



(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)



1-0024650

(51)⁷ C12N 1/20; A61K 35/74; A61P 37/00

(13) B

(21) 1-2012-01478

(22) 27/10/2010

(86) PCT/KR2010/007431 27/10/2010

(87) WO2011/052996 05/05/2011

(30) 10-2009-0102822 28/10/2009 KR

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/09/2012 294A

(73) CJ CHEILJEDANG CORP. (KR)

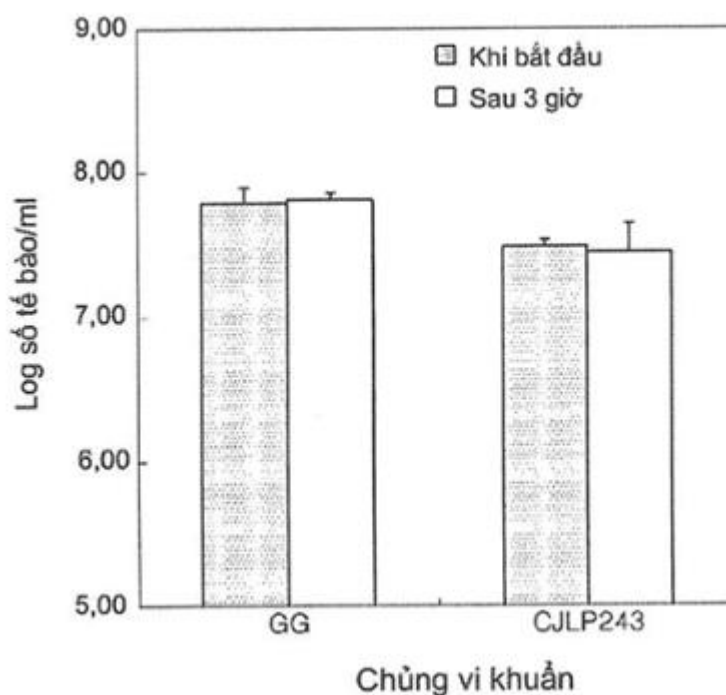
CJ Bldg., 500, Namdaemunno 5-ga, Jung-gu, Seoul 100-749, Republic of Korea

(72) KIM, Bong Joon (KR); JUNG, Heon Woong (KR); LEE, Kang Pyo (KR); KIM, Sae Hun (KR); CHUN, Tae Hoon (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, CHẾ PHẨM VÀ MỸ PHẨM CHỨA VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 (KCTC 11045P) và chế phẩm chứa vi khuẩn này để điều trị các bệnh đường ruột và tăng cường đáp ứng miễn dịch. Sáng chế còn đề cập đến mỹ phẩm chứa vi khuẩn này.



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* dùng để phòng hoặc điều trị các bệnh đường ruột, bệnh miễn dịch, chế phẩm và mỹ phẩm chứa vi khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn axit lactic được tìm thấy trong thực phẩm lên men truyền thống của Hàn Quốc, ví dụ, kim chi, vi khuẩn này sống khu trú trong hệ tiêu hóa của cơ thể người, phân hủy chất xơ và các protein phức hợp thành chất dinh dưỡng quan trọng. Các vi sinh vật có thể sống được như vi khuẩn axit lactic là có lợi cho đường dạ dày-ruột của các vật chủ như động vật, kể cả người do chúng cải thiện môi trường vi sinh vật đường ruột của vật chủ và được gọi là men vi sinh. Các men vi sinh phải có khả năng chịu được axit và axit mật, và có độ bám tốt vào các tế bào biểu mô ruột để khi sử dụng qua đường miệng, chúng vẫn còn sống khi đến được ruột và bám tốt vào bề mặt ruột.

Các vi khuẩn axit lactic *Lactobacillus* sp. là các men vi sinh có nhiều trong thực phẩm lên men truyền thống của Hàn Quốc như kim chi. Các vi sinh vật *Lactobacillus* sp. sản sinh ra axit lactic trong quá trình lên men đồng chất hoặc dị chất và được tìm thấy nhiều trong đường ruột của động vật, kể cả người, và trong quá trình lên men các sản phẩm sữa và rau. Các vi sinh vật *Lactobacillus* sp. duy trì sự cân bằng độ pH có tính axit để ức chế sự sinh sản của các vi khuẩn có hại như *E. coli* hoặc *Clostridium* và làm giảm tình trạng tiêu chảy và chứng táo bón. Các vi sinh vật *Lactobacillus* sp. còn tổng hợp vitamin, có hoạt tính trị bệnh ung thư và làm giảm mức cholesterol trong huyết thanh. Axidophilin được sản sinh bởi vi khuẩn *Lactobacillus* đã biết là có tác dụng ức chế sự phát triển của các vi khuẩn *shigella*, *salmonella*, *staphylococcus*, *E. coli*, hoặc vi khuẩn tương tự. Axidophilin cũng ức chế sự sinh sản của các vi sinh vật gây bệnh tiêu chảy và làm bình thường hóa hệ vi sinh đường ruột (Michael and Philippe, *Probiotics and prebiotics: Effects on diarrhea*, *The journal of nutrition*,

Volume 137, March 2007, trang 803S-811S; Roberfroid, Prebiotics and probiotics: Are they functional foods?, American journal of clinical nutrition, Volume 71, June 2000, trang 1682S-1687S).

Nghiên cứu dựa trên tác dụng của vi sinh vật *Lactobacillus* sp. như đã nêu trên đây đối với vi sinh vật *Lactobacillus* sp. dưới dạng men vi sinh và thức ăn cho vật nuôi đã được tiến hành tích cực. Bệnh tiêu chảy do vi khuẩn gây ra ở vật nuôi làm chết vật nuôi và làm giảm tốc độ tăng cân của chúng. Do đó, để phòng ngừa bệnh tiêu chảy do vi khuẩn và làm tăng sản lượng vật nuôi, phương pháp bổ sung chất kháng sinh vào thức ăn cho vật nuôi đã được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên, do hiện tượng vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh và dư lượng thuốc kháng sinh trong vật nuôi nên việc sử dụng thuốc kháng sinh bị hạn chế và các phương pháp hữu cơ để nuôi vật nuôi được khuyến cáo (Công bố patent Hàn Quốc số 1998-78358) (McEwen and Fedorka-Cray, *Antimicrobial use and resistance in animals, Clinical infectious Diseases, Volume 34, June 2002, trang S93-S106*).

Ngoài ra, vi khuẩn axit lactic như vi sinh vật *Lactobacillus* sp. được biết là có hiệu quả tăng cường đáp ứng miễn dịch. Vì vậy, nghiên cứu về cơ chế tác dụng của vi khuẩn axit lactic đối với hiệu quả tăng cường đáp ứng miễn dịch được tiến hành. Mặc dù cơ chế cụ thể vẫn chưa được phát hiện, đã biết rằng vi khuẩn axit lactic được sử dụng qua đường miệng và sống khu trú trong ruột có ảnh hưởng đến hệ miễn dịch đường ruột. Ví dụ, việc bổ sung vi khuẩn axit lactic bằng sữa chua đã được biết là làm tăng hoạt tính kháng sinh của lymphô bào mảng Peyer. Theo nghiên cứu đối với động vật và người, đã biết là vi khuẩn axit lactic làm tăng đáp ứng của IgA. Ngoài ra, hệ miễn dịch thể hiện sức đề kháng của cơ thể đối với mầm bệnh là vi khuẩn từ bên ngoài được chia thành miễn dịch tự nhiên và miễn dịch thích ứng, cả hai loại miễn dịch này đều bị ảnh hưởng bởi vi khuẩn axit lactic. Đối với sự miễn dịch tự nhiên của hệ miễn dịch đường ruột, vi khuẩn axit lactic được biết là có tác dụng phòng ngừa và tiêu diệt mầm bệnh, nhờ đó có tác dụng duy trì tình trạng sức khỏe chống lại sự nhiễm bệnh. Phản ứng miễn dịch tự nhiên đóng vai trò quan trọng trong việc ức chế sự gia tăng số lượng mầm bệnh bên ngoài ở giai đoạn mới nhiễm bệnh. Ngoài ra, phản ứng miễn dịch tự nhiên giải phóng các kháng nguyên và phân tử đồng kích thích, nhờ đó làm hoạt hóa sự miễn dịch thích ứng sau đó đối với hệ miễn dịch tự nhiên. Các tế bào miễn dịch làm đại diện liên quan đến phản ứng miễn dịch tự nhiên bao gồm tế bào giết tự nhiên

(natural killer: NK), bạch cầu trung tính, đại thực bào và tế bào có tua (*Fearon DT, Locksley RM, Science 1996, 272:50-53, The instructive role of innate immunity in the acquired immune response*). Về cơ bản, miễn dịch thích ứng tạo ra sự loại bỏ mầm bệnh bên ngoài khi đối tượng bị nhiễm bệnh, và các tế bào miễn dịch tương ứng với sự miễn dịch thích ứng bao gồm các lymphô bào T và B. Do đó, sức đề kháng của cơ thể đối với mầm bệnh bên ngoài có thể phụ thuộc vào mức độ tăng cường hoạt tính của sự miễn dịch thích ứng (*Gowans JL., Immunology Today. 1996 Jun; 17(6):288-91, The lymphocyte - a disgraceful gap in medical knowledge*).

Đối với sự miễn dịch thích ứng, các đại thực bào phân hủy kháng nguyên để cho chúng tiếp xúc với lymphô bào T đã được hoạt hóa để kích thích sự sản sinh các xytokin khác nhau, cụ thể là intolokin IL-12 và IL-18. Về mặt này, một số thành phần của thành tế bào của vi khuẩn axit lactic hoạt hóa con đường truyền tín hiệu NF- κ B và STAT trong đại thực bào để làm tăng sự sản sinh các xytokin. Ngoài ra, đã biết rằng vi khuẩn axit lactic kích thích sự sản sinh IL-12, IL-18, và TNF- α trong các tế bào trình diện kháng nguyên như tế bào có tua là tế bào thường được phát hiện trong hạch bạch huyết và màng nhầy của hệ tiêu hóa. Hơn nữa, vi khuẩn axit lactic được biết là làm tăng mức độ biểu hiện của phân tử bề mặt trong tế bào có tua để hoạt hóa lymphô bào T như MHC nhóm II và B7-2 (*Cross et. al., Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?, International Immunopharmacology, Volume 1, May 2001, trang 891-901*).

Nhiều nghiên cứu về mối liên quan giữa vi sinh vật *Lactobacillus* sp. và các phản ứng miễn dịch đã được tiến hành. Cụ thể, một số vi sinh vật *Lactobacillus* sp. (ví dụ, *L. fermentum*) được biết là kích thích phản ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên, và do đó việc sử dụng nó làm chất phụ trợ trong các vacxin chứa vi khuẩn (ví dụ, bệnh bạch hầu, bệnh uốn ván) hoặc vacxin chứa virus (ví dụ, bệnh cúm, bệnh bại liệt) đã được thực hiện (*de Vrese et al., 2005; Olivares et al., 2007; West et al., 2008*). Hiệu quả tăng cường miễn dịch của vi sinh vật *Lactobacillus* sp. được cho là do hoạt tính gia tăng của lymphô bào T sản sinh xytokin loại Th1 bởi các vi sinh vật *Lactobacillus* sp. đặc hiệu, điều này có hiệu quả tạo ra sự phát triển của các tế bào miễn dịch thông thường và hoạt tính của các tế bào T hoặc B trong sự miễn dịch thích ứng (*Mohamadzadeh et al., Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization., Proc Natl Acad Sci USA. 2005 22; 102(8):2880-2885*).

Để xác định hoạt tính gia tăng của lymphô bào T, nghiên cứu xác định lượng IFN- γ sản sinh ra được tiến hành tích cực trong những năm gần đây (Shida *et al.*, 2006; Foligne *et al.*, 2007). Đã biết rằng việc tạo sự phát triển của các tế bào miễn dịch thông thường có thể phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa (đường ruột) (Jain S, Yadav H, Sinha PR. *probiotic dahi containing Lactobacillus casei protects against Salmonella enteritidis infection and modulates immune response in mice. J Med Food.* 2009 Jun; 12(3): 576-83.), bệnh nhiễm khuẩn cơ quan sinh dục-niệu (Zarate G, Santos V, Nader-Macias ME. *Protective effect of vaginal Lactobacillus paracasei CRL 1289 against urogenital infection produced by Staphylococcus aureus in a mouse animal model. Infect Dis Obstet Gynecol.* 2009;2009: 48358. Epub 2007 Mar 29.), bệnh nhiễm khuẩn hô hấp (Yasuda Y, Matsumura Y, Kasahara K, O uji N, Sugiura S, Mikasa K, Kita E. *Microbial exposure early in life regulates airway inflammation in mice after infection with Streptococcus pneumoniae with enhancement of local resistance. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009 Sep 25 [Epub ahead of print]), bệnh nhiễm khuẩn *helicobacter* (Boyanova L, Stephanova-Kondratenko M, Mitov I. *Anti-Helicobacter pylori activity of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strains: preliminary report. Lett Appl Microbiol.* 2009 May; 48(5):579-84. Epub 2009 Mar 9.), và phản ứng dị ứng (Ouwehand AC, Nermes M, Collado MC, Rautonen N, Salminen S, Isolauri E. *Specific probiotics alleviate allergic rhinitis during the birch pollen season. World J Gastroenterol.* 2009 Jul 14;15(26):3261-8).

Các lymphô bào T kiểm soát sự miễn dịch thích ứng có thể được phân loại thành đáp ứng Th1 dưới dạng miễn dịch tế bào và đáp ứng Th2 dưới dạng miễn dịch thể dịch. Các đáp ứng Th1 và Th2 sản sinh các cytokin khác nhau trong tế bào trình diện kháng nguyên. Trong đáp ứng Th1, sự sản sinh IL-2, IL-12, IL-18, interferon- γ (IFN- γ) là chủ yếu. Trong đáp ứng Th2, sự sản sinh PGE2, IL-4, và IL-10 là chủ yếu. Các đáp ứng Th1 và Th2 cần được làm cân bằng. Nếu các đáp ứng Th1 và Th2 bị mất cân bằng, sẽ xuất hiện nhiều bệnh miễn dịch khác nhau. Các tế bào Th1 chủ yếu chống lại mầm bệnh, trong khi các tế bào Th2 chủ yếu liên quan đến bệnh dị ứng và đáp ứng viêm. Khi các đáp ứng Th1 và Th2 ở tình trạng bình thường, tế bào Th2 bảo vệ cơ thể khỏi bụi và các chất không mong muốn. Tuy nhiên, nếu các tế bào Th2 đáp ứng quá mức, sự sản sinh kháng thể IgE tăng lên, từ đó gây ra đáp ứng dị ứng với các protein không có hại cho cơ thể người như phấn hoa và thực phẩm. Do đó, tỷ lệ của các đáp

ứng Th1 và Th2 cần được giữ cân bằng. Đáp ứng của một trong số chúng quá mức hoặc không đủ sẽ gây bệnh. Ngoài ra, sự tiết ra cortisol liên tục do tình trạng stress mãn tính làm giảm đáp ứng Th1 và làm tăng đáp ứng Th2, do đó gây bệnh ung thư, tạng dị ứng, bệnh dị ứng, và bệnh tự miễn (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).

Theo các thử nghiệm *in vivo*, vi khuẩn axit lactic làm gia tăng sự sản sinh IL-2 và IFN- γ là các cytokin Th1 trong lymphô bào T và ức chế sự sản sinh IL-4 và IL-5 là các cytokin 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). Trong khi đó, IL-12 và IL-18 là các cytokin quan trọng để biệt hóa lymphô bào Th0 thành lymphô bào Th1 và được sản sinh trong các đại thực bào hoặc tế bào có tua. Đã biết rằng sự sản sinh IL-12, IL-18 và IFN- α gia tăng phụ thuộc vào nồng độ vi khuẩn axit lactic, khi các tế bào lách hoặc đại thực bào được xử lý bằng vi khuẩn axit lactic trong quá trình nuôi cấy. Vì thế, vi khuẩn axit lactic làm gia tăng sự sản sinh IL-12, IL-18 và IFN- α trong các đại thực bào, nhờ đó thúc đẩy sự biệt hóa Th0 thành Th1 và kích thích sự tạo ra IFN- γ và do đó vi khuẩn axit lactic đóng vai trò duy trì sự cân bằng Th1/Th2 trong trạng thái thiên về đáp ứng Th2 (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 được biết là có tác dụng phòng và điều trị bệnh ung thư, bệnh thể tạng dị ứng, bệnh dị ứng và bệnh tự miễn do sự mất cân bằng Th1/Th2 gây bởi đáp ứng Th2 quá mức.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Trong khi tìm kiếm vi khuẩn axit lactic mới có hoạt tính tăng cường miễn dịch tốt hơn so với vi khuẩn axit lactic thông thường, các tác giả sáng chế đã phân lập và xác định được vi khuẩn *Lactobacillus* sp. từ thực phẩm lên men truyền thống của Hàn Quốc.

Do đó, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sp. có hiệu quả tăng cường đáp ứng miễn dịch rất tốt, cụ thể là hoạt tính kích thích sự sản sinh IFN- γ , cytokin loại Th1 rất tốt, kích thích sự tăng sinh các tế bào miễn dịch thông thường, và

điều chỉnh sự mất cân bằng Th1/Th2 do đáp ứng Th2 quá mức gây ra, cũng như có khả năng chịu được axit và axit mật tốt và có độ bám dính rất tốt với tế bào biểu mô ruột là đặc tính cơ bản của men vi sinh.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh đường ruột chứa chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sp..

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm để tăng cường đáp ứng miễn dịch chứa chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sp..

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 (được lưu trữ tại Trung tâm giống vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms: KCCM), ngày lưu trữ: 14 tháng 10 năm 2009, số lưu trữ: KCCM 11045P).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm để phòng hoặc điều trị các bệnh đường ruột chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm để tăng cường đáp ứng miễn dịch chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các dấu hiệu và ưu điểm của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn qua phần mô tả chi tiết các phương án làm ví dụ cùng với hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 là đồ thị thể hiện khả năng chịu axit của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

Fig.2 là đồ thị thể hiện khả năng chịu axit mật của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

Fig.3 là đồ thị thể hiện khả năng của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 bám vào tế bào biểu mô ruột.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoli bromua) được tiến hành đối với các tế bào miễn dịch trong lách phân lập được từ chuột và được nuôi cấy *ex vivo*, và sau đó được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243, so với các nhóm điều trị bằng tác nhân gây phân bào chủ yếu, nhóm điều trị bằng β -glucan và nhóm điều trị bằng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Fig.5 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm IFN- γ được tiến hành đối với các tế bào miễn dịch trong lách phân lập được từ chuột và được nuôi cấy *ex vivo*, và sau đó

được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243, so với nhóm điều trị bằng tác nhân gây phân bào chủ yếu, nhóm điều trị bằng β -glucan và nhóm điều trị bằng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Fig.6 là đồ thị thể hiện trọng lượng chuột xác định được ngay trước khi giết chuột đã được cho sử dụng chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 qua đường miệng, so với nhóm đối chứng âm và nhóm sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Fig.7 là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách xác định sự thay đổi về quần thể tế bào T để xác định hiệu quả của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 đối với các tế bào miễn dịch trong lách phân lập được sau khi giết chuột đã được cho sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 qua đường miệng, so với nhóm đối chứng âm và nhóm sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Fig.8 là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách xác định sự thay đổi về quần thể tế bào T CD4 để xác định hiệu quả của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 đối với các tế bào miễn dịch trong lách phân lập được sau khi giết chuột đã được cho sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 qua đường miệng, so với nhóm đối chứng âm và nhóm sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Fig.9 là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách xác định sự thay đổi về quần thể tế bào T CD8 để xác định hiệu quả của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 đối với các tế bào miễn dịch trong lách phân lập được sau khi giết chuột đã được cho sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 qua đường miệng, so với nhóm đối chứng âm và nhóm sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Fig.10 là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách xác định lượng IL-2 được sản sinh bởi tế bào T trong tế bào lách thu được từ lách phân lập được sau khi giết chuột đã được cho sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 qua đường miệng và sau đó được kích thích bằng enzym ConA *ex vivo*, bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA), để xác định hiệu quả của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 đối với sự hoạt hóa tế bào T, so với nhóm đối chứng âm và nhóm sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Fig.11 là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách xác định lượng IFN- γ được sản sinh bởi tế bào T trong tế bào lách thu được từ lách phân lập được sau khi giết

chuột đã được cho sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 qua đường miệng và sau đó được kích thích bằng enzym ConA *ex vivo*, bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, để xác định hiệu quả của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 đối với sự hoạt hoá tế bào T, so với nhóm đối chứng âm và nhóm sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết cùng với các hình vẽ kèm theo, trong đó các phương án làm ví dụ của sáng chế được thể hiện.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 là chủng *Lactobacillus plantarum* mới được phân lập và xác định từ thực phẩm lên men truyền thống của Hàn Quốc. Thực phẩm này có thể là kim chi, rau lên men, đậu hũ, xì dầu, đậu hũ lên men (chungkookjang), cá lên men, hoặc thực phẩm tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở các thực phẩm này.

Kết quả của thử nghiệm trình tự xác định bazơ của ARN ribosom 16S để xác định và phân loại vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* cho thấy rằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có mức độ tương đồng cao nhất (99,9%) so với chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* chuẩn (*Lactobacillus plantarum* NBRC15891^T, mã số lưu trữ trong ngân hàng gen là AB326351) và có mối liên hệ phát sinh giống loài ở cấp độ phân tử gần nhất với vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*. Do đó, vi sinh vật nêu trên được xác định là vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* với tên là *Lactobacillus plantarum* CJLP243, và được lưu trữ tại trung tâm KCCM ngày 14 tháng 10 năm 2009 (mã số lưu trữ: KCCM11045P). Trình tự bazơ của gen ARN ribosom 16S của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được thể hiện ở trình tự nhận biết SEQ ID NO: 1 trong phần danh mục trình tự kèm theo.

Lactobacillus plantarum CJLP243 là vi khuẩn gram dương và không bắt buộc kỵ khí nên có thể phát triển trong cả điều kiện ưa khí và kỵ khí, không tạo ra bào tử, không có tính di động và có dạng hình que. Các đặc tính hình thái và sinh lý cụ thể của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được phân tích theo các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này và được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

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 dị chất tùy ý
Tăng sinh ở nhiệt độ 10°C	+
Tăng sinh ở nhiệt độ 42°C	+
Tăng sinh ở NaCl 7%	+
Tăng sinh ở NaCl 10%	-
Tăng sinh ở độ pH = 3,8	+
Tăng sinh trong điều kiện kỵ khí	+
Tạo ra CO ₂ bằng cách sử dụng glucoza	-
Lên men đường	
Glyxerol	-
Erythritol	-
D-arabinoza	-
L-arabinoza	+
Riboza	+
D-xyloza	-
L-xyloza	-
Adonitol	-
Xylosit	-
Galactoza	+
D-glucoza	+
D-fructose	+
D-manoza	+
L-sorboza	-

Rhamnoza	+
Dulxitol	-
Inositol	-
Manitol	+
Sorbitol	+
D-manosit	+
D-glucosit	+
Glucosamin	+
Amygdalin	+
Alutin	+
Esculin	+
Salixin	+
Xenlobioza	+
Maltoza	+
Lactoza	+
Melibioza	+
Sacaroza	+
Trehaloza	+
Inulin	+
Melizitoza	+
D-rafinoza	+
Amidon	-
Glycogen	-
Xylitol	-
Gentiobioza	-
D-turanoza	-
D-lyxoza	-
D-tagatoza	-
D-fucoza	-

L-fucoza	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
Gluconat	-
2-gluconat	-
5-gluconat	-

+: dương tính

-: âm tính

Để bảo quản ổn định vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 trong khoảng thời gian dài, các chủng có thể được bảo quản bằng cách phân tán chúng trong dung dịch bảo quản điều chế được bằng cách trộn nước với glyxerol và cất giữ thể phân tán này ở nhiệt độ -70°C, hoặc bằng cách tạo hỗn dịch chúng trong 10% sữa tách kem vô trùng và làm đông khô nhanh hỗn dịch này.

Ngoài ra, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 là men vi sinh có hiệu quả làm giảm các rối loạn đường ruột và tăng cường đáp ứng miễn dịch, đây là các hiệu quả thông thường của vi khuẩn axit lactic.

Về mặt này, men vi sinh là vi sinh vật sống có lợi cho đường dạ dày-ruột của các vật chủ như động vật, kể cả người bằng cách cải thiện môi trường trong ruột. Các men vi sinh là vi sinh vật sống có hoạt tính men vi sinh ở dạng một chủng hoặc chủng hỗn hợp, có lợi cho hệ sinh vật đường ruột khi được sử dụng cho người hoặc động vật ở dạng khô hoặc lên men. Vi sinh vật là men vi sinh phải chịu được tác động của dịch dạ dày và axit mật, và cần phải còn sống trong ruột non sau khi đi qua dạ dày, khu trú ở ruột và có lợi cho hệ vi sinh vật đường ruột của vật chủ. Do đó, vi sinh vật là men vi sinh cần có khả năng chịu được axit và axit mật, và có độ bám tốt với các tế bào biểu mô ruột. Ngoài ra, vi sinh vật là men vi sinh cần có độ ổn định. Về mặt này, thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm loại amin của phenylalanin bằng deaminaza, thử nghiệm tạo amoniac, thử nghiệm tan huyết, hoặc thử nghiệm tương tự được tiến hành. Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 theo phương án của sáng chế có kết quả âm tính đối với thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm loại amin của phenylalanin bằng deaminaza, và thử nghiệm tạo amoniac, và thử nghiệm tan huyết cho thấy rằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 không phải là tác nhân gây bệnh (xem Ví dụ 4), có

khả năng chịu được axit và axit mật, và có độ bám tốt với các tế bào biểu mô ruột (xem Ví dụ 2 và 3).

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có thể có hiệu quả tốt trong việc làm giảm các rối loạn đường ruột do khả năng chịu được axit và axit mật, và có độ bám tốt với các tế bào biểu mô ruột.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh đường ruột chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

Chế phẩm để điều trị bệnh đường ruột chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có thể dùng để phòng hoặc điều trị bệnh đường ruột ở động vật có vú, kể cả người, ví dụ vật nuôi bao gồm bò, ngựa và lợn. Các bệnh đường ruột này bao gồm bệnh nhiễm vi khuẩn có hại cho môi trường ruột và bệnh viêm ruột, ví dụ, bệnh tiêu chảy nhiễm khuẩn do vi sinh vật là tác nhân gây bệnh gây ra (*E. coli*, *salmonella*, và *clostridium*), bệnh viêm dạ dày ruột, bệnh viêm ruột, hội chứng viêm ruột tâm sinh, tình trạng vi sinh vật phát triển quá mức trong ruột non, bệnh tiêu chảy, hoặc bệnh tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh này. Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 chứa trong chế phẩm để điều trị bệnh đường ruột có thể là vi khuẩn sống hoặc vi khuẩn đã chết, và tốt hơn nếu là vi khuẩn sống. Nói chung, vi khuẩn sống để điều trị hoặc làm giảm các triệu chứng thông thường do sự lên men bất thường trong hệ vi sinh vật đường ruột gây ra, sống khu trú trong đường ruột để ngăn không cho vi khuẩn có hại bám vào đường ruột của người và động vật, và tạo ra axit lactic để làm giảm độ pH trong ruột, nhờ đó ức chế sự tăng sinh của vi khuẩn có hại. Ngoài ra, vi khuẩn sống được sử dụng sẽ tạo ra peroxit cùng với bacterioxin để ức chế sự tăng sinh của vi khuẩn có hại và kích thích hoạt tính của nhung mao ruột để hấp thu chất dinh dưỡng. Ngoài ra, vi khuẩn sống có thể tạo ra các chất thúc đẩy sự hấp thu và sử dụng chất dinh dưỡng, cải thiện nhu cầu thức ăn cho vật nuôi, và tạo ra các chất làm trung hòa chất độc do tác nhân gây bệnh gây ra.

Chế phẩm để phòng hoặc điều trị các bệnh đường ruột có thể được sử dụng qua đường miệng, tuy nhiên phương pháp sử dụng chế phẩm này không chỉ giới hạn ở đó. Liều dùng có thể thay đổi theo loại bệnh đường ruột, mức độ mắc bệnh, độ tuổi, giới tính, và sắc tộc của bệnh nhân, và mục đích điều trị hoặc phòng bệnh. Nói chung, vi khuẩn có thể được sử dụng cho người lớn với lượng từ 10 triệu đến 100 tỷ.

Ngoài ra, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có tác dụng tăng cường

đáp ứng miễn dịch rất tốt cũng như tác dụng làm giảm các rối loạn đường ruột so với vi khuẩn axit lactic thông thường. Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được phát hiện là kích thích sự sản sinh IFN- γ , xytokin loại Th-1, nhờ đó làm tăng cường sự tạo miễn dịch loại Th-1. Tác dụng làm tăng cường đáp ứng miễn dịch của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Khi các tế bào miễn dịch phân lập được từ lách chuột được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243, chúng làm hoạt hóa sự sinh trưởng của các tế bào miễn dịch thông thường tạo ra đáp ứng Th2 (Ví dụ 5), và làm gia tăng sự sản sinh IFN- γ , xytokin loại Th1 (Ví dụ 6). Quá trình hoạt hóa sự sinh trưởng của tế bào miễn dịch và tác dụng làm tăng phản ứng miễn dịch loại Th1 được phát hiện là có lợi đáng kể so với vi khuẩn axit lactic thông thường khác như *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033). Ngoài ra, khi vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được sử dụng qua đường miệng cho chuột trong 8 tuần, kết quả cho thấy rằng sự sản sinh IFN- γ và IL-2, xytokin loại Th-1 tăng lên và sự sinh trưởng của tế bào T, tế bào T CD4, và tế bào T CD8 cũng tăng lên. Do đó, có thể nói rằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 sản sinh ra lượng lớn IFN- γ để kích thích đáp ứng kiểu Th1, nhờ đó không chỉ làm tăng cường sự miễn dịch thông thường mà còn điều chỉnh sự cân bằng miễn dịch của Th1/Th2.

Đã biết rằng sự gia tăng số lượng tế bào miễn dịch thông thường, cụ thể là các tế bào T bao gồm tế bào T CD4 và tế bào T CD-8, làm gia tăng sự miễn dịch hữu hiệu để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa (đường ruột), nhiễm khuẩn niệu-sinh dục, nhiễm khuẩn hô hấp, nhiễm khuẩn *helicobacter* hoặc phản ứng dị ứng (bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa (đường ruột); Jain S, Yadav H, Sinha PR. *Probiotic dahi containing Lactobacillus casei protects against Salmonella enteritidis infection and modulates immune response in mice. J Med Food. 2009 Jun; 12(3):576-83.*), bệnh nhiễm khuẩn niệu-sinh dục; Zarate G, Santos V, Nader-Macias ME. *Protective effect of vaginal Lactobacillus paracasei CRL 1289 against urogenital infection produced by Staphylococcus aureus in a mouse animal model. Infect Dis Obstet Gynecol. 2009; 2009: 48358. Epub 2007 Mar 29.*, bệnh nhiễm khuẩn đường hô hấp; Yasuda Y, Matsumura Y, Kasahara K, Ouji N, Sugiura S, Mikasa K, Kita E. *Microbial exposure early in life regulates airway inflammation in mice after infection with Streptococcus pneumoniae with enhancement of local resistance. Am J Physiol Lung Cell Mol*

Physiol. 2009 Sep 25. [Epub ahead of print]; hoặc bệnh nhiễm khuẩn *helicobacter* (Boyanova L, Stephanova-Kondratenko M, Mitov I. *Anti-Helicobacter pylori* activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains: preliminary report. *Lett Appl Microbiol.* 2009 May; 48(5):579-84. Epub 2009 Mar 9.) và các phản ứng dị ứng (Ouweland AC, Nermes M, Collado MC, Rautonen N, Salminen S, Isolauri E. *Specific probiotics alleviate allergic rhinitis during the birch pollen season. World J Gastroenterol.* 2009 Jul 14;15(26):3261-8). Do đó, các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có hiệu quả phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa (đường ruột), bệnh nhiễm khuẩn niệu-sinh dục, bệnh nhiễm khuẩn hô hấp, bệnh nhiễm khuẩn *helicobacter* hoặc phản ứng dị ứng, do sự miễn dịch thông thường gia tăng từ quá trình hoạt hóa sự phát triển tế bào T.

Gần đây, đã có báo cáo rằng số lượng các tế bào Th2 tăng lên đáng kể trong máu ngoại vi và tổn thương da của bệnh nhân bị viêm da dị ứng (*Miraglia et. al, Immune dysregulation in atopic dermatitis, Allergy and Asthma Proceedings, Volume 27, November-December 2006, trang 451-455*). Vì thế, sự mất cân bằng Th1/Th2 do đáp ứng Th2 quá mức gây ra các bệnh như bệnh viêm da dị ứng. Ngoài ra, như đã mô tả trên đây, sự đáp ứng Th1 hoặc Th2 quá mức hoặc không đủ cũng gây bệnh. Nếu đáp ứng Th1 giảm đi và đáp ứng Th2 tăng lên, đã biết là có thể gây các bệnh ung thư, bệnh thể tạng dị ứng, bệnh dị ứng, và bệnh tự miễn (*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* CJLP243 được cho là có thể sử dụng không chỉ đối với bệnh thể tạng dị ứng và bệnh dị ứng mà còn đối với bệnh ung thư và bệnh tự miễn do vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 kiểm soát sự mất cân bằng Th1/Th2 bằng cách thúc đẩy phản ứng loại Th1.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm để tăng cường đáp ứng miễn dịch, chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243. Chế phẩm này có tác dụng tăng cường đáp ứng miễn dịch hữu hiệu do vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 là vi khuẩn axit lactic có tác dụng tăng cường đáp ứng miễn dịch như đã mô tả trên đây. Cụ thể, như được chứng minh trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế sau đây, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có tác dụng hoạt hóa sự phát triển của các tế bào miễn dịch thông thường, và do đó chế phẩm để tăng cường đáp ứng miễn dịch

này có hiệu quả phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa (đường ruột), bệnh nhiễm khuẩn niệu-sinh dục, bệnh nhiễm khuẩn hô hấp, bệnh nhiễm khuẩn *helicobacter* và phản ứng dị ứng. Ngoài ra, chế phẩm để tăng cường miễn dịch này có hiệu quả phòng hoặc điều trị các bệnh do sự mất cân bằng Th1/Th2 gây ra, do chủng CJLP243 có hiệu quả kích thích đáp ứng Th1. Vì thế, chế phẩm để tăng cường đáp ứng miễn dịch có thể được sử dụng hữu hiệu để phòng hoặc điều trị bệnh thể tạng dị ứng, bệnh dị ứng, bệnh ung thư và bệnh tự miễn. Các bệnh tự miễn bao gồm bệnh hen, cảm mạo, và bệnh tương tự.

Chế phẩm để tăng cường đáp ứng miễn dịch có thể được sử dụng qua đường miệng, nhưng phương pháp sử dụng chế phẩm này không chỉ giới hạn ở đó. Liều dùng có thể thay đổi theo loại bệnh, sự miễn dịch cần được tăng cường, mức độ mắc bệnh, độ tuổi, giới tính, và sắc tộc của bệnh nhân, và mục đích điều trị hoặc phòng bệnh. Nói chung, vi khuẩn có thể được sử dụng cho người lớn với lượng từ 10 triệu đến 100 tỷ.

Chế phẩm để phòng hoặc điều trị các bệnh đường ruột, chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 và chế phẩm để tăng cường đáp ứng miễn dịch chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 sử dụng vi khuẩn axit lactic có độ an toàn đã được chứng minh, và do đó chế phẩm này có thể được sử dụng làm dược phẩm, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, thức ăn cho vật nuôi, hoặc chất phụ gia cho thức ăn cho vật nuôi, mà không có lo ngại bất kỳ về tác dụng phụ.

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

Khi bào chế dược phẩm, các tá dược hoặc chất mang dược dụng tương hợp được có thể được thêm vào. Dạng dược phẩm dùng qua đường miệng có thể chứa ít nhất một chất làm tá dược được chọn từ nhóm bao gồm chất pha loãng, chất làm trơn, chất kết dính, chất phân rã, chất tạo ngọt, chất ổn định, và chất bảo quản, và ít nhất một chất làm chất phụ gia được chọn từ nhóm bao gồm chất điều vị, vitamin, và chất chống oxy hóa.

Tá dược và chất phụ gia có thể là chất dược dụng bất kỳ. Cụ thể, chất pha loãng có thể là axit lactic, tinh bột ngô, dầu đậu tương, xenluloza vi tinh thể, hoặc manitol, chất làm trơn có thể là magie stearat hoặc bột talc, và chất kết dính có thể là polyvinyl

pyrolidon hoặc hydroxypropylxenluloza. Ngoài ra, các chất phân rã có thể là canxi carboxymethylxenluloza, natri tinh bột glycolat, polacrilin kali, hoặc crospovidon, chất tạo ngọt có thể là đường trắng, fructoza, sorbitol, hoặc aspartam, chất ổn định có thể là natri carboxymethylxenluloza, β -cyclodextrin, sáp trắng, hoặc gôm xantan, và chất bảo quản có thể là metyl paraoxybenzoat, propyl paraoxybenzoat, hoặc kali sorbat.

Ngoài các chất nêu trên, chất tạo vị tự nhiên như vị mặn, vị chanh, vị dứa, hoặc vị thảo mộc, nước ép trái cây tự nhiên, chất màu tự nhiên như clophylin hoặc flavonoit, chất tạo ngọt như fructoza, mật ong, rượu đường, hoặc đường, hoặc chất axit hóa như axit xitric hoặc natri xitrat, hoặc hỗn hợp của chúng có thể được thêm vào chế phẩm theo sáng chế để cải thiện vị.

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

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm thực phẩm. Thực phẩm này có thể không chỉ là thực phẩm chức năng mà còn là thực phẩm hàng ngày. Chế phẩm để sử dụng làm thực phẩm chức năng có thể được chế biến thành các dạng khác nhau thường được sử dụng trong lĩnh vực này với tá dược hoặc chất phụ gia chấp nhận được về mặt dinh dưỡng. Thực phẩm chức năng có thể ở dạng bột, hạt, viên nén, viên nang, hỗn dịch, nhũ tương, xirô, chất lỏng, chất chiết, chè, thạch, đồ uống, hoặc dạng tương tự. Tá dược hoặc chất phụ gia chấp nhận được về mặt dinh dưỡng bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực này có thể được sử dụng.

Do có hiệu quả phòng hoặc điều trị bệnh thể tạng dị ứng, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng trong mỹ phẩm. Chế phẩm được sử dụng trong mỹ phẩm có thể được bào chế thành các dạng khác nhau thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Trong quá trình bào chế, tá dược hoặc chất phụ gia chấp nhận được đối với mỹ phẩm có thể được thêm vào.

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

Nếu chế phẩm theo sáng chế được sử dụng làm chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi, chế phẩm này có thể ở dạng lỏng với nồng độ cao nằm trong khoảng từ 20 đến 90% hoặc có thể được chế biến thành dạng bột hoặc hạt. Chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi có thể bao gồm ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm axit hữu cơ như axit xitric, axit fumaric, axit adipic, axit lactic, hoặc axit malic, muối phosphat như natri

phosphat, kali phosphat, pyrophosphat axit, hoặc polyphosphat (phosphat polyme hóa), và chất chống oxy hóa tự nhiên như polyphenol, catechin, α -tocopherol, dịch chiết lá hương thảo, vitamin C, dịch chiết chè xanh, dịch chiết cam thảo, chitosan, axit tanic, hoặc axit phytic. Chế phẩm được sử dụng làm thức ăn cho vật nuôi có thể được chế biến thành các dạng khác nhau thường được sử dụng trong lĩnh vực này với các thành phần thường được sử dụng trong thức ăn cho vật nuôi.

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

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

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

Ngoài ra, chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi và thức ăn cho vật nuôi có thể bao gồm chất phụ gia như chất bảo quản, chất ổn định, chất thấm ướt, chất nhũ hóa, và chất

hòa tan. Chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi có thể được bổ sung vào thức ăn cho vật nuôi bằng cách thấm lọc, phun, và trộn.

Thức ăn cho vật nuôi hoặc chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi có thể dùng cho bữa ăn của các động vật khác nhau như động vật có vú, gia cầm, và cá. Các động vật có vú bao gồm lợn, bò, cừu, dê, động vật gặm nhấm để thử nghiệm, và động vật cảnh (ví dụ, chó và mèo). Gia cầm bao gồm gà, gà tây, vịt, ngỗng, gà lôi, và chim cút, và cá bao gồm cá hồi. Tuy nhiên, vật nuôi không chỉ giới hạn ở các động vật này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết cùng với các Ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này không dùng làm giới hạn mục đích và phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Phân lập và xác định chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 phân lập được từ kim chi được phết lên môi trường MRS dạng rắn (Difco, Mỹ) chứa 1,5% aga, và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc được chứng minh là tinh khiết được thu hoạch bằng cách sử dụng vòng và ủ trong môi trường MRS dạng lỏng (Difco, Mỹ) ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 18 đến 24 giờ.

Sau đó, đặc tính hình thái và sinh lý của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được xác định bằng cách sử dụng phương pháp của Kim và các đồng tác giả (Kim *et. al.*, *Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi, *International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology*, Volume 53, July 2003, trang 1123-1126), và sử dụng kit API50CH và API50CHL (Biomero). Đặc tính hình thái và sinh lý xác định được của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được liệt kê trong Bảng 1 trên đây.

Ngoài ra, trình tự bazơ của gen ARN ribosom 6S được phân tích để xác định và phân loại vi khuẩn axit lactic. Việc xác định và phân tích trình tự bazơ của gen ARN ribosom 16S được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp của Kim và các đồng tác giả (Kim *et. al.*, *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology*, Volume 50, September 2000, trang 1915-1919). Kết quả là trình tự bazơ của gen ARN ribosom 16S của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được thể hiện với trình tự nhận biết SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự kèm theo.

Theo kết quả phân tích trình tự bazơ của gen ARN ribosom 16S, chủng

Lactobacillus plantarum CJLP243 có mức độ tương đồng cao nhất (99,9%) so với chủng *Lactobacillus plantarum* chuẩn (*Lactobacillus plantarum* NBRC15891^T, mã số lưu trữ trong ngân hàng gen là AB326351), và được xác định là chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243, và lưu trữ tại Trung tâm giống Vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM) ngày 14.10. 2009 (mã số lưu trữ: KCCM11045P).

Ví dụ 2: Thử nghiệm về khả năng chịu axit trong dịch vị nhân tạo và thử nghiệm về khả năng chịu axit mật trong dịch mật nhân tạo đối với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243

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

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 phân lập và xác định được trong Ví dụ 1 và được ủ trong môi trường MRS dạng lỏng ở nhiệt độ 37⁰C trong 18 giờ được ly tâm để làm kết tủa chủng vi khuẩn này, và rửa hai lần bằng dung dịch nước muối tiệt trùng (NaCl 0,85%). Sau đó, hỗn dịch của chủng này được cấy vào môi trường đối chứng và dịch vị nhân tạo có nồng độ khoảng 10⁷ cfu (đơn vị tạo khuẩn lạc)/ml. Số lượng vi khuẩn còn sống được xác định khi bắt đầu cấy và 3 giờ sau khi cấy trong khi nuôi cấy ở nhiệt độ 37⁰C, trong đó tổng số vi khuẩn được xác định bằng cách pha loãng vi khuẩn 10 lần bằng dung dịch đệm phosphat (độ pH = 6,8) chứa KH₂PO₄, Na₂HPO, L-xystein, HCl, Tween 80, và chất tương tự.

Thử nghiệm về khả năng chịu axit mật trong dịch mật nhân tạo được tiến hành theo phương pháp của Casey và các đồng tác giả (Casey *et. al.*, Isolation and characterization of anti-Salmonella lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract, Letters in Applied Microbiology. Volume 39, 2004, trang 431-438). Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được ủ trong môi trường điều chế được bằng cách bổ sung 0,3% dịch mật bò đực vào môi trường MRS dạng lỏng được sử dụng trong thử nghiệm về khả năng chịu axit nêu trên. Các vi khuẩn được cấy theo

cách giống như trong thử nghiệm về khả năng chịu axit trên đây, và số lượng vi khuẩn còn sống được xác định khi bắt đầu cấy và 12 giờ và 24 giờ sau khi cấy.

Khả năng chịu axit và axit mật của chủng *Lactobaillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) được tiến hành theo cách giống như trong thử nghiệm đối với chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 để so sánh.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.1 và Fig.2. Fig.1 là đồ thị thể hiện khả năng chịu axit của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243. Fig.2 là đồ thị thể hiện khả năng chịu axit mật của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

Theo Fig.1 và Fig.2, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có khả năng chịu axit và axit mật bằng hoặc cao hơn so với vi khuẩn axit lactic khác. Điều này cho thấy rằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 theo sáng chế có thể đến được ruột non mà không bị ảnh hưởng bởi dịch vị và sống khu trú trong ruột non mà không bị ảnh hưởng bởi axit mật.

Ví dụ 3: Độ bám dính của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 vào các tế bào biểu mô ruột

Tế bào HT-29 được lấy từ Ngân hàng dòng tế bào của Hàn Quốc (Korean Cell Line Bank: KCLB) được dùng làm tế bào động vật để thử nghiệm về khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột, và thử nghiệm này được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp của Kim và 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) và phương pháp của Hirano và các đồng tác giả (Hirano *et. al.*, The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells *in vitro*, Microbiology and Immunology, Volume 47, 2003, trang 405-109).

Tế bào HT-29 được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (Gibco, Mỹ) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (fetal bovine serum: FBS) được bất hoạt bằng nhiệt, 1% L-glutamin, penixilin G (100 IU/ml), và streptomycin (100 mg/ml) với sự có mặt của 5% CO₂ ở nhiệt độ 37°C. Để xác định khả năng bám và khả năng ức chế bám, các tế bào HT-29 được cấy vào đĩa có 24 lỗ sao cho số lượng tế bào HT-29 trong một lỗ là $1,0 \times 10^5$ tế bào/ml. Các tế bào HT-29 được nuôi cấy trong khi thay mới môi trường nuôi cấy mỗi ngày cho đến khi đơn lớp được tạo ra hoàn toàn. Đơn lớp hoàn toàn của

tế bào HT-29 được rửa năm lần bằng dung dịch đệm PBS ở nhiệt độ 25⁰C, và 0,5 ml môi trường RPMI 1640 không chứa chất kháng sinh được bổ sung vào.

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được tạo hỗn dịch trong môi trường RPMI tới nồng độ khoảng $1,0 \times 10^9$ cfu/ml, và hỗn dịch này được cấy vào đĩa có 24 lỗ và ủ với sự có mặt của 5% CO₂ ở nhiệt độ 37⁰C trong 2 giờ. Khi ủ xong, đĩa có 24 lỗ được rửa ba lần bằng dung dịch đệm PBS trong khi khuấy với tốc độ 200 vòng/phút trong 3 phút để loại bỏ các vi khuẩn không bám vào đĩa này và để xác định số lượng vi khuẩn có khả năng bám vào tế bào khi rửa. Sau khi rửa, 0,2% trypsin-EDTA được thêm vào các lỗ để làm bong các tế bào đã bám vào đĩa. Các tế bào tách ra này được pha loãng trong nước pepton theo cách pha loãng theo bậc và được phết lên đĩa MRS-aga, và sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 37⁰C trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy, số lượng tế bào được đếm.

Trong thử nghiệm riêng biệt, để xác định khả năng bám không hoàn toàn, sau khi tấm kính phủ được tiệt trùng hoàn toàn bằng cách ngâm trong rượu 70% trong một ngày được gắn với đáy của đĩa petri và các tế bào HT-29 được ủ, vi khuẩn axit lactic như đã sử dụng trên đây với cùng lượng được bổ sung vào, và sau đó được nuôi cấy và rửa theo cách giống như đã mô tả trên đây. Vi khuẩn axit lactic không bị rửa trôi và vẫn bám với các tế bào HT-29 được làm khô và nhuộm Gram. Vi khuẩn đã nhuộm được quan sát bằng cách sử dụng kính hiển vi quang học và số lượng vi khuẩn được đếm. Thử nghiệm tương tự được tiến hành bằng cách sử dụng chủng *Lactobaillus rhamnosus* GG (KCTC 5033).

Kết quả được thể hiện trên Fig.3. Fig.3 là đồ thị thể hiện khả năng của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 bám vào tế bào biểu mô ruột.

Theo Fig.3, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột sau 24 giờ tốt hơn so với chủng *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) đã biết rõ trên thị trường dưới dạng men vi sinh. Theo các kết quả này, có thể thấy rằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 theo một khía cạnh của sáng chế có khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột, nhờ đó cải thiện môi trường trong ruột.

Ví dụ 4: Thử nghiệm về độ an toàn của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243

Để đánh giá độ an toàn của các chủng phân lập được trong Ví dụ 1, thử nghiệm tan huyết, thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm về sự tạo ra sản phẩm chuyển hóa

có hại (amoniac), và thử nghiệm loại amin của phenylalanin bằng deaminaza được tiến hành theo các phương pháp thử nghiệm về độ an toàn được đề xuất theo tiêu chuẩn chung của Hiệp hội kinh doanh trong lĩnh vực sinh học của Hàn Quốc.

Kết quả được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Độ an toàn của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243

Chủng	Thử nghiệm			
	Thử nghiệm hóa lỏng gelatin	Loại amin của phenylalanin bằng deaminaza	Thử nghiệm tan huyết	Thử nghiệm tạo amoniac
CJLP243	âm tính	âm tính	tan huyết α , an toàn	âm tính

Theo kết quả trên đây, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có kết quả âm tính trong thử nghiệm hóa lỏng gelatin, thử nghiệm về sự tạo ra sản phẩm chuyển hóa có hại (amoniac), và thử nghiệm loại amin của phenylalanin bằng deaminaza, và có hiện tượng tan huyết α là hiện tượng được cho là không liên quan đến tác nhân gây bệnh. Do đó, đã chứng minh được rằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có thể được sử dụng an toàn cho cơ thể người.

Ví dụ 5: Sự phát triển của tế bào miễn dịch của chuột bằng cách thử nghiệm *ex vivo*

Để xác định khả năng tăng cường miễn dịch của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP 243, sự phát triển của các tế bào miễn dịch của chuột được xác định bằng thử nghiệm MTT. Thử nghiệm này được tiến hành như sau theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit thử nghiệm MTT (promega, số cat G5430). Trước tiên, các tế bào miễn dịch thu được bằng cách loại bỏ tế bào máu ra khỏi tế bào lách của chuột B6 được pha loãng trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% huyết thanh bào thai bò. Sau đó, các tế bào miễn dịch được cấy vào đĩa có 96 lỗ với mật độ 1×10^6 tế bào/lỗ (tổng thể tích 200 μ l). Sau khi cấy xong các tế bào miễn dịch, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP 243 còn sống (5×10^6 tế bào) được thêm vào mỗi lỗ và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong tủ sấy chứa 5% CO₂ trong 3 ngày. Sau 3 ngày, 100 μ l môi trường

được loại bỏ trong 1 giờ trước khi thử nghiệm MTT để chuẩn bị cho thử nghiệm này. Tiếp đó, 20 μ l dung dịch MTT (2 mg/ml) được phân tán vào mỗi lỗ, và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau đó, hệ số hấp thụ được xác định ở bước sóng 490nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc ELISA (Molecular device, Mỹ). Quá trình này được lặp lại ít nhất 3 lần. Trong quá trình này, mỗi nhóm đối chứng dương với nồng độ 10 μ g/ml, được cho sử dụng concanavalin A (con A; số sigma cat L6397), phytohemagglutamin (PHA; số sigma cat L8902), hoặc lipopolysaccharit (LPS; số sigma cat L4516) là các tác nhân gây phân bào chủ yếu. Ngoài ra, β -glucan có độ tinh khiết 99% được mua từ công ty Sigma Chemical (số cat G5011, Mỹ) và được sử dụng với nồng độ cuối bằng 1,25 μ g/ml để so sánh về khả năng tăng cường miễn dịch. Các kết quả được thể hiện trên Fig.4.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm MTT được tiến hành đối với các tế bào miễn dịch thu được từ lách chuột, các tế bào này được phân lập từ chuột và được nuôi cấy *ex vivo*, và sau đó được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

Theo Fig.4, có thể nói rằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có khả năng hoạt hóa sự phát triển của tế bào lách tốt hơn so với các tác nhân gây phân bào chủ yếu là β -glucan, và vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033), và do đó được khẳng định là có khả năng tạo miễn dịch gia tăng.

Ví dụ 6: Khả năng sản sinh IFN- γ bằng cách sử dụng thử nghiệm xytokin

Để xác định khả năng tăng cường miễn dịch của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 đối với kháng nguyên ngoại lai, khả năng sản sinh IFN- γ , xytokin loại Th1, được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA. Trước tiên, các tế bào miễn dịch thu được bằng cách loại bỏ các tế bào máu ra khỏi tế bào lách của chuột B6 được pha loãng trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% huyết thanh bào thai bò. Sau đó, các tế bào miễn dịch được cấy vào đĩa có 96 lỗ với mật độ 1×10^6 tế bào/lỗ (tổng thể tích 200 μ l). Sau khi cấy xong các tế bào miễn dịch, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP 243 (5×10^5 tế bào) còn sống được bổ sung vào mỗi lỗ và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong tủ sấy chứa 5% CO₂ trong 3 ngày. Sau 3 ngày, 50 μ l môi trường nuôi cấy được loại bỏ và lượng IFN- γ chứa trong đó được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA. Để tiến hành thử nghiệm ELISA, đĩa ELISA được phủ kháng thể

IFN- γ ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ, và sau đó 50 μ l môi trường nuôi cấy được bổ sung vào và nuôi cấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, môi trường nuôi cấy được loại bỏ ra khỏi đĩa ELISA, tiếp đó đĩa này được phủ kháng thể IFN- γ biotinyl hóa (BD Bioscience, số cat 554410), là kháng thể thứ hai, ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 2 giờ. Phản ứng màu được tạo ra bằng peroxidaza của cây củ cải cay kết hợp với streptavidin (vectore, số cat SA-5004) và cơ chất của nó, TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, KPL, số cat 50-76-03). Sau khi phản ứng màu được tiến hành, 100 μ g/ml dung dịch ngừng phản ứng (HCl 3M) được bổ sung vào đĩa để làm ngừng phản ứng màu. Lúc này, phản ứng màu có sự thay đổi màu từ màu xanh lá cây thành màu vàng, và hệ số hấp thụ được xác định ở bước sóng 450nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc ELISA (Molecular device, Mỹ) sau khi phản ứng màu ngừng lại. Quá trình này được lặp lại ít nhất 3 lần. Trong các quá trình này, nhóm đối chứng dương được cho sử dụng concanavalin A (con A; số sigma cat L6397), phytohemaglutamin (PHA; số sigma cat L8902), hoặc lipopolysaccharit (LPS; số sigma cat L4516) là các tác nhân gây phân bào chủ yếu, nồng độ của mỗi tác nhân này bằng 10 μ g/ml. Ngoài ra, β -glucan có độ tinh khiết 99% được mua từ công ty Sigma Chemical (số cat G5011, Mỹ) và được sử dụng với lượng cuối bằng 1,25 mg để so sánh khả năng tăng cường miễn dịch. Các kết quả được thể hiện trên Fig.5.

Fig.5 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm tạo ra IFN- γ được tiến hành đối với các tế bào miễn dịch trong lách phân lập được từ chuột và được nuôi cấy *ex vivo*, và sau đó được xử lý bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

Theo Fig.5, có thể nói rằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có khả năng sản sinh IFN- γ kém hơn so với các nhóm đối chứng dương được cho sử dụng tác nhân gây phân bào chủ yếu, nhưng khả năng này cao hơn đáng kể so với vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033), và do đó chủng này được khẳng định là có thể tạo sự miễn dịch loại Th1 gia tăng.

Ví dụ 7: Khả năng tạo miễn dịch gia tăng của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 khi chủng này được sử dụng qua đường miệng

Thử nghiệm để xác định khả năng tạo miễn dịch gia tăng của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 khi chủng này được sử dụng qua đường miệng được tiến hành như sau.

Chuột cái Balb/c 4 tuần tuổi được mua về và duy trì để làm ổn định trong 1 tuần trong phòng chăm sóc động vật ở điều kiện không có mầm bệnh đặc hiệu (specific pathogen free: SPF) với nhiệt độ được duy trì bằng $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm $55 \pm 15\%$. Chuột được cung cấp thức ăn cho vật nuôi ở dạng bột thông thường có bổ sung thêm một số chất kháng sinh, và được cung cấp nước uống tùy ý. Mỗi chủng *Lactobacillus rhamnosus* GG và *Lactobacillus plantarum* CJLP 243 được chế biến thành dạng bột đông khô nhanh và được duy trì trong tủ lạnh. Vi khuẩn axit lactic được trộn đều với thức ăn cho vật nuôi dạng bột và được cho sử dụng qua đường miệng cho chuột với liều $2,5 \times 10^{10}$ cfu/ngày/con. Trọng lượng của mỗi con chuột được xác định trong 8 tuần trong khi sử dụng, và sau đó tất cả các con chuột bị giết để thử nghiệm sau đó.

Lấy lách từ mỗi con chuột đã bị giết, chiều dài và trọng lượng của lách được xác định. Lách này được làm vỡ bằng cách sử dụng pít tông của bơm tiêm và được lọc qua lưới để tách tế bào, và các quá trình này được tiến hành trong dung dịch đệm ACK. Các tế bào tách được được đếm bằng cách sử dụng kính hiển vi.

Để xác định sự thay đổi thành phần của các tế bào miễn dịch trong các tế bào lách tách được, tế bào T trong các tế bào tách được được nhuộm bằng kháng thể FITC kháng Thy1.2, và các tế bào B được nhuộm bằng kháng thể FITC kháng CD19. Các tế bào T CD được nhuộm bằng kháng thể FITC kháng Thy1.2 và kháng thể PE kháng CD4, và các tế bào CD8 được nhuộm bằng kháng thể FITC kháng Thy1.2 và kháng thể PE kháng CD8. Các tế bào đã nhuộm màu trong mỗi mô được phân tích về tỷ lệ thành phần của chúng bằng cách sử dụng thiết bị quét FAC (BD Biosciences, Mỹ).

Các tế bào lách tách được được xử lý bằng ConA với nồng độ $5 \mu\text{g/ml}$ để kích thích các lymphô bào T. Sau 24 giờ, dịch nổi bề mặt được loại bỏ và xác định nồng độ của IFN- γ và IL-2, xytokin của lymphô bào T, bằng cách sử dụng phương pháp ELISA. Vi đĩa được phủ IFN- γ và các kháng thể bắt giữ IL-2 ở nhiệt độ 4°C qua đêm, và sau đó được rửa bằng PBS (PBST) chứa 0,05% Tween20 và ức chế bằng PBS chứa 3% huyết thanh bào thai bò. Sau 1 giờ, vi đĩa được rửa và dịch nổi bề mặt và dung dịch chất chuẩn (dung dịch chất chuẩn được cung cấp bởi công ty BD Bioscience) được bổ sung vào mỗi lỗ và cho phản ứng ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Tiếp đó, vi đĩa được rửa và kháng thể biotinyl hóa được bổ sung vào mỗi lỗ, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng trong 45 phút. Sau đó, vi đĩa được rửa và streptavidin-phosphatase kiềm được bổ sung vào mỗi lỗ, và nuôi cấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Sau khi

rửa vi đĩa, phản ứng màu được tiến hành bằng cách bổ sung dung dịch p-nitrophenyl phosphat (Sigma, Mỹ) vào mỗi lỗ. Hệ số hấp thụ được xác định ở bước sóng 405nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa, và nồng độ xytokin được xác định bằng cách sử dụng đường cong chuẩn.

Kết quả được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.6 đến Fig.11.

Fig.6 là đồ thị thể hiện trọng lượng xác định được ngay trước khi giết chuột đã được cho sử dụng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 qua đường miệng, so với nhóm đối chứng âm và nhóm sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Theo Fig.6, nhóm sử dụng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 vẫn duy trì trọng lượng cơ thể bình thường mà không có sự bất thường bất kỳ do sự miễn dịch tăng cường quá mức, và không quan sát thấy sự bất thường đối với trọng lượng lách và số lượng tế bào (số liệu không được thể hiện trên hình vẽ).

Fig.7 là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách xác định sự thay đổi về quần thể tế bào T để xác định hiệu quả của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 đối với các tế bào miễn dịch trong lách phân lập được sau khi giết chuột đã được cho sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 qua đường miệng, so với nhóm đối chứng âm và nhóm sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Fig.8 là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách xác định sự thay đổi về quần thể tế bào T CD4 để xác định hiệu quả của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 đối với các tế bào miễn dịch trong lách phân lập được sau khi giết chuột đã được cho sử dụng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 qua đường miệng, so với nhóm đối chứng âm và nhóm sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Fig.9 là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách xác định sự thay đổi về quần thể tế bào T CD8 để xác định hiệu quả của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 đối với các tế bào miễn dịch trong lách phân lập được sau khi chuột được cho sử dụng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 qua đường miệng, so với nhóm đối chứng âm và nhóm sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Theo các hình vẽ từ Fig.7 đến Fig.9, chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được xác định là làm tăng số lượng các tế bào T, tế bào T CD4, và tế bào T CD8, và do đó có thể nói rằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 làm tăng cường miễn dịch bằng cách kích thích sự hoạt hóa quá trình phát triển của tế bào T.

Ngoài ra, để xác định hiệu quả của *Lactobacillus plantarum* CJLP243 đối với

sự hoạt hóa tế bào T, lượng IL-2 và IFN- γ được sản sinh bởi các tế bào T trong tế bào lách chuột phân lập được sau khi giết chuột đã được cho sử dụng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 qua đường miệng và sau đó được kích thích bằng ConA *ex vivo* được xác định bằng cách sử dụng phương pháp ELISA. Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.10 và Fig.11.

Fig.10 là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách xác định lượng IL-2 được sản sinh bởi tế bào T từ tế bào lách chuột phân lập được sau khi giết chuột đã được cho sử dụng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 qua đường miệng và sau đó được kích thích bằng enzym ConA *ex vivo* bằng cách sử dụng phương pháp ELISA để xác định hiệu quả của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 đối với sự hoạt hóa các tế bào T, so với nhóm đối chứng âm và nhóm sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Fig.11 là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách xác định lượng IFN- γ sản sinh bởi tế bào T từ tế bào lách phân lập được sau khi giết chuột đã được cho sử dụng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 và sau đó được kích thích bằng enzym ConA *ex vivo*, bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, để xác định hiệu quả của chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 đối với sự hoạt hóa tế bào T, so với nhóm đối chứng âm và nhóm sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Theo Fig.10 và Fig.11, có thể nói rằng chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 được xác định là làm gia tăng sự sản sinh xytokin của tế bào T so với nhóm đối chứng âm, nhờ đó chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có thể làm hoạt hóa tế bào T và tăng cường sự miễn dịch thông thường.

Ví dụ 8: Điều chế bột men vi sinh chứa chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243

Chủng *Lactobacillus plantarum* CJLP243 xác định được trong Ví dụ 1 được sản xuất trên quy mô lớn và làm đông khô nhanh để tạo ra men vi sinh để sử dụng làm nguyên liệu cho dược phẩm, thực phẩm, thức ăn cho vật nuôi, chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi, hoặc mỹ phẩm.

Vi khuẩn được ủ trong môi trường MRS dạng lỏng (Difco) ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ trong khi điều chỉnh độ pH = 6,0 bằng cách sử dụng dung dịch NaOH 25%, và được ly tâm để thu được chủng vi khuẩn. Chủng vi khuẩn thu được được làm đông khô nhanh ở nhiệt độ -40°C bằng cách sử dụng 5% dextrin và 10% sữa tách kem

làm chất bảo vệ quá trình làm đông khô nhanh, và chủng vi khuẩn đã khô được nghiền thành bột bằng cách sử dụng thiết bị khuấy ở nhiệt độ 37°C để thu được bột. Vi khuẩn sống ở dạng bột được trộn với các tá dược như glucoza, axit lactic, và sữa tách kem để điều chỉnh số lượng vi khuẩn tới mức cần thiết và cất giữ vi khuẩn sống này, và đóng gói trong túi nhôm hàn kín.

Men vi sinh điều chế được theo phương pháp này có thể được sử dụng cho mỹ phẩm, thực phẩm, thức ăn cho vật nuôi, mỹ phẩm, hoặc sản phẩm tương tự, bằng cách trộn với bột ngũ cốc được sử dụng làm nguyên liệu của thức ăn cho vật nuôi, trộn với các tá dược hoặc chất phụ gia để tạo ra dược phẩm như viên nén và viên nang, hoặc thực phẩm, và trộn với nguyên liệu để tạo ra mỹ phẩm.

Trong khi sáng chế đã được thể hiện cụ thể và mô tả cùng với các phương án làm ví dụ của nó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các thay đổi khác nhau về dạng và chi tiết có thể được thực hiện mà vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế như được xác định trong phần Yêu cầu bảo hộ sau đây.

Những hiệu quả có thể đạt được

Như đã mô tả trên đây, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 theo sáng chế là men vi sinh có khả năng chịu được axit và axit mật rất tốt, và có độ bám tốt với tế bào biểu mô ruột, và do đó có hiệu quả làm giảm các rối loạn đường ruột. Ngoài ra, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 có hiệu quả trong việc phòng hoặc điều trị các bệnh khác nhau do tác dụng tăng cường miễn dịch của nó bằng cách kích thích sự phát triển của các tế bào miễn dịch thông thường, kể cả tế bào T. Cụ thể, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 kích thích đáp ứng Th1 và do đó có hiệu quả trong việc điều trị các bệnh do sự mất cân bằng Th1/Th2 bởi đáp ứng Th2 quá mức gây ra. Vì thế, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 theo sáng chế có thể được dùng cho chế phẩm để điều trị các bệnh đường ruột và tăng cường đáp ứng miễn dịch.

**HIỆP ƯỚC BUDAPEST VỀ
CÔNG NHẬN QUỐC TẾ VIỆC LƯU GIỮ VI SINH VẬT
NHẪM MỤC ĐÍCH ĐĂNG KÝ SÁNG CHẾ**

MẪU QUỐC TẾ

To
CJ CHEILJEDANG CORPORATION
500 5-GA NAMDAEMUN-RO,
CHUNG-KU, SEOUL
REPUBLIC OF KOREA

GIẤY BIÊN NHẬN TRONG TRƯỜNG HỢP LƯU
GIỮ GỐC được cấp theo Quy tắc 7.1 bởi
CƠ QUAN LƯU GIỮ QUỐC TẾ
xác nhận ở phần cuối trang này

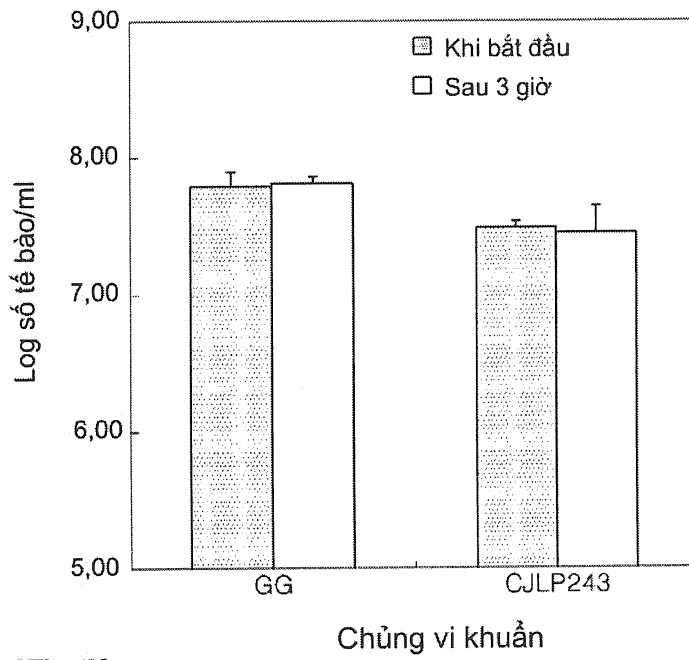
I. NHẬN DẠNG VI SINH VẬT	
Số tham chiếu nhận dạng do NGƯỜI LƯU GIỮ đưa ra: <i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP243	Số truy cập do CƠ QUAN LƯU GIỮ QUỐC TẾ đưa ra KCTM 11045P
II. MÔ TẢ KHOA HỌC VÀ/HOẶC KÝ HIỆU PHÂN LOẠI ĐƯỢC ĐỀ XUẤT	
Vi sinh vật được nhận dạng trong mục I trên đây có kèm theo ☐ Mô tả khoa học ☐ Ký hiệu phân loại được đề xuất (Đánh dấu chéo nếu có)	
III. NHẬN VÀ CHẤP NHẬN	
Cơ quan lưu giữ quốc tế chấp nhận vi sinh vật được nhận dạng trong mục I trên đây, vi sinh vật này đã được Cơ quan nhận ngày 14/10/2009 (ngày lưu giữ gốc) ¹	
IV. CƠ QUAN LƯU GIỮ QUỐC TẾ	
Tên: Korean Culture Center of Microorganisms Địa chỉ: 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun-gu SEOUL 120-091 Republic of Korea	Chữ ký của (những) người có quyền đại diện cho Cơ quan lưu giữ quốc tế hoặc (các) nhân viên được uỷ quyền: Ngày: 14/10/2009

¹ Trong trường hợp áp dụng Quy tắc 6.4(d), ngày này là ngày Cơ quan lưu giữ quốc tế nhận được vi sinh vật; trong trường hợp lưu trữ không được thực hiện theo Hiệp ước Budapest, sau khi Cơ quan lưu trữ quốc tế nhận được yêu cầu chuyển đổi thành lưu trữ theo Hiệp ước Budapest, ngày này là ngày cơ quan lưu trữ quốc tế nhận được vi sinh vật

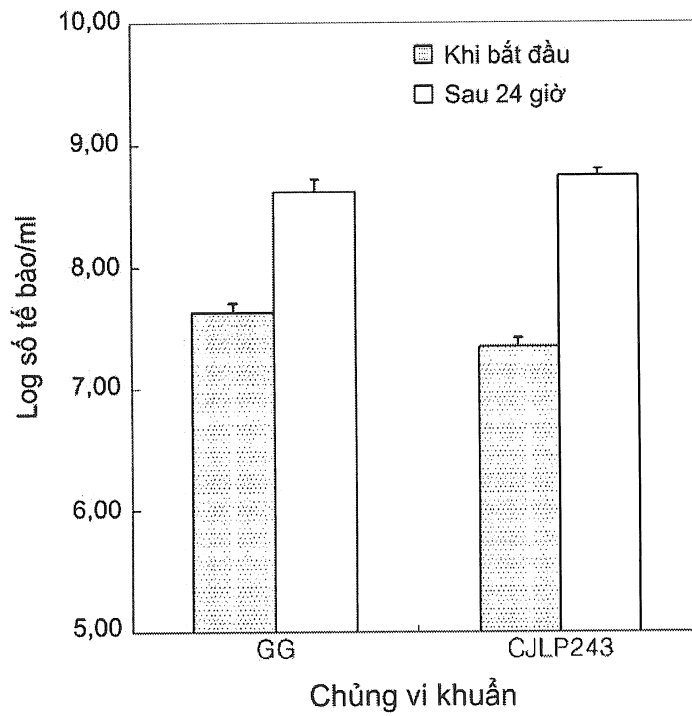
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 (KCTC 11045P).
2. Chế phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh đường ruột, trong đó chế phẩm này chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 (KCTC 11045P).
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này là dược phẩm.
4. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này là thực phẩm chức năng chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 (KCTC 11045P).
5. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này là thức ăn cho vật nuôi hoặc chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 (KCTC 11045P).
6. Chế phẩm để tăng cường đáp ứng miễn dịch, trong đó chế phẩm này chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 (KCTC 11045P).
7. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó chế phẩm này là dược phẩm.
8. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó chế phẩm này là thực phẩm chức năng chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 (KCTC 11045P).
9. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó chế phẩm này là thức ăn cho vật nuôi hoặc chất phụ gia thức ăn cho vật nuôi chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 (KCTC 11045P).
10. Mỹ phẩm chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CJLP243 (KCTC 11045P).

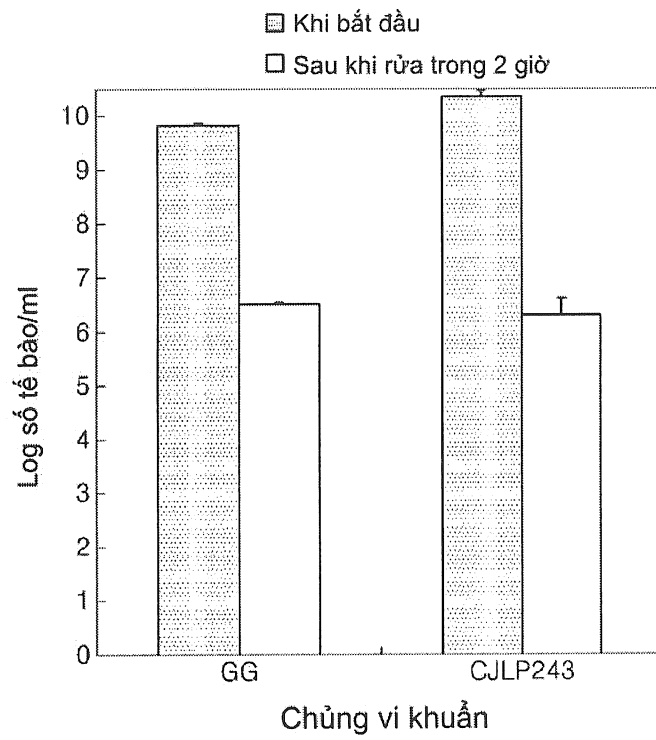
[Fig. 1]



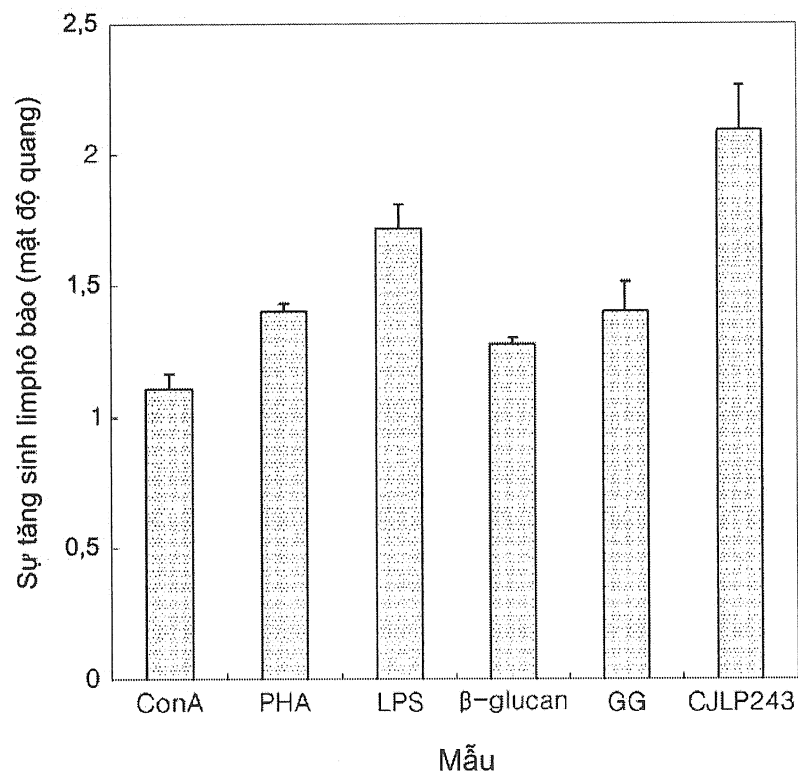
[Fig. 2]



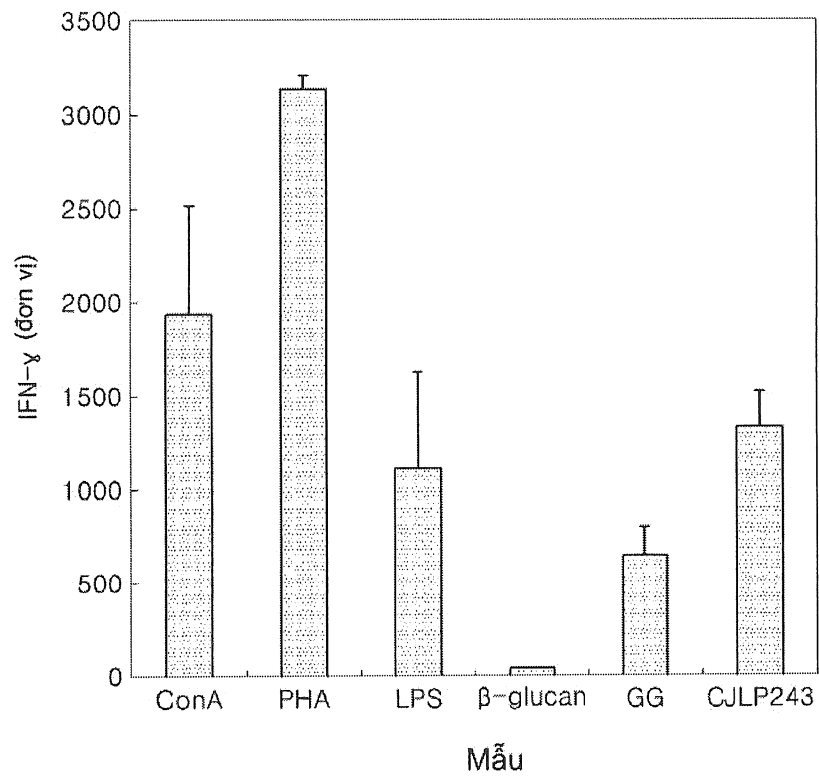
[Fig. 3]



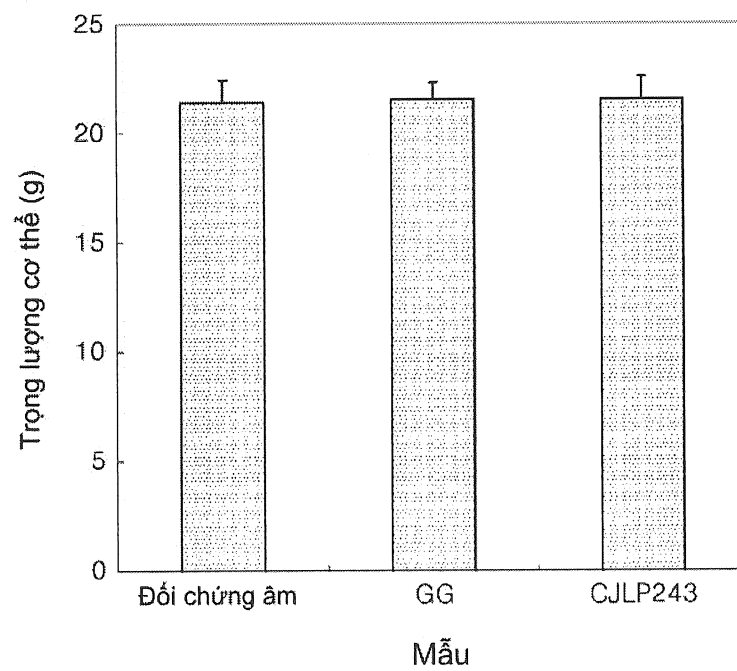
[Fig. 4]



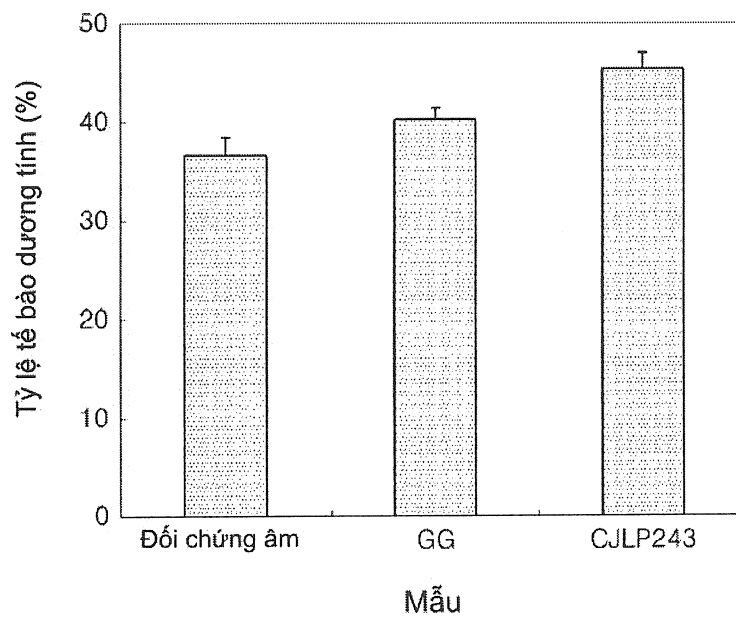
[Fig. 5]



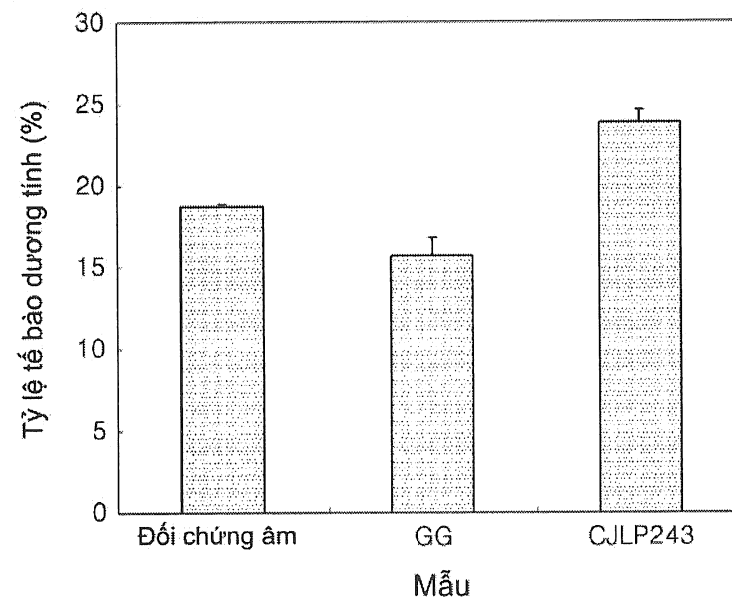
[Fig. 6]



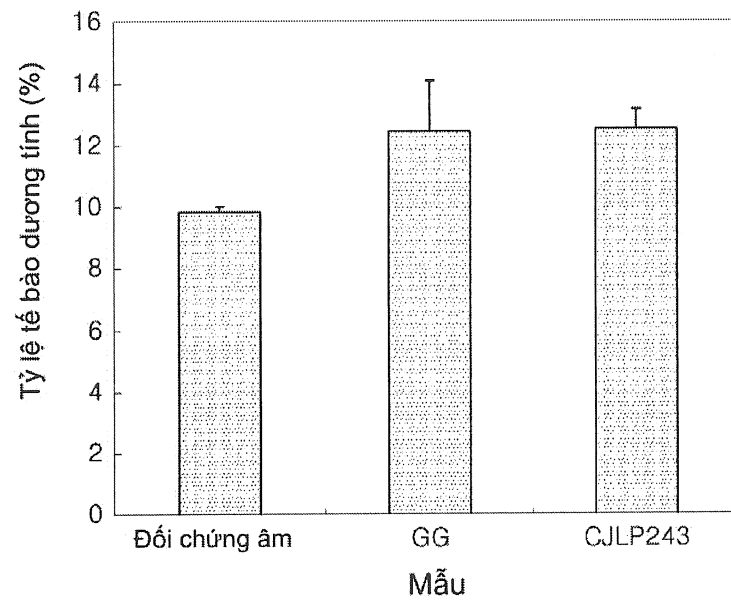
[Fig. 7]



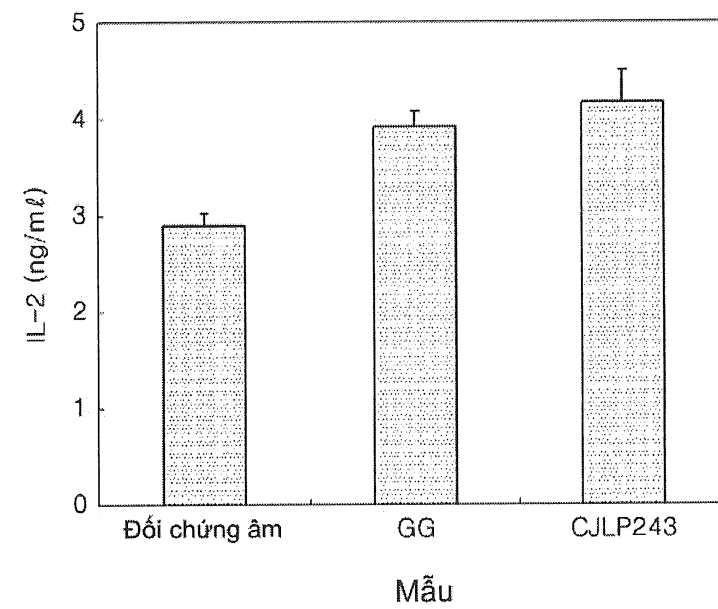
[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

