



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

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

(11)



1-0024093

(51)⁷ A61K 35/747; C12R 1/255; C12R 1/25; (13) B
A23L 33/135

(21) 1-2013-03724

(22) 03/05/2012

(86) PCT/BG2012/000014 03/05/2012

(87) WO2012/149615 08/11/2012

(30) 110932 04/05/2011 BG

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/02/2014 311A

(73) LB BULGARICUM PLC (BG)

9 Saborna Street, 1000 Sofia, Bulgaria

(72) DIMITROV, Zhechko (BG); MICHAYLOVA, Michaela (BG).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA ĐA VI KHUẨN LACTIC VÀ PHƯƠNG PHÁP THU NHẬN
CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm probiotic chứa đa vi khuẩn, chế phẩm này bao gồm các chủng mới của vi khuẩn axit lactic *Lactobacillus gasseri* 7/12 NBIMCC No. 8720, *Lactobacillus plantarum* F12 NBIMCC No. 8722 và *Lactobacillus helveticus* A1, NBIMCC No. 8721 và có các đặc tính sau đây: chống oxy hóa, tác dụng làm giảm cholesterol huyết, tác dụng điều hòa miễn dịch chống viêm, khả năng giải phóng các peptit có hoạt tính sinh học mà ức chế enzym chuyển hóa angiotensin (ACE), mà có thể đáp ứng đối với huyết áp cao. Sáng chế cũng đề cập đến các chủng probiotic của vi khuẩn axit lactic và các sản phẩm chứa vi khuẩn được phát triển với các đặc tính hữu ích. Chủng probiotic được hợp nhất *Lactobacillus gasseri* 7/12 NBIMCC No. 8720, có nhiều đặc tính: dính bám mạnh vào lớp biểu mô của ruột kết, khả năng làm giảm cholesterol và các tác dụng chống viêm bằng cách làm giảm hàm lượng của xytokin interleukin-8 tiền viêm. Các chủng vi khuẩn axit lactic và các hỗn hợp chứa vi khuẩn này được dùng trong sản xuất giống nuôi cấy gốc, chất phụ gia dùng cho thức ăn, thức ăn, sản phẩm có chức năng và được phẩm nhằm mục đích tác động đến sức khỏe của con người và động vật.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học và cụ thể là, đến các chủng probiotic của vi khuẩn axit lactic và chế phẩm chứa đa vi khuẩn, mà thu được nhờ các chủng này. Sáng chế cũng đề cập đến các tác dụng có lợi cho sức khỏe khác nhau của chế phẩm và việc sử dụng chế phẩm này làm phần bổ sung cho khẩu phần ăn để ngăn ngừa các bệnh khác nhau.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chế phẩm probiotic là các vi sinh vật sống có thể ăn được mà có tác dụng tích cực đối với sức khỏe của con người. Các chế phẩm probiotic nhiều nhất là vi khuẩn lactoza và/hoặc bifidobacteria. Chúng là các vi khuẩn không sinh bệnh có khả năng tạo thành khuẩn lạc trên đường dạ dày-ruột. Đã được thể hiện rằng vi khuẩn lactoza và bifidobacteria là các thành phần chính của hệ thực vật nhỏ của người (khu hệ vi sinh vật). Các đại diện của hai giống này có khả năng tạo khuẩn lạc lớp niêm mạc của ruột kết và tác động đến sự duy trì nội cân bằng của hệ sinh thái trong ruột. Sự có mặt của chúng kết hợp với các tác dụng có lợi cho sức khỏe như sự ngăn chặn các vi sinh vật gây hại, cải thiện sự tiêu hóa, tác dụng kích thích miễn dịch, giảm sự không nạp của lactoza, giảm cholesterol huyết thanh, ngăn ngừa bệnh tiêu chảy và các bệnh khác. Một số chủng trong số các vi khuẩn lactoza tạo ra peptit có hoạt tính sinh học mà có tác dụng chống chứng tăng huyết áp cũng như tác dụng hấp thụ canxi và magie. Nói chung, các tác dụng probiotic không liên quan đến các giống *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*, nhưng là đặc hiệu của chúng. Để chứng minh các tác dụng có lợi, sự nhận dạng chính xác các loài và các chủng được thực hiện trong nghiên cứu. Nhiều tác dụng có lợi cho sức khỏe được bảo đảm sau khi tiêu thụ các sản phẩm chứa các chủng probiotic. Dưới đây là các lợi ích quan trọng nhất được liệt kê:

- Tác dụng có lợi đối với khu hệ thực vật trong ruột bằng cách kích thích các vi khuẩn có lợi và ngăn chặn các vi sinh vật gây hại

Vài chủng của vi khuẩn axit lactic tạo ra bacterioxin, mà tiêu diệt các vi sinh vật gây hại như *Clostridium tyrobutiricum*, *St. aureus*, *Listeria monocytogenes* và các vi sinh vật khác.

- Sự sản xuất ra các axit béo mạch ngắn

Trong cơ thể người khỏe mạnh sản xuất ra khoảng 400mM axit béo mạch ngắn/ngày, nhưng quan trọng nhất là axit axetic, axit propionic và axit butyric. Chúng tác động một cách có lợi đến độ pH trong ruột. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng butyrat làm giảm nguy cơ phát triển bệnh ung thư ruột kết bằng cách ức chế tác dụng độc tố gen của nitrosamin và hydro peroxit. Hơn nữa, axit butyric gây chết tế bào theo lập trình ở tế bào khối u của ruột kết. Axit béo làm giảm sự biểu hiện của xytokin tiền viêm $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6.

- Sự kích thích của đáp ứng miễn dịch thông qua sự điều hòa miễn dịch và sự tăng cường miễn dịch di truyền

Vi khuẩn probiotic điều chỉnh sự cân bằng nhạy giữa đáp ứng miễn dịch thiết yếu và quá mức. Các chủng probiotic mà dẫn đến sự kích thích cảm ứng IL-10 là thích hợp đối với người mắc bệnh viêm ruột kết. Tác dụng điều hòa miễn dịch là đặc hiệu của chủng. Vài chủng trong số các vi khuẩn lactoza và bifidobacteria, một số trong số chúng dẫn đến sự giảm $TNF\alpha$ và tăng IL-10 (McCarthy, 2003), được thử nghiệm.

- Sự cải thiện sự hấp thụ chất dinh dưỡng ở sinh vật lớn

Vi khuẩn lactoza và bifidobacteria có hoạt tính beta-galactosidaza, do đó làm giảm nồng độ lactoza. Hoạt tính này là có lợi đối với người mắc bệnh không dung nạp lactoza. Sự sản xuất phức hợp vitamin B bởi một số chủng bifidobacteria là đáng kể và được lưu ý trên đây. Vi khuẩn lactoza góp phần vào sự phân hủy protein thông qua phức hợp phân giải protein của nó và do đó tạo thuận lợi cho sự hấp thụ protein bởi con người. Một số bifidobacteria có thể đồng hóa nitơ vô cơ và tiếp theo có thể làm giảm nồng độ của amoniac, mà có thể là chất gây bệnh ung thư ở nồng độ cao.

- Tác dụng chống oxy hóa

Sự tích tụ gia tăng của các gốc oxy trong mô có thể gây tổn hại cho tế bào. Sự hình thành oxy hoạt tính có thể được kết hợp với các yếu tố như sử dụng một số dược chất, sự tiêu thụ rượu gia tăng, tâm trạng căng thẳng và các yếu tố khác. Sự oxy hóa

gia tăng được kết hợp với một số rối loạn tiêu hóa cũng như tuổi tác, chứng xơ cứng động mạch, các bệnh ung thư, v.v. Cơ thể có vài yếu tố bảo vệ kháng oxy độc, nhưng nó quan trọng để tiêu thụ các chất chống oxy hóa để cải thiện chức năng của các hệ này. Một số vi sinh vật có enzym chống oxy hóa như SOD (Superoxid dismutaza), các enzym catalaza, các enzym glutathion reductaza và các enzym khác.

- Sự giảm cholesterol huyết thanh

Cholesterol được tổng hợp bởi tế bào trong ruột và được giải phóng vào trong ruột. Phần khác của cholesterol là từ sự tiết của mật và thức ăn. Khu hệ vi sinh vật tác động đến nồng độ cholesterol. Một số vi sinh vật làm thoái hóa các muối mật, sử dụng taurin và glyxin. Do đó, sự tuần hoàn của muối mật bị nghẽn và gan phải huy động cholesterol bên ngoài để tổng hợp muối mật mới, mà dẫn đến làm giảm cholesterol huyết thanh. Gilliland et al. (1985) đã nghiên cứu khả năng của chủng *L. acidophilus* để đồng hòa cholesterol.

- Sự tiết peptit có hoạt tính sinh học có hoạt tính chống chứng tăng huyết áp và các peptit cải thiện sự hấp thụ của canxi và magie.

Bằng cách phá vỡ protein sữa, vi khuẩn axit lactic giải phóng peptit có trọng lượng phân tử thấp. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng một số trong số chúng ức chế enzym chuyển hóa angiotensin (angiotensin-converting enzyme-ACE). ACE chia tách dipeptit từ angiotensin I, chuyển hóa nó thành angiotensin II (tác nhân gây co mạch mà cảm ứng sự sản xuất aldosteron), mà dẫn đến sự gia tăng nồng độ của ion natri và huyết áp. Tác dụng được nghiên cứu tốt nhất là tác dụng chống chứng tăng huyết áp của oligopeptit Ile-Pro-Pro và Val-Pro-Pro mà được giải phóng trong hoạt tính phân giải protein của một số chủng *L. helveticus*. Chúng gây ra sự ức chế mạnh của ACE. Tác dụng chống chứng tăng huyết áp được xác nhận trong các thử nghiệm lâm sàng.

Hiện nay, có vài chế phẩm probiotic có bán trên thị trường mà được sử dụng một cách thành công, ví dụ *L. rhamnosus* GG (Saxelin M. Lactobacillus GG - a human probiotic strain with thorough clinical documentation. Food Rev Int 1997, 13:293-313). Chế phẩm probiotic dùng trong công nghiệp khác là *L. fermentum* 39, được sử dụng đối với sự ổn định hóa của khu hệ thực vật nhỏ trong ruột trong sự mất cân bằng vi sinh vật (1).

Có chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* ME3, có hoạt tính SOD và hoạt tính kháng mầm bệnh (Mikelsaar et al., 2007).

Ví dụ, các tài liệu tham khảo 3 và 4 bộc lộ chủng *Lb. gasseri* và các vi khuẩn lactoza khác để dùng cho các chế phẩm probiotic và các ứng dụng liên quan đến sức khỏe. Tài liệu tham khảo 5 bộc lộ sự bám dính vào tế bào HT-29 của một vài chủng *L. plantarum*.

Vấn đề quan tâm là việc nhận dạng và chọn lọc các chủng probiotic của vi khuẩn axit lactic và sử dụng chúng để tạo ra sản phẩm chứa đa vi khuẩn mà có nhiều đặc tính có lợi, như sự sống sót cao trong đường dạ dày-ruột, tác dụng chống oxy hóa, sự dính bám mạnh vào lớp biểu mô của ruột kết, khả năng giảm cholesterol, tác dụng điều hòa miễn dịch và chống viêm, hoạt tính ức chế ACE.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhận dạng và chọn lọc các chủng của vi khuẩn axit lactic probiotic có các đặc tính có lợi cho sức khỏe, mà sẽ được sử dụng để tạo ra chế phẩm probiotic mà có sự tổ hợp gồm các tác dụng chức năng.

Chế phẩm probiotic, mà là mục đích của sáng chế, là tổ hợp chứa đa vi khuẩn gồm có ba chủng probiotic của vi khuẩn axit lactic: *Lactobacillus gasseri* 7/12, được lưu trữ với No. 8720 ở Ngân hàng vi sinh vật dùng trong công nghiệp và nuôi cấy tế bào quốc gia (National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures-NBIMCC), *Lactobacillus plantarum* F12, được lưu trữ với No. 8722 ở NBIMCC và *Lactobacillus helveticus* A1, được lưu trữ với No. 8721 ở NBIMCC. Sản phẩm có nhiều lợi ích cho sức khỏe: tác dụng chống oxy hóa; giảm nồng độ cholesterol do sự thủy phân muối mật và sự hấp thụ trực tiếp cholesterol; tác dụng điều hòa miễn dịch chống viêm nhờ sự giảm nồng độ xytokin tiền viêm “interleukin-8”; khả năng giải phóng các peptit có hoạt tính sinh học ức chế enzyme có thể đáp ứng với huyết áp cao (ACE).

Mục đích của sáng chế cũng là các chủng mới *Lactobacillus gasseri* 7/12, NBIMCC No. 8720, *Lactobacillus plantarum* F12, NBIMCC No. 8722 và *Lactobacillus helveticus* A1, NBIMCC No. 8721, và các đặc tính có lợi của chúng.

Chủng probiotic *Lactobacillus plantarum* F12, NBIMCC No. 8722, có hoạt tính chống oxy hóa và sự dính bám đáng kể và tế bào biểu mô.

Chủng probiotic *Lactobacillus gasseri* 7/12, NBIMCC No. 8720, có nhiều đặc tính hữu ích sau đây: sự sống sót cao trong đường dạ dày-ruột, sự dính bám mạnh lớp biểu mô của ruột kết, khả năng làm giảm cholesterol và các tác dụng chống viêm bằng cách làm giảm nồng độ của xytokin tiền viêm “interleukin-8”.

Chủng probiotic *Lactobacillus helveticus* A1, NBIMCC No. 8721, có tác dụng chống ACE mạnh.

Mục đích của sáng chế là sử dụng các chủng probiotic mới và chế phẩm chứa đa vi khuẩn probiotic trong công nghiệp dược phẩm và thức ăn để ngăn ngừa các bệnh quan trọng về mặt xã hội như: chứng tăng huyết áp, chứng xơ cứng động mạch và bệnh tăng cholesterol huyết, các quy trình miễn dịch và viêm bị suy yếu trong đường ruột, sự cân bằng bị rối loạn trong hệ thực vật nhỏ trong ruột.

Lactobacillus gasseri 7/12, NBIMCC No. 8720, và *Lactobacillus plantarum* F12, NBIMCC No. 8722, được phân lập từ đường ruột của người tự nguyện khỏe mạnh. *Lactobacillus helveticus* A1, NBIMCC No. 8721, được phân lập từ pho mát trắng tự chế, mà chứng minh tình trạng GRAS của chúng (thường được nhận biết là an toàn). Sự hội nhập của các loài và sự giống nhau của các chủng của ba chủng được thiết lập thông qua các phương pháp dựa trên ADN chính xác (2) tạo trình tự gen 16S ribosom, ARDRA, điện di xung, AFLP.

Việc nhận dạng kiểu hình của ba chủng được thực hiện bằng cách sử dụng Hệ API 50 CHL (BioMerieux, France).

Các chủng được nhận dạng về mặt phân tử bằng các phương tiện AFLP và điện di xung. Hai phương pháp phân tử chủ yếu, mà được sử dụng đối với sự nhận dạng của ba chủng và thu được hình dạng ADN đặc hiệu chủng của chúng, được mô tả trong ấn phẩm được kể đến trên đây (Dimitrov Zh. Et al., 2008). Trong Fig.1 là hình dạng ADN điện di xung được thể hiện của *Lactobacillus plantarum* F12, NBIMCC No. 8722, trong Fig.2 – hình dạng ADN điện di xung của *Lactobacillus gasseri* 7/12, NBIMCC No. 8720, và trong Fig.3 – hình dạng ADN điện di xung của *Lactobacillus helveticus* A1, NBIMCC No. 8721.

Lactobacillus plantarum F12, NBIMCC No. 8722, tạo ra khuẩn lạc S màu trắng với kích cỡ từ 1 đến 2mm. Tế bào vi khuẩn là ngắn (từ 0,9 đến 1,2 X từ 3 đến 8um) với các góc tròn. Môi trường nuôi cấy chính là nước dùng MRS và thạch (OXOID). Việc nhận dạng được thực hiện theo Bergey's Manual (2009) bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu Api web (API 50CHL strip) và cơ sở dữ liệu MicroLog M5.1.1 (Biolog AN Microplate). Hình dạng ARDRA là đặc trưng đối với chủng *L. plantarum*. Hình dạng của protein tế bào có thể hòa tan là giống với hình dạng của *L. plantarum* (ATCC). Nó phát triển trong nước dùng MRS sau khi cấy truyền với 0,1%. Việc nuôi cấy được thực hiện ở 37°C trong khoảng từ 18 đến 24 giờ. Môi trường nước dùng và không khí không cần thiết phải kỵ khí hóa sơ bộ bất kỳ trong khi nuôi cấy. Chủng phát triển trong 48 giờ trong môi trường kỵ khí trên thạch MRS.

Lactobacillus gasseri 7/12, NBIMCC No. 8720, tạo ra khuẩn lạc S màu trắng với kích cỡ từ 1 đến 2mm. Tế bào vi khuẩn là ngắn (từ 0,6 đến 0,8 X từ 3,0 đến 5,0um) với các góc tròn. Môi trường nuôi cấy chính là nước dùng MRS và thạch (OXOID). Chủng được nhận dạng theo Bergey's Manual (2009) bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu Api web (API 50CHL strip) và cơ sở dữ liệu MicroLog M5.1.1 (Biolog AN Microplate). Hình dạng ARDRA là đặc trưng đối với chủng *L. gasseri*. Hình dạng của các protein tế bào có thể hòa tan là giống với hình dạng của chủng *L. gasseri* 33323 (ATCC). *Lactobacillus gasseri* 7/12 được phát triển trên nước dùng MRS sau khi cấy truyền với 0,1%. Việc nuôi cấy được thực hiện ở 37°C trong khoảng từ 18 đến 24 giờ. Môi trường nước dùng và không khí không cần thiết phải kỵ khí hóa sơ bộ bất kỳ trong khi nuôi cấy. Chủng phát triển trong 48 giờ trong môi trường kỵ khí trên thạch MRS.

Lactobacillus helveticus A1, NBIMCC No. 8721, tạo ra khuẩn lạc R màu trắng với kích cỡ nằm trong khoảng từ 1 đến 2mm. Tế bào vi khuẩn có chiều dài nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0um. Môi trường nuôi cấy cơ bản là nước dùng MRS và thạch (OXOID) và sữa không kem vô trùng đối với các mục đích của vi sinh vật, nguyên liệu khô 10% (OXOID). Chủng được nhận dạng theo Bergey's Manual (2009) bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu Api web (API 50CHL strip) và cơ sở dữ liệu MicroLog M5.1.1 (Biolog AN Microplate). Hình dạng ARDRA là đặc trưng đối với *L. helveticus*. Hình dạng của các protein tế bào có thể hòa tan là giống với hình dạng của chủng *L. helveticus* 15009 (ATCC). *Lactobacillus helveticus* A1 được phát triển trên

nước dùng MRS sau khi tiêm truyền với 0,1%. Việc nuôi cấy được thực hiện ở 37°C trong khoảng từ 18 đến 24 giờ. Môi trường nước dùng và không khí không cần thiết phải kỵ khí hóa sơ bộ bất kỳ trong khi nuôi cấy. Chúng phát triển trong 48 giờ trong môi trường kỵ khí trên thạch MRS. Chúng phát triển trên sữa không kem vô trùng sau khi cấy truyền với 0,1% và được nuôi cấy ở 37°C trong từ 18 đến 24 giờ.

Các đặc tính chức năng của chủng *Lactobacillus plantarum* F12, NBIMCC No. 8722

- Xác định tác dụng chống oxy hóa

Chủng *L. plantarum* F12 có các đặc tính chống oxy hóa và như vậy nó được chọn từ trong số nhiều hơn 400 vi khuẩn lactoza. Để thực hiện việc chọn lọc, theo các đặc tính chống oxy hóa, các chủng được ủ trong nước dùng MRS trong 24 giờ và ly tâm ở 3500g trong 10 phút ở 4°C. Sau khi rửa bằng dung dịch nước muối, tạo huyền phù lại tế bào trong 1,15% KCl đến 1×10^9 tế bào trong 1ml. Huyền phù tế bào được cho vào siêu âm (Branson B-12 Sonic power Company) trong 5 phút trong bể nước đá, tiếp theo 10 phút lưu lại ở -20°C. Huyền phù được ly tâm ở 10.000g trong 10 phút ở 4°C. Dịch nổi được sử dụng như phần chiết không chứa tế bào. Ba loại hoạt tính được xác định:

- Tổng hoạt tính chống oxy hóa - ORAC

Phương pháp chính để xác định tổng hoạt tính chống oxy hóa là ORAC (Oxygen radical absorbance capacity). Kết quả được thể hiện theo các đương lượng TROLOX 10^9 tế bào vi sinh vật. Phương pháp Cao *et al* (1995) được sử dụng. Nguyên lý là như sau: chất nền OI-phycoerythrin (Sigma Chemical Co.) được cho vào chất oxy hóa bởi máy phát điện gốc 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihydroclorua (AAPH; Waco Chemical USA). Dung dịch tiêu chuẩn TROLOX (axit 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic, Trolox; Aldrich) được tạo ra bằng cách hòa tan 5mg chất nền trong 200ml 0,2M chất đệm phosphat (dung dịch lưu trữ). Dung dịch thử nghiệm thu được bằng cách trộn 1ml dung dịch lưu trữ với 9ml chất đệm phosphat.

Với sự có mặt của mẫu có các đặc tính chống oxy hóa, sự oxy hóa phycoerythrin được giảm đến một số phạm vi. Sự huỳnh quang tương đối được đo bằng cách sử dụng sóng có chiều dài lần lượt là 535nm (kích thích) và 595nm (phát ra), trong khoảng thời gian 60 phút. Công thức sau đây được sử dụng:

$$\text{Giá trị ORAC} = X K (S_{\text{mẫu}} - S_{\text{trắng}}) / (S_{\text{TROLOX}} - S_{\text{trắng}})$$

trong đó, X là thể tích mẫu tính theo microlit và K là hệ số của dung môi. S - diện tích của đường cong huỳnh quang.

- Hoạt tính chống gốc chung

Các chất mà bắt giữ các gốc tự do được xác định đối với mỗi trong số các chủng dựa trên mức độ giảm cường độ nhuộm màu của hợp chất 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazin (DPPH). Độ bền của hoạt tính bắt giữ gốc là tỷ lệ với mức độ phai màu của màu tía của DPPH. Sữa được lên men với chủng tương ứng được ly tâm và dịch nổi được chiết bằng diethyl ete. Quy trình tiếp theo bay hơi lớp ete và hòa tan phần còn lại trong metanol. Thể tích gồm 0,1ml dung dịch này được trộn với 1,4ml dung dịch DPPH (40µg/ml trong metanol). Hoạt tính bắt giữ gốc được xác định như sự khác nhau về chất hấp thụ ở 517nm giữa mẫu trắng và mẫu [$A_{517}(\text{trắng}) - A_{517}(\text{mẫu})$].

- Hoạt tính SOD

Thử nghiệm được thực hiện theo Chang & Hasan, 1997. Các chủng được phát triển trên nước dùng (M17 đối với streptococci, MRS đối với vi khuẩn lactoza) và sau khi cấy truyền, ly tâm môi trường nuôi cấy, rửa bằng chất đệm phosphat với 0,1mM EDTA, độ pH = 7,8, được tạo huyền phù lại trong cùng chất đệm và sau đó siêu âm. Được ly tâm ở 17000g và thẩm tách đối với chất đệm phosphat trên đây trong 24 giờ. Được ly tâm lần nữa ở 20000g. Tổng nồng độ protein của phần chiết không chứa tế bào được xác định theo Lowry. Các hoạt tính enzym được xác định bằng cách sử dụng kit thử nghiệm đặc biệt (SIGMA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. SOD được xác định bằng phương pháp xytochrom C trong hệ enzym được tiếp hợp với xanthin oxidaza. Nguyên lý là: xanthin oxidaza oxy hóa xanthin trong khi xytochrom C được khử. Với sự có mặt của mẫu có hoạt tính SOD, việc khử xytochrom C được ức chế đến một số phạm vi, bởi vì hai proton gắn kết với gốc superoxit từ SOD thay cho được chuyển vào xytochrom C.

Bảng 1 thể hiện các kết quả của việc xác định các hoạt tính chống oxy hóa khác nhau: tổng hoạt tính chống oxy hóa bởi thử nghiệm ORAC, tổng hoạt tính chống gốc và hoạt tính SOD.

Bảng 1

Hoạt tính	Tế bào nguyên vẹn	Phần chiết không chứa tế bào
Tổng hoạt tính chống oxy hóa ORAC, trolox đương lượng/ 10^9 tế bào	1488 ± 72 n=5	1764 ± 110 n=5
Tổng hoạt tính chống gốc, $A_{517}(\text{trắng}) - A_{517}(\text{mẫu})$	$0,19 \pm 0,02$ n=5	$0,32 \pm 0,04$ n=5
Hoạt tính superoxit dismutaza		$38,4 \pm 2,4$ U/mg protein n=3

Tổng hoạt tính chống oxy hóa đáng kể được phát hiện ở tế bào nguyên vẹn của chủng *L. plantarum* F12, cũng như trong phần chiết không chứa tế bào. Theo hoạt tính SOD, phần chiết không chứa tế bào của chủng này vượt trội hơn tất cả các vi khuẩn lactoza được thử nghiệm từ các loài vi khuẩn khác nhau.

- Xác định sự dính bám đối với tế bào biểu mô

Cacsa dòng tế bào biểu mô Caco-2 và HT29 được nuôi cấy như các lớp đơn trong môi trường DMEM (Môi trường Eagle được biến đổi Dilbecco, Gibco, UK), được làm đầy với huyết thanh bào thai bò 10%. Nhiệt độ ủ là 37°C trong không khí bão hòa nước chứa CO_2 5%. Ở khoảng 90% lớp đơn được xây dựng, tế bào trải qua sự chuyển qua ủ với trypsin 0,25% và 10mM dung dịch EDTA trong 10 phút ở 37°C . Để xác định sự dính bám, tế bào có nhân thật được tạo hạt trong đĩa nuôi cấy nhóm 6 giếng ở nồng độ 2×10^5 tế bào/ml. Môi trường được thay đổi cứ mỗi 2 ngày trong tổng số 10 ngày trong khi lớp đơn được xây dựng (từ 3 đến 4 ngày) và các thụ thể tế bào là đang trưởng thành. Sau khi dính bám, các lớp đơn được rửa hai lần bằng chất đệm PBS. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn ở nồng độ 10^8 tế bào/ml trong 2ml DMEM mà không cần thuốc kháng sinh được bổ sung vào các lớp đơn. Việc ủ trong 60 phút ở 37°C trong không khí bão hòa chứa CO_2 5% là được thực hiện. Sau đó, rửa các giếng năm lần bằng PBS và được cố định với metanol trong 3 phút. Tiếp theo, nhuộm Gram và đánh giá bằng kính hiển vi của sự dính bám được thực hiện. Đếm số lượng vi khuẩn được dính bám vào 20 tế bào biểu mô. Thử nghiệm bao gồm báo cáo của 10 trường kính hiển vi.

Fig.4 là bức ảnh của sự dính bám của chủng *L. plantarum* F12 vào tế bào biểu mô Caco-2. Các kết quả của sự dính bám của chủng, được biểu diễn như số lượng vi khuẩn trung bình được dính bám vào tế bào có nhân thật, được thể hiện trong Bảng 2. Thử nghiệm được thực hiện ba lần để đánh giá sự dính bám lần lượt đối với cả hai dòng tế bào Caco-2 và HT-29, và kết quả được tính trung bình.

Bảng 2

Chủng	Số lượng vi khuẩn trung bình được dính bám vào tế bào có nhân thật Caco-2	Số lượng vi khuẩn trung bình được dính bám vào tế bào có nhân thật HT-29
<i>L. plantarum</i> F12	25	29

Các đặc tính chức năng của chủng *L. gasseri* 7/12, NBIMCC No. 8720

- Xác định sự dính bám đối với tế bào biểu mô

Phương pháp được thể hiện trên đây. Fig.5 thể hiện bức ảnh của sự dính bám của chủng *L. gasseri* 7/12 vào tế bào biểu mô Caco-2. Kết quả của sự dính bám của chủng, được biểu diễn như số lượng vi khuẩn trung bình được dính bám vào tế bào có nhân thật, được thể hiện trong Bảng 3. Thử nghiệm được thực hiện ba lần để lần lượt đánh giá sự dính bám đối với cả hai dòng tế bào Caco-2 và HT-29, và các kết quả được tính trung bình.

Bảng 3.

Chủng	Số lượng vi khuẩn trung bình được dính bám vào tế bào có nhân thật Caco-2	Số lượng vi khuẩn trung bình được dính bám vào tế bào có nhân thật HT-29
<i>L. gasseri</i> 7/12	20	22

- Xác định tác dụng điều hòa miễn dịch chống viêm

Việc tăng cường sự cảm ứng của xytokin viêm là không mong muốn ở mức cao ở người mắc bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease-IBD). Sự tổng hợp xytokin viêm được ức chế bởi peptit báo hiệu Interleukin 10 (IL-10), mà được tạo ra bởi tế bào T hỗ trợ chuyên cần hoặc đại thực bào. Dòng tế bào bạch cầu đơn nhân của người U-937 được chứng minh là thích hợp không chỉ đối với sự đánh giá sự cảm ứng TNF- α và IL-1 độc tế bào, mà cũng thích hợp trong việc xác định sự cảm ứng của peptit báo hiệu IL-10.

Việc xác định số lượng của thể biểu hiện của hai peptit báo hiệu TNF- α và IL-10 của tế bào thể hiện kháng nguyên được sử dụng để đo tác dụng điều hòa miễn dịch: các đại thực bào được biệt hóa của dòng tế bào bạch cầu đơn nhân của người U-937 (ATCC). Việc duy trì dòng tế bào này được thực hiện ở 37°C và CO₂ 5% trên môi trường RPMI 1640 (ATCC 30-2001), chứa huyết thanh bào thai bò 10% (ATCC 30-2020), 4,5g/l glucoza, 10mM HEPES, 1mM natri pyruvat, 2mM L-glutamin, 1,5g/l natri bicarbonat, 100U/ml penixilin, 100 μ g/ml streptomycin. Được duy trì trong khoảng từ 2×10^5 đến 1×10^6 tế bào/mililit. Khi đạt đến mật độ khoảng 1×10^6 , tế bào được ly tâm và đổi mới môi trường. Hàm lượng tế bào, mà được báo cáo bởi tế bào kế, là 2×10^5 . Trong đĩa nuôi cấy nhóm 48 giếng, 1×10^6 tế bào/mililit (5×10^5 đối với giếng) có thể được biệt hóa thành đại thực bào với sự trợ giúp của 5 μ g/ml PMA (phorbol 12-myristat-13-axetat, SIGMA), được bổ sung vào môi trường phát triển trong 48 giờ trong tủ ấm CO₂. Rửa các đại thực bào được dính bám được biệt hóa hai lần bằng chất đệm PBS (nước muối được đệm phospat Dulbecco, GibcoBRL) và được ủ bằng môi trường sạch trong 48 giờ mà không cần PMA. Sau khi hít môi trường ở mỗi giếng với các đại thực bào được dính bám được bổ sung 0,5ml tế bào vi khuẩn với nồng độ 1×10^6 /ml, được tạo huyền phù trong môi trường phát triển của đại thực bào. Ủ tế bào trong 24 giờ trong tủ ấm CO₂.

- Đánh giá sự cảm ứng của peptit báo hiệu TNF- α

Việc đánh giá sự cảm ứng của peptit báo hiệu TNF- α của vi khuẩn axit lactic được thực hiện bằng ELISA kiểu bánh kẹp. Khi kết thúc ủ, dịch nổi được gom lại và được ly tâm để loại bỏ tế bào vi khuẩn và của người. 200 μ l dịch nổi thu được là được sử dụng đối với sự xác định TNF- α qua kit đặc biệt của R&D Systems (Human TNF- α /TNFSF1A Immunoassay, Cat. # DTA00C), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại: các đĩa miễn dịch được phủ với kháng thể đơn dòng kháng TNF- α của người, mà giữ TNF- α theo cách đặc biệt. Sau khi rửa, xử lý các giếng bằng kháng thể đa dòng kháng TNF- α , mà được kết nối với enzym Horseradish Peroxidaza. Tiếp theo, được bổ sung chất nền, hydro peroxit và tetrametylbenzidin và sau đó phản ứng enzym ở nhiệt độ trong phòng 20 phút ở bóng tối, làm ngừng phản ứng bằng axit sulfuric 2N. Đo sự hấp thụ ở 450nm. Đối với sự tính toán TNF- α , nồng độ là các tiêu chuẩn được sử dụng và đường cong tiêu chuẩn được vẽ.

- Đánh giá sự cảm ứng của peptit báo hiệu IL-6

Việc đánh giá sự cảm ứng của peptit báo hiệu IL-6 của vi khuẩn axit lactic được thực hiện bằng ELISA kiểu bánh kẹp. Nguyên lý của sự phát hiện này là tương tự với nguyên lý được mô tả trên đây. Trong khi đánh giá sử dụng kit ELISA phân tích kit và sau đó sự đánh giá số lượng được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Đánh giá sự cảm ứng của peptit báo hiệu IL-10

Việc đánh giá sự cảm ứng của peptit báo hiệu IL-10 của vi khuẩn axit lactic được thực hiện bằng ELISA kiểu bánh kẹp. Trong khi đánh giá sử dụng kit ELISA phân tích và sau đó việc đánh giá số lượng được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Việc đánh giá năm xytokin TGF- β , IL-8, IL-6, IL-10 và TNF α đối với mỗi trong số các chủng được phân lập được thực hiện ba lần. Bảng 4 đưa ra các kết quả cảm ứng trung bình đối với năm xytokin. Chủng *L. gasseri* 7/12, mà có sự dính bám ở mức độ vừa phải, là chủng chống viêm thành công nhất trong số các đối tượng khác. Đối tượng có mối tương quan tốt giữa IL-10 và TNF- α , sự giảm đáng kể IL-8 và TGF- β , và không có sự cảm ứng đáng kể của IL-6. Xytokin tiền viêm IL-8 được tổng hợp bởi tế bào biểu mô. Đối với việc đánh giá là các dòng tế bào Caco-2 và HT-29 được sử dụng. Hàm lượng IL-8 gia tăng có thể dẫn đến hoạt tính của tế bào bạch cầu trung tính gia tăng và do đó đối với các vấn đề viêm ở ruột kết. Việc phát hiện các chủng mà có khả năng làm giảm hàm lượng IL-8 là hầu như đối với sự thiết lập chế phẩm chứa vi khuẩn để ngăn ngừa các bệnh viêm của đường dạ dày-ruột. Chủng *L. gasseri* 7/12 là có giá trị trong khía cạnh này. Các kết quả của sự kích thích tế bào biểu mô với *L. gasseri* 7/12 được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 4

Chủng	IL-10 ng/ml	TNF- α ng/ml	TGF- β ng/ml	IL-6 ng/ml
đối chứng (U-937)	0,10	0,2	0,88	27,2
<i>L. gasseri</i> 7/12	2,3	0,7	0,82	28,7

Bảng 5

Chủng	IL-8 ng/ml	TGF- β ng/ml
đối chứng (HT-29)	8,7	0,37
<i>L. gasseri</i> 7/12	6,2	0,30

- Xác định khả năng làm giảm nồng độ cholesterol

Hoạt tính hydrolaza muối mật (BSH)

Các chủng được phát triển trong các điều kiện tối ưu trong môi trường nước dùng như được nêu trên đây, nhưng trong nước dùng được bổ sung hai muối mật quan trọng nhất: natri taurocholat (TCA) và natri glycocholat (GCA). Nồng độ của các muối là 1mM. Chúng được bổ sung vào sau khi làm vô trùng bằng vi lọc nước dùng. Lượng cấy truyền là 1% và thời gian ủ là 24 giờ. Nước dùng không được cấy truyền được sử dụng làm đối chứng. Hoạt tính BSH được đo như các nanomol được khử tiếp hợp TCA và GCA trong 1 phút. Việc xác định là sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Cột được sử dụng là cột Ultrasphere ODS, 80 angstrom, 15cm, 3µm đường kính của hạt lọc. Cấu hình được sử dụng là bộ dò SHIMADZU UV ở 210nm. Axit mật tự do và được tiếp hợp được phát hiện ở cách thức pha ngược gradient. Dung môi A là metanol 65% trong 0,03M natri axetat ở độ pH = 4,3, được điều chỉnh bằng axit phosphoric. Dung môi B là metanol với chất lượng HPLC. Chương trình rửa giải là bước chính thể đồng quyền trong 8 phút ở 15% rửa giải B và sau đó gradient tuyến tính đến 85% trong 17 phút. Quy trình được tiếp theo bước chính thể đồng quyền trong 5 phút ở 85%. Thể tích được tiêm là 10µl. Giá trị hoạt tính BSH được biểu diễn theo các micromol axit cholin (CA) được giải phóng từ 1010 tế bào/phút và thời gian ủ 24 giờ.

- Sự giảm cholesterol trực tiếp

Các chủng được cấy truyền ở nồng độ 1% trong môi trường tương ứng trong 24 giờ. Môi trường nước dùng chứa 0,3% Oxgal và 100µg cholesterol hòa tan trong nước/ml (cholesterol-PEG600, SIGMA). Sau khi ủ, tạo viên tế bào bằng cách ly tâm và 0,5ml dịch nổi được xử lý bằng 4ml metanolic 2M KOH bằng cách gia nhiệt trong 20 phút ở 80°C. Chiết hỗn hợp bằng 5ml hexan và chuyển 4ml lớp hexan vào ống thử nghiệm và được bay hơi với nitơ ở 60°C. Hòa tan phần còn lại khô trong 0,5ml isopropanol và hàm lượng cholesterol được xác định bằng kit phân tích của Boeringer Mannheim. Mức độ giảm cholesterol được xác định dựa trên môi trường đối chứng không được cấy truyền.

Hai hoạt tính chính có liên quan đến việc giảm cholesterol được thử nghiệm – làm giảm trực tiếp hàm lượng cholesterol và giảm cholesterol gián tiếp của cholesterol huyết thanh là kết quả của hoạt tính khử tiếp hợp kháng các muối mật (BSH). Theo sự

loại bỏ trực tiếp cholesterol, chủ yếu là do sự hấp phụ vào các thành phần vách tế bào vi sinh vật, cholesterol còn lại được đo như được mô tả trong phần phương pháp luận. Việc đo nồng độ cholesterol được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym. Việc đo được thực hiện ba lần và các kết quả được tính trung bình. Bảng 6 thể hiện các kết quả của hoạt tính kháng cholesterol trực tiếp được biểu diễn như tỷ lệ phần trăm giảm cholesterol.

Bảng 6

Chủng	% cholesterol giảm
<i>L. gasseri</i> 7/12	36,2

Hoạt tính khử tiếp hợp BSH tác động một cách trực tiếp đến nồng độ cholesterol huyết thanh. Các chủng có hoạt tính BSH thủy phân muối đường và sau đó các axit mật được khử tiếp hợp được chuyển vào lõi ra của đường ruột. Các muối mật được tái tuần hoàn trong cơ thể và sau đó sự giảm nồng độ của chúng trong gan, một phần cholesterol được chuyển đổi để sản xuất axit mật và tiếp theo là muối mật (axit mật tiếp hợp với axit amin taurin và glyxin). Thay cho tất cả, nồng độ cholesterol huyết thanh được mong đợi giảm. Trong Bảng 7 đưa ra các kết quả của hoạt tính BSH của *L. gasseri* 7/12 sau khi thử nghiệm ba lần và tính trung bình các kết quả.

Bảng 7

Chủng	% khử tiếp hợp của muối mật
<i>L. gasseri</i> 7/12	60,1

Các đặc tính chức năng của chủng *L. helveticus* A1, NBIMCC No. 8721

Xác định khả năng đối với sự tiết peptit ức chế ACE có hoạt tính sinh học

- Hoạt tính ức chế ACE

Các chủng được tinh chế với chỉ không kem 9% ở 37°C. Sau khi điều chế mẫu (5000g, 10 phút). Dịch nổi được Quy trình được cho phép bằng cách t 0,1% và sau đó bay hơi và tổ chức lạ loãng của nó được phân tích đối với s

Tổng phần chiết peptit được tạo ra. Phản ứng enzym được thực hiện bằng thử nghiệm thông thường, nhưng bằng cách sử dụng các pha loãng khác nhau của phần chiết peptit như thể tích của chúng là 20 μ l. Dung dịch enzym là 40 μ l với hoạt tính 0,1U/ml. Hòa tan chất nền hipuril-histidil-leuxin trong chất đệm borat ở độ pH = 8,3 và có thể tích 190 μ l. Nồng độ cuối cùng của chất nền là 6mM và nồng độ của natri clorua là 300mM. Phản ứng được thực hiện ở 37°C trong 30 phút. Sự dích được thực hiện với 100 microlit 4n HCl và việc chiết axit hippuric tự do được thực hiện với 1ml etyl axetat. Sau khi làm bay hơi dung môi, hòa tan phần còn lại trong 1ml nước và được thử nghiệm về mặt phổ quang kế ở 228nm.

Tỷ lệ phần trăm ức chế của enzym ACE được tính theo công thức:

$$\frac{B-A}{B-C} * 100$$

trong đó, A là chất hấp thụ trong phản ứng cao hơn, C là chất hấp thụ mà không cần enzym, B là chất hấp thụ mà không cần sự bao gồm của phần chiết peptit.

Biểu đồ được tạo cấu trúc và trục hoành thể hiện microlit của phần chiết peptit - 20, 10, 5, và trên trục tung thể hiện sự ức chế theo tỷ lệ phần trăm. Cường độ của tác dụng ức chế được xét đến về mặt biểu đồ như thể tích của phần chiết peptit mà gây ra sự ức chế 50% enzym ACE. Thể tích nhỏ hơn gợi ý khả năng ức chế ACE lớn hơn của sản phẩm. Bảng 8 cung cấp hoạt tính peptidaza quan trọng của chủng *L. helveticus* A1, mà ở mức độ lớn dựa trên khả năng của chủng này giải phóng peptit có hoạt tính sinh học. Bảng 9 cung cấp hoạt tính ức chế ACE của *L. helveticus* A1 theo % ức chế ACE, được làm tròn đến số nguyên gần nhất.

Bảng 8

Chủng	Amino-peptidaza N (PepN)	X-prolyl-amino-peptidaza (PepX)	Glu-amino-peptidaza (PepA)	Pro-imino-peptidaza (PIP)	Oligo-peptidaza	Endo-peptidaza	Proteaza
<i>L. helveticus</i> A1	690	405	3	14	7	2	10

Bảng 9

Chủng	% ức chế ACE
<i>L. helveticus</i> A1	88%

Đối với *L. helveticus* A1 được vẽ biểu đồ (Fig.5), mà xác định tác dụng ức chế của các pha loãng 1/2 và 1/4 của dịch nổi được phân tích. Mục đích chính là để phát hiện cường độ của tác dụng kháng ACE đối với sự pha loãng các mẫu. Trên trục hoành thể hiện microlit của dịch nổi được sử dụng trong thử nghiệm và trục tung thể hiện tỷ lệ phần trăm ức chế ACE.

Các kết quả thể hiện rằng chủng *L. helveticus* A1 có tác dụng kháng ACE mạnh.

- Xác định trình tự của các peptit ức chế ACE từ chủng *L. helveticus* A1

Chế phẩm chứa phân chiết peptit được cô đặc

Dịch nổi của mỗi chủng được cho vào siêu lọc ly tâm qua hộp siêu lọc đặc biệt với cơ cấu cắt khối lượng phân tử 5000 Da. Các peptit kỵ nước có trọng lượng phân tử thấp và peptit kỵ nước trung bình, trong số chúng thường tìm kiếm các đại diện kháng ACE, là phần cô đặc trên hộp pha ngược. Cụ thể là, sau khi siêu lọc mẫu được bổ sung axit trifloaxetic đến 0,1% và chuyển hỗn hợp qua hộp. Các peptit được giữ lại. Sau khi rửa bằng TFA 0,1% tiếp theo tách rửa peptit có trọng lượng phân tử thấp với axetonitril 60% trong TFA 0,1%. Sau khi bay hơi, tạo huyền phù lại peptit trong axetonitril 10% trong TFA 0,1% và được phân li trên cột HPLC pha ngược điều chế Nucleosil C18. Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao SHIMADZU được trang bị với hai bơm, mô đun cột HPLC có khả năng duy trì nhiệt độ nhất định, bộ dò hấp thụ và bộ gom phân đoạn.

Để kiểm tra hoạt tính, tất cả phần cô đặc được đo đối với hoạt tính kháng ACE.

Sự cắt phân đoạn thô của phần cô đặc peptit sau khi chia tách sắc ký.

Các mẫu được tiêm vào cột HPLC, như được chỉ định trên đây, được cho vào cắt phân đoạn gradient pha ngược. Axetonitril gradient nằm trong khoảng từ 0% đến 80% trong TFA 0,1%. Peptit được phát hiện ở bước sóng 214nm. Bằng các phương tiện của bộ gom phân đoạn bắt giữ các phân đoạn 1ml. Sau khi cắt phân đoạn thô, các phân đoạn này được làm bay hơi trong hộp chân không và tạo huyền phù lại trong TFA 0,1%. Hoạt tính kháng ACE của các phân đoạn được thử nghiệm để được chọn lọc các

phân đoạn này mà có hoạt tính này. Sắc phổ mà thể hiện sự cắt phân đoạn thô của nồng độ peptit của chủng *L. helveticus* A1 được thể hiện trong Fig.6.

Cắt phân đoạn lại các phân đoạn được chọn để gom các peptit được tinh chế sau khi sắc ký pha ngược hiệu năng cao.

Sự cắt phân đoạn mịn theo phương pháp được thực hiện theo cùng nguyên lý như cắt phân đoạn thô – nghĩa là pha ngược, nhưng độ dốc của gradient là thoải hơn. Các điều kiện gradient đối với các phân đoạn của chủng *L. helveticus* A1 là từ 25 đến 35% axetonitril. Cột được sử dụng là Nucleodur Sphinx bán điều chế.

Trong Fig.7 thể hiện sắc phổ của các mẫu cắt phân đoạn loại pha ngược mịn của các phân đoạn peptit thô được chọn trước đối với chủng *L. helveticus* A1. Phân đoạn kháng ACE có hoạt tính sau khi thực hiện thử nghiệm enzym đối với sự ức chế ACE được đánh dấu bằng đường đậm nét. Bước cuối cùng đối với sự tinh chế các phân đoạn peptit được chọn là sự tinh chế qua cột HPLC trao đổi ion. Cột này là cột trao đổi cation có tính axit ở mức cao với các nhóm có hoạt tính ion benzensulfonat ở dạng lithi. Sự tách rửa là đạt được bởi gradient độ pH trong chất đệm xitrat ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 9,0.

Trong Fig.7 thể hiện sắc phổ của việc xử lý trao đổi ion đối với phân đoạn kháng ACE có hoạt tính được chọn trước của chủng *L. helveticus* A1. Với đường đậm nét là peptit đơn lẻ được đánh dấu có hoạt tính kháng ACE.

Tạo trình tự peptit

Nguyên lý của việc tạo trình tự là sơ đồ trình tự thủ công cổ điển với phenylisothioxyanat: bắt đầu với phenyl thioisoxyanat: tạo dẫn xuất ban đầu của đầu amino của peptit; cắt bỏ axit amin đầu N của dẫn xuất (CA) bằng cách sử dụng 100% axit trifloaxetic (TFA); chia tách nhờ sự chiết axit amin đầu N của dẫn xuất từ peptit còn lại; chuyển hóa axit amin đầu N thành dẫn xuất phenylthiohydantoin bằng cách xử lý với 40% (TFA); phân tích HPLC của axit amin PTH; chu trình tiếp theo đối với axit amin đầu N mới. Trong trường hợp của peptit kỵ nước nhỏ, bước chia tách nhờ chiết axit amin đầu N của dẫn xuất từ peptit còn lại là không thể thực hiện được. Điều này có thể được thực hiện bằng cách cố định sơ bộ đầu C của peptit với màng arylamin-PVDF. Do đó, peptit có thể được tạo trình tự với axit amin đầu C cuối cùng từ đầu N. Việc cố định peptit từ đầu COOH là có thể thực hiện được sau khi hoạt hóa đầu COOH bằng cách xử lý với EDC (etyl-dimetylaminopropyl carbodiimide) và phản ứng

tiếp theo của nhóm carboxyl được hoạt hóa với phân tử arylamin của màng. Bảng 10 là trình tự của các peptit kháng ACE được giải phóng bởi chủng *L. helveticus* A1

Bảng 10

Chủng	% hoạt tính kháng ACE	Trình tự peptit
<i>L. helveticus</i> A1	78,0	Ala-Leu-Pro-Met

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Hình dạng ADN đặc hiệu chủng điện di xung của *L. plantarum* F12 sau khi thủy phân bằng enzym *XhoI*. và xung lực từ 1 giây đến 12 giây trong 24 giờ ở 5 vôn/xentimet. Chất chỉ thị phân tử - λ -DNA HindIII (từ 0,1 đến 200 kbp).

Fig.2: Hình dạng ADN đặc hiệu chủng điện di xung của *L. gasseri* 7/12 sau khi thủy phân bằng enzym *ApaI*. và xung lực từ 2 giây đến 28 giây trong 24 giờ ở 5 vôn/xentimet. Chất chỉ thị phân tử - λ -Ladder DNA (từ 50 đến 1000 kbp).

Fig.3: Hình dạng ADN đặc hiệu chủng điện di xung của *L. helveticus* A1 sau khi thủy phân bằng enzym *SmaI*. và xung lực từ 5 giây đến 30 giây trong 26 giờ ở 5,2 V/cm. Chất chỉ thị phân tử - λ -Ladder DNA (từ 50 đến 1000 kbp) và λ -DNA HindIII (từ 0,1 đến 200 kbp).

Fig.4. Sự dính bám của *L. plantarum* F12 vào tế bào biểu mô Caco-2.

Fig.5. Biểu đồ của tác dụng ức chế ACE của *L. helveticus* A1. Trên trục hoành – μ l phần chiết peptit, trên trục tung - % ức chế ACE

Fig.6. Sự cắt phân đoạn thô của chất cô đặc peptit của *L. helveticus* A1

Fig.7. Tinh chế pha ngược mịn của phân đoạn peptit của sự cắt phân đoạn sơ bộ với hoạt tính kháng ACE cao nhất đối với chủng *L. helveticus* A1.

Fig.8. Tinh chế trao đổi ion của phân đoạn có hoạt tính của chu trình tinh chế trên đây đối với chủng *L. helveticus* A1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm chứa đa vi khuẩn chứa các chủng được làm đông khô gồm *Lactobacillus gasseri* 7/12, NBIMCC No. 8720, *Lactobacillus plantarum* F12, NBIMCC No. 8722, và *Lactobacillus helveticus* A1, NBIMCC No. 8721. Ba chủng được phát triển một cách riêng biệt trong các buồng lên men của phòng thí nghiệm, mỗi buồng 5 lit, đối với sự tích tụ sinh khối ở sữa làm môi trường, mà được thủy phân

thành kiềm proteaza, được bổ sung với 0,2% chất ly giải nấm men vì mục đích dinh dưỡng (Springer Biotec), như lượng chất cấy truyền là 1% và độ pH được duy trì ở 5,7 với natri hydroxit. Việc ủ được tiếp tục cho đến khi bắt đầu pha tĩnh. Với ba môi trường nuôi cấy chứa sinh khối được làm giàu của khoảng 10^9 đối với *Lactobacillus plantarum* F12, và *Lactobacillus helveticus* A1, và 2×10^8 đối với *Lactobacillus gasseri* 7/12, chất lên men công nghiệp được ủ trong môi trường sữa mà được thủy phân bằng kiềm proteaza bằng cách bổ sung 0,2% chất ly giải nấm men vì mục đích dinh dưỡng (Springer Biotec), do lượng chất cấy truyền là 2%. Độ pH được duy trì ở 5,7 bằng natri hydroxit. Hỗn hợp sinh khối thu được gồm ba chủng probiotic được phân liều trong thiết bị làm đông khô công nghiệp. Sự làm khô thăng hoa được thực hiện ở từ -28 đến -29°C. Sự gia nhiệt cuối cùng đến 30°C. Hơi ẩm còn lại là 4%. Hỗn hợp được đóng gói trong khí trơ (nitơ). Các biện pháp đặc biệt để làm giảm tỷ lệ tử vong của các chủng trong chu trình công nghệ được thực hiện. Các thông số lên men, làm đông khô và đóng gói được tối ưu hóa. Sự sống sót và hoạt tính của các chủng được kiểm soát bằng các phương tiện công nghệ sinh học phân tử hiện đại (PCR thời gian thực). Sự có mặt và cường độ tác dụng của chế phẩm probiotic được kiểm soát bằng các công nghệ có độ chính xác cao – Sắc ký lỏng cao áp (sự thủy phân muối mật, sự phân tích peptit có hoạt tính sinh học), Sắc ký khí (xác định hoạt tính làm giảm cholesterol), PCR thời gian thực (xác định sức sống của các chủng và số lượng của chúng), Thiết bị quang phổ (xác định hoạt tính chống oxy hóa, phát hiện hoạt tính điều hòa miễn dịch).

Chế phẩm chứa đa vi khuẩn được làm đông khô sẵn sàng để sử dụng chứa vi khuẩn sống (số lượng tế bào sống/1g) của ba chủng probiotic ít nhất: 10^9 *Lactobacillus gasseri* 7/12, 2×10^9 *Lactobacillus helveticus* A1, 9×10^9 *Lactobacillus plantarum* F12.

Trong Bảng 11 đưa ra các kết quả của việc xác định hoạt tính chống oxy hóa đặc hiệu như: tổng hoạt tính chống oxy hóa, tổng hoạt tính kháng gốc, hoạt tính SOD của sản phẩm kết thúc.

Bảng 11

Hoạt tính	Tế bào nguyên vẹn	Phân chiết không chứa tế bào
Tổng hoạt tính chống oxy hóa ORAC, trolox đương lượng/ 10^9 tế bào	1105 ± 68 n=3	1320 ± 95 n=3
Tổng hoạt tính kháng gốc, $A_{517}(\text{trắng}) - A_{517}(\text{mẫu})$	$0,12 \pm 0,02$ n=3	$0,22 \pm 0,03$ n=3
Hoạt tính superoxit dismutaza		$21,2 \pm 2,0$ U/mg protein n=3

Trong Bảng 12 và Bảng 13 đưa ra hàm lượng xytokin sau khi cảm ứng các dòng tế bào của người U-937 và HT-29 theo 10^8 /ml tế bào vi khuẩn của chế phẩm.

Bảng 12

Sản phẩm	IL-10 ng/ml	TNF- α ng/ml	TGF- β ng/ml	IL-6 ng/ml
Đối chứng (U-937)	0,11	0,22	0,90	25,1
Chế phẩm chứa đa vi khuẩn	1,1	0,24	0,87	18,1

Bảng 13

Sản phẩm	IL-8 ng/ml	TGF- β ng/ml
Đối chứng (HT-29)	8,9	0,40
Chế phẩm chứa đa vi khuẩn	7,7	0,35

Trong Bảng 14 đưa ra các hoạt tính kháng cholesterol của chế phẩm chứa đa vi khuẩn liên quan đến khả năng thủy phân của muối mật và giảm cholesterol theo tỷ lệ phần trăm.

Bảng 14

Sản phẩm	% giảm cholesterol	% khử tiếp hợp của muối mật
Chế phẩm chứa đa vi khuẩn	21,0	42,4

Trong Bảng 15 đưa ra hoạt tính ức chế ACE của chế phẩm.

Bảng 15

Sản phẩm	% ức chế ACE
Chế phẩm chứa đa vi khuẩn	65%

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Chế phẩm chứa đa vi khuẩn là khẩu phần ăn được làm đông khô được bổ sung với tổ hợp đơn nhất gồm các đặc tính probiotic thích hợp để ngăn ngừa các bệnh có ý nghĩa về mặt xã hội như chứng tăng huyết áp, chứng xơ cứng động mạch và bệnh tăng cholesterol huyết, các quy trình miễn dịch và viêm bị suy yếu trong đường ruột, sự cân bằng bị phá vỡ trong hệ thực vật nhỏ trong ruột. Việc sản xuất sản phẩm này cần phải có sự tham gia của thiết bị công nghiệp tiên tiến và thiết bị nghiên cứu công nghệ cao. Nguyên lý của việc sản xuất sản phẩm này là được mô tả trong phần ví dụ.

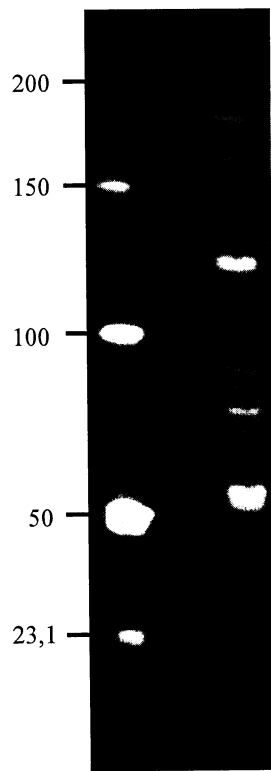
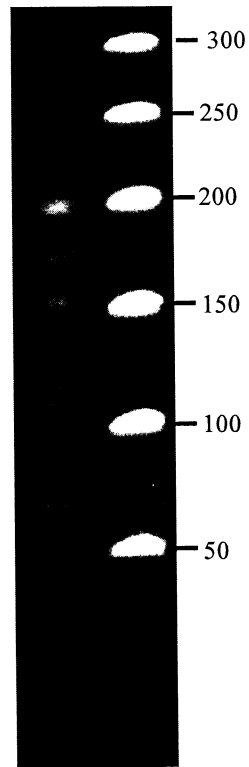
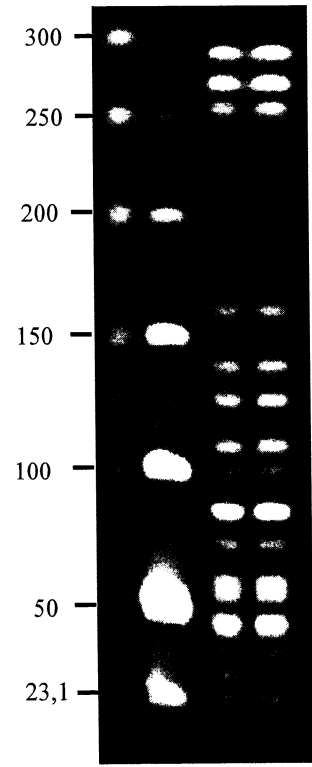
Các tài liệu tham chiếu:

1. Đơn sáng chế quốc tế số PCT/SU89/00264, C12N1/20, A61K35/74, University of Tartu, 1991.
2. Ấn phẩm: Dimitrov Zh. et al., 2008. Comparative evaluation of three molecular typing methods in their applicability to differentiate *Lactobacillus* strains with human origin. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24:1305-1312.
3. Đơn yêu cầu cấp patent Hoa Kỳ số US 2008/019954 “Lactic acid bacteria strains useful against urogenital pathogens and compositions containing same”.
4. Ấn phẩm: USMAN ET AL: “Bile Tolerance, taurocholate Deconjugation, and Binding of Cholestreol by *Lactobacillus gasseri* Strains”, JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, vol. 82, no.2, 1 February 1999 (1999-02-01), pages 243-248.
5. Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hoa Kỳ số US 6159465 A “Epithelia Adhesive *Lactobacilli*”.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa đa vi khuẩn, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này bao gồm tổ hợp bao gồm các chủng *Lactobacillus gasseri* 7/12 NBIMCC No. 8720 và *Lactobacillus plantarum* F12 NBIMCC No. 8722 và *Lactobacillus helveticus* A1 NBIMCC No. 8721, trong đó chế phẩm này chứa các tế bào sống được xác định theo cfu/g như sau: đối với *Lactobacillus gasseri* 7/12 ít nhất là 10^9 , đối với *Lactobacillus helveticus* A1 ít nhất là 2×10^9 và đối với *Lactobacillus plantarum* F12 ít nhất là 9×10^9 .
2. Chế phẩm chứa đa vi khuẩn theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, *Lactobacillus gasseri* 7/12 NBIMCC No. 8720 có khả năng bám dính khoảng 22 vào dòng tế bào HT-29, *Lactobacillus plantarum* F12 NBIMCC No. 8722 có khả năng bám dính khoảng 29 vào dòng tế bào HT-29 và *Lactobacillus helveticus* A1 NBIMCC No. 8721 giải phóng trình tự peptit Ala-Leu-Pro-Met.
3. Chế phẩm chứa đa vi khuẩn theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này có chất chống oxy hóa, tác dụng điều hòa miễn dịch chống viêm, tác dụng làm giảm cholesterol huyết và tác dụng chống chứng tăng huyết áp.
4. Chế phẩm chứa đa vi khuẩn theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này ở dạng dịch nuôi cấy đông khô hoặc dạng lỏng.
5. Chế phẩm chứa vi khuẩn, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này chứa chủng *Lactobacillus gasseri* 7/12 NBIMCC No. 8720.
6. Chế phẩm chứa vi khuẩn theo điểm 5, trong đó chế phẩm này có hoạt tính làm giảm cholesterol huyết và hoạt tính điều hòa miễn dịch chống viêm và khả năng bám dính khoảng 22 vào dòng tế bào HT-29.
7. Chế phẩm chứa vi khuẩn theo điểm 5, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này ở dạng dịch nuôi cấy đông khô hoặc dạng lỏng.
8. Phương pháp thu nhận chế phẩm chứa đa vi khuẩn theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho phát triển *Lactobacillus gasseri* 7/12 NBIMCC No. 8720, *Lactobacillus plantarum* F12 NBIMCC No. 8722 và *Lactobacillus helveticus* A1

NBIMCC No. 8721, một cách riêng biệt trong môi trường chứa sữa, được thủy phân bằng proteaza kiềm và phần bổ sung gồm 0,2% chất tự ly giải nấm men vì mục đích dinh dưỡng, với lượng chất cấy truyền là 1% và độ pH được duy trì ở 5,7 bằng natri hydroxit và tiếp đó nuôi cấy với sự kết hợp của ba môi trường nuôi cấy đơn chứa sinh khối được làm giàu của *Lactobacillus plantarum* F12, *Lactobacillus helveticus* A1 và *Lactobacillus gasseri* 7/12 trong môi trường chứa sữa, được thủy phân bằng proteaza kiềm và phần bổ sung chứa 0,2% chất tự ly giải nấm men vì mục đích dinh dưỡng, với lượng chất cấy truyền là 2% và độ pH được duy trì ở 5,7 bằng natri hydroxit.

**Fig.1****Fig.2****Fig.3**

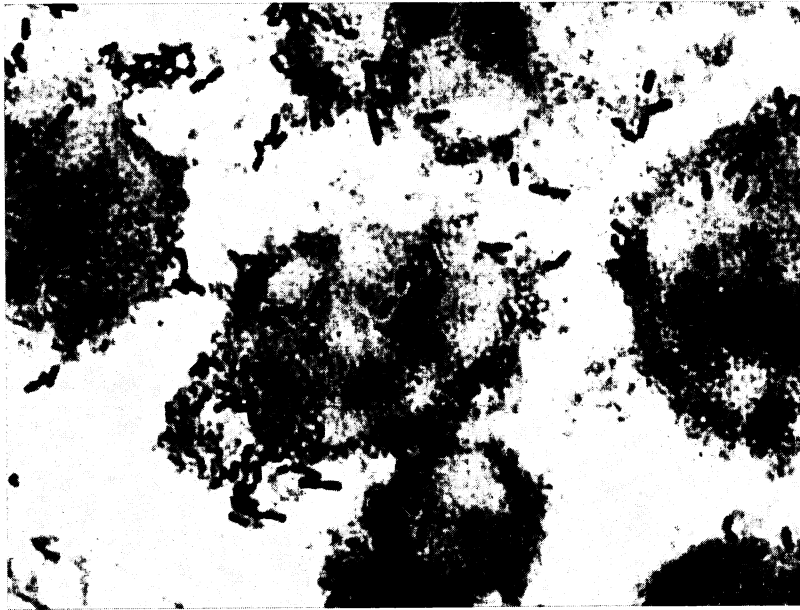


Fig.4

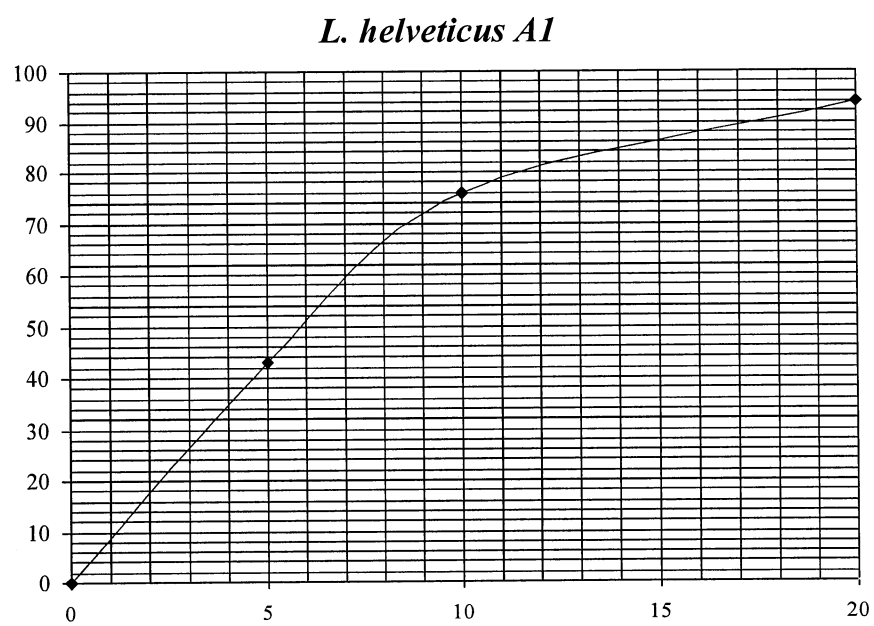
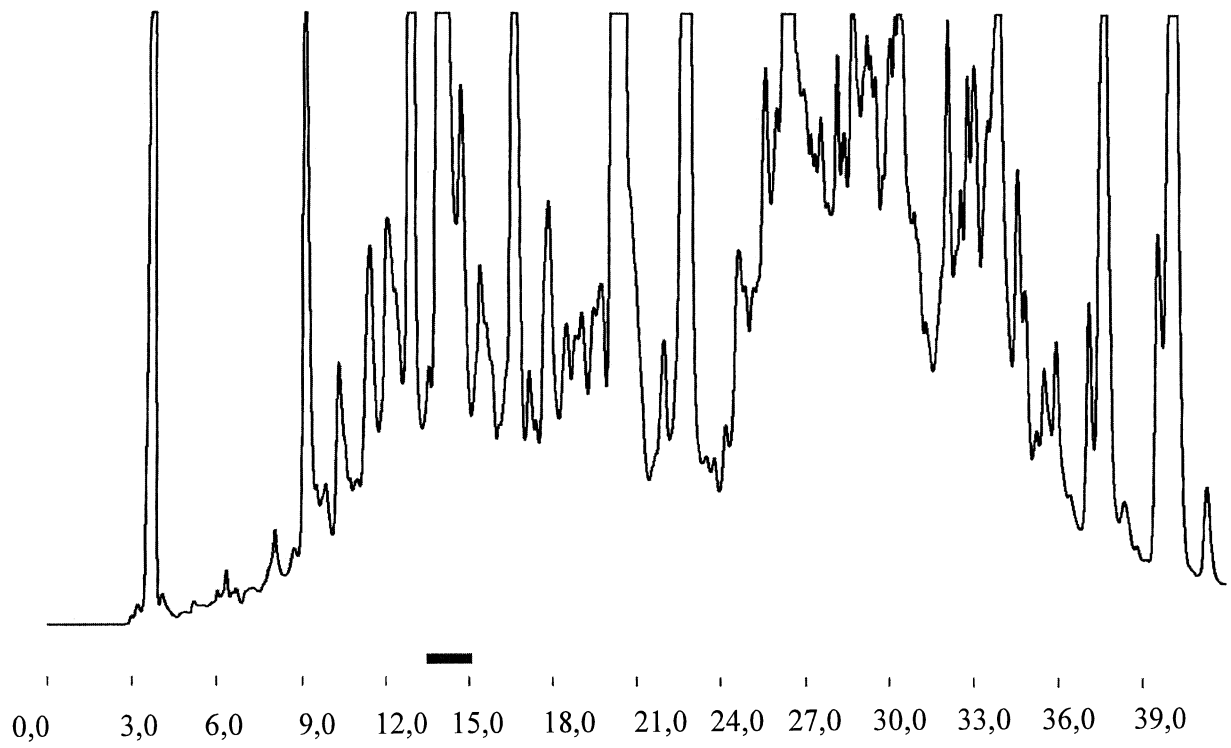


Fig.5

**Fig.6**

24093

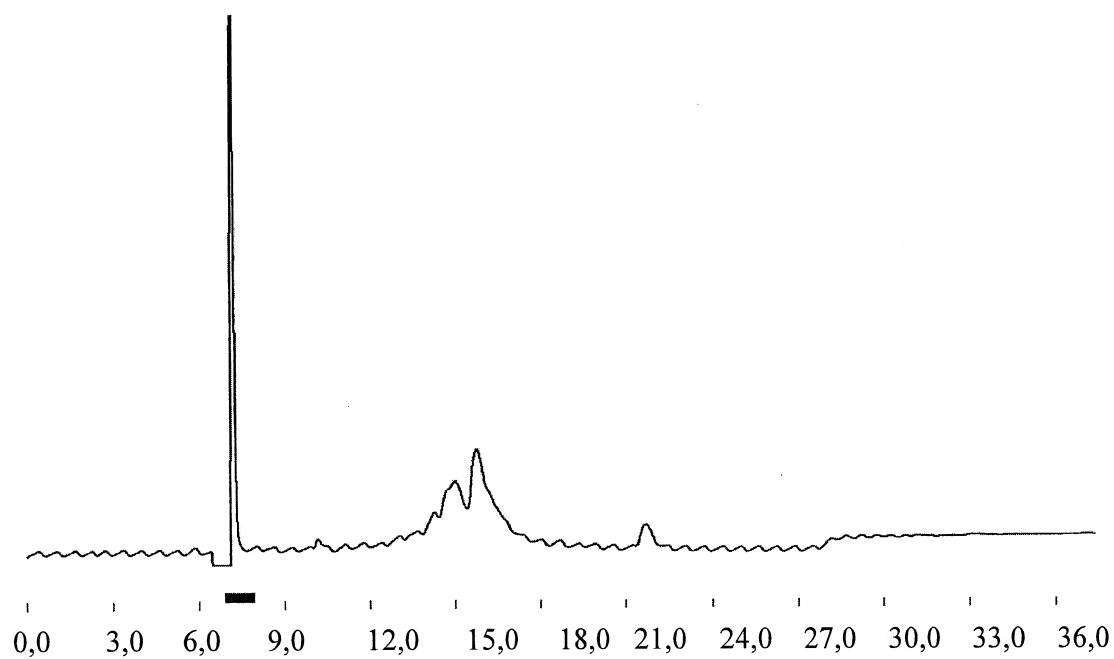


Fig.7

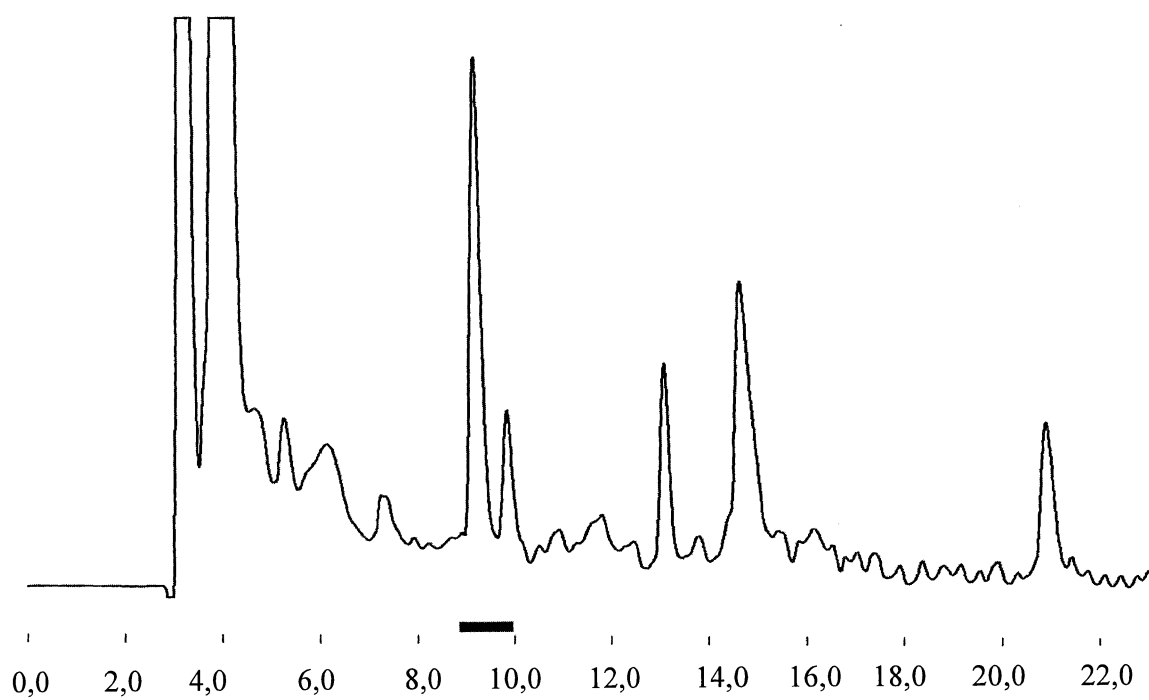


Fig.8