



(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) 
1-0022373

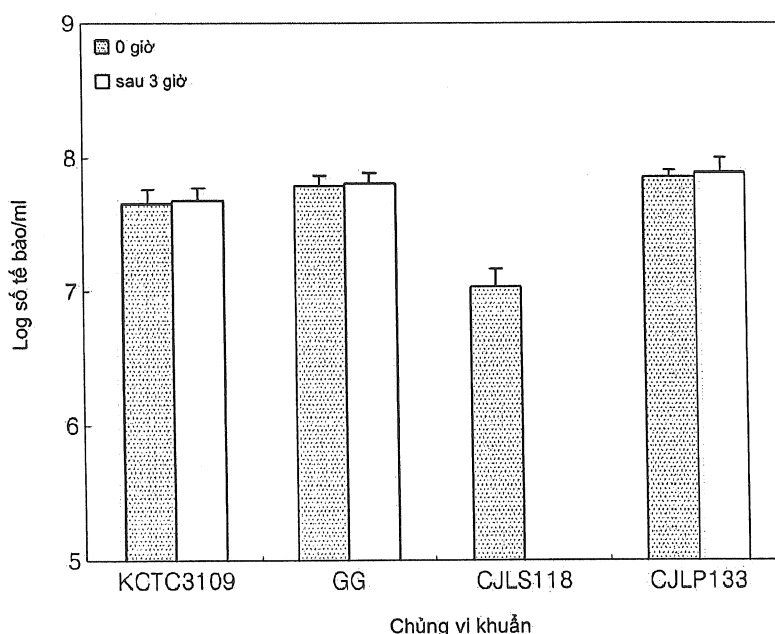
(51)⁷ **C12N 1/20, A23L 1/28, A61K 35/74,**
A61P 37/04, 37/06

(13) **B**

- (21) 1-2012-00442 (22) 02.09.2009
(86) PCT/KR2009/004930 02.09.2009 (87) WO2011/010770A1 27.01.2011
(30) 10-2009-0067015 22.07.2009 KR
(45) 25.12.2019 381 (43) 25.04.2012 289
(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), HWANG, Se Hee (KR), LEE, Jin
Hee (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 CHỨA VI KHUẨN NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 KCTC 11403BP và chế phẩm chứa vi khuẩn này để phòng hoặc điều trị bệnh đường ruột và tăng cường miễn dịch.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* và chế phẩm chứa vi khuẩn này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có ích cho việc phòng/điều trị bệnh đường ruột, bệnh miễn dịch và chế phẩm chứa vi khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Có thể tìm thấy vi khuẩn axit lactic trong thực phẩm lên men truyền thống như 'kimchi', vi khuẩn này sống cộng sinh trong đường tiêu hóa của người, phân hủy chất xơ và protein. Các vi sinh vật này có lợi cho môi trường tiêu hóa trong cơ thể người hoặc các động vật khác và được gọi là 'men vi sinh'. Các men vi sinh này phải có khả năng chịu được axit và axit mật, có độ bám vào tế bào biểu mô ruột tốt để bám hữu hiệu vào ruột non khi được sử dụng qua đường miệng.

Lactobacillus sp. là vi khuẩn đại diện được tìm thấy trong thực phẩm lên men truyền thống như 'Kimchi'. Vi khuẩn *Lactobacillus* sp. có dạng hình que được tìm thấy trong đường dạ dày ruột của người hoặc các động vật khác, sản phẩm sữa và rau, và gây ra quá trình lên men đồng chất hoặc dị chất. Vi khuẩn *Lactobacillus* sp. làm giảm độ pH trong đường dạ dày ruột để ức chế sự sinh sản của các vi khuẩn có hại như *E.coli* hoặc *Clostridium*, và cải thiện tình trạng tiêu chảy hoặc chứng táo bón. Ngoài ra, các vi khuẩn này có vai trò trong việc tổng hợp vitamin, có hoạt tính chống ung thư, làm giảm mức cholesterol. Axidophilin là sản phẩm của vi khuẩn axit lactic, cũng có tác dụng ức chế sự phát triển của các vi khuẩn *Shigella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *E.coli*. Ngoài ra, vi khuẩn axit lactic còn cải thiện tình trạng tiêu chảy bằng cách ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy và làm bình thường hóa hệ vi sinh vật trong ruột (Michael and Phillipe, *Probiotics and prebiotics: Effects on diarrhea, The journal of nutrition, Volume 137, March 2007, pages 803S-811S*; Roberfroid, *Prebiotics and probiotics: Are the functional foods?, American journal of clinical nutrition, Volume 71, June 2000, trang 1682S-*

1687S).

Hiện nay, ngày càng có nhiều nghiên cứu về việc phát triển men vi sinh và thức ăn cho vật nuôi bằng cách sử dụng các đặc tính đã nêu trên đây của vi khuẩn *Lactobacillus* sp. Bệnh tiêu chảy do vi khuẩn gây ra ở gia súc dẫn đến làm giảm tốc độ tăng cân và tăng tỷ lệ chết. Do đó, để ngăn ngừa tình trạng này, chất kháng sinh thường được bổ sung vào thức ăn. Tuy nhiên, việc sử dụng chất kháng sinh trong thức ăn được quy định thêm và cần quản lý gia súc hữu cơ do các vấn đề nảy sinh từ việc vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh và dư lượng thuốc kháng sinh trong động vật (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 1998-78358; McEwen and Fedorka-Cray, Antimicrobial use and resistance in animals, Clinical infectious Disease, Volume 34, June 2002, trang S93-S106).

Ngoài ra, vi khuẩn *Lactobacillus* sp. đã được biết là có hiệu quả trong việc làm tăng đáp ứng miễn dịch. Gần đây, các bệnh miễn dịch như bệnh dị ứng hoặc bệnh thể tạng dị ứng gia tăng trên toàn cầu, kể cả ở Hàn Quốc. Hiện nay, liệu pháp vi khuẩn nhằm điều trị các bệnh này bằng cách sử dụng vi khuẩn axit lactic qua đường miệng đang phát triển ở châu Âu. Nghiên cứu cho thấy rằng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* làm giảm tỷ lệ mắc bệnh dị ứng ở trẻ em (Kalliomaki et al., Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial, Lancet, Volume 357, April 2001, trang 1076-1079). Ngoài ra, đã có báo cáo rằng phạm vi và mức độ viêm da tạng dị ứng tiến triển ở trẻ em giảm đi khi chúng được điều trị bằng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* và *Lactobacillus reuteri* (Rosenfeldt et al., Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis, Dermatologic and ocular diseases, Volume 111, February 2003, trang 389-395).

Mặc dù cơ chế chính xác của hiệu quả miễn dịch gia tăng của vi khuẩn axit lactic vẫn chưa được phát hiện, việc nghiên cứu nhằm tìm hiểu nguyên nhân hiện vẫn đang tiếp tục và cho đến nay, cần hiểu rằng vi khuẩn axit lactic được sử dụng qua đường miệng sống trong đường dạ dày – ruột và có ảnh hưởng đến hệ miễn dịch. Ví dụ, đã có thông báo rằng vi khuẩn axit lactic trong sữa chua làm tăng hoạt tính của tế bào lympho mảng Peyer và kích thích sự đáp ứng của IgA như được thể hiện trong các thử nghiệm trên cả người và động vật. Ngoài ra, vi khuẩn axit lactic

ảnh hưởng đến cả hệ miễn dịch tự nhiên và hệ miễn dịch thích ứng. Các vi khuẩn này tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh trong đường dạ dày - ruột (hệ miễn dịch tự nhiên), và còn hoạt hóa đại thực bào để phân hủy và trình diện kháng nguyên cho tế bào lympho T (hệ miễn dịch thích ứng) để sản sinh ra các xytokin và intolokin khác nhau như IL-12 và IL-18. Sự tiết ra xytokin gia tăng là kết quả của việc hoạt hóa con đường truyền tín hiệu NF- κ B và STAT trong đại thực bào được kích thích bởi các thành phần của thành tế bào của vi khuẩn axit lactic. Ngoài ra, vi khuẩn axit lactic là các tế bào trình diện kháng nguyên chuyên biệt và hoạt hóa các tế bào đuôi gai trong hạch bạch huyết và màng nhầy của dạ dày-ruột làm cho mức độ tiết ra IL-12, IL-18 và TNF α gia tăng. Ngoài ra, các vi khuẩn này cũng làm gia tăng protein màng của các tế bào đuôi gai hoạt hóa MHC nhóm II và B7-2 kích thích tế bào lympho T (Cross et al., Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?, International Immunopharmacology, Volume 1, May 2001, trang 891-901).

Tế bào lympho T đóng vai trò thiết yếu trong hệ miễn dịch thích ứng và hệ miễn dịch này gồm đáp ứng Th1 qua trung gian tế bào và đáp ứng Th2 qua trung gian kháng thể. Trong đáp ứng Th1, sự sản sinh xytokin từ các tế bào trình diện kháng nguyên như IL-2, IL-18 và Interferon (IFN) là chủ yếu. Nhưng trong đáp ứng Th2, sự sản sinh PGE2, IL-4 và IL-10 là chủ yếu. Cần có sự cân bằng giữa hai đáp ứng này và có thể xuất hiện các bệnh miễn dịch khác nhau khi sự cân bằng này không còn. Các tế bào Th1 thường liên quan với bệnh nhiễm khuẩn, trong khi các tế bào Th2 liên quan với đáp ứng dị ứng và đáp ứng viêm. Trong trường hợp các tế bào Th2 bị hoạt hóa quá mức, sự sản sinh các kháng thể IgE tăng lên và có thể gây ra đáp ứng dị ứng với một số protein (phấn hoa, thực phẩm) mà trước đó chúng không gây hại. Do đó, điều quan trọng là các đáp ứng Th1 và Th2 được giữ cân bằng do sự không ổn định có thể gây bệnh. Ngoài ra, đã có thông báo rằng sự tiết ra cortisol do tình trạng stress mãn tính có thể gây bệnh ung thư, tạng dị ứng, bệnh dị ứng và bệnh tự miễn, như trong trường hợp đáp ứng Th1 giảm đi và đáp ứng Th2 tăng lên (Elenkov and Chrousos, Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease, Trends in Endocrinology and Metabolism, Volume 10, November 1999, trang 359-368).

Đã có thông báo từ thử nghiệm *in vivo* rằng vi khuẩn axit lactic làm gia tăng sự tiết ra xytokin IFN- γ của tế bào Th1 nhưng ức chế sự tiết ra các xytokin IL-4 và IL-5 của tế bào Th2 (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, January 1998, trang 48-53). Ngoài ra, thử nghiệm khác đã mô tả rằng việc cho chuột đã mẫn cảm sơ bộ với albumin trứng sử dụng vi khuẩn axit lactic cho thấy đáp ứng thiên về Th2 dẫn đến mức IFN- γ gia tăng nhưng mức IL-4, IL-5 và IgE giảm đi. Ngoài ra, việc đồng nuôi cấy các tế bào lách thu được từ các động vật này với vi khuẩn axit lactic tạo ra cùng mô hình sản sinh xytokin như thử nghiệm *in vivo*. Tuy nhiên, việc đồng nuôi cấy tế bào lympho T với vi khuẩn axit lactic không cho thấy sự gia tăng IFN- γ gợi ý rằng các tế bào trình diện kháng nguyên như đại thực bào hoặc tế bào đuôi gai có thể là cần thiết cho sự sản sinh IFN- γ từ các tế bào lympho T (Kato et al., Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon-gamma by mouse splenocytes, International Journal of Immunopharmacology, Volume 21, February 1999, trang 121-131). Ngoài ra, đã có thông báo rằng sự tiết ra IL-12 và IL-18 là các xytokin được sản sinh từ đại thực bào hoặc tế bào đuôi gai gia tăng theo cách phụ thuộc liều, khi các tế bào này được đồng nuôi cấy với vi khuẩn axit lactic. Do đó, vi khuẩn axit lactic làm cân bằng đáp ứng Th1/Th2 khi đáp ứng Th2 là chủ yếu, bằng cách kích thích đáp ứng Th1 và làm gia tăng sự sản sinh IL-12 và IL-18 (Cross et al., Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?, International Immunopharmacology, Volume 1, May 2001, trang 891-901). Do đó, vi khuẩn axit lactic có lợi cho việc phòng hoặc điều trị bệnh ung thư, tạng dị ứng, bệnh dị ứng và bệnh tự miễn do sự mất cân bằng đáp ứng Th1/Th2 và đáp ứng Th2 quá mức gây ra.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã tách và xác định được chủng *Lactobacillus sp.* mới từ sản phẩm lên men truyền thống để phát triển vi khuẩn có hiệu quả hơn trong việc điều chỉnh sự mất cân bằng đáp ứng Th1/Th2 do đáp ứng Th2 quá mức gây ra so với các vi khuẩn đã biết khác.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất chủng *Lactobacillus* sp. mới có tính chịu axit và axit mật, độ bám vào tế bào biểu mô ruột rất tốt và tạo ra đáp ứng miễn dịch được cải thiện, đặc biệt là bằng cách làm cân bằng đáp ứng Th1/Th2 khi xuất hiện đáp ứng Th2 quá mức.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus* sp. mới nêu trên có lợi cho việc phòng hoặc điều trị các bệnh đường ruột.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus* sp. mới nêu trên có lợi cho việc cải thiện đáp ứng miễn dịch.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 (được lưu trữ tại Viện nghiên cứu sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology: KRIBB) ngày 16.10.2008, số lưu trữ KCTC: 11403BP).

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có lợi cho việc phòng hoặc điều trị các bệnh đường ruột.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có lợi cho việc cải thiện đáp ứng miễn dịch.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện tính chịu axit của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133.

Fig.2 là đồ thị thể hiện tính chịu axit mật của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133.

Fig.3 là đồ thị thể hiện khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133.

Fig.4 là đồ thị thể hiện nồng độ xytokin IL-12 gây ra đáp ứng Th1 thu được từ tế bào đơn nhân lách của chuột. Tế bào đơn nhân này được xử lý sơ bộ bằng albumin trứng để gây ra đáp ứng Th2 và sau đó được đồng nuôi cấy với vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 và các vi khuẩn khác để so sánh kết quả nồng độ IL-12.

Fig.5 là đồ thị thể hiện nồng độ xytokin IL-4 gây ra đáp ứng Th2 thu được từ tế bào đơn nhân lách của chuột. Tế bào đơn nhân này được xử lý sơ bộ bằng

albumin trứng để gây ra đáp ứng Th2 và sau đó được đồng nuôi cấy với vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 và các vi khuẩn khác để so sánh kết quả nồng độ IL-4.

Fig.6 là đồ thị thể hiện nồng độ IL-12 và IL-10, xác định được bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, thu được từ dòng tế bào đại thực bào RAW264.7 được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 so với các loại vi khuẩn axit lactic khác.

Fig.7 là đồ thị thể hiện nồng độ IL-12 và IL-10, xác định được bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, thu được từ dòng tế bào đuôi gai JAWS II được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 so với các loại vi khuẩn axit lactic khác.

Fig.8 là đồ thị thể hiện nồng độ ARN thông tin (mARN) của IL-12p40 và IL-18, xác định được bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction: RT-PCR), thu được từ đại thực bào RAW264.7 được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 so với các loại vi khuẩn axit lactic khác.

Fig.9 là đồ thị thể hiện nồng độ ARN thông tin của IL-12p40 và IL-18, xác định được bằng cách sử dụng phản ứng RT-PCR, thu được từ tế bào đuôi gai JAWS II được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 so với các loại vi khuẩn axit lactic khác.

Fig.10a thể hiện độ dày của da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.10b là ảnh chụp qua kính hiển vi quang học thể hiện các tế bào lympho tích tụ trong vùng da bị tổn thương viêm được lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.11a là đồ thị thể hiện số lượng bạch cầu ưa eosin thu được từ da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.11b là ảnh chụp qua kính hiển vi quang học thể hiện sự xâm nhiễm bạch cầu ưa eosin trong da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.12a là đồ thị thể hiện số lượng tế bào bón thu được từ da lấy từ chuột

NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.12b là ảnh chụp qua kính hiển vi quang học thể hiện sự xâm nhiễm tế bào bơn trong da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.13a là đồ thị thể hiện số lượng sợi thần kinh thu được từ da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.13b là ảnh chụp qua kính hiển vi quang học thể hiện sự xâm nhiễm sợi thần kinh trong da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.14 là ảnh chụp qua kính hiển vi quang học thể hiện tuyến bạch huyết nách (A) và lách (B) lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.15 là đồ thị thể hiện tổng số tế bào đếm được từ tuyến bạch huyết nách (A) và lách (B) lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.16 là đồ thị thể hiện tổng số tế bào T đếm được từ tuyến bạch huyết nách (A) và lách (B) lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.17 là đồ thị thể hiện tổng số tế bào B đếm được từ tuyến bạch huyết nách (A) và lách (B) lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.18 là đồ thị thể hiện nồng độ IL-12, xác định được bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, thu được từ hỗn dịch đơn tế bào của tuyến bạch huyết nách (A) và lách (B) lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic, sau khi nuôi cấy với chất chiết từ mạt bụi.

Fig.19 là đồ thị thể hiện nồng độ IFN- γ , xác định được bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, thu được từ hỗn dịch đơn tế bào của tuyến bạch huyết nách (A) và lách (B) lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic, sau khi nuôi cấy với chất chiết từ mạt bụi.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có đặc trưng là chủng *Lactobacillus plantarum* mới được tách và xác định từ thực phẩm lên men truyền thống. Thực phẩm lên men truyền thống này bao gồm kimchi, rau lên men, đậu hũ lên men, xì dầu, đậu hũ lên men nhanh và cá muối, nhưng không chỉ giới hạn ở các thực phẩm này.

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo sáng chế có mức độ tương đồng 99,9% với chủng tham chiếu (*Lactobacillus plantarum* NBRC15891^T, mã số lưu trữ tại Ngân hàng gen là AB326351) cho thấy có sự phát sinh giống loài ở cấp độ phân tử cao được khẳng định bằng cách xác định trình tự của gen ARN ribosom 16S. Do đó, các vi sinh vật nêu trên đã được xác định là chủng *Lactobacillus plantarum*, có tên là *Lactobacillus plantarum* CJLP133 và được lưu trữ tại Viện nghiên cứu khoa học sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc (KRIBB) ngày 16.10.2008 (mã số lưu trữ KCTC 11403BP). Kết quả xác định trình tự gen ARN ribosom 16S của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 được gửi kèm theo bản mô tả của patent này trong phần danh mục trình tự SEQ ID NO: 1.

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo sáng chế là vi khuẩn Gram dương, không bắt buộc kỵ khí, có thể phát triển cả trong điều kiện ưa khí và kỵ khí. Vi khuẩn này không di chuyển, có dạng hình que và không tạo thành bào tử. Đặc tính hình thái và sinh lý chi tiết của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 được liệt kê trong Bảng 1 theo các tiêu chuẩn chung của lĩnh vực kỹ thuật này.

Bảng 1

Đặc tính hình thái, sinh lý và sinh hóa	Kết quả
Hình thái	Hình que
Tính di động	-
Bào tử	-
Catalaza	-
Lên men đồng chất - dị chất	Lên men tùy ý
Tăng sinh ở nhiệt độ 15°C	+
Tăng sinh ở nhiệt độ 45°C	-

Tăng sinh ở NaCl 3%	+
Tăng sinh kỵ khí	+
Tạo CO ₂ với glucoza	-
Đặc tính 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	-
Ramnoza	-
Dulxitol	-
Inositol	-
Manitol	+
Sorbitol	+
D-manosit	-
D-glucosit	-
Glucosamin	+
Amygdalin	+
Arbutin	-
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	-

+: Phản ứng dương tính

-: Phản ứng âm tính

Để bảo quản vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 trong khoảng thời gian dài một cách an toàn, cần duy trì vi khuẩn này trong chất lỏng bảo quản được trộn với nước và glyxerol ở nhiệt độ -70°C hoặc trong hỗn dịch trong sữa tách kem 10% vô trùng, sau đó làm đông khô nhanh.

Ngoài ra, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo sáng chế là men vi sinh có lợi cho việc làm sạch ruột và cải thiện đáp ứng miễn dịch giống như các vi khuẩn axit lactic khác.

Theo sáng chế, ‘men vi sinh’ là thuật ngữ được hiểu là vi sinh vật còn sống có lợi cho việc cải thiện môi trường trong dạ dày – ruột của người và các động vật khác, do đó có lợi cho sức khỏe của vật chủ. Các men vi sinh là vi sinh vật còn sống có hoạt tính vi sinh và có lợi cho hệ sinh vật trong ruột khi được cung cấp cho người hoặc động vật dưới dạng một chủng vi khuẩn hoặc chủng vi khuẩn hỗn hợp được làm khô hoặc lên men. Để là vi sinh vật dùng làm men vi sinh có hiệu quả, điều quan trọng trước tiên là các vi khuẩn này có thể đi qua dạ dày mà không bị ảnh hưởng của dịch dạ dày và dịch mật, sao cho chúng đến được ruột và vẫn còn sống ở đó để có lợi cho sức khỏe của hệ vi sinh vật trong ruột. Do đó, các vi khuẩn này phải có tính chịu axit, axit mật và có khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột. Điều quan trọng thứ hai là các vi khuẩn này phải là vi sinh vật an toàn và các đánh giá về độ an toàn được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm loại amin của phenylalanin bằng deaminaza, thử nghiệm tạo amoniac, và thử nghiệm tan huyết. Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo sáng chế có tính chịu axit, axit mật và có khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột rất tốt. Ngoài ra, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có kết quả âm tính đối với thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm loại amin của phenylalanin bằng deaminaza, thử nghiệm tạo amoniac và có hiện tượng tan huyết α đối với thử nghiệm tan huyết chứng minh độ an toàn.

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo sáng chế được dự đoán là có lợi đối với sức khỏe đường ruột do nó có tính chịu axit, axit mật và khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột tốt. Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có lợi cho việc phòng hoặc điều trị các bệnh đường ruột.

Chế phẩm chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có lợi cho việc phòng hoặc các điều trị bệnh đường ruột nêu trên có thể sử dụng cho động vật có vú, kể cả người và tốt hơn là sử dụng cho gia súc như bò, ngựa, lợn. Thuật ngữ ‘bệnh đường ruột’ nêu trên bao gồm bệnh nhiễm khuẩn đường dạ dày - ruột và các

bệnh viêm ruột. Ví dụ, bệnh tiêu chảy do nhiễm khuẩn là do các sinh vật gây bệnh (*E.coli*, *Salmonella*, *Chlostridium*) gây ra, bệnh viêm dạ dày-ruột, bệnh viêm ruột, bệnh viêm ruột kết do tâm lý, tình trạng vi sinh vật phát triển quá mức trong ruột non, bệnh viêm dạ dày cấp tính, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh này. Tốt hơn, nếu vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 nêu trên được sử dụng cho chế phẩm theo sáng chế là vi khuẩn còn sống, mặc dù vi khuẩn này có thể được sử dụng ở dạng còn sống hoặc đã chết. Nói chung, khi được sử dụng ở người hoặc động vật, các vi khuẩn còn sống có thể điều trị và cải thiện các triệu chứng bất kỳ do sự lên men bất thường của hệ vi sinh vật trong ruột gây ra, và ngăn không cho vi khuẩn có hại bám vào thành ruột. Ngoài ra, các vi khuẩn còn sống sẽ sản sinh ra lactat có tác dụng làm giảm độ pH trong ruột, do đó phòng ngừa sự sống sót của vi khuẩn có hại. Hơn nữa, các vi khuẩn còn sống được sử dụng sẽ ức chế sự tăng sinh của vi khuẩn có hại và giúp cho sự hoạt động của nhung mao ruột để hấp thu chất dinh dưỡng bằng cách sản sinh ra bacteriocin và peroxit. Ngoài ra, các vi khuẩn còn sống có lợi trong việc sản sinh ra chất giúp hấp thu và sử dụng chất dinh dưỡng, cải thiện tỷ lệ yêu cầu của thức ăn cho vật nuôi, và làm trung hòa các chất độc do vi khuẩn gây bệnh tiết ra.

Đường sử dụng của chế phẩm được mô tả trong sáng chế được khuyến cáo là qua đường miệng, nhưng không chỉ giới hạn ở đường sử dụng này. Liều dùng chế phẩm này là khác nhau, tùy thuộc vào loại bệnh đường ruột, mức độ triệu chứng, độ tuổi, giới tính, chủng tộc và mục đích sử dụng (điều trị hoặc phòng ngừa), tuy nhiên, nói chung, có thể sử dụng cho người lớn với lượng nằm trong khoảng từ 10 triệu đến 100 tỷ vi khuẩn/ngày.

Ngoài ra, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 không chỉ có lợi cho sức khỏe đường ruột mà còn có tác dụng tăng cường đáp ứng miễn dịch đáng kể so với vi khuẩn axit lactic khác. Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 làm gia tăng sự tiết ra IL-12 gây đáp ứng Th1 ở lách và còn ức chế sự tiết ra IL-4 gây đáp ứng Th2. Ngoài ra, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 kích thích các tế bào trình diện kháng nguyên để điều hòa đáp ứng miễn dịch của tế bào T như đại thực bào và tế bào đuôi gai. Sau đó, các tế bào trình diện kháng nguyên này tiết ra xytokin gây biệt hóa tế bào Th1 từ tế bào Th0 sao cho sự mất cân bằng Th1/Th2

được điều chỉnh, do đó chứng minh việc vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có khả năng điều hòa miễn dịch. Phần mô tả chi tiết về tác dụng làm tăng đáp ứng miễn dịch của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 được giải thích dưới đây.

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 sản sinh IL-12 gây ra đáp ứng Th1 ở mức cao hơn từ 7,3 đến 9,5 lần và ức chế sự sản sinh IL-4 gây ra đáp ứng Th2 ở mức cao hơn từ 3,2 đến 12,1%, so với các mẫu đối chứng âm. Các xytokin xác định được từ tế bào lách của chuột được điều trị bằng albumin trứng sao cho đáp ứng Th2 là chủ yếu. Hiệu quả điều hòa miễn dịch của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 cao hơn nhiều so với các vi khuẩn axit lactic khác như *Lactobacillus rhamnosus* (KCTC 5033), *Lactobacillus casei* (KCTC3109), *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC13416). Do đó, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có đặc tính điều hòa miễn dịch do nó điều chỉnh sự mất cân bằng đáp ứng Th1/Th2 bằng cách ức chế đáp ứng Th2 và kích thích đáp ứng Th1.

Ngoài ra, đã khẳng định được rằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 cải thiện đáp ứng miễn dịch bằng cách kích thích đại thực bào, như được thể hiện trong các thử nghiệm đồng nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 với đại thực bào (RAW264.7) và tế bào đuôi gai (JAWS II). Khi vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 được đồng nuôi cấy với đại thực bào (RAW264.7) và tế bào đuôi gai (JAWSII, sự tiết ra cả IL-12 và IL-18 là các chất gây biệt hóa tế bào Th1 được gia tăng nhưng sự tiết ra chất IL-10 có tác dụng ức chế sự biệt hóa tế bào Th1 được giảm đi so với IL-12. Thử nghiệm này cũng chứng minh rằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có đặc tính điều hòa miễn dịch do nó điều chỉnh sự mất cân bằng đáp ứng Th1/Th2 bằng cách kích thích đáp ứng Th1.

IL-4 được tiết ra từ các tế bào Th2 đóng vai trò chủ yếu trong miễn dịch tế bào và là xytokin kháng viêm có tác dụng ức chế sự tiết ra IL-12 từ các tế bào Th1. Các báo cáo gần đây đã mô tả rằng lượng tế bào Th2 tiết ra IL-4 và IL-5 tăng lên trong máu và các tổn thương da của bệnh nhân bị viêm da tạng dị ứng (Miraglia et al., Immune dysregulation in atopic dermatitis, Allergy and Asthma Proceedings, Volume 27, November-December 2006, trang 451-455). Do đó, sự thiên về đáp

ứng Th2 và sự mất cân bằng đáp ứng Th1/Th2 có thể gây ra các bệnh như viêm da tạng dị ứng. Ngoài ra, như được mô tả trên đây, sự mất cân bằng đáp ứng Th1/Th2 có thể gây bệnh. Các bệnh như bệnh ung thư, viêm da tạng dị ứng, bệnh dị ứng và bệnh tự miễn có thể xuất hiện khi đáp ứng Th1 giảm đi và đáp ứng Th2 tăng lên (Elenkov and Chrousos, Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease, Trends in Endocrinology and Metabolism, Volume 10, November 1999, trang 359-368). Do đó, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 không chỉ có thể dùng để điều trị bệnh viêm da tạng dị ứng, bệnh dị ứng nhờ đặc tính điều hòa miễn dịch của nó để làm cân bằng đáp ứng Th1/Th2, mà còn dùng để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh tự miễn.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có lợi cho việc làm tăng đáp ứng miễn dịch. Chế phẩm có tác dụng làm tăng đáp ứng miễn dịch do hoạt tính của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 chứa trong đó. Ngoài ra, chế phẩm này có tác dụng hữu hiệu trong việc phòng hoặc điều trị các bệnh do sự mất cân bằng đáp ứng Th1/Th2 và đáp ứng thiên về Th2 gây ra, do hoạt tính của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 chứa trong đó. Do đó, chế phẩm chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo sáng chế có thể được dùng để phòng hoặc điều trị bệnh viêm da tạng dị ứng, bệnh dị ứng, bệnh ung thư và bệnh tự miễn. Các bệnh tự miễn như bệnh hen và cảm mạo có thể được phòng hoặc điều trị, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh này.

Đường sử dụng của chế phẩm chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo sáng chế được khuyến cáo là dùng qua đường miệng, nhưng không chỉ giới hạn ở đường sử dụng này. Liều dùng của chế phẩm này là khác nhau, tùy thuộc vào loại bệnh đường ruột, mức độ triệu chứng, độ tuổi, giới tính, chủng tộc, mục đích sử dụng (điều trị hoặc phòng ngừa). Tuy nhiên, nói chung có thể sử dụng với liều dùng từ 10 triệu đến 100 tỷ vi khuẩn/ngày cho người lớn.

Chế phẩm chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 đã mô tả có lợi cho việc phòng hoặc điều trị các bệnh đường ruột và làm tăng đáp ứng miễn dịch mà không có tác dụng phụ để sử dụng làm thuốc, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, thức ăn cho vật nuôi, chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi, do chế phẩm này chứa axit

lactic đã được chứng minh là an toàn.

Trong trường hợp chế phẩm chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 đã mô tả được dùng làm hoạt chất của thuốc, chế phẩm này có thể được sản xuất với chất mang được dụng thông thường. Tốt hơn, nếu chế phẩm này có thể được sản xuất thành dạng liều dùng qua đường miệng. Ví dụ, dạng lỏng, huyền phù đặc, dạng bột, dạng hạt, viên nén, viên nang, viên tròn hoặc chất chiết có thể được sử dụng.

Để bào chế thành dạng liều dùng tương ứng, các chất mang hoặc chất phụ gia cần thiết và được dụng có thể được thêm vào khi sản xuất dạng liều này. Ví dụ, ít nhất một chất mang được chọn từ chất pha loãng, chất gây trượt, 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 chất điều vị, vitamin và chất chống oxy hóa có thể được sử dụng để bào chế dạng liều dùng qua đường miệng.

Các chất mang và chất phụ gia được dụng bất kỳ có thể được sử dụng. Cụ thể, có thể tốt hơn nếu lactoza, tinh bột ngô, dầu đậu tương, xenluloza vi tinh thể hoặc manitol được sử dụng làm chất pha loãng; magie stearat hoặc bột talc được sử dụng làm chất gây trượt; polyvinylpyrrolidon hoặc hydroxypropylxenluloza được sử dụng làm chất kết dính. Ngoài ra, có thể tốt hơn nếu carboxymethylxenluloza canxi, natri tinh bột glycolat, polacrilin kali hoặc crospovidon được sử dụng làm chất phân rã; đường trắng, fructoza, sorbitol hoặc aspartam được sử dụng làm chất tạo ngọt; natri carboxymethylxenluloza, β -cyclodextrin, sáp trắng hoặc gôm xanthan được sử dụng làm chất ổn định; và methyl p-hydroxybenzoat, propyl p-hydroxybenzoat hoặc kali solvat được sử dụng làm chất bảo quản.

Hơn nữa, ngoài các thành phần trên đây, các cây thảo mộc tự nhiên có vị mai mơ (Maesil, mận Nhật Bản), vị chanh, vị dứa hoặc vị thảo mộc, nước ép trái cây tự nhiên, các chất màu tự nhiên như clophylin hoặc flavonoit, các thành phần tạo ngọt như fructoza, mật ong, rượu đường hoặc đường, các chất axit hóa như axit xitric hoặc natri xitrat có thể được sử dụng sau khi trộn lẫn để nhằm mục đích làm tăng độ ngon miệng.

Phương pháp bào chế, chất mang và chất phụ gia cần thiết cho việc bào chế này được mô tả chi tiết trong tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences (19th

ed., 1995).

Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có thể được dùng làm thực phẩm. Chế phẩm dùng làm thực phẩm bao gồm các thực phẩm thông thường được sử dụng hàng ngày cũng như các thực phẩm bổ dưỡng. Nếu chế phẩm dùng làm thực phẩm được sử dụng trong thực phẩm bổ dưỡng, chế phẩm này có thể được bào chế thành các dạng liều dùng thực phẩm bổ dưỡng thông thường đã biết trong lĩnh vực này, với các chất mang hoặc chất phụ gia chấp nhận được về mặt dinh dưỡng. Các thực phẩm bổ dưỡng này có thể được bào chế, ví dụ, thành dạng bột, hạt, viên nén, viên nang, huyền phù, nhũ tương, xirô, chất lỏng, chất chiết, thạch hoặc đồ uống. Chất mang hoặc chất phụ gia tùy ý có thể được sử dụng ở dạng bất kỳ để bào chế có thể được dùng làm chất mang hoặc chất phụ gia chấp nhận được về mặt dinh dưỡng.

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm mỹ phẩm do chế phẩm này có lợi cho việc phòng và điều trị bệnh viêm da tạng dị ứng. Chế phẩm dùng làm mỹ phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng thông thường đã biết trong ngành mỹ phẩm. Chất mang hoặc chất phụ gia bất kỳ chấp nhận được và cần thiết trong việc bào chế dạng mỹ phẩm cụ thể có thể được thêm vào.

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi hoặc thức ăn cho vật nuôi.

Để sử dụng trong chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi, chế phẩm này có thể được sản xuất thành dạng chất lỏng có nồng độ cao từ 20 đến 90%, dạng bột hoặc hạt. Chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi có thể được thêm vào bao gồm ít nhất một chất được chọn từ các axit hữu cơ như axit xitric, axit humalic, axit adipic, axit lactic và axit malic; các hợp chất phosphat như natri phosphat, kali phosphat, pyrophosphat và polyphosphat (phosphat ngưng tụ) có tính axit; và các chất chống oxy hóa tự nhiên như polyphenol, catechin, alpha-tocopherol, dịch chiết lá hương thảo, vitamin C, dịch chiết chè xanh, dịch chiết cam thảo, chitosan, axit tanic và axit phytic. Để sử dụng trong chế phẩm làm thức ăn cho vật nuôi, chế phẩm này có thể được sản xuất thành dạng thức ăn cho động vật thông thường và bao gồm các thành phần thông thường trong thức ăn cho vật nuôi.

Chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi và thức ăn cho vật nuôi có thể được thêm

vào bao gồm cây trồng, ví dụ, cây lúa mì, cây yến mạch, cây lúa mạch, cây ngô, cây lúa gạo được nghiền hoặc cắt vụn; các thức ăn cho vật nuôi chứa protein thực vật, ví dụ, thức ăn chủ yếu gồm bã nho, đậu tương và bã hướng dương; thức ăn cho vật nuôi chứa protein động vật, ví dụ, bột huyết, bột thịt, bột xương và bột cá; và đường và các sản phẩm sữa, ví dụ, các thành phần khô khác nhau gồm sữa bột và bột váng sữa, và có thể còn bao gồm các chất bổ sung dinh dưỡng, chất trợ tiêu hóa và hấp thu, chất kích thích sinh trưởng.

Các chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi có thể được sử dụng cho động vật một mình hoặc kết hợp với các chất phụ gia khác được chọn từ chất mang ăn được. Ngoài ra, các chất phụ gia cho thức ăn này có thể là nước sốt, có thể được trộn trực tiếp với thức ăn cho vật nuôi hoặc có thể được sử dụng một cách dễ dàng cho động vật ở dạng dùng qua đường miệng một cách riêng rẽ với thức ăn cho vật nuôi. Trong trường hợp được sử dụng riêng rẽ với thức ăn cho vật nuôi, chất phụ gia cho thức ăn có thể được kết hợp với chất mang được dùng ăn được và được tạo thành dạng giải phóng tức thì hoặc dạng giải phóng duy trì, như đã biết rõ trong lĩnh vực này. Chất mang ăn được có thể là chất rắn hoặc chất lỏng, ví dụ, tinh bột ngô, lactoza, sucroza, vụn đậu, dầu lạc, dầu oliu, dầu vừng và propylen glycol. Trong trường hợp chất mang dạng rắn được sử dụng, chất phụ gia cho thức ăn có thể ở dạng viên nén, viên nang, bột, viên tròn hoặc viên hình thoi, hoặc có thể là nước sốt không phân tán. Nếu chất mang dạng lỏng được sử dụng, chất phụ gia cho thức ăn có thể ở dạng viên nang gelatin mềm, xirô, hỗn dịch, nhũ tương hoặc dung dịch.

Thức ăn cho vật nuôi có thể bao gồm bột ngũ cốc hữu cơ chứa protein tùy ý thường được sử dụng để đáp ứng sự thèm ăn của động vật. Bột ngũ cốc chứa protein này thường gồm bột ngô hoặc bột đậu tương hoặc là hỗn hợp bột ngô/đậu tương.

Ngoài ra, các chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi và thức ăn cho vật nuôi có thể chứa các chất phụ trợ như chất bảo quản, chất ổn định, chất thấm ướt, chất nhũ hóa và chất hóa lỏng. Các chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi có thể được thêm vào thức ăn cho vật nuôi bằng cách ngâm, phun hoặc trộn để sử dụng.

Thức ăn cho vật nuôi hoặc chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi theo sáng chế có thể được sử dụng cho bữa ăn của các động vật khác nhau như động vật có vú,

gia cầm và cá. Các động vật có vú có thể là vật nuôi trong nhà (ví dụ chó, mèo) cũng như lợn, bò, cừu, dê và các động vật gặm nhấm dùng trong phòng thí nghiệm; ví dụ về gia cầm như 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

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn qua các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ 1: Phân lập và xác định vi sinh vật là vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133

Vi khuẩn axit lactic *Lactobacillus plantarum* CJLP133 được phết lên môi trường MRS dạng rắn (Difco, Mỹ) chứa aga 1,5% và ủ ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Khuẩn lạc được xác nhận là tinh khiết được tách ra bằng cách sử dụng vòng và ủ với môi trường canh thang MRS (Difco, Mỹ) ở nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian từ 18 đến 24 giờ.

Sau đó, đặc tính hình thái và sinh lý của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 được xác định bằng kit API50CH và API50CHL (Bio-Mé'ieux) theo phương pháp được bộc lộ trong tài liệu 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). Đặc tính hình thái và sinh lý thu được của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 được tổng kết trong Bảng 1 nêu trên.

Ngoài ra, trình tự của gen ARN ribosom 16S được phân tích để xác định và phân loại vi khuẩn axit lactic. Trình tự của gen ARN ribosom 16S được xác định và phân tích theo phương pháp được bộc lộ trong tài liệu 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, September 2000, trang 1915-1919). Kết quả trình tự của vi khuẩn CJLP133 được liệt kê trong danh mục trình tự SEQ ID NO: 1.

Do vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo sáng chế có mức độ

tương đồng cao nhất (99,9%) so với vi khuẩn so sánh *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891^T (mã số lưu trữ trong ngân hàng gen là AB326351), vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo sáng chế được xác định là chủng *Lactobacillus plantarum* và có tên là *Lactobacillus plantarum* CJLP133, và được lưu trữ tại Viện nghiên cứu khoa học sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc (KRIBB) ngày 16.10. 2008 (mã số lưu trữ: KCTC 11403BP).

Ví dụ 2: Thử nghiệm đánh giá tính chịu axit và axit mật của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 bằng cách sử dụng dịch dạ dày nhân tạo và dịch mật nhân tạo.

Thử nghiệm về tính chịu axit được thực hiện bằng cách sử dụng dịch dạ dày nhân tạo được cải biến và điều chế theo phương pháp thử nghiệm 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, July 1974, trang 691-697). Cụ thể, dịch dạ dày nhân tạo được điều chế bằng cách điều chỉnh độ pH của môi trường lỏng MRS tới 2,5 bằng cách sử dụng dung dịch HCl 1N và bổ sung pepsin với nồng độ 100 đơn vị/ml, sau đó vô trùng.

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 phân lập được như đã mô tả trong Ví dụ 1 được nuôi cấy trong môi trường lỏng MRS ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ và sau đó ly tâm để làm kết tủa. Sau đó, phần kết tủa được rửa hai lần bằng dung dịch NaCl 0,85% vô trùng. Tiếp theo, hỗn dịch vi khuẩn với nồng độ 10^7 đơn vị tạo khuẩn lạc (colony forming unit: cfu)/ml được cấy vào môi trường đối chứng và dịch dạ dày nhân tạo để nuôi cấy tiếp ở nhiệt độ 37°C. Tổng số vi khuẩn còn sống được đánh giá ở thời điểm 0 và 3 giờ sau khi cấy sau khi pha loãng vi khuẩn 10 lần trong dung dịch đệm phosphat chứa KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , L-cystein, HCl, Tween 80.

Thử nghiệm về tính chịu axit mật được thực hiện bằng cách sử dụng axit mật nhân tạo được cải biến và điều chế theo phương pháp thử nghiệm của Casey và các đồng tác giả (Casey et al., Isolation and characterisation of anti-Salmonella lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract, Letters in Applied Microbiology, Volume 39, 2004, trang 431-438). Vi khuẩn được ủ trong môi

trường lỏng MRS được cho thêm mật bò đực 0,3%, và tổng số vi khuẩn được đếm ở thời điểm 0, 12 và 24 giờ sau khi cấy vi khuẩn axit lactic giống như thử nghiệm về tính chịu axit.

Các vi khuẩn axit lactic đại diện khác như *Lactobacillus casei* (KCTC3109), *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416) và *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) cũng được thử nghiệm về tính chịu axit và axit mật như đã mô tả trên đây để so sánh.

Kết quả được thể hiện trên Fig.1 và Fig.2. Fig.1 là đồ thị thể hiện tính chịu axit của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133. Fig.2 là đồ thị thể hiện tính chịu axit mật của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133.

Theo các kết quả được thể hiện trên Fig.1 và Fig. 2, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có tính chịu axit và axit mật tốt hơn so với các vi khuẩn axit lactic khác. Điều này cho thấy rằng vi khuẩn mới được mô tả trong sáng chế có khả năng đến được ruột và vẫn còn sống ở đó mà không bị ảnh hưởng bởi dịch dạ dày hoặc axit mật trong ruột.

Ví dụ 3: Thử nghiệm về khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133

Dòng tế bào động vật HT-29 được cung cấp từ Ngân hàng dòng tế bào của Hàn Quốc (Korean Cell Line Bank: KCLB) để thử nghiệm độ bám vào biểu mô ruột, và sử dụng phương pháp đã được mô tả trong các tài liệu nghiên cứu của Kim và các đồng tác giả, và Hirano 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, April 2007, trang 1103-1111, 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 nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (Gibco, Mỹ) đã bổ sung huyết thanh bào thai bò 10% được bất hoạt bằng nhiệt, L-glutamin 1%, penixilin G (100 IU/ml) và streptomycin (100 mg/ml) ở nhiệt độ 37°C trong môi trường CO₂ 5%. Để thử nghiệm khả năng bám và bong ra, tế bào HT-29 được cấy với mật độ $1,0 \times 10^5$ tế bào/ml vào một lỗ của đĩa có 24 lỗ. Môi trường được thay

đổi cách mỗi ngày để nuôi cấy các tế bào này cho đến khi tạo ra đơn lớp hoàn toàn. Các đơn lớp hoàn toàn của tế bào HT-29 được rửa 5 lần bằng dung dịch đệm PBS ở nhiệt độ 25°C và môi trường RPMI 1640 không chứa chất kháng sinh được thêm vào.

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 với nồng độ $1,0 \times 10^9$ được tạo hỗn dịch trong môi trường RPMI và hỗn dịch này được cấy vào mỗi lỗ để nuôi cấy trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C trong môi trường CO₂ 5%. Sau khi nuôi cấy, các lỗ được rửa ba lần bằng dung dịch đệm PBS bằng cách khi khuấy đĩa với tốc độ 200 vòng/phút trong 3 phút để loại bỏ vi khuẩn axit lactic không bám bất kỳ và để thử nghiệm đặc tính gắn bám. Sau khi rửa, trypsin 0,2% -EDTA được thêm vào để làm bong các tế bào bất kỳ ra khỏi lỗ. Số lượng vi khuẩn được phết lên đĩa MRS-aga được đếm bằng cách sử dụng phương pháp pha loãng theo bậc bằng pepton, sau khi được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ.

Ngoài ra, để thử nghiệm đặc tính bám không hoàn toàn của vi khuẩn axit lactic, cùng lượng vi khuẩn axit lactic được sử dụng trong thử nghiệm trên đây được cho lên trên các tế bào HT-29, các tế bào này được nuôi cấy trên tấm kính phủ được vô trùng bằng rượu 70% trong một ngày và được cho lên đĩa petri. Số lượng vi khuẩn axit lactic bám vào các tế bào HT-29 được đếm bằng cách quan sát dưới kính hiển vi quang học sau khi được làm khô và nhuộm Gram. Các thử nghiệm so sánh được thực hiện bằng cách sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416) và *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033).

Các kết quả được thể hiện trên Fig.3. Fig.3 là đồ thị thể hiện đặc tính bám vào tế bào biểu mô ruột của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133. Kết quả được thể hiện trên Fig.3 cho thấy rằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có khả năng bám vào biểu mô ruột sau 24 giờ tốt hơn so với các men vi sinh khác như vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) và *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416). Cụ thể là đặc tính bám của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 tốt hơn nhiều so với vi khuẩn *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416). Các kết quả này gợi ý rằng chủng vi khuẩn mới theo sáng chế có thể cải thiện sức khỏe đường ruột bằng cách bám vào biểu mô ruột.

Ví dụ 4: Đánh giá độ an toàn của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*

CJLP133

Thử nghiệm tan huyết, thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm về sự tạo ra sản phẩm chuyển hóa có hại (tạo ra amoniac) và thử nghiệm loại amin của phenylalanin bằng deaminaza được thực hiện theo phương pháp đánh giá độ an toàn được đề xuất theo tiêu chuẩn của Tổ chức công nghệ sinh học Hàn Quốc (Korea Biotechnology Industry Organization) để đánh giá độ an toàn của vi khuẩn phân lập được từ Ví dụ 1. Kết quả thu được được tóm tắt trong Bảng 2.

Bảng 2

Đánh giá độ an toàn của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133

Vi khuẩn	Thử nghiệm			
	hóa lỏng gelatin	loại amin của phenylalanin bằng deaminaza	tan huyết	tạo amoniac
CJLP133	âm tính	âm tính	tan huyết α , an toàn	âm tính

Theo kết quả trên đây, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 được phát hiện là có kết quả âm tính trong thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm về sự tạo ra sản phẩm chuyển hóa có hại (amoniac), thử nghiệm loại amin của phenylalanin bằng deaminaza. Thử nghiệm tan huyết cho thấy có hiện tượng tan huyết α , hiện tượng này không liên quan đến vi khuẩn gây bệnh. Do đó, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 được xác nhận là an toàn để sử dụng cho người.

Ví dụ 5: Đánh giá đặc tính kích thích sự sản sinh IL-12 sau khi tế bào đơn nhân lách của chuột được xử lý

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 được bổ sung vào tế bào đơn nhân lách của chuột được xử lý bằng albumin trứng có xu hướng thiên về đáp ứng Th2, để đánh giá đặc tính của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 trong việc kích thích sự sản sinh xytokin IL-12 gây ra đáp ứng Th1. Thử nghiệm này được tiến hành theo phương pháp trong tài liệu của Fujiwara và các đồng tác giả

(Fujiwara et al., A double-blinded trial of *Lactobacillus paracasei* strain KW3110 administration for immunomodulation in patients with pollen allergy, *Allergology International*, 2005, volume 54, trang 143-149) và tài liệu 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).

Chuột cái Balb/c từ 5 đến 6 tuần tuổi được tạo miễn dịch bằng dung dịch hỗn hợp gồm 1,538ml phen hydroxit (Sigma) 13mg/ml, 10mg albumin trứng, 0,4615ml PBS. Dung dịch này được trộn kỹ và duy trì ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút để phản ứng xảy ra, và 0,2 ml (1mg OVA + 2mg phen) được tiêm qua đường màng bụng vào cơ thể chuột. Các con chuột này được tiêm nhắc lại với cùng lượng dung dịch vào ngày 6. Chuột bị giết vào ngày 13 sau khi tiêm để lấy lách. Lấy 100 μ l (4×10^6) tế bào đơn nhân lách từ lách thu được, 50 μ l vi khuẩn đã chết để thử nghiệm và 50 μ l (4mg/ml) albumin trứng được thêm vào và cho vào đĩa nuôi cấy tế bào dạng lỗ trong môi trường DMEM-10 trong 7 ngày ở môi trường CO₂ 10% để nuôi cấy. Sau khi nuôi cấy 7 ngày, dịch nổi bề mặt được thu hồi để xác định nồng độ IL-12 bằng cách sử dụng kit IL-12 ELISA (Biosource).

Thu được vi khuẩn đã chết dùng để thử nghiệm đã mô tả trên đây như sau.

Vi khuẩn thử nghiệm được cấy vào môi trường lỏng MRS (Difco) và nuôi cấy trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, môi trường nuôi cấy được ly tâm với tốc độ 13000 vòng/phút trong 1 phút, tiếp đó rửa hai lần bằng cách sử dụng nước muối sinh lý để thu được vi khuẩn. Vi khuẩn thu được này được gia nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút và tạo hỗn dịch trong nước cất vô trùng (cùng lượng môi trường nuôi cấy ban đầu). Sau đó, hỗn dịch này được ly tâm ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 1 phút và vi khuẩn được tái tạo hỗn dịch trong môi trường DMEM với nồng độ 50 μ g/ml và 5 μ g/ml. Vi khuẩn thử nghiệm là *Lactobacillus plantarum* CJLP133, và thử nghiệm tương tự được thực hiện bằng cách sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033), *Lactobacillus casei* (KCTC 3109) và *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416) để so sánh.

Thử nghiệm đối với IL-12 nêu trên được thực hiện bằng cách sử dụng kit IL-

12 ELISA theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Giá trị mật độ quang (O.D) của mẫu đối chứng được cung cấp trong kit này được xác định và tham chiếu theo công thức, lượng IL-12 thu được từ mẫu thử nghiệm được tính. Các kết quả được thể hiện trên Fig.4.

Fig.4 là đồ thị thể hiện nồng độ xytokin IL-12 gây ra đáp ứng Th1 thu được từ tế bào đơn nhân lách của chuột. Tế bào đơn nhân này được xử lý sơ bộ bằng albumin trứng để gây ra đáp ứng Th2 và sau đó được đồng nuôi cấy với vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 và với các vi khuẩn khác để so sánh nồng độ IL-12.

Theo kết quả được thể hiện trên Fig.4, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 làm tăng đáng kể sự sản sinh xytokin IL-12 gây ra đáp ứng Th1 so với các vi khuẩn khác. Do đó, đã chứng minh được rằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo sáng chế làm tăng hữu hiệu đáp ứng Th1 ở chuột có xu hướng thiên về đáp ứng Th2.

Ví dụ 6: Đánh giá hiệu quả ức chế sự sản sinh IL-4 sau khi tế bào đơn nhân lách của chuột được xử lý

Để thử nghiệm xem vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có tác dụng ức chế sự sản sinh xytokin IL-4 gây ra đáp ứng Th2 hay không, vi khuẩn này được bổ sung vào tế bào đơn nhân lách của chuột có xu hướng thiên về đáp ứng Th2 do việc điều trị bằng albumin trứng. Kit ELISA như đã mô tả trong Ví dụ 5 được sử dụng nhưng kit IL-4 (Biosource) được sử dụng thay cho kit IL-12. Các điều kiện thử nghiệm khác vẫn giữ nguyên và kết quả được thể hiện trên Fig. 5.

Fig.5 là đồ thị thể hiện nồng độ xytokin IL-4 gây ra đáp ứng Th2 thu được từ tế bào đơn nhân lách của chuột. Tế bào này được xử lý sơ bộ bằng albumin trứng để gây ra đáp ứng Th2 và sau đó được đồng nuôi cấy với vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 và với các vi khuẩn khác để so sánh nồng độ IL-4.

Fig.5 cho thấy rằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 có tác dụng ức chế sự sản sinh xytokin IL-4 gây ra đáp ứng Th2, sao cho nó ức chế đáp ứng Th2 trong tế bào đơn nhân lách của chuột có xu hướng thiên về đáp ứng Th2.

Ví dụ 7: Thử nghiệm về sự biểu hiện của xytokin IL-12p40 và IL-18 gây biệt hóa thành tế bào lympho Th1 và sự biểu hiện của xytokin IL-10 ức chế sự biệt hóa thành tế bào lympho Th1

Các tế bào trình diện kháng nguyên như đại thực bào và tế bào đuôi gai sản sinh ra IL-12 và IL-18 để gây biệt hóa tế bào Th1 từ tế bào Th0 và mặt khác sản sinh ra IL-10 để ức chế sự biệt hóa tế bào Th1 từ tế bào Th0. Các thử nghiệm khác được thực hiện để đánh giá hiệu quả của vi khuẩn axit lactic đối với sự sản sinh ra IL-12, IL-10 và IL-18 nhờ đại thực bào và các tế bào đuôi gai.

Vi khuẩn thử nghiệm với nồng độ 5×10^7 /ml được bổ sung vào dòng tế bào đại thực bào RAW264.7 và nuôi cấy trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C trong môi trường CO_2 10%. Sau đó, môi trường này được xác định nồng độ IL-12p40 và IL-10 bằng cách sử dụng phương pháp ELISA. Ngoài ra, các vi khuẩn được bổ sung vào dòng tế bào đuôi gai JAWSII bằng cách sử dụng phương pháp như trên đây và nồng độ của IL-12p40 và IL-10 được xác định bằng cách sử dụng phương pháp ELISA.

Vi khuẩn thử nghiệm là *Lactobacillus plantarum* CJLP133 và lipopolysaccharit được dùng làm đối chứng dương. Các vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033), *Lactobacillus casei* (KCTC 3109) và *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416) cũng được sử dụng trong thử nghiệm này để so sánh kết quả.

Việc xác định nồng độ xytokin được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp ELISA. Kit IL-12p40 (BD BioSciences, Mỹ) và kit IL-10 (BD BioSciences, Mỹ) được sử dụng để xác định nồng độ của IL-12 và IL-10 tương ứng. Các kết quả được thể hiện trên Fig.6 và Fig.7.

Fig.6 là đồ thị thể hiện nồng độ IL-12 và IL-10, xác định được bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, thu được từ dòng tế bào đại thực bào RAW264.7 được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 so với các loại vi khuẩn axit lactic khác.

Fig.7 là đồ thị thể hiện nồng độ IL-12 và IL-10, xác định được bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, thu được từ dòng tế bào đuôi gai JAWSII được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 so với các loại vi khuẩn axit lactic khác.

Theo các kết quả được thể hiện trên Fig.6 và Fig.7, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 sản sinh ra xytokin IL-12 gây ra sự biệt hóa thành tế bào Th1, và sản sinh ra xytokin IL-10 ức chế sự biệt hóa thành tế bào Th1 ít hơn, so với IL-12. Ngoài ra, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 sản sinh ra lượng IL-12 nhiều hơn đáng kể so với các vi khuẩn axit lactic khác.

Hơn nữa, để đánh giá lượng IL-12 và IL-18 ở cấp độ di truyền, vi khuẩn thử nghiệm với nồng độ 5×10^7 /ml được bổ sung vào dòng tế bào đại thực bào RAW264.7 để nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, trong môi trường CO₂ 10% trong 6 giờ. Sau đó, ARN tổng số được tách và nồng độ ARN thông tin của IL-12 và IL-18 được xác định bằng cách sử dụng phản ứng RT-PCR. Vi khuẩn thử nghiệm cũng được cấy và nuôi cấy với dòng tế bào đuôi gai JAWSII để xác định lượng ARN thông tin của IL-12 và IL-18 bằng cách sử dụng phản ứng RT-PCR.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.8 và Fig.9.

Fig.8 là đồ thị thể hiện nồng độ ARN thông tin của IL-12p40 và IL-18, xác định được bằng cách sử dụng phản ứng RT-PCR, thu được từ đại thực bào RAW264.7 được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 so với các loại vi khuẩn axit lactic khác.

Fig.9 là đồ thị thể hiện nồng độ ARN thông tin của IL-12p40 và IL-18, xác định được bằng cách sử dụng phản ứng RT-PCR, thu được từ tế bào đuôi gai JAWS II được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 so với các loại vi khuẩn axit lactic khác.

Theo kết quả được thể hiện trên Fig.8 và Fig.9, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 kích thích sự sản sinh ARN thông tin để cảm ứng sự tạo ra các xytokin IL-12 và IL-18 gây biệt hóa thành tế bào Th1. Cụ thể, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 sản sinh ra lượng ARN thông tin của IL-12 nhiều hơn đáng kể so với các vi khuẩn axit lactic khác.

Ví dụ 8: Thử nghiệm *in vivo* về hiệu quả của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP133 đối với bệnh viêm da tạng dị ứng

1) Chăm sóc và chia nhóm động vật thử nghiệm

Chủng vi khuẩn axit lactic được sử dụng qua đường miệng cho chuột NC/Nga 4 tuần tuổi bị nhốt trong lồng trong một tuần sau khi đến nơi. Nhiệt độ

được duy trì ở mức $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, và chu kỳ ánh sáng là 12 giờ. Chuột được cho ăn thức ăn cho vật nuôi ở dạng bột mà không cho thêm chất kháng sinh bất kỳ. Vi khuẩn axit lactic được sử dụng qua đường miệng cho chuột bằng cách trộn đều vào thức ăn cho vật nuôi trong 10 tuần (1×10^{10} cfu/con). Chuột được gây nhiễm bệnh viêm da tạng dị ứng sau khi sử dụng vi khuẩn axit lactic 6 tuần bằng cách bôi pomat Biostir AD (Biostir, Nhật Bản) trong 5 tuần. Chuột được chia nhóm thành nhóm không gây nhiễm không bị bệnh viêm da tạng dị ứng, nhóm đối chứng bị gây nhiễm bệnh viêm da tạng dị ứng và nhóm bị bệnh viêm da tạng dị ứng được cho sử dụng vi khuẩn axit lactic. Mỗi nhóm gồm 8 con chuột (Bảng 3). Các vi khuẩn *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC13416), *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) được sử dụng làm vi khuẩn axit lactic thử nghiệm. Ngoài ra, các vi khuẩn CJLP55 (KCTC11401BP), CJLP56 (KCTC 11402BP) và CJLP136 (KCTC 11404BP) được phát triển bởi tác giả sáng chế được sử dụng. Cuối cùng, vi khuẩn CJLP133 (KCTC 11403BP) theo sáng chế cũng được sử dụng.

Bảng 3

Nhóm	sử dụng vi khuẩn axit lactic	gây nhiễm bệnh viêm da tạng dị ứng
Không gây nhiễm		X
Nhóm đối chứng		O
GG	GG (KCTC 5033)	O
LP55	CJLP55 (KCTC 11401BP)	O
LP56	CJLP56 (KCTC 11402BP)	O
LP133	CJLP133 (KCTC 11403BP)	O
LP136	CJLP136 (KCTC 11404BP)	O
LS118	CJLS118 (KCTC 13416)	O
LA12	CJLA12	O

2) Gây nhiễm bệnh viêm da tạng dị ứng

Lông chuột NC/Nga được loại bỏ từ phần lưng đến phía sau tai bằng cách sử dụng dụng cụ làm rụng lông và phần lông còn lại bất kỳ được loại bỏ bằng cách sử dụng kem làm rụng lông. Dung dịch SDS 4% được phun lên vùng da thử nghiệm để loại bỏ thành phần lipid và được làm khô trong một giờ. Một que phẳng dẹt được sử dụng để bôi đều 100mg pomat Biostir AD (Biostir, Nhật Bản) ở lưng và vành tai. Pomat Biostir AD được bôi tổng cộng 10 lần bằng cách bôi 2 lần/tuần trong 5 tuần.

3) Nhuộm mô

Bệnh viêm da tạng dị ứng đặc trưng bởi độ dày của da, sự xâm nhập của các tế bào miễn dịch như tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân to, bạch cầu ưa eosin, tế bào bón vào mô gây viêm. Ngoài ra, các sợi thần kinh kéo dài bất thường đến biểu bì gây ngứa. Do đó, da chuột bị bệnh viêm da tạng dị ứng được lấy mẫu để xét nghiệm và đếm số lượng tế bào miễn dịch và các sợi thần kinh nêu trên.

5 tuần sau khi gây nhiễm bệnh viêm da tạng dị ứng, chuột được chọn lọc để lấy mẫu da. Da này được cố định bằng dung dịch cố định không chứa accustain formali và tạo khối bằng parafin. Khối này được cắt theo độ dày 5µm, và được nhuộm hematoxylin/eosin để kiểm tra độ dày của da (biểu bì +da). Mô cũng được sử dụng để đánh giá sự tích tụ tế bào lympho trong vùng da bị tổn thương viêm có kích thước 2x2mm bằng cách quan sát bằng kính hiển vi quang học. Ngoài ra, mô này được nhuộm thuốc nhuộm xanh toluidin để phát hiện tế bào bón, và dung dịch đỏ Congo để phát hiện bạch cầu ưa eosin trong vùng da có kích thước 2x2mm bằng cách sử dụng kính hiển vi quang học. Các tế bào bón và bạch cầu ưa eosin được đếm bằng cách quan sát vùng từ biểu bì đến mô cơ. Kỹ thuật hóa mô miễn dịch được sử dụng để phát hiện sự xâm nhập của các sợi thần kinh vào mô da. Kháng thể là sản phẩm gen kháng protein (PGP.5) được sử dụng để phát hiện, và kháng thể của dê tiếp hợp biotin kháng kháng thể của thỏ và streptavidin tiếp hợp peroxidaza lần lượt được thêm vào để tạo màu bằng phản ứng peroxidaza

Kết quả được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.10 đến Fig.13.

Fig.10a là đồ thị thể hiện độ dày của da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.10b là ảnh chụp qua kính hiển vi quang học thể hiện tế bào lympho tích

tụ trong vùng da bị tổn thương viêm lây từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.11a là đồ thị thể hiện số lượng bạch cầu ưa eosin thu được từ da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.11b là ảnh chụp qua kính hiển vi quang học thể hiện sự xâm nhiễm bạch cầu ưa eosin trong da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.12a là đồ thị thể hiện số lượng tế bào bón thu được từ da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.12b là ảnh chụp qua kính hiển vi quang học thể hiện sự xâm nhiễm tế bào bón trong da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.13a là đồ thị thể hiện số lượng sợi thần kinh thu được từ da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.13b là ảnh chụp qua kính hiển vi quang học thể hiện sự xâm nhiễm sợi thần kinh trong da lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Theo các kết quả đã mô tả trên đây, độ dày của da trong mỗi nhóm thử nghiệm gồm chuột NC/Nga bị gây nhiễm bệnh viêm da tạng dị ứng là khoảng 100 μ m. Tuy nhiên, độ dày của da chuột được cho sử dụng vi khuẩn CJLP133 là khoảng 50 μ m, độ dày này giảm đi gần một nửa so với các nhóm còn lại (Fig.10a). Ngoài ra, trong khi quan sát sự xâm nhập của tế bào lympho và bạch cầu đơn nhân to, đã phát hiện được rằng số lượng tế bào miễn dịch có mặt trong nhóm sử dụng vi khuẩn CJLP133 là ít hơn đáng kể, trong khi số lượng tế bào miễn dịch được nhuộm màu tía ở nhóm đối chứng và nhóm sử dụng GG là nhiều hơn (Fig. 10b).

Việc đánh giá số lượng bạch cầu ưa eosin và tế bào bón trong tổn thương viêm cho thấy rằng nhóm bị gây nhiễm bệnh viêm da tạng dị ứng có số lượng bạch cầu ưa eosin và tế bào bón lớn hơn so với nhóm không bị gây nhiễm bệnh này. Tuy nhiên, nhóm được cho sử dụng vi khuẩn CJLP133 có số lượng bạch cầu ưa eosin và tế bào bón ít hơn đáng kể so với nhóm đối chứng và nhóm được cho sử dụng vi khuẩn axit lactic khác (Fig.11a và Fig.12a). Các ảnh chụp bằng kính hiển vi quang

học cho thấy rằng số lượng bạch cầu ưa eosin và tế bào bón màu xanh da trời ở nhóm đối chứng và nhóm được cho sử dụng vi khuẩn GG là nhiều hơn. Tuy nhiên, cũng thấy rằng số lượng bạch cầu ưa eosin và tế bào bón trong nhóm được cho sử dụng vi khuẩn CJLP133 là ít hơn (Fig.11b và Fig.12b).

Phân tích kỹ thuật hóa mô miễn dịch cho thấy rằng không quan sát thấy sự xâm nhập của các sợi thần kinh ở nhóm không bị gây nhiễm bệnh. Tuy nhiên, ở nhóm đối chứng, phát hiện thấy nhiều sợi thần kinh màu nâu (Fig.13a). Ở nhóm được cho sử dụng vi khuẩn axit lactic, số lượng sợi thần kinh xâm nhập giảm đi, và đặc biệt là số lượng sợi thần kinh giảm đi đáng kể ở các nhóm sử dụng vi khuẩn CJLP55, CJLP133, CJLP136 (Fig.13b).

4) Đánh giá chế phẩm chứa tuyến bạch huyết nách và tế bào đơn nhân lách

Tuyến bạch huyết nách (Axillary Lymph node: ALN) là cơ quan miễn dịch quan trọng đóng vai trò chính trong mô hình động vật bị bệnh viêm da tạng dị ứng mạn tính. Một số bệnh nhân bị bệnh viêm da tạng dị ứng mạn tính mức độ nặng thông báo rằng kích thước tuyến bạch huyết nách của họ tăng lên. Ở chuột NC/Nga, mô hình động vật bị bệnh viêm da tạng dị ứng do mật bụi, tuyến bạch huyết nách là tuyến bạch huyết đích để đánh giá trong nhiều nghiên cứu. Do đó, trong nghiên cứu này, tuyến bạch huyết nách và lách là cơ quan miễn dịch chính được lấy mẫu để quan sát sự thay đổi về kích thước và thành phần của tế bào.

5 tuần sau khi gây nhiễm bệnh viêm da tạng dị ứng, chuột được chọn lọc để lấy tuyến bạch huyết nách và lách để so sánh kích thước. Sau đó, lấy hồng cầu từ các cơ quan này để thu được hỗn dịch đơn tế bào. 1×10^6 tế bào trong hỗn dịch được phân bố vào mỗi ống FACS và được nhuộm bằng thuốc nhuộm FITC kháng Thy1.2, thuốc nhuộm FITC kháng CD19, thuốc nhuộm FITC kháng F4/80, thuốc nhuộm FITC kháng CD11c để phân tích FACS để nghiên cứu thành phần của tế bào lympho T và B. Kết quả được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.14 đến Fig.17.

Fig.14 là ảnh chụp qua kính hiển vi quang học thể hiện tuyến bạch huyết nách (A) và lách (B) lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.15 là đồ thị thể hiện tổng số tế bào đếm được từ tuyến bạch huyết nách (A) và lách (B) lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng

vi khuẩn axit lactic.

Fig.16 là đồ thị thể hiện tổng số tế bào T đếm được từ tuyến bạch huyết nách (A) và lách (B) lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Fig.17 là đồ thị thể hiện tổng số tế bào B đếm được từ tuyến bạch huyết nách (A) và lách (B) lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic.

Theo các kết quả trên đây, kích thước của tuyến bạch huyết nách tăng lên ở nhóm đối chứng được gây nhiễm bệnh viêm da tạng dị ứng, và nhóm được cho sử dụng vi khuẩn GG có kích thước tương tự. Tuy nhiên, kích thước tuyến bạch huyết nách của nhóm được cho sử dụng các vi khuẩn CJLP55, CJLP56, CJLP133, CJLP136, CJLS118 là nhỏ hơn so với nhóm đối chứng (Fig.14A). Không có sự khác biệt nhiều về kích thước lách giữa các nhóm (Fig.14B). Số lượng tế bào phân lập được từ tuyến bạch huyết nách ở nhóm đối chứng cao hơn 4,5 lần so với nhóm không bị gây nhiễm bệnh. Tuy nhiên, số lượng tế bào ở nhóm được cho sử dụng vi khuẩn CJLP55, CJLP133, CJLP136 là ít hơn đáng kể so với nhóm đối chứng (Fig.15A). Không có sự khác biệt nhiều về số lượng tế bào trong lách giữa các nhóm khác nhau (Fig.15B).

Việc đánh giá số lượng tế bào lympho T và B được thực hiện đối với tuyến bạch huyết nách và lách bằng cách nhuộm và phân tích FACS. Số lượng tế bào lympho T và B thu được từ tuyến bạch huyết nách tăng lên gấp 5 lần so với nhóm đối chứng bị gây nhiễm bệnh viêm da tạng dị ứng. Tuy nhiên, số lượng tế bào trong tất cả các nhóm đã sử dụng vi khuẩn CJLP55, CJLP56, CJLP133, CJLP136 giảm đi đáng kể so với nhóm đối chứng. Đặc biệt là số lượng tế bào ở nhóm sử dụng vi khuẩn CJLP133 giảm đi đáng kể so với các nhóm sử dụng axit lactic khác (Fig.16a và Fig.17a). Số lượng tế bào lympho T và B không có sự khác biệt nhiều (Fig.16b và Fig.17b).

5) Khả năng sản sinh xytokin của tế bào tuyến bạch huyết nách và tế bào đơn nhân lách

IL-12 chủ yếu được sản sinh bởi đại thực bào gây biệt hóa tế bào lympho Th0 thành tế bào lympho Th1. IFN- γ được sản sinh bởi tế bào lympho Th1 không

những hoạt hóa đại thực bào mà còn ức chế sự biệt hóa thành tế bào Th2 và hoạt tính của nó. Do đó, sự thay đổi về nồng độ IL-12 và IFN- γ sản sinh ra được xác định.

Hỗn dịch đơn tế bào thu được từ thử nghiệm 4) đã nêu trên đây được đánh giá về thành phần của tuyến bạch huyết nách và tế bào đơn nhân lách. Hỗn dịch này được cho vào mỗi lỗ của đĩa có 24 lỗ với nồng độ 5×10^6 tế bào/đĩa, và phần chiết từ mật bụi (*Dermatophagoides farinae* body: Dfb) với nồng độ 10 μ g/ml được cho thêm vào mỗi lỗ. Đĩa này được duy trì ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ để nuôi cấy và sau đó nồng độ IFN- γ và IL-12 được xác định bằng cách sử dụng phương pháp ELISA. Kết quả được thể hiện trên Fig.18 và Fig.19.

Fig.18 là đồ thị thể hiện nồng độ IL-12, xác định được bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, thu được từ hỗn dịch đơn tế bào của tuyến bạch huyết nách (A) và lách (B) lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic, sau khi nuôi cấy với chất chiết từ mật bụi.

Fig.19 là đồ thị thể hiện nồng độ IFN- γ , xác định được bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, thu được từ hỗn dịch đơn tế bào của tuyến bạch huyết nách (A) và lách (B) lấy từ chuột NC/Nga bị viêm da tạng dị ứng đã được điều trị bằng vi khuẩn axit lactic, sau khi nuôi cấy với chất chiết từ mật bụi.

Theo kết quả thu được, nồng độ IL-12 (Fig.18) và IFN- γ (Fig.19) ở nhóm sử dụng vi khuẩn CJLP133 được tăng lên đáng kể so với nhóm đối chứng. Ngoài ra, nồng độ các xytokin này cao lên đáng kể so với các nhóm khác được cho sử dụng vi khuẩn axit lactic đã biết khác.

Tất cả các nhóm đã sử dụng vi khuẩn CJLP55, CJLP56, CJLP133, CJLP136 đều có sự cải thiện về triệu chứng của bệnh viêm da tạng dị ứng, phần tóm tắt kết quả thu được từ các thử nghiệm từ 1) đến 5) như đã mô tả trên đây. Đặc biệt là vi khuẩn CJLP133 có hiệu quả đối với bệnh viêm da tạng dị ứng tốt hơn so với các vi khuẩn lactic đã biết khác, như được chứng minh bởi hiệu quả ở cấp độ tế bào và phân tử của nó đối với động vật, như kích thích tuyến bạch huyết nách, số lượng tế bào trong tuyến bạch huyết nách, sự xâm nhập của các tế bào miễn dịch hoặc tế bào thần kinh vào tổn thương viêm da và sự cân bằng xytokin Th1/Th2.

Ví dụ 9: Sản xuất men vi sinh chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 xác định được như đã mô tả trong Ví dụ 1 được tạo ra trên quy mô lớn và làm đông khô nhanh để sản xuất thành men vi sinh để sử dụng làm thuốc, thực phẩm, thức ăn cho vật nuôi, chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi hoặc nguyên liệu dùng cho mỹ phẩm.

Để sản xuất hàng loạt, vi khuẩn này được ủ trong môi trường lỏng MRS (Difco) có bổ sung NaOH 25% để đạt độ pH = 6,0 trong 18 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, thu được vi khuẩn này bằng cách ly tâm. Tiếp đó, vi khuẩn được đông lạnh ở nhiệt độ -40°C bằng cách sử dụng dextrin 5% và sữa tách kem 10% để làm chất bảo vệ, và vi khuẩn khô được nghiền bằng cách sử dụng máy trộn để thành dạng bột. Bột vi khuẩn này được bảo quản và đóng gói trong túi nhôm cùng với lượng thích hợp của chất pha loãng như glucoza, lactoza, sữa tách kem.

Men vi sinh thu được có thể được dùng làm men vi sinh cho thức ăn cho vật nuôi bằng cách trộn với nguyên liệu thức ăn như bột ngũ cốc; làm thuốc hoặc thực phẩm bổ dưỡng ở dạng viên nén hoặc viên nang được trộn với chất mang hoặc chất phụ gia; làm mỹ phẩm sau khi được trộn với chất mỹ phẩm khác. Men vi sinh có thể được sử dụng trong các ngành khác nhau như thuốc, thực phẩm, thức ăn cho vật nuôi, mỹ phẩm theo các phương pháp thông thường trong lĩnh vực này.

Hiệu quả của sáng chế

Như đã mô tả trên đây, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 theo sáng chế là men vi sinh có đặc trưng là có tính chịu axit, tính chịu axit mật, khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột. Vi khuẩn này cũng có lợi cho sức khỏe đường ruột và điều chỉnh sự mất cân bằng đáp ứng Th1/Th2 do đáp ứng Th2 quá mức gây ra bằng cách kích thích đáp ứng Th1. Do đó, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 mới theo sáng chế có thể được sử dụng trong chế phẩm để điều trị bệnh đường ruột và làm tăng đáp ứng miễn dịch, và để điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh do sự mất cân bằng đáp ứng Th1/Th2 gây ra.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 KCTC 11403BP.
2. Chế phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh đường ruột chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 KCTC 11403BP.
3. Chế phẩm tăng cường miễn dịch chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP133 KCTC 11403BP.
4. Chế phẩm theo điểm 2 hoặc 3, trong đó chế phẩm này ở dạng thuốc.
5. Chế phẩm theo điểm 2 hoặc 3, trong đó chế phẩm này ở dạng thực phẩm chức năng.
6. Chế phẩm theo điểm 2 hoặc 3, trong đó chế phẩm này ở dạng thức ăn cho vật nuôi hoặc chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi.
7. Chế phẩm theo điểm 2 hoặc 3, trong đó chế phẩm này ở dạng mỹ phẩm.

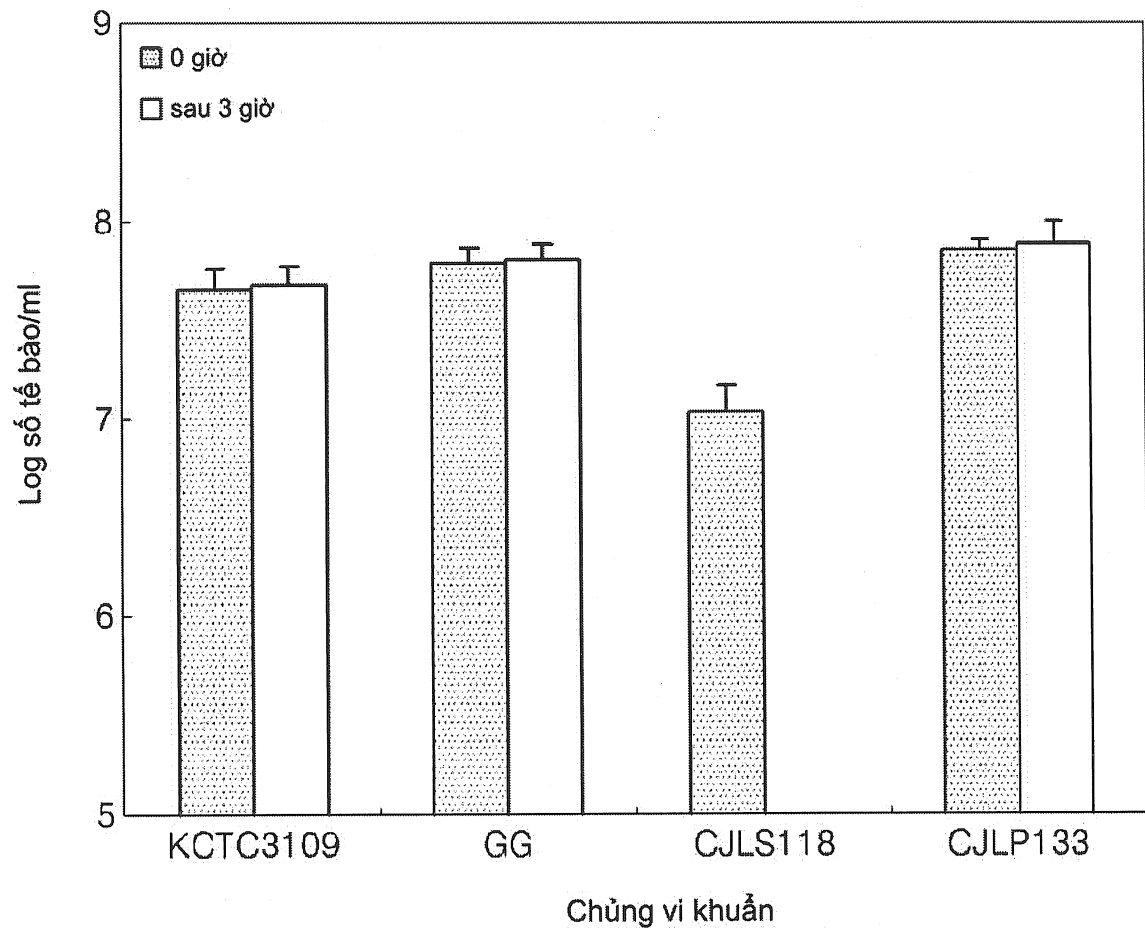
Fig.1

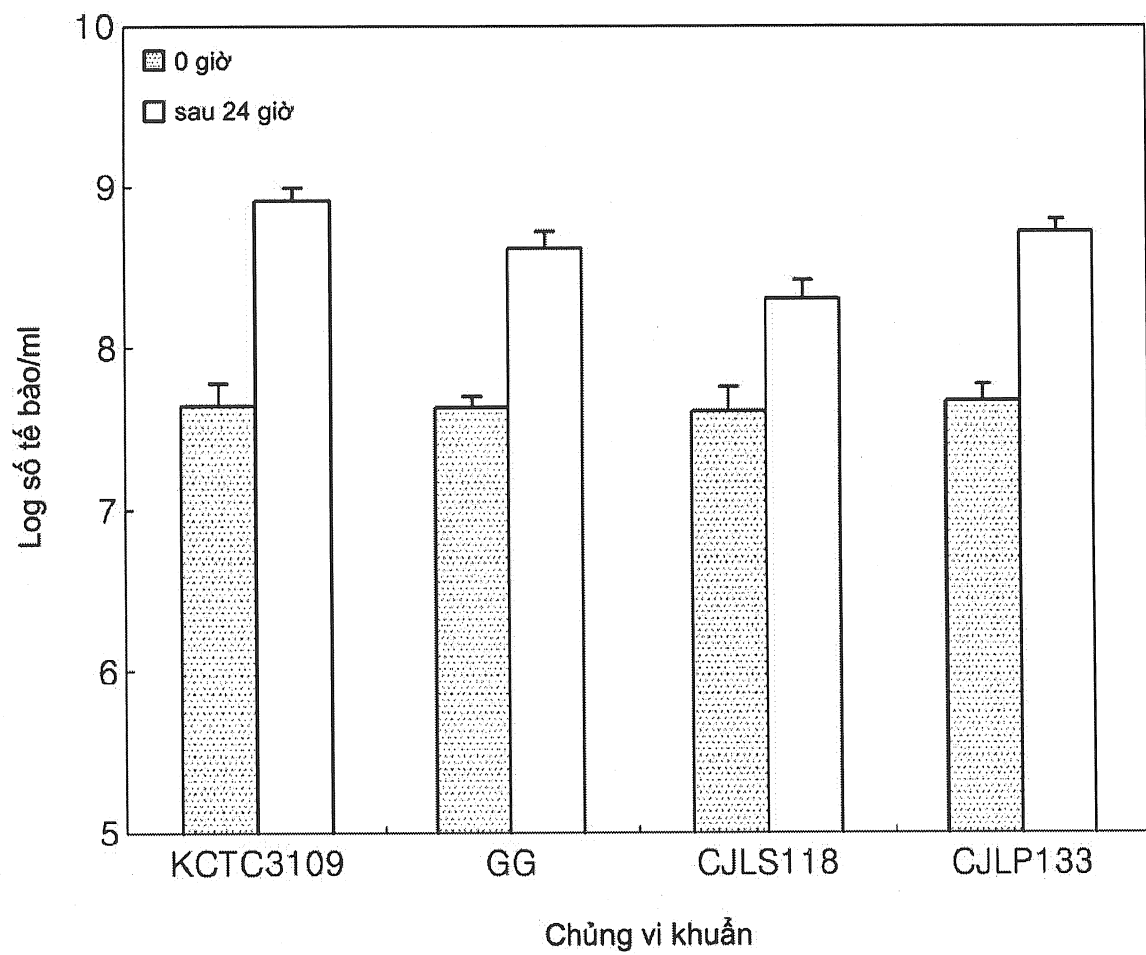
Fig.2

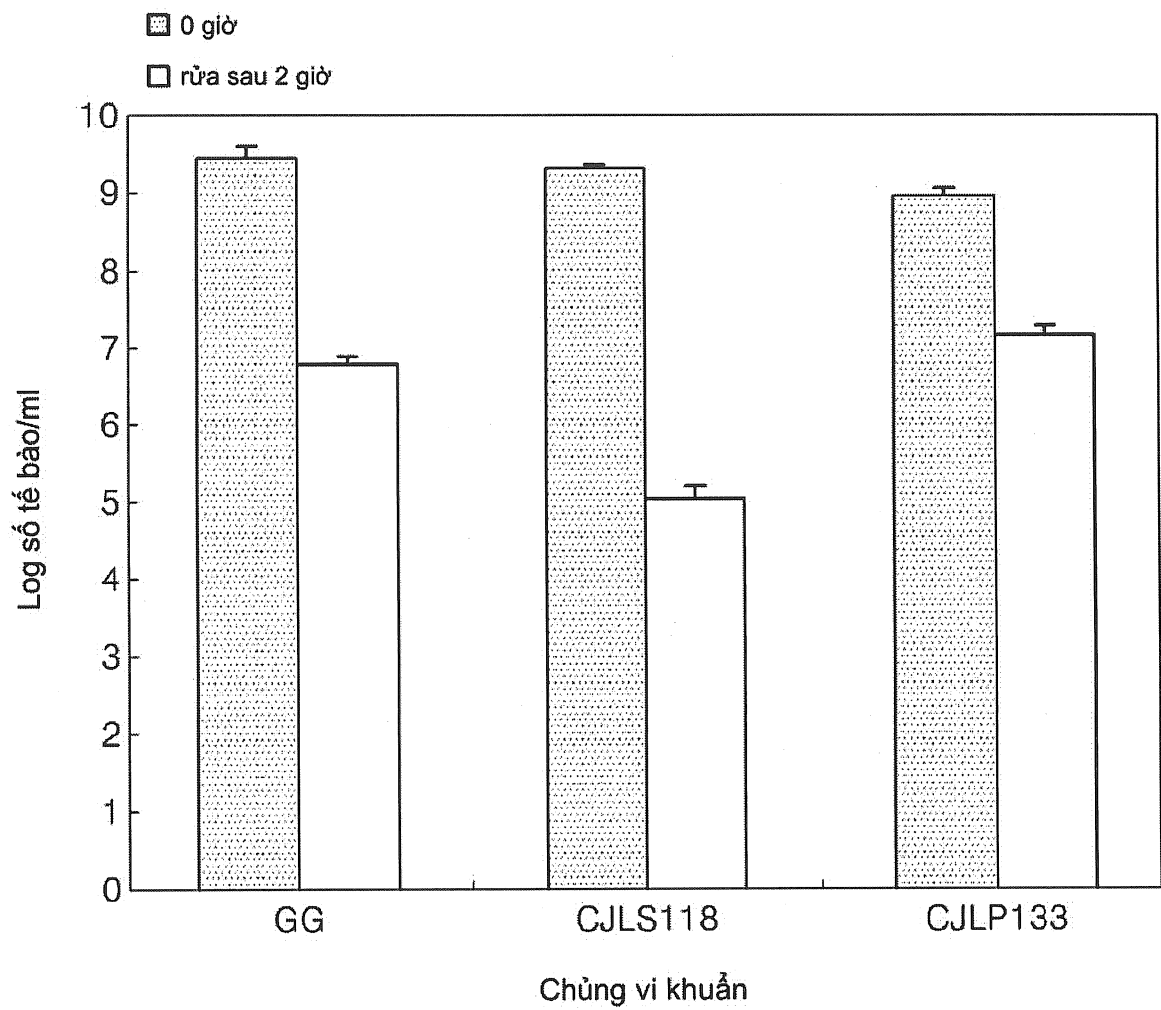
Fig.3

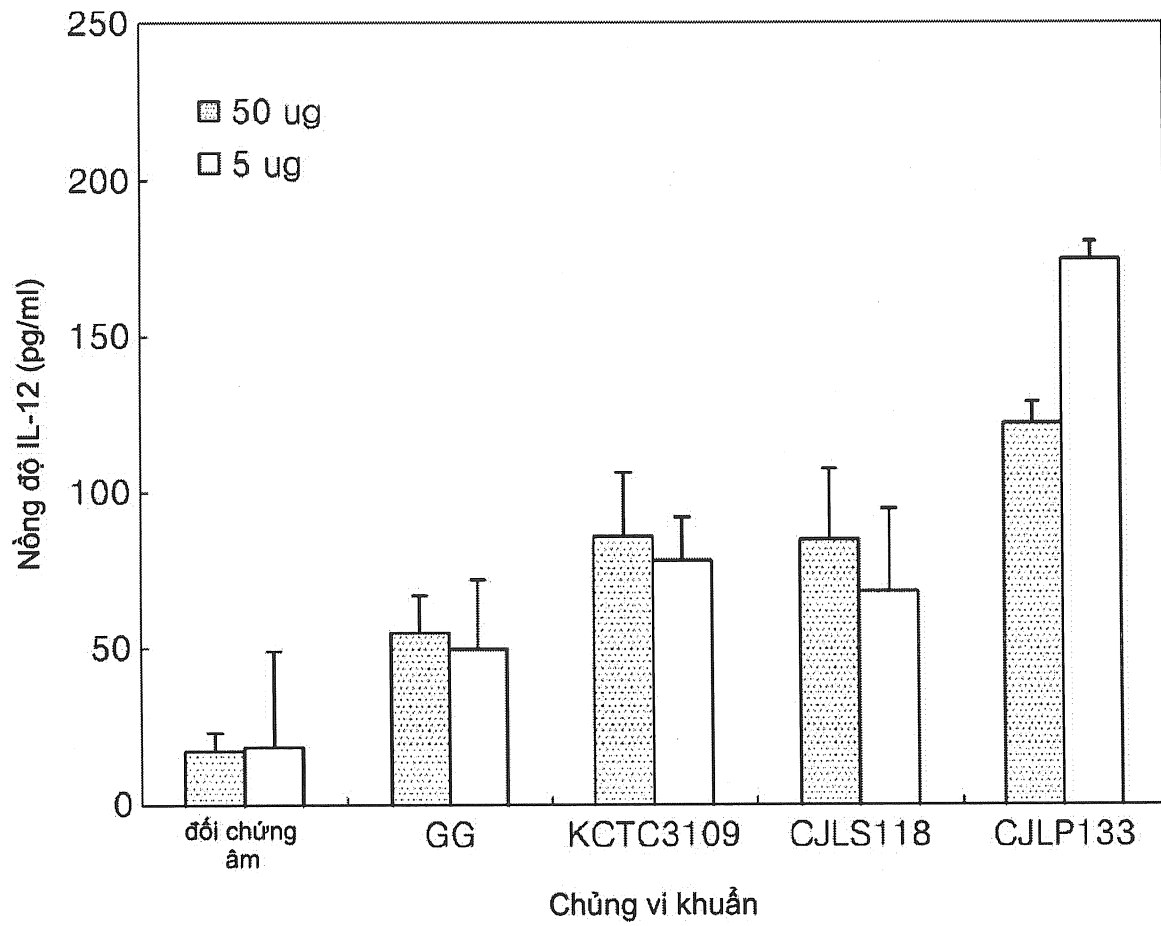
Fig.4

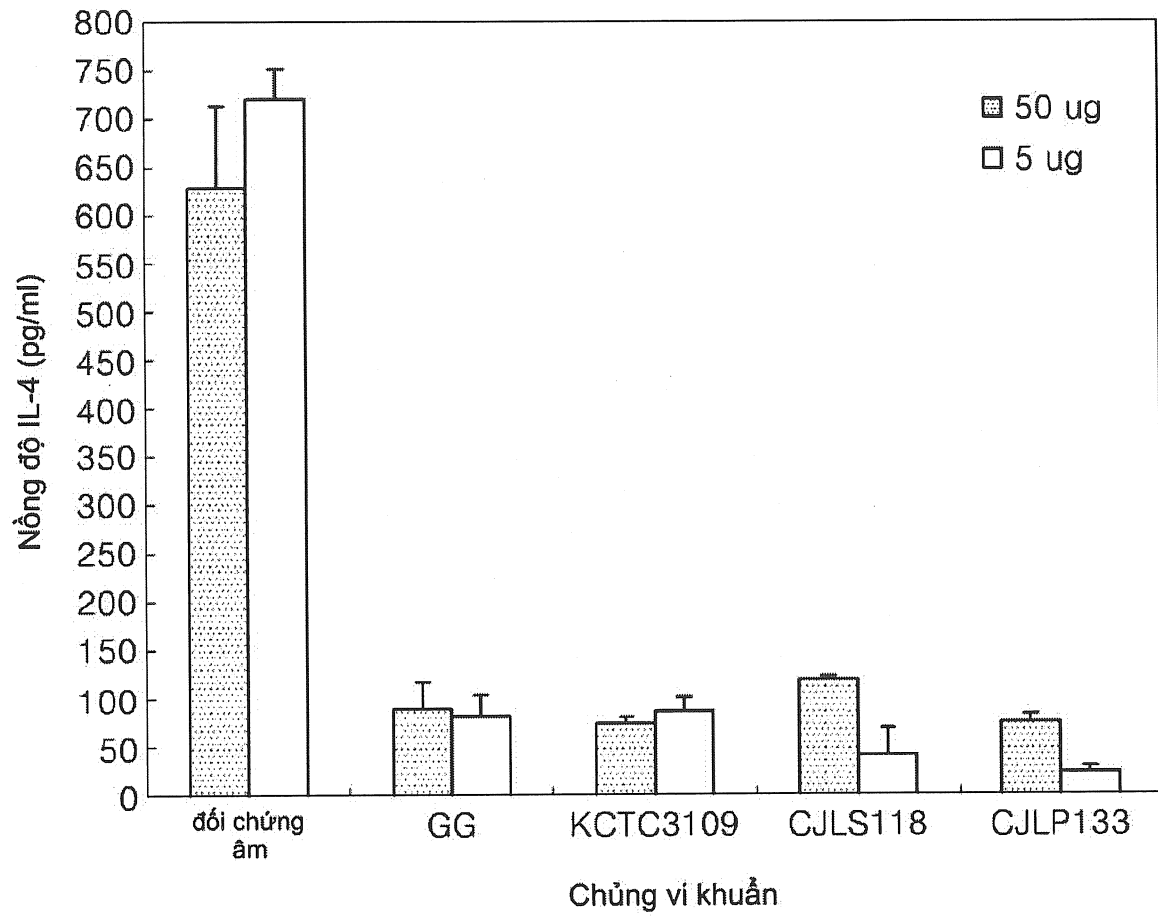
Fig.5

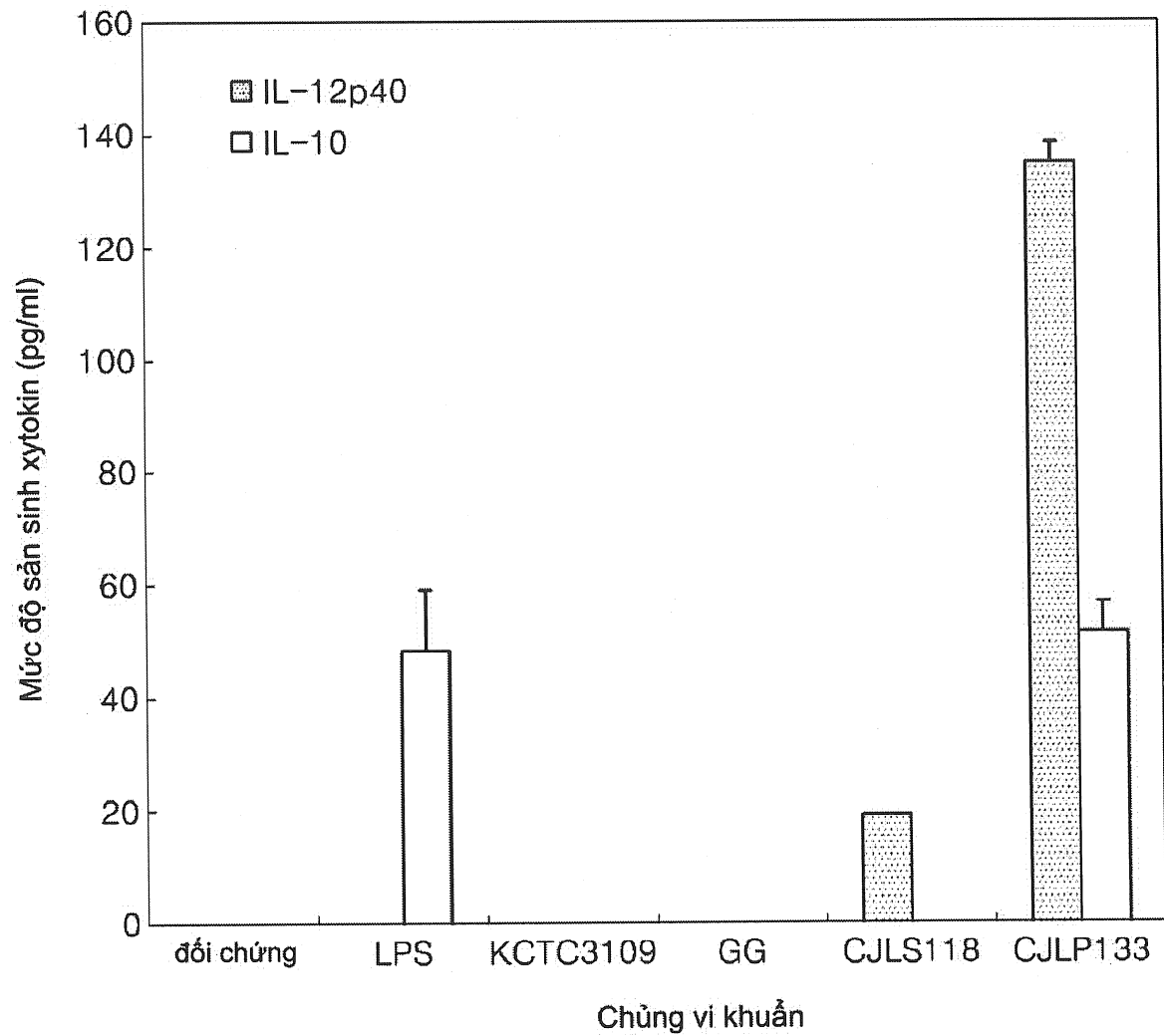
Fig.6

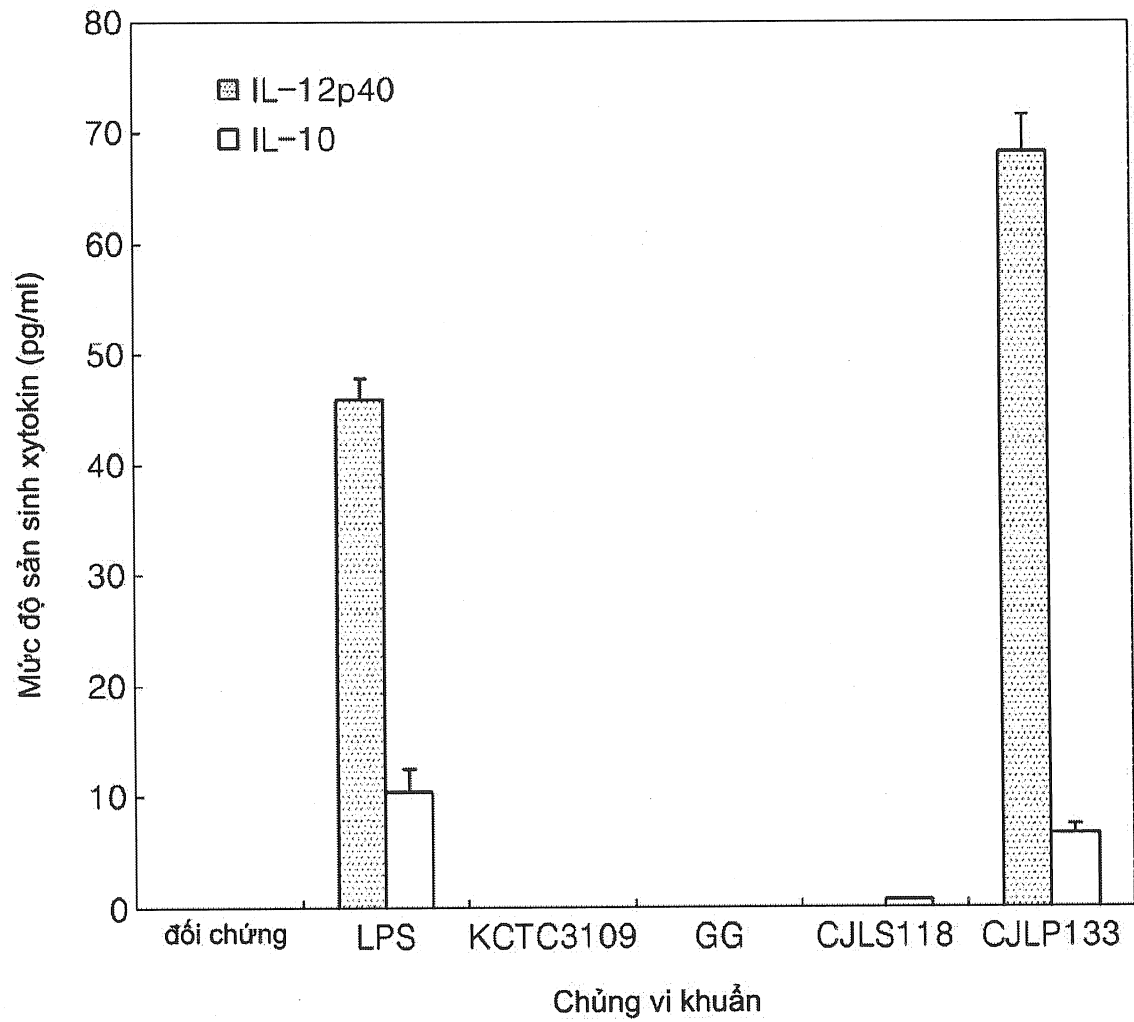
Fig.7

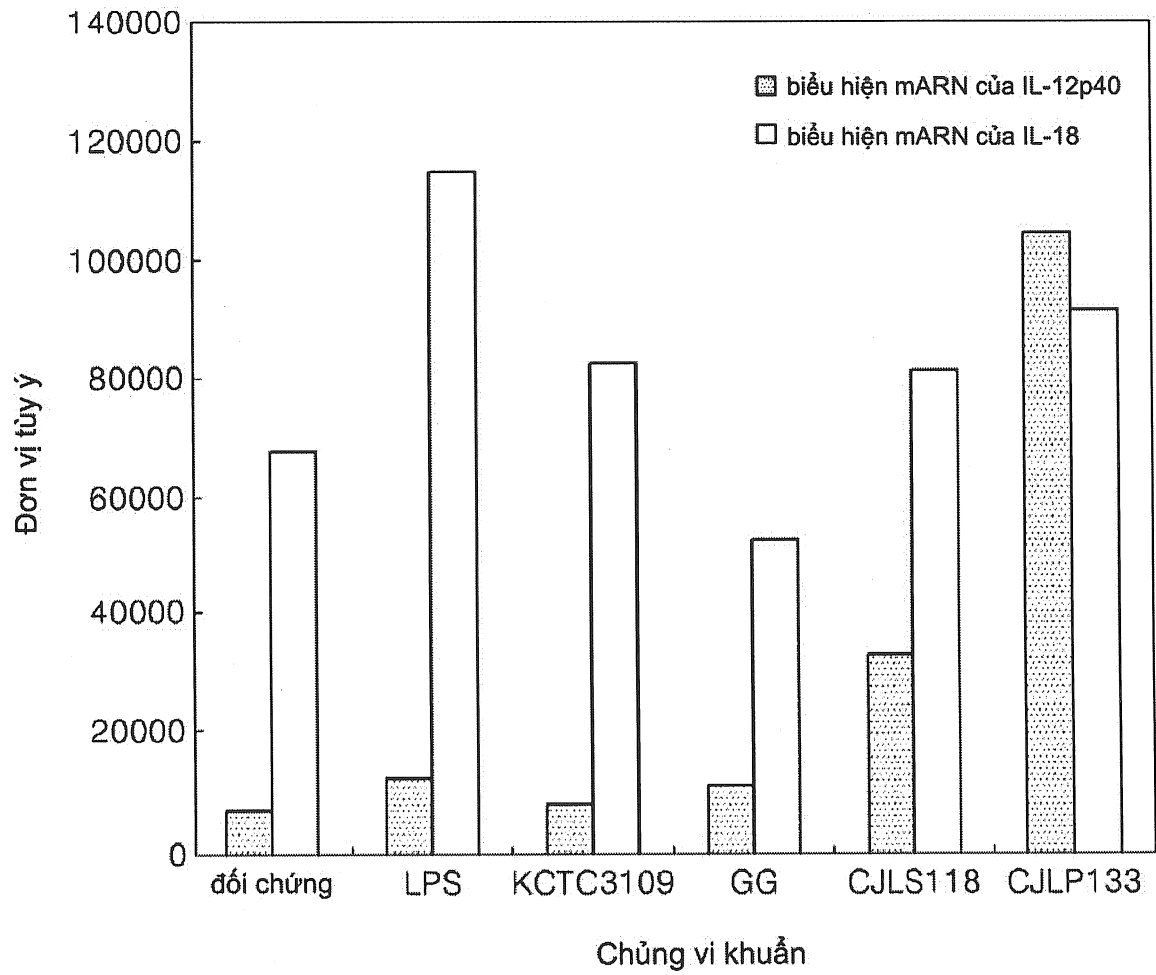
Fig.8

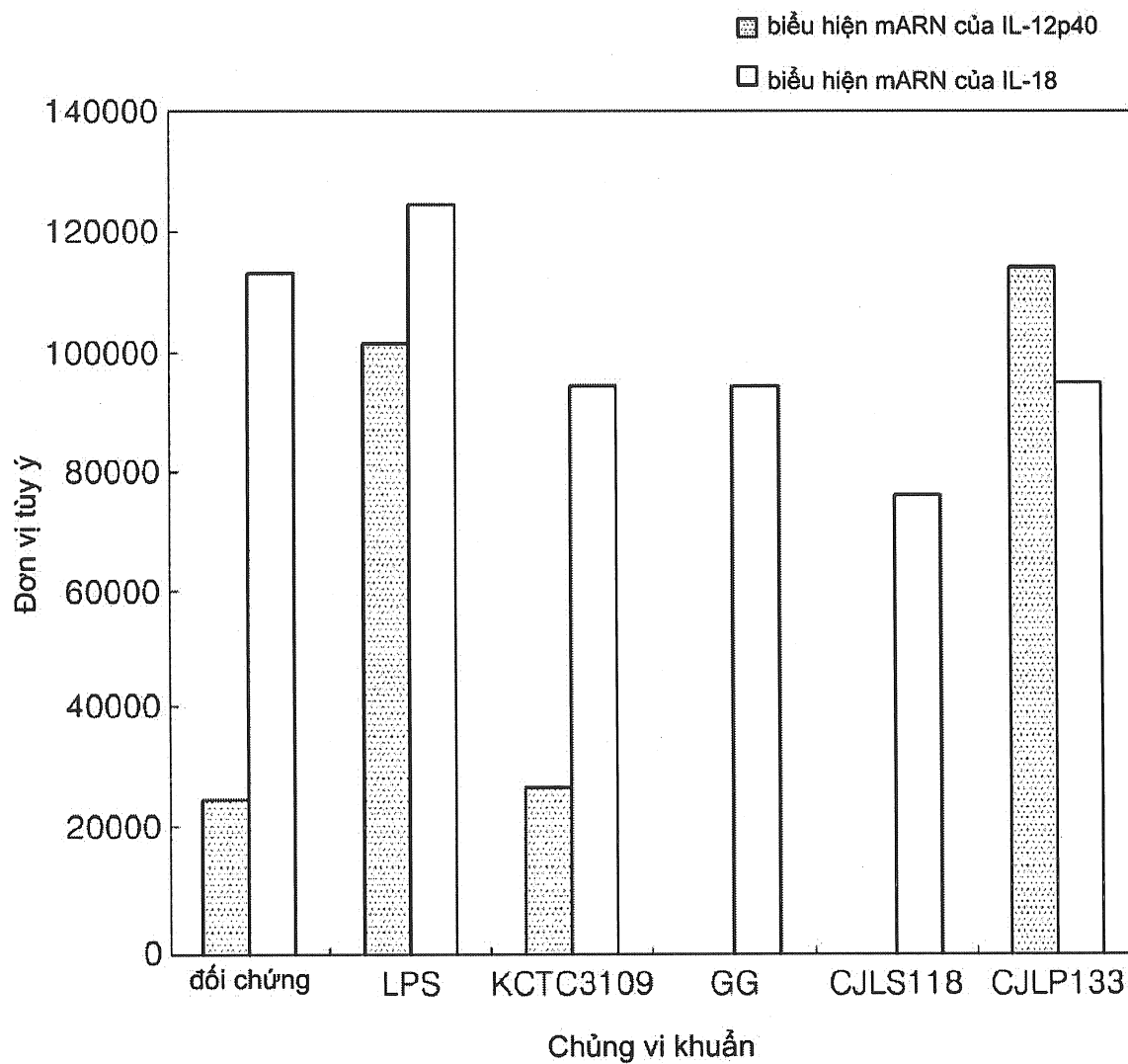
Fig.9

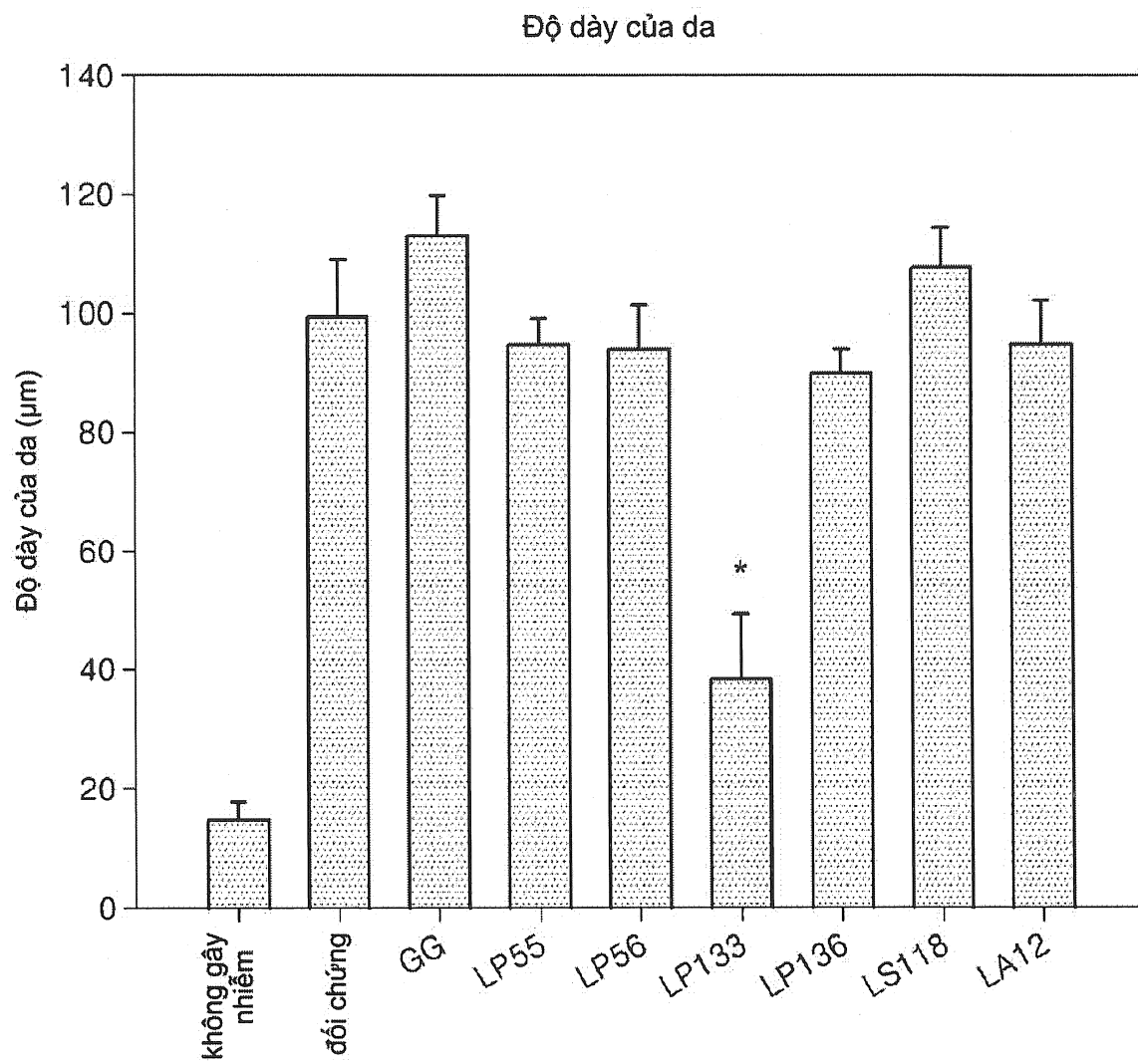
Fig.10a

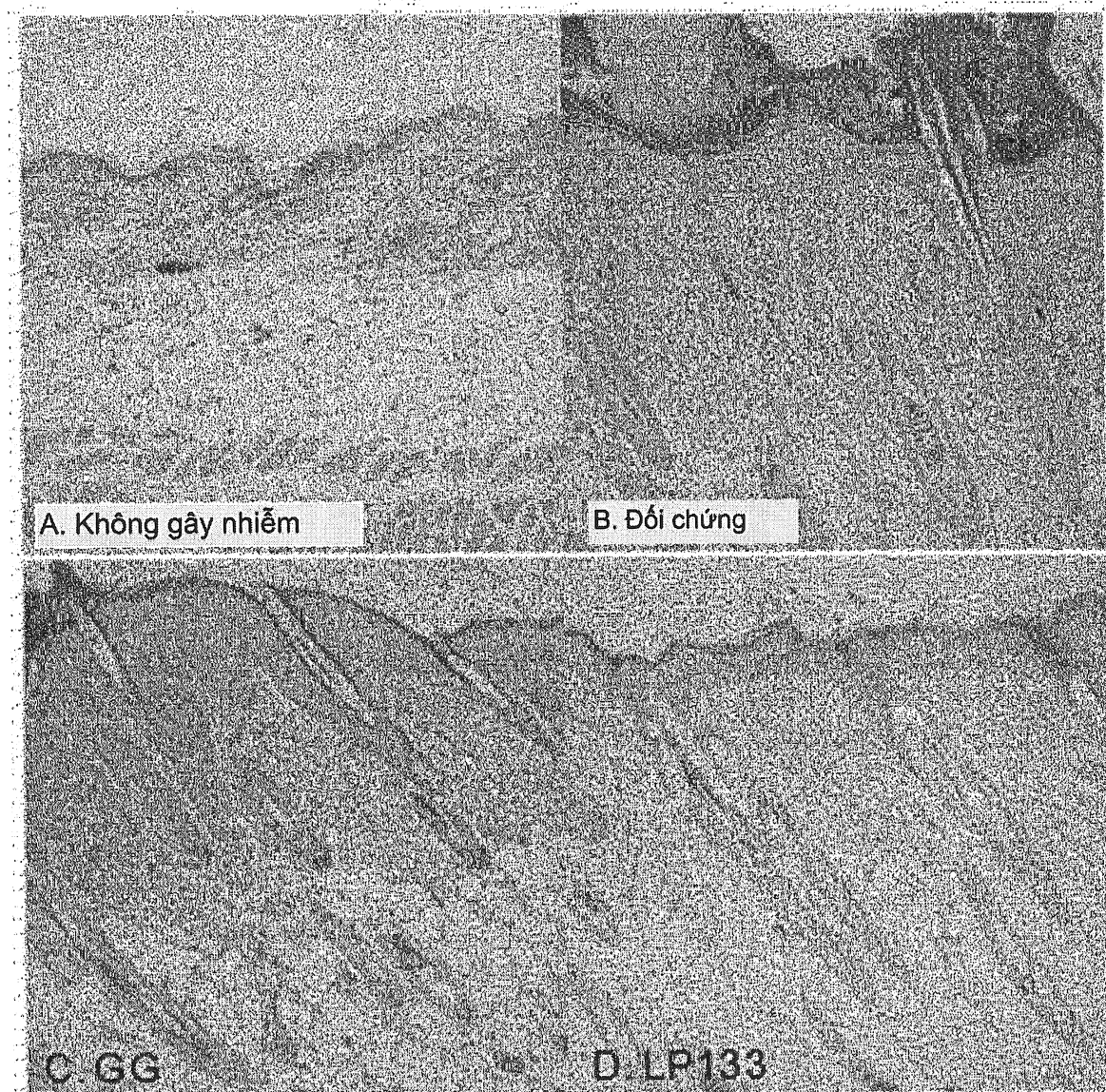
Fig.10b

Fig.11a

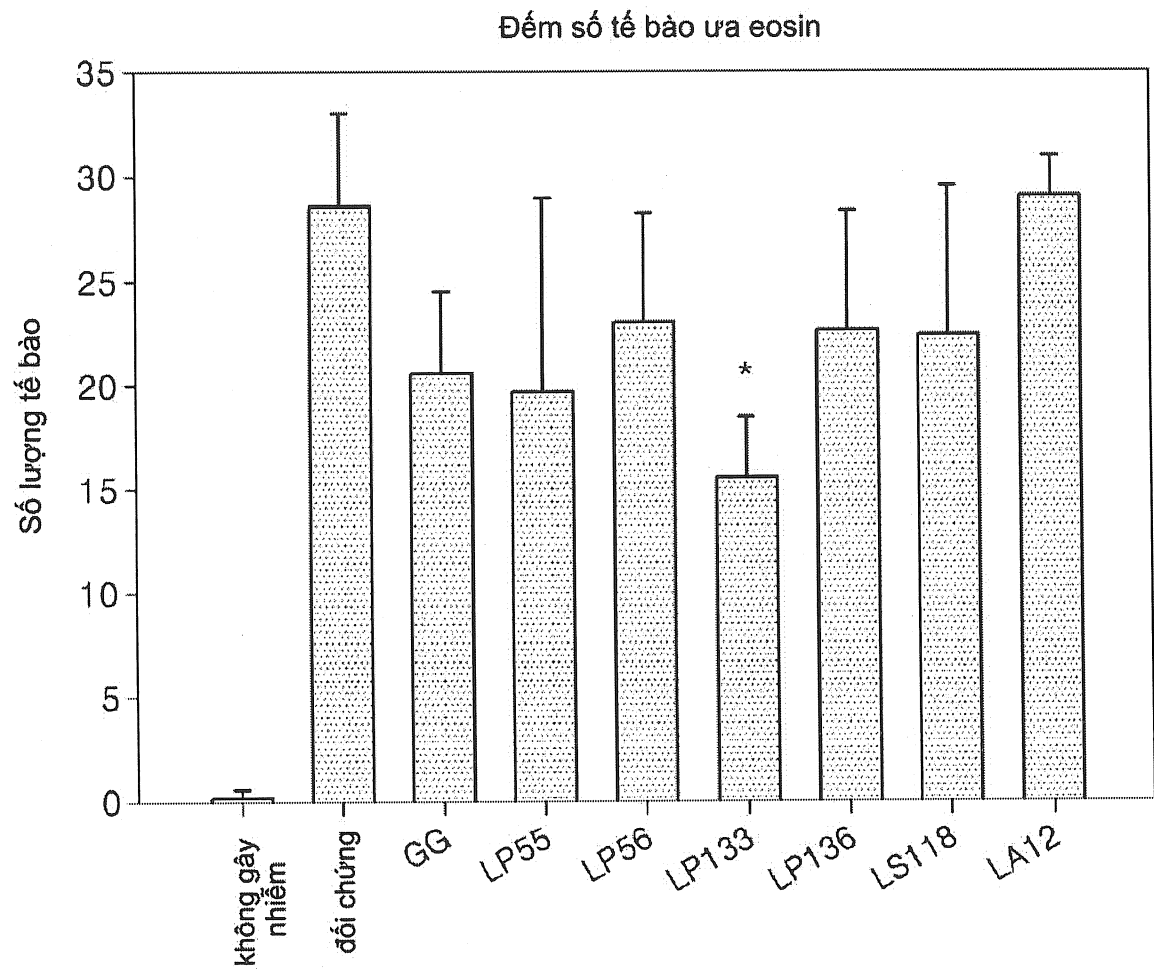


Fig.11b

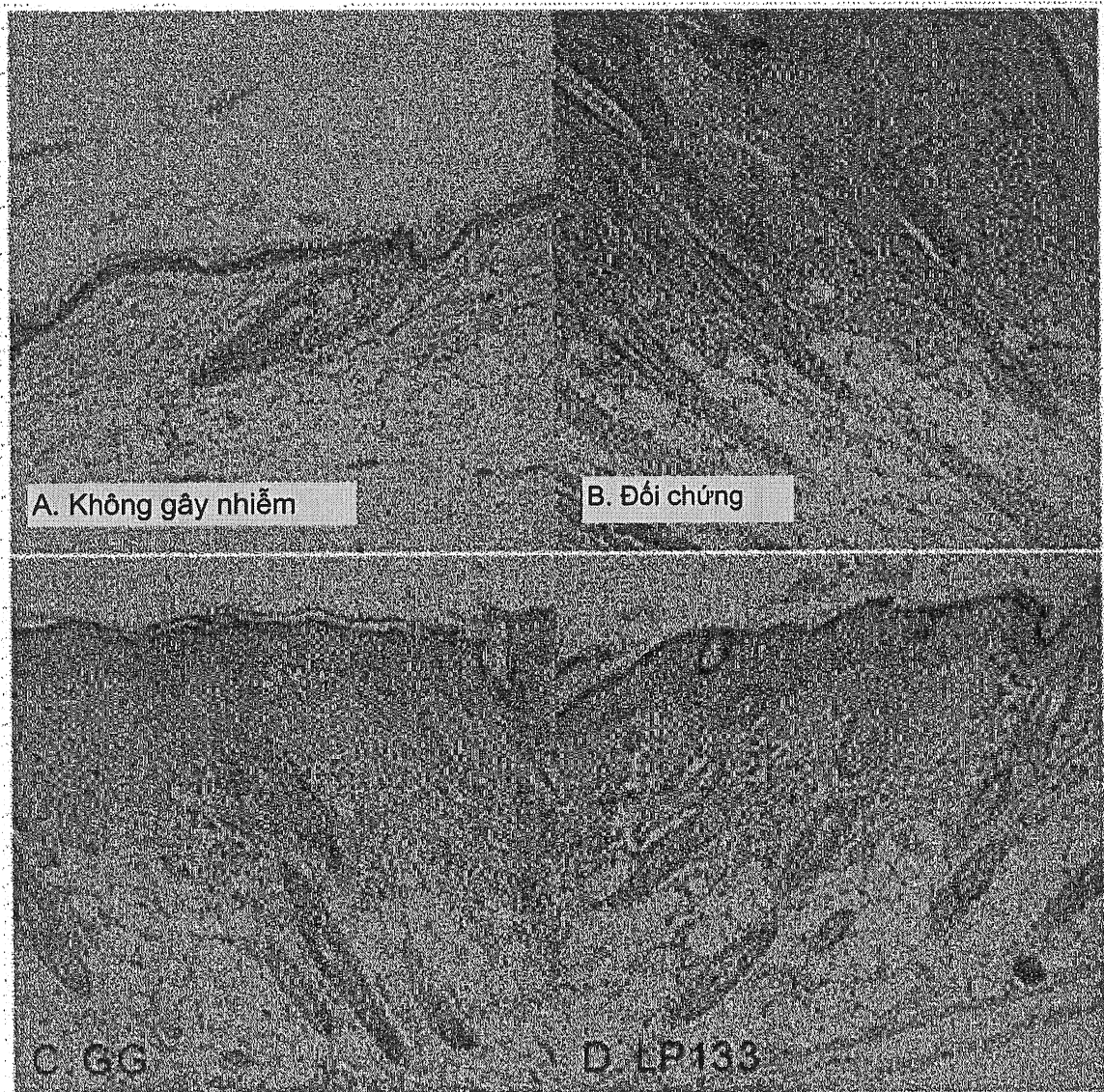


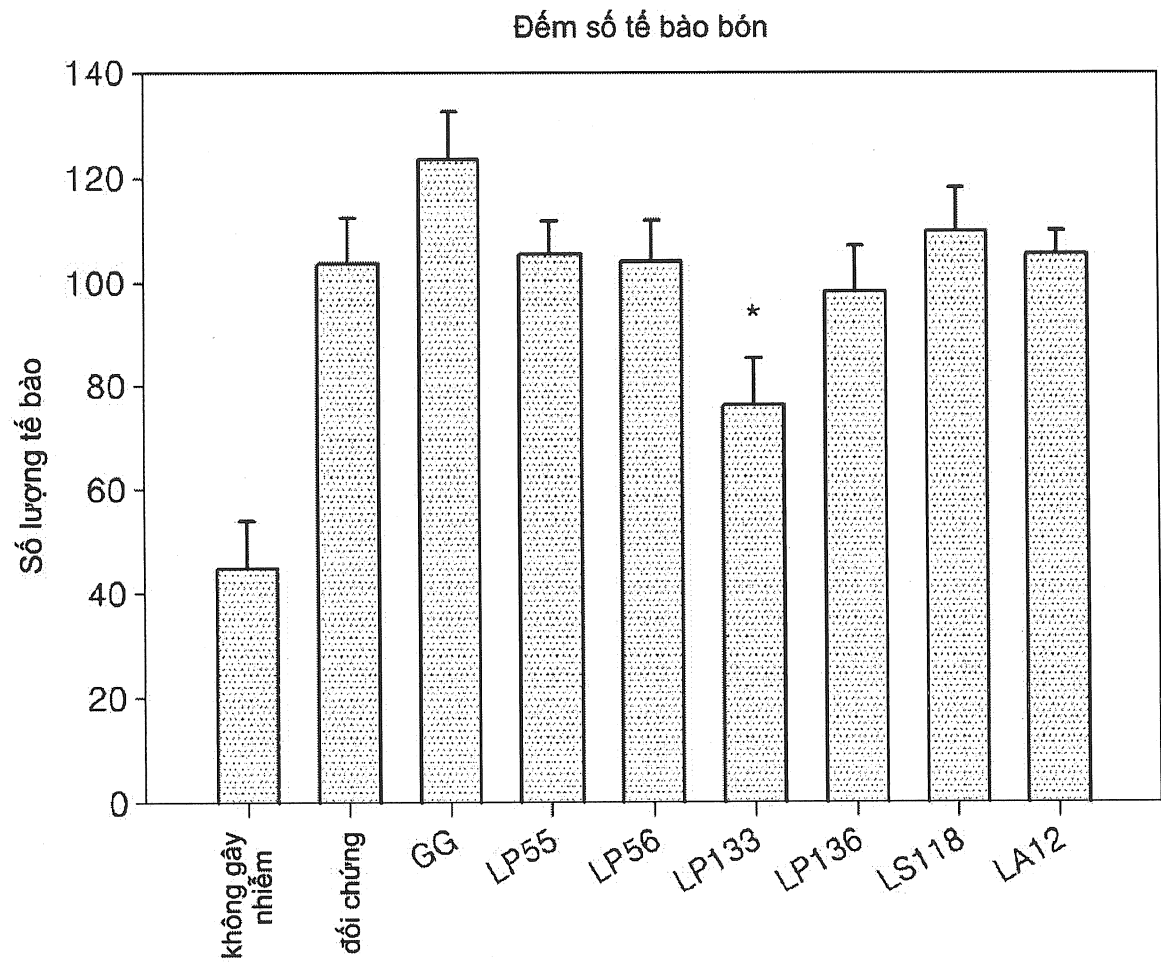
Fig.12a

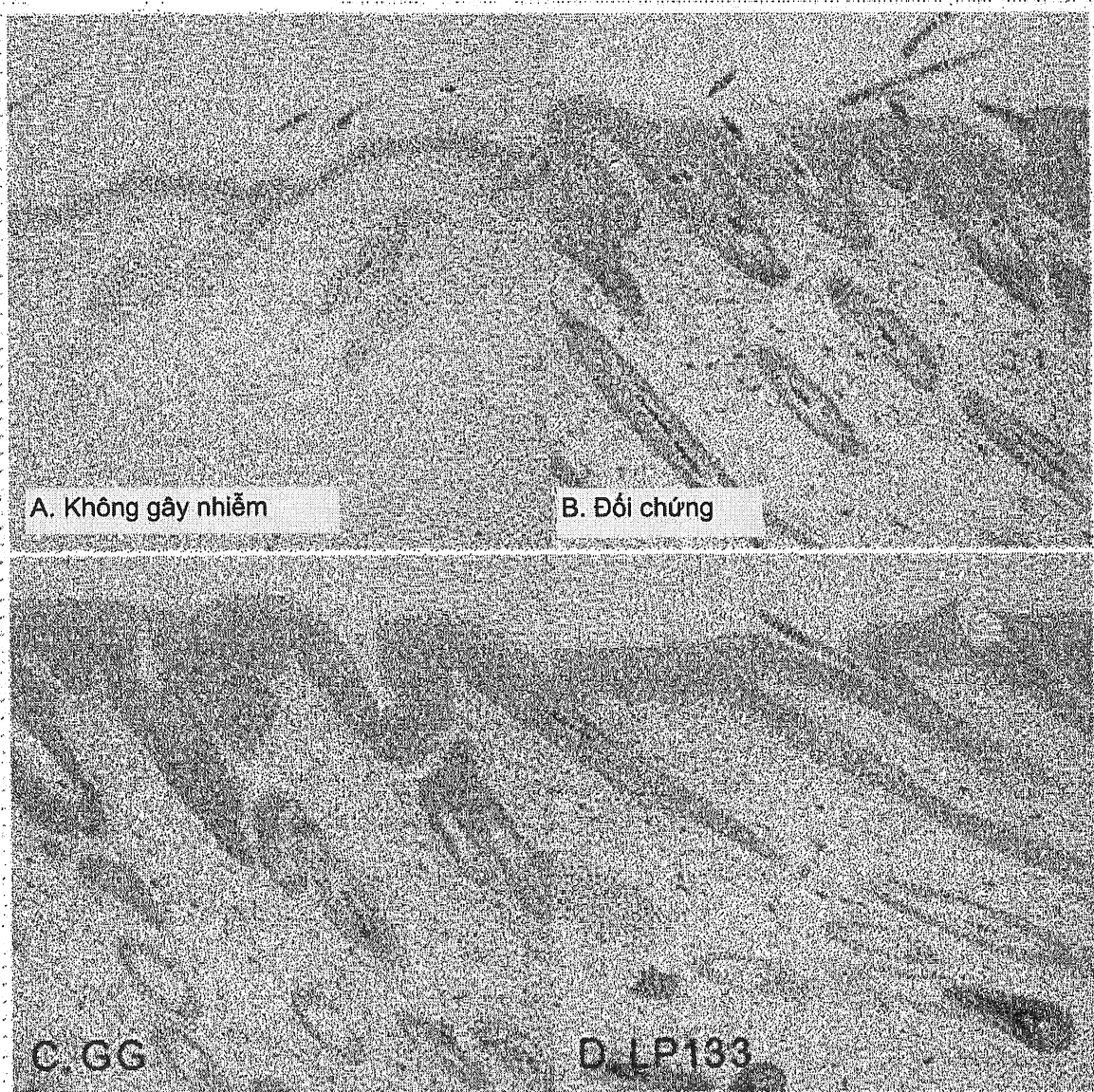
Fig.12b

Fig.13a

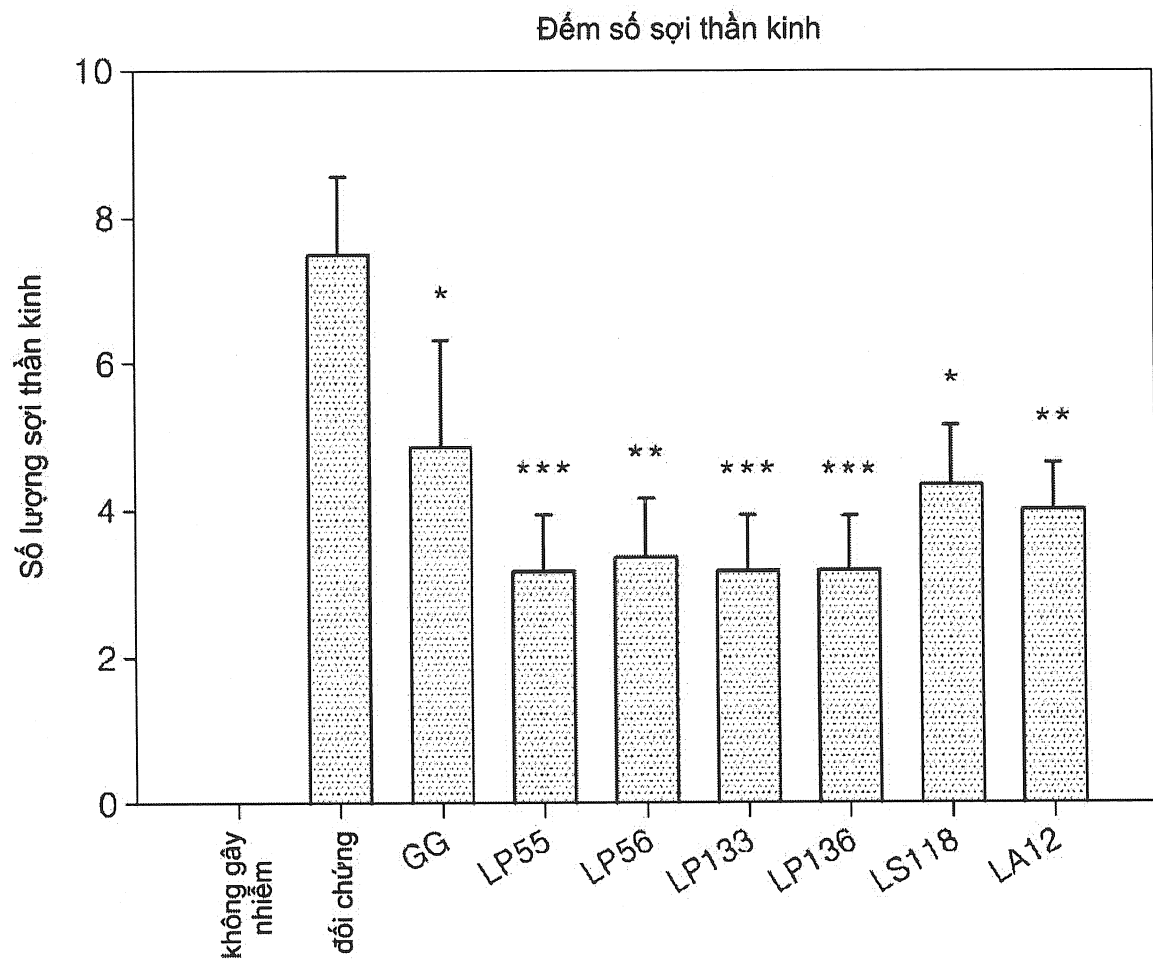


Fig.13b

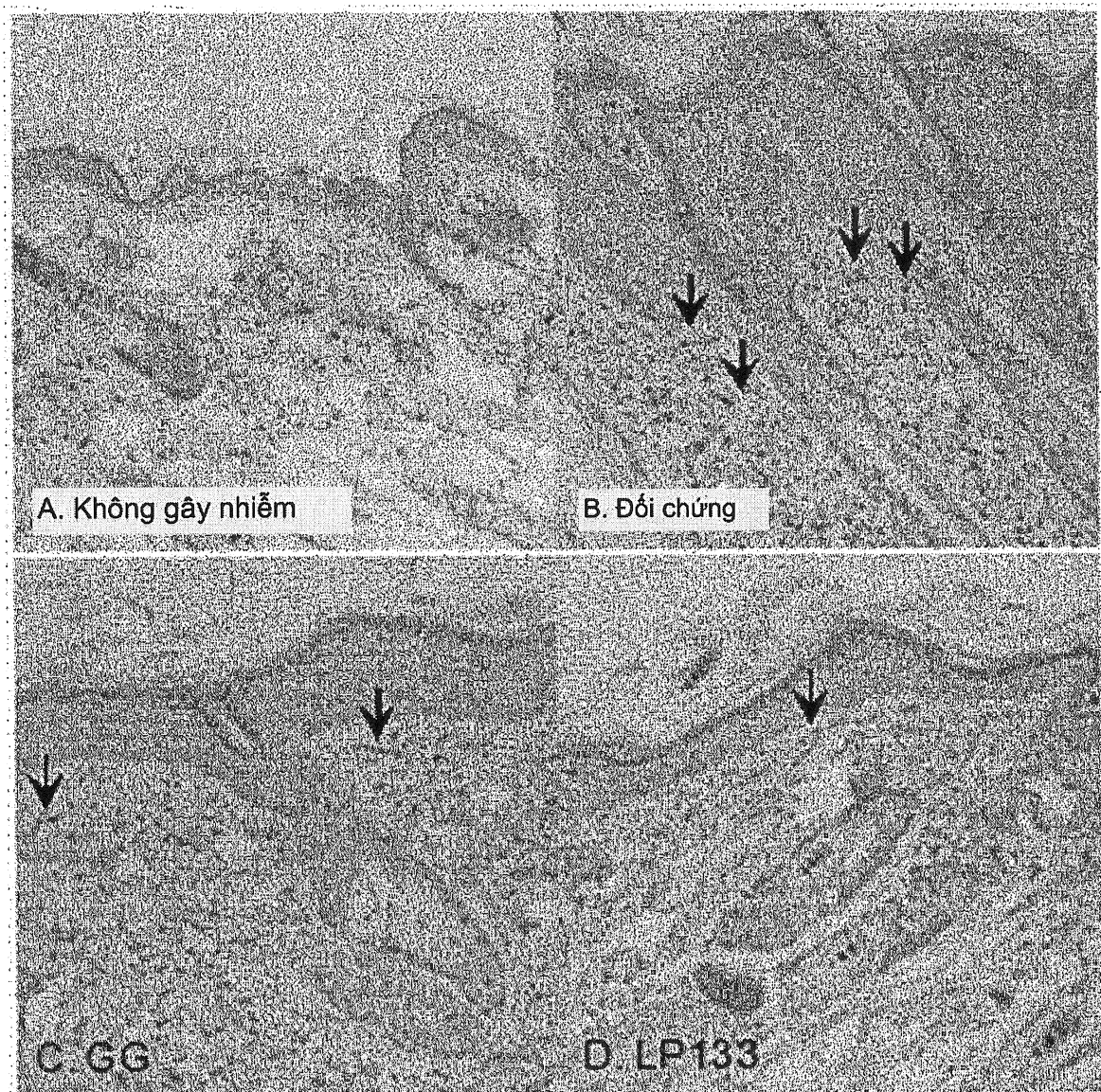


Fig.14a

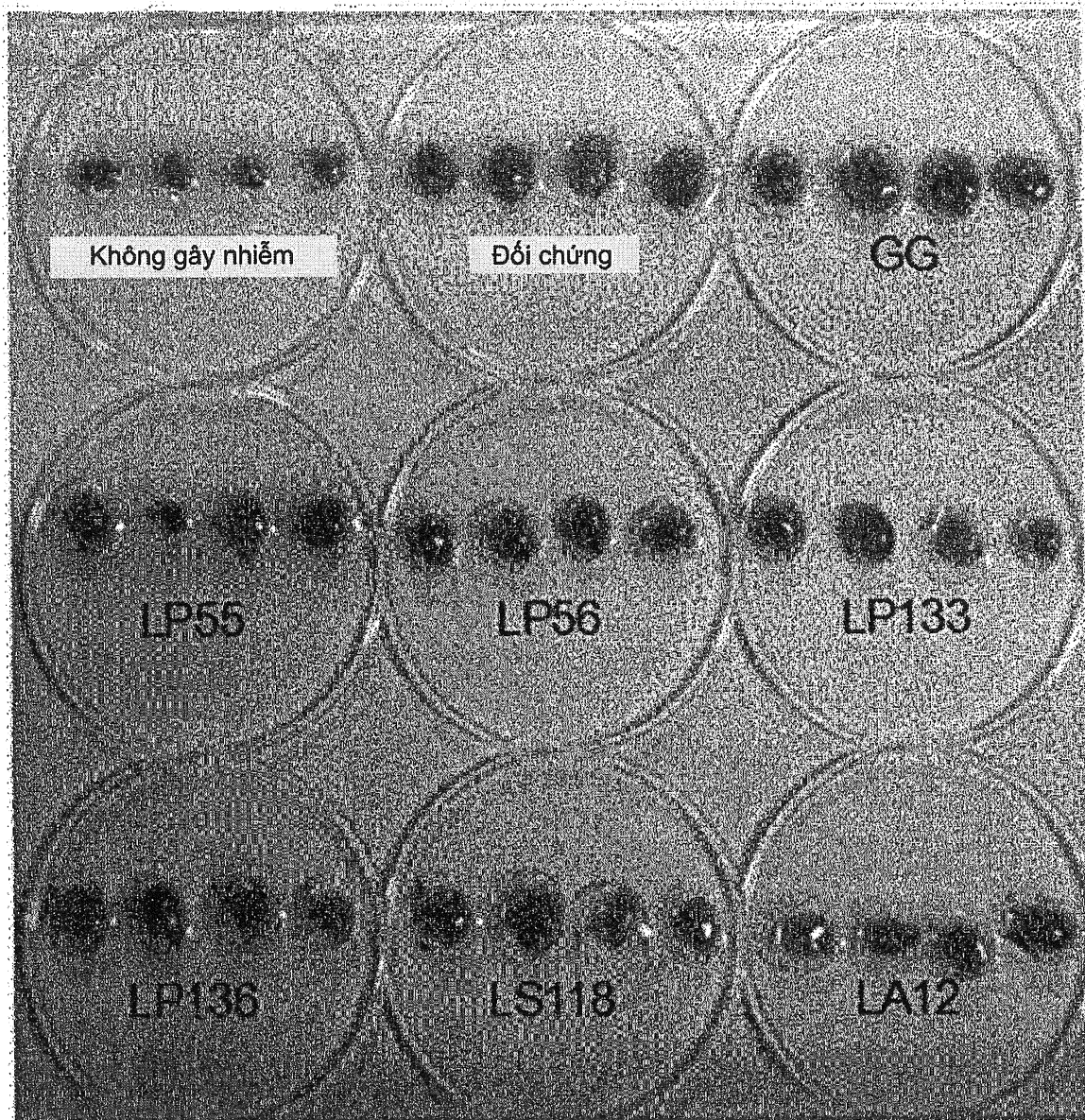


Fig.14b

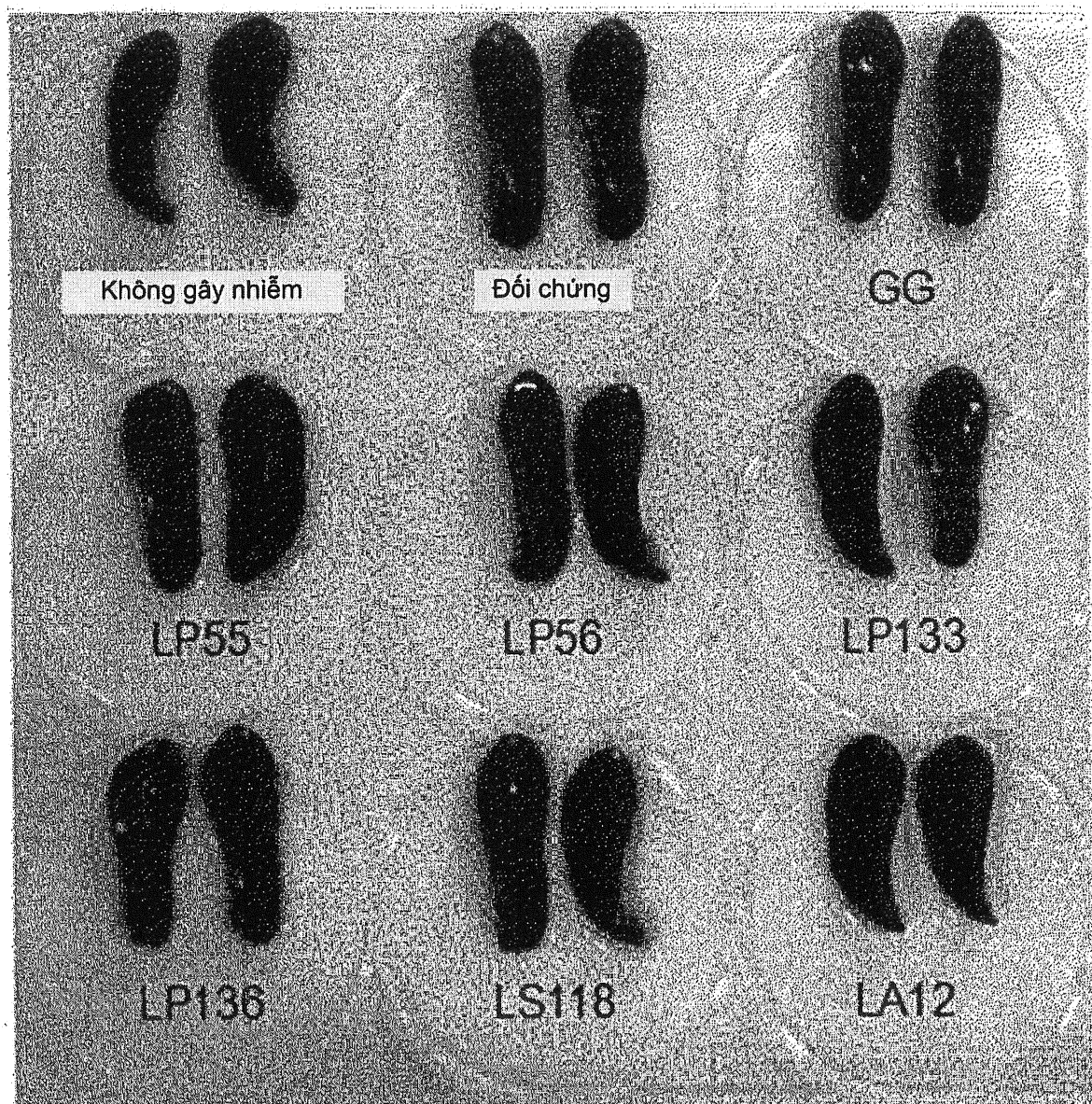


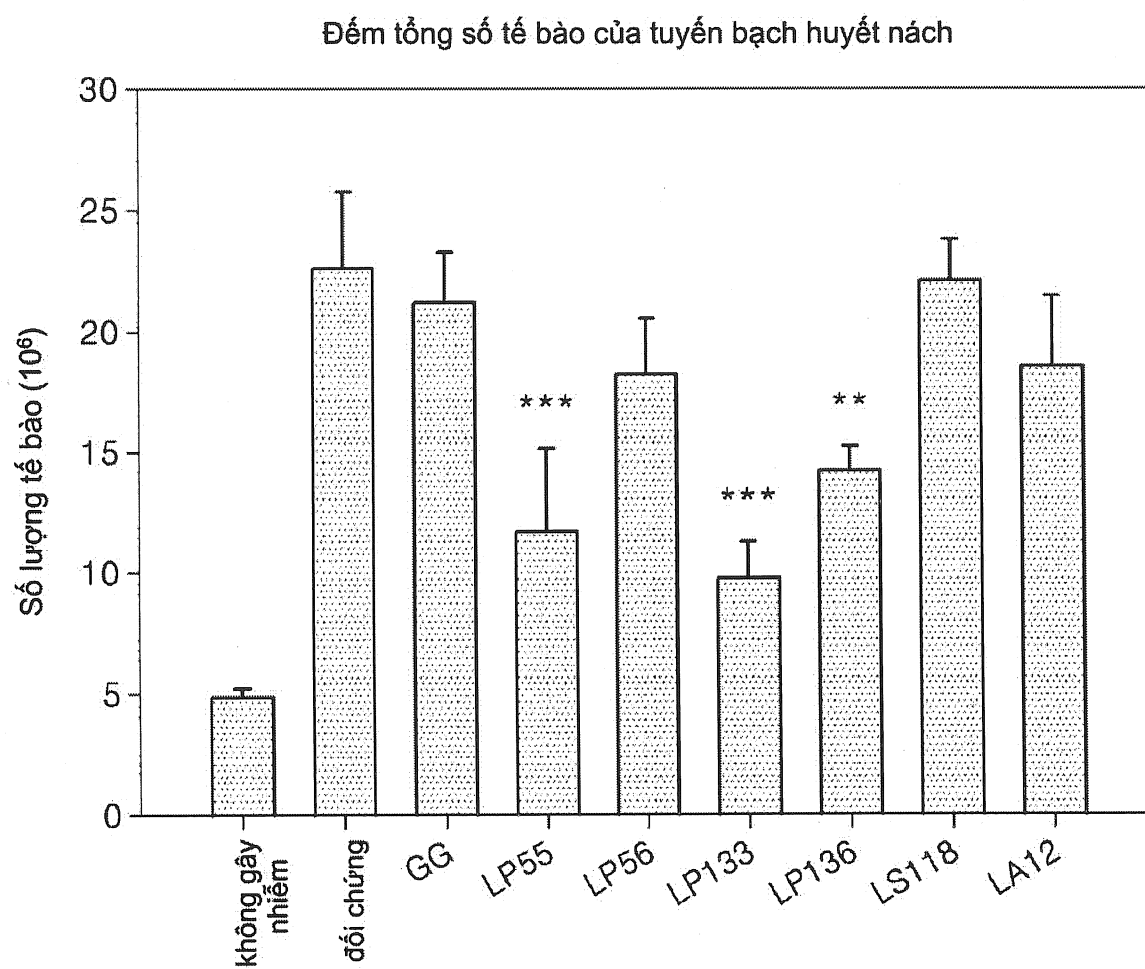
Fig.15a

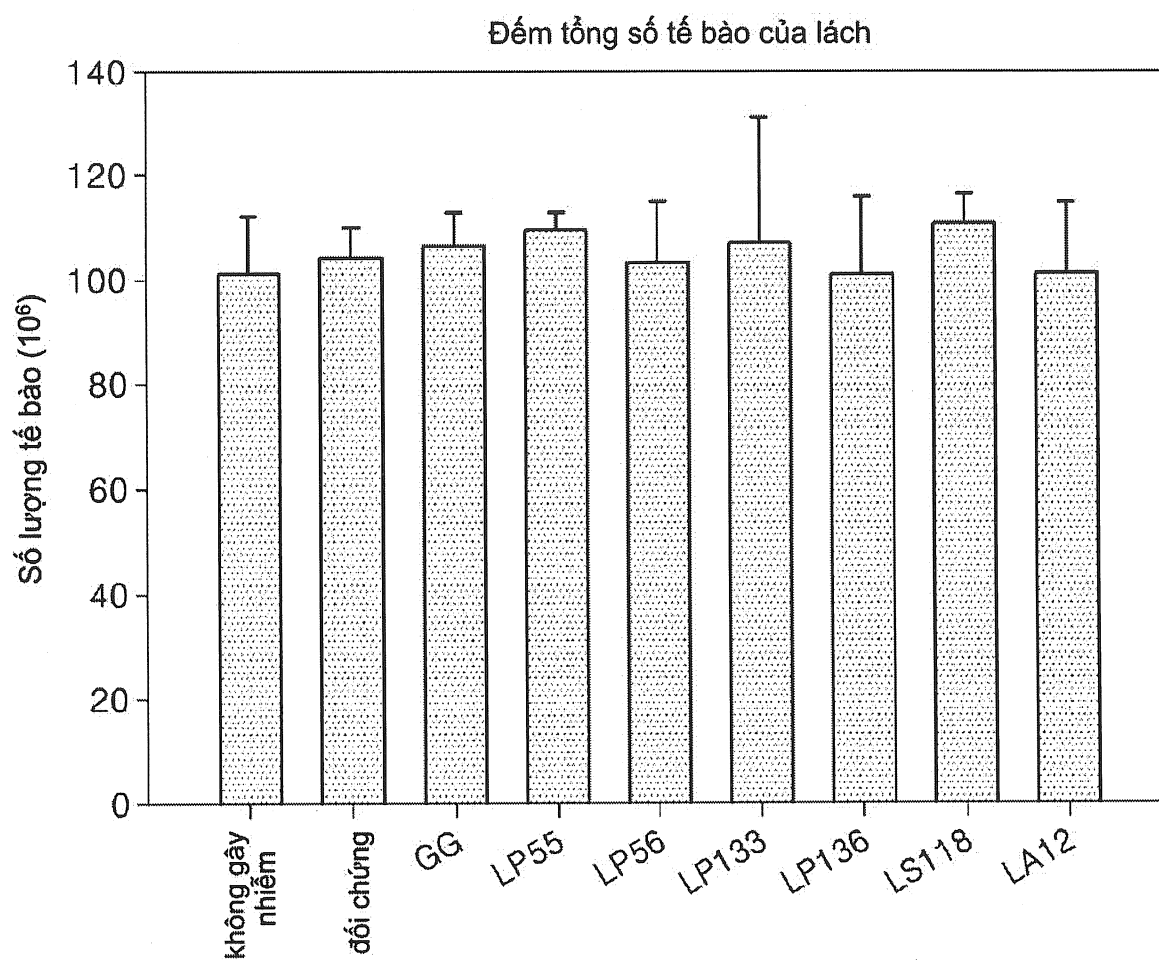
Fig.15b

Fig.16a

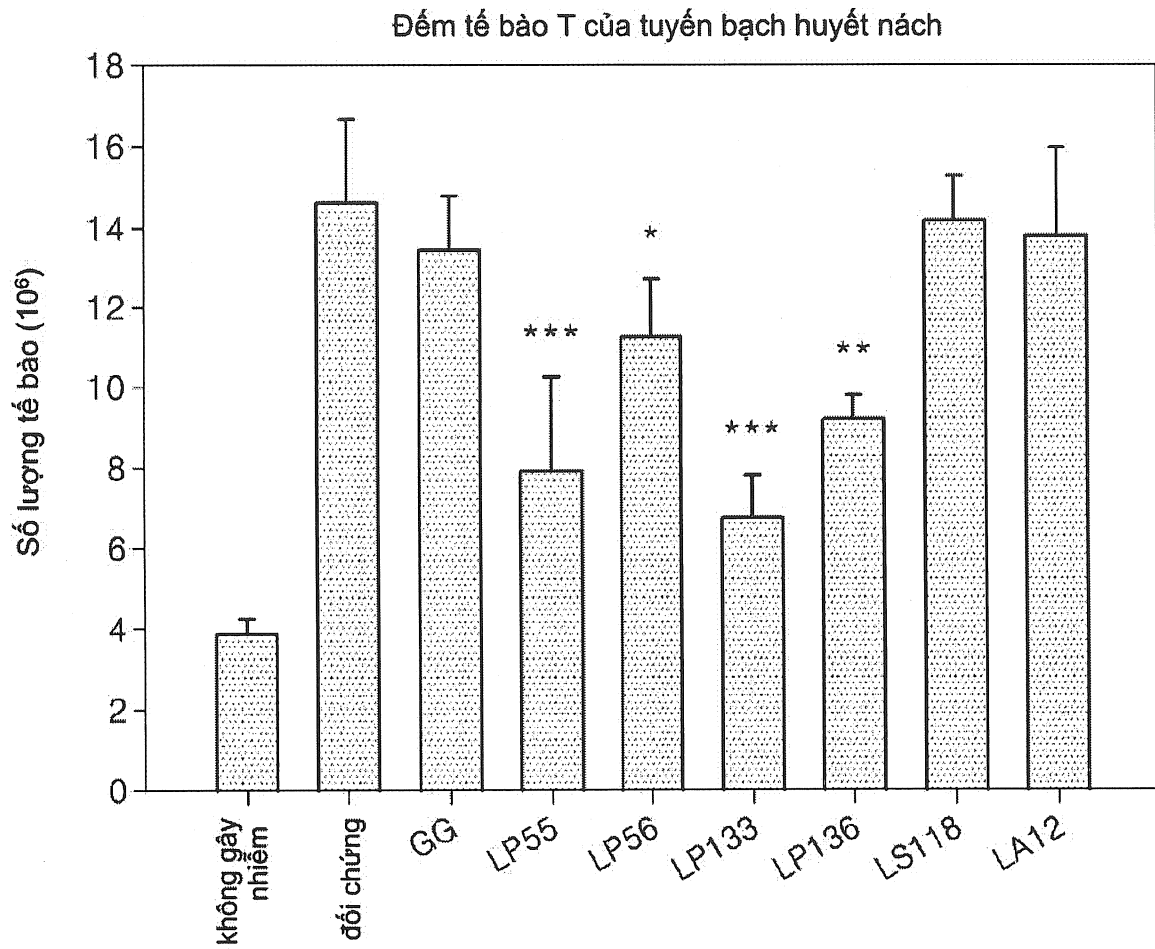


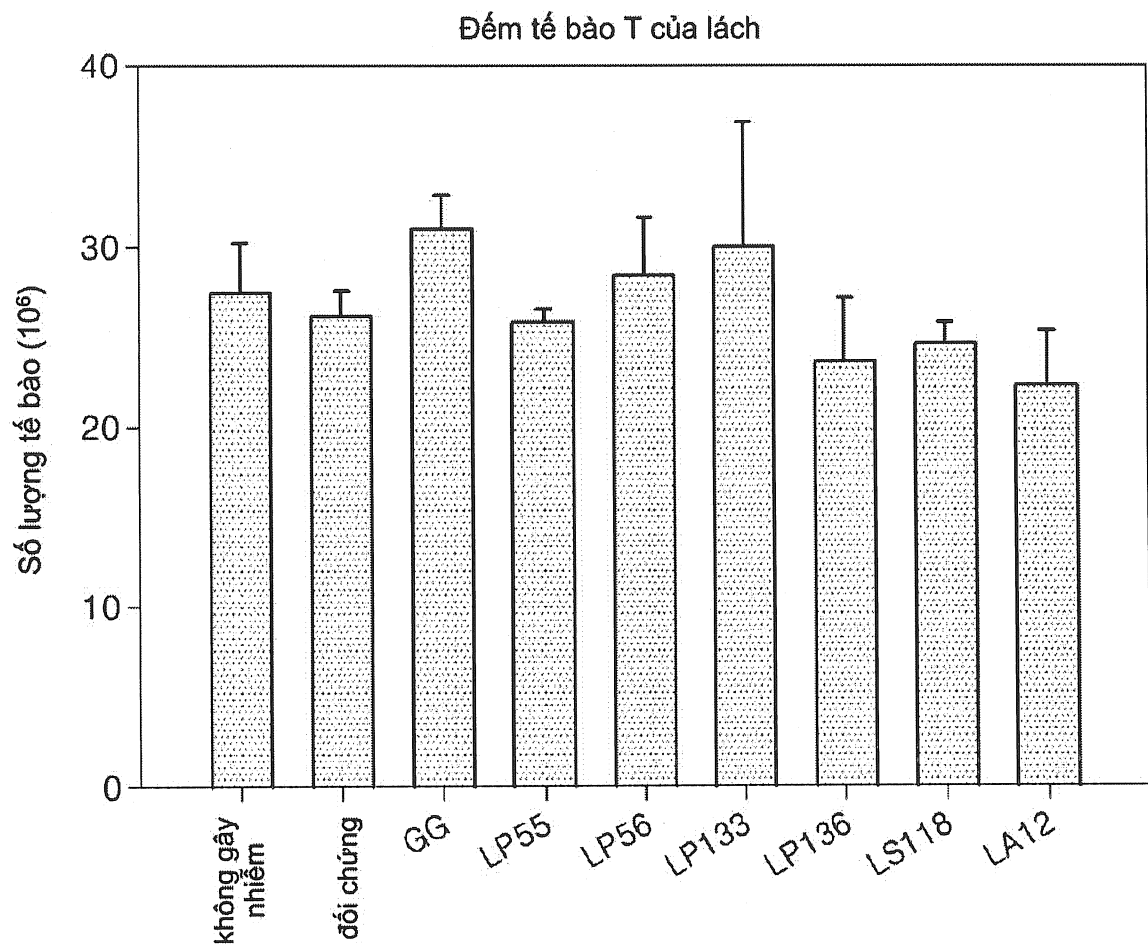
Fig.16b

Fig.17a

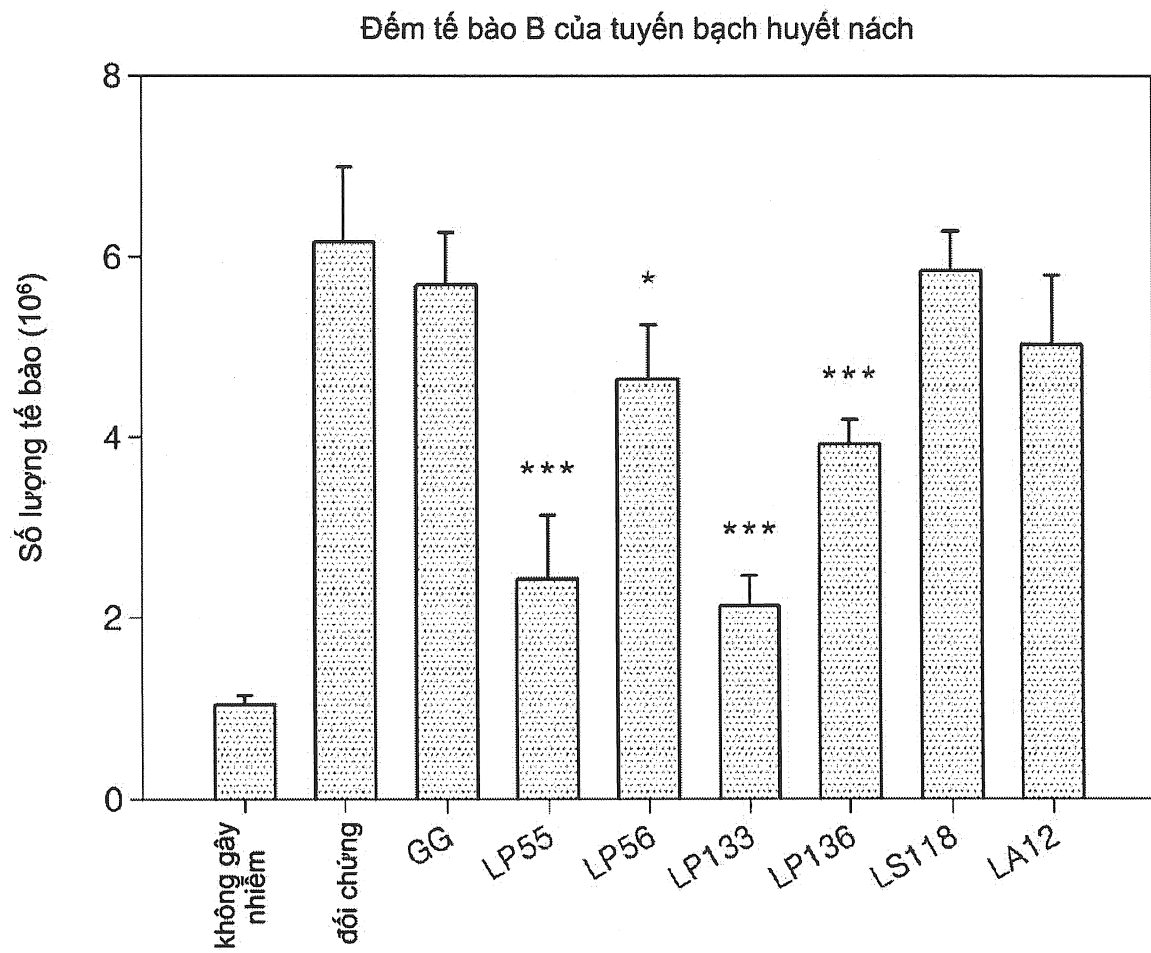


Fig.17b

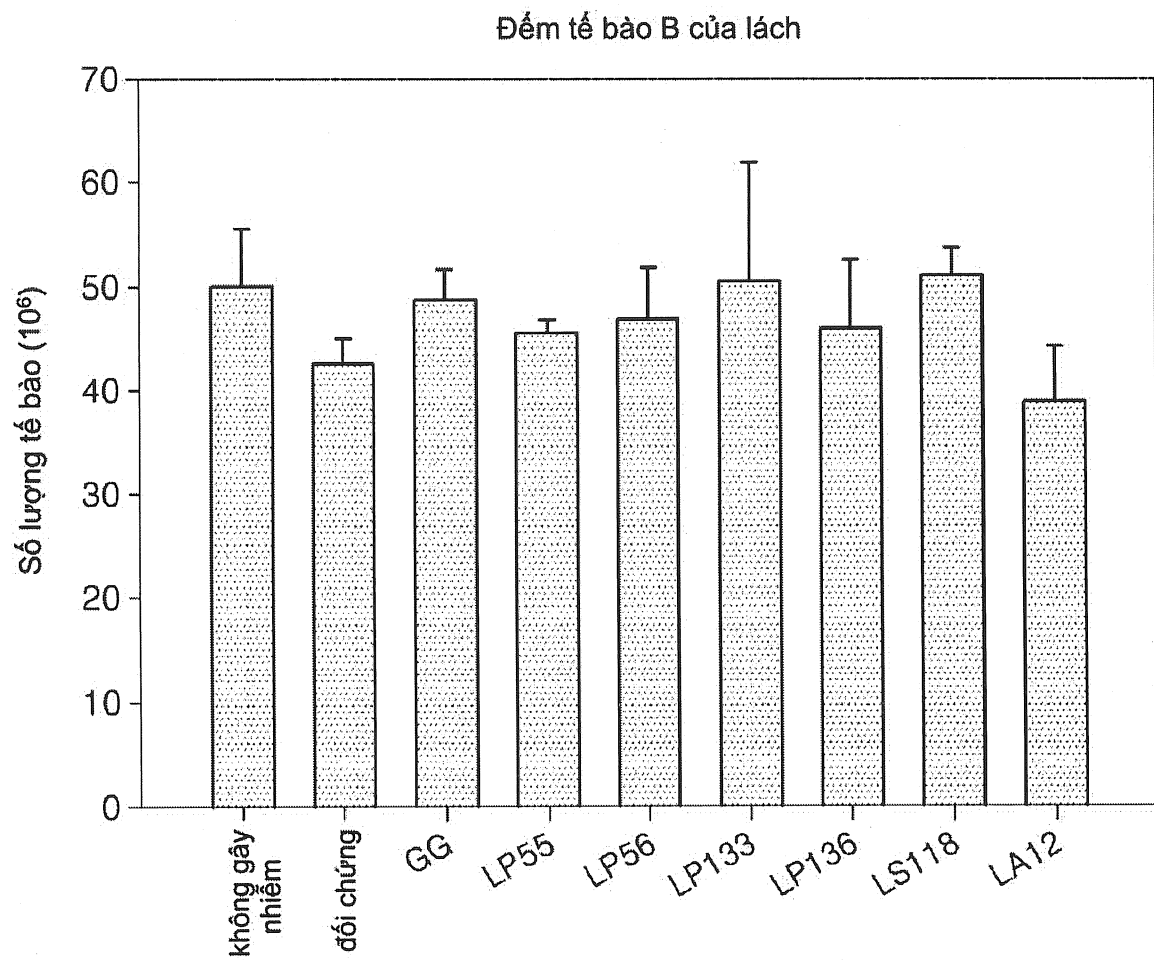


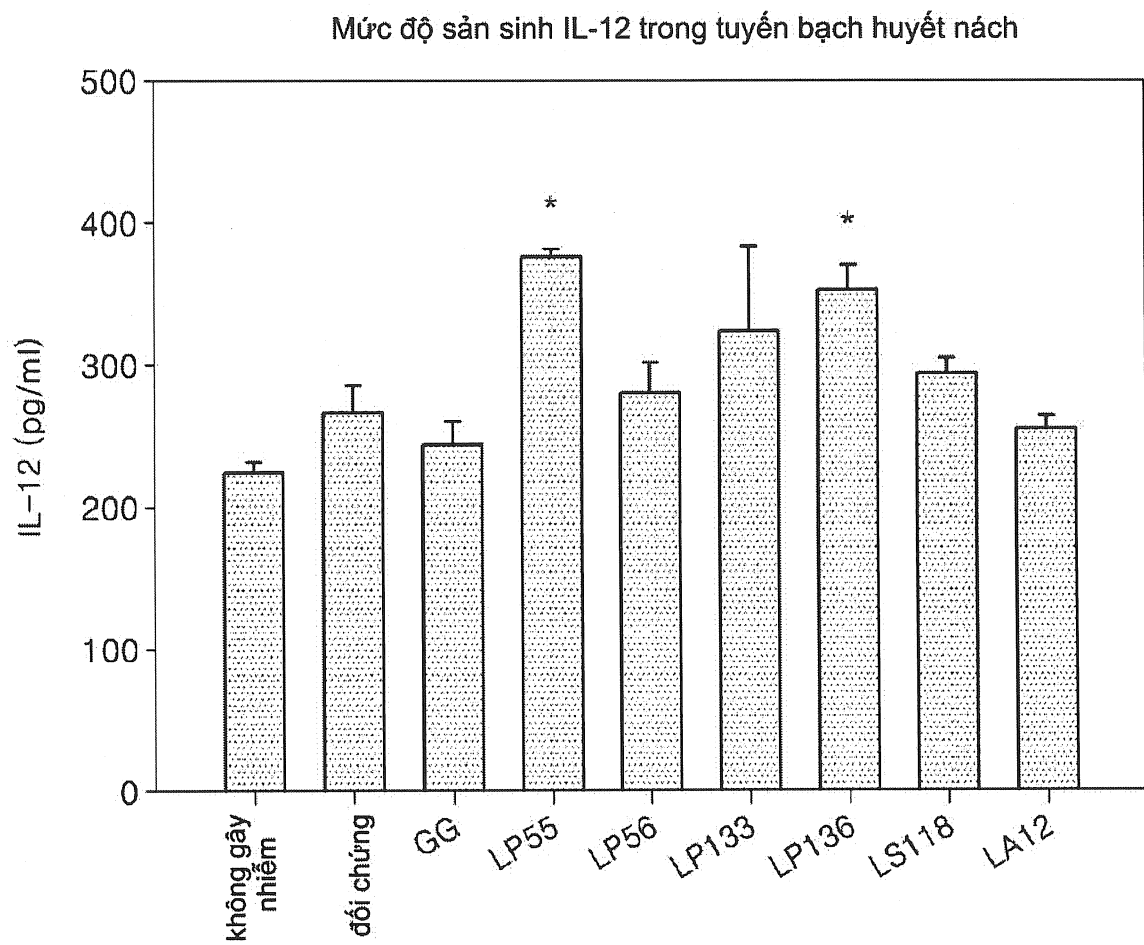
Fig.18a

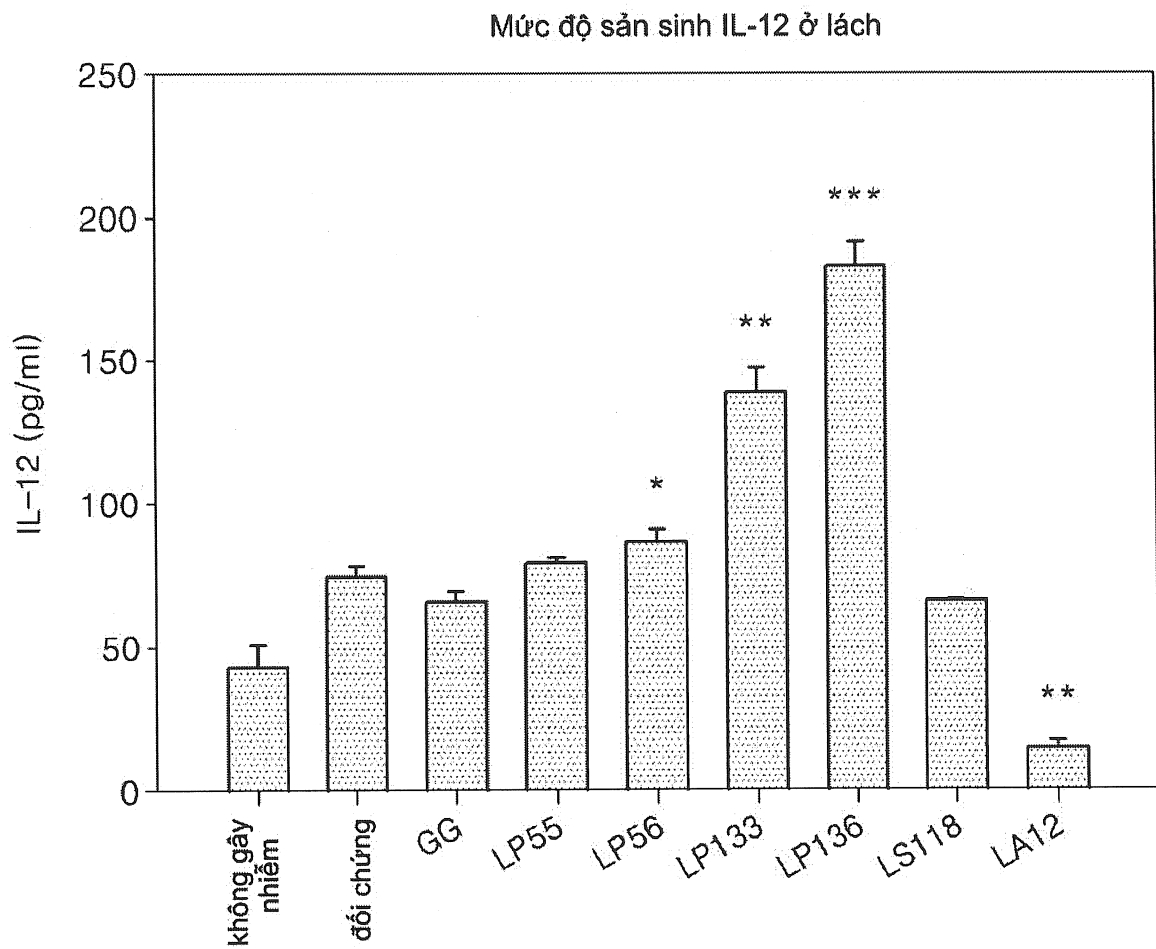
Fig.18b

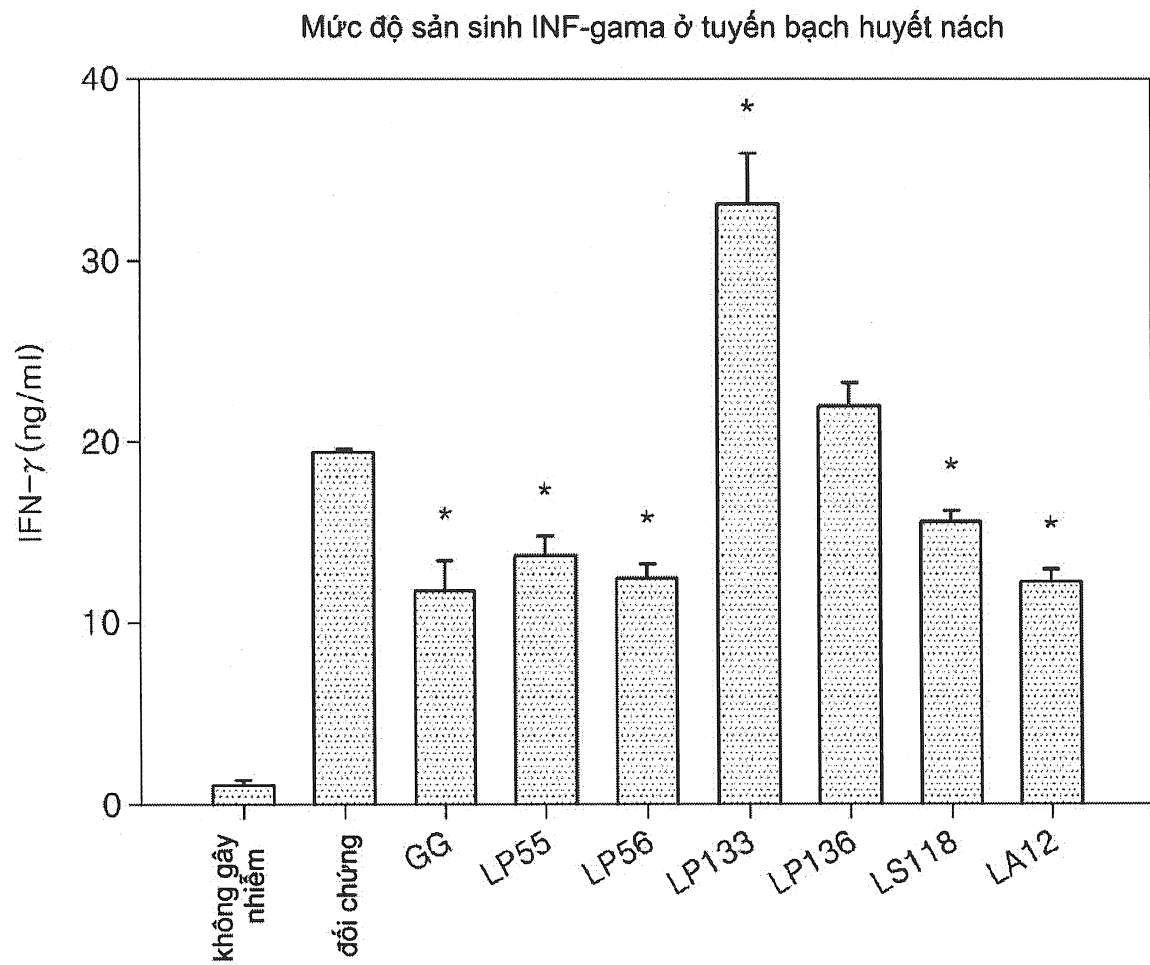
Fig.19a

Fig.19b

