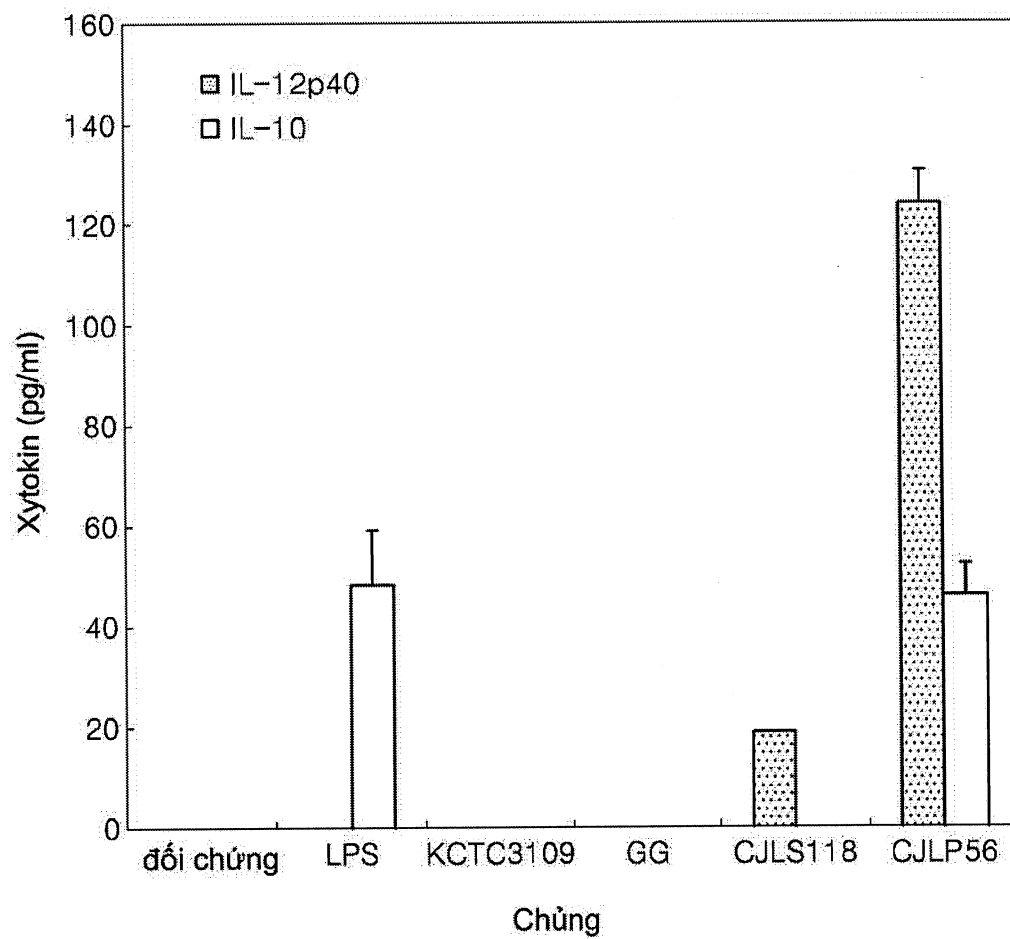
[Fig. 4]



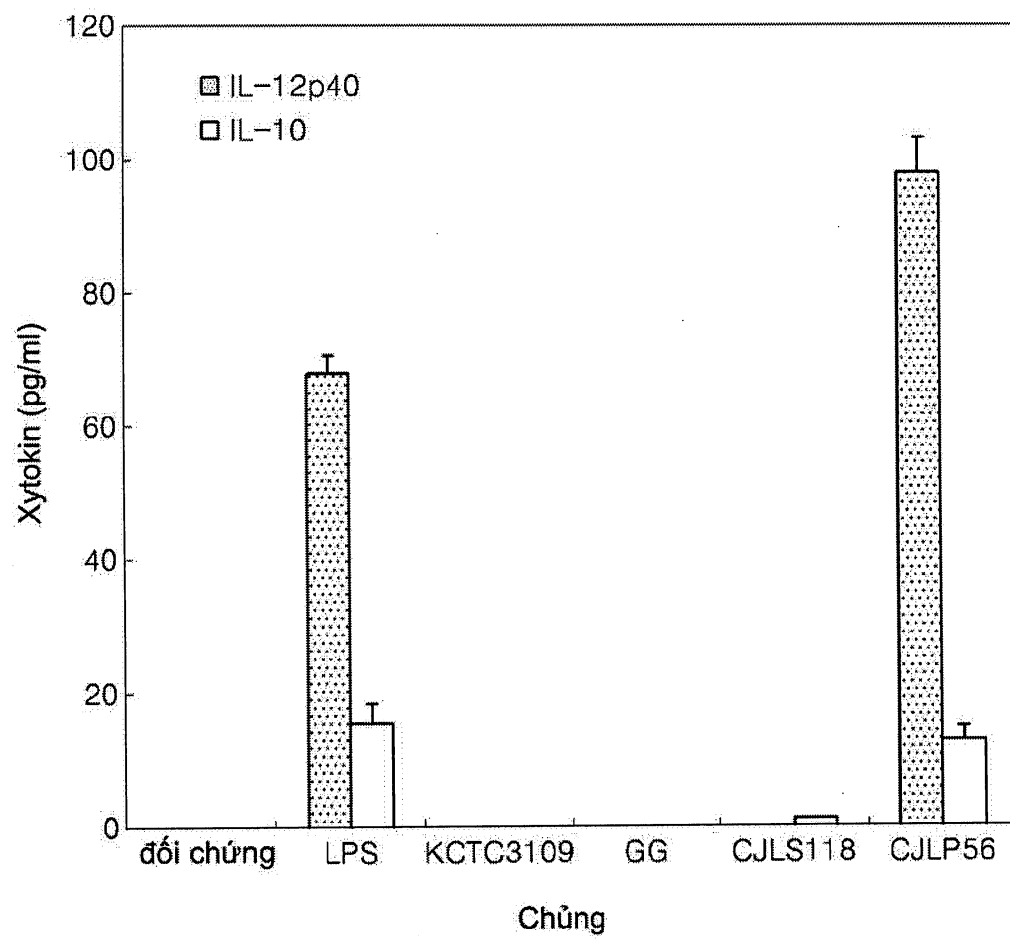
[Fig. 5]



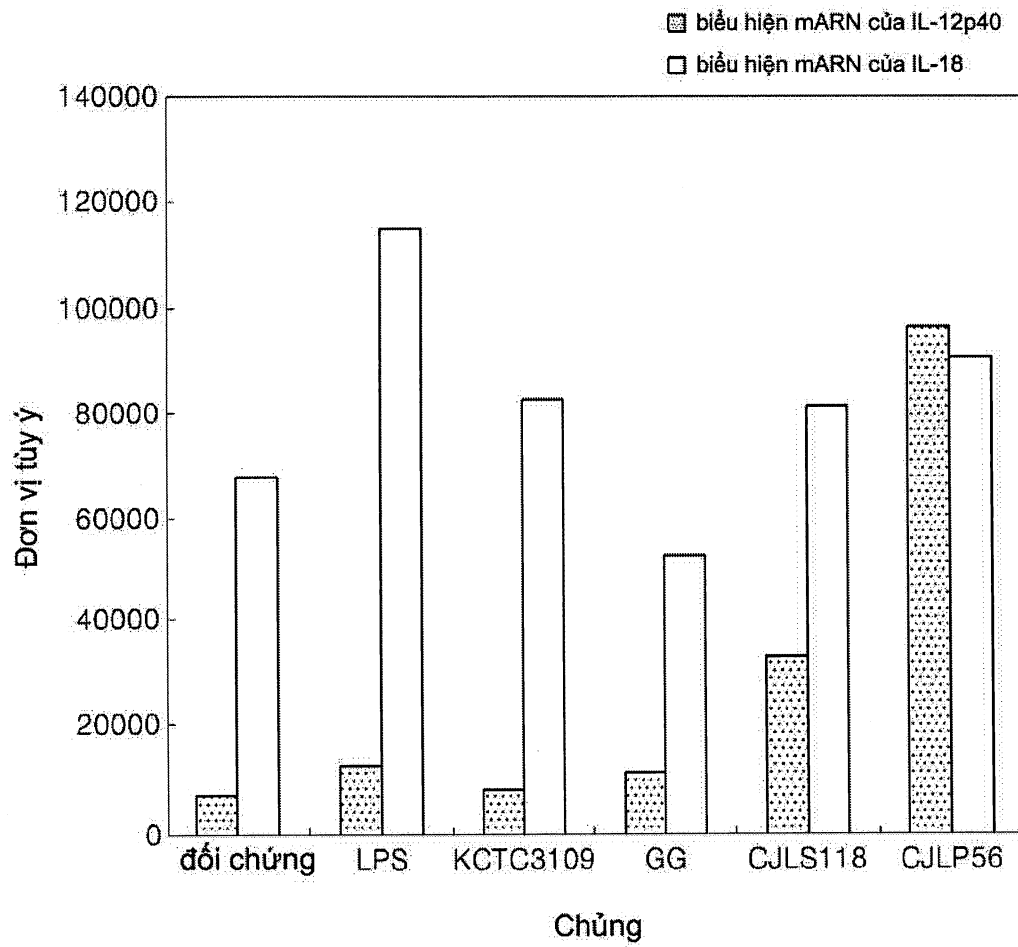
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

