



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

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

(11)



1-0027448

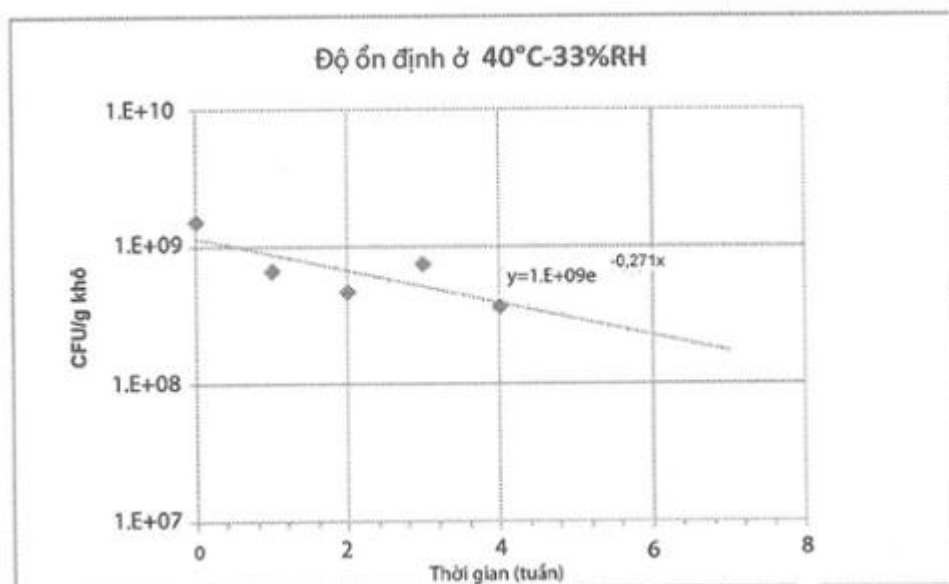
(51)⁷ C12N 1/04; C12N 11/02; A23K 1/16;
C07K 17/02

(13) B

- (21) 1-2011-03487 (22) 26/05/2010
(86) PCT/US2010/036098 26/05/2010 (87) WO/2010/138522 02/12/2010
(30) 61/181,248 26/05/2009 US; 61/223,295 06/07/2009 US
(45) 25/02/2021 395 (43) 25/07/2012 292A
(73) ADVANCED BIONUTRITION CORPORATION (US)
7155 Columbia Gateway Drive, Columbia, MD 21046-2545, United States of America
(72) HAREL, Moti (US); DREWES, Roger (US); CARPENTER, Brian (US);
ARTIMOVICH, Elena (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA VI SINH VẬT VÀ/HOẶC NGUYÊN LIỆU CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học, chất làm ổn định chế phẩm, và chất bảo quản. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm này bao gồm bước phân tán toàn bộ chế phẩm rắn trong dung dịch, có hoặc không có chân không, và làm lạnh dung dịch xuống nhiệt độ cao hơn nhiệt độ đông lạnh của nó. Phương pháp này bao gồm bước làm khô sơ cấp chế phẩm ở nhiệt độ và khoảng thời gian mong muốn, và bước làm khô thứ cấp tăng tốc trong độ chân không lớn nhất và nhiệt độ cao, để đạt được độ hoạt động mong muốn cuối cùng của nước trong nguyên liệu khô.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực bảo quản vi sinh vật và/hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm cao. Cụ thể, sáng chế đề cập đến việc gắn vi sinh vật sống và/hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học trong chất nền chế phẩm bảo quản khô.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi sinh vật có hoạt tính sinh học, chẳng hạn như vi khuẩn và virus sống hoặc chết, hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học, chẳng hạn như protein, vitamin, khoáng chất, hoóc-môn và tế bào nhìn chung không ổn định khi được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ và độ ẩm cao. Ví dụ, nhiều lợi khuẩn có sẵn trên thị trường chẳng hạn như *Lactobacillus rhamnosus* có thể mất khả năng sống nhiều hơn 1 log trong ít hơn hai tuần khi được bảo quản trong môi trường khí xung quanh ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 25°C). Quy trình thông thường để làm khô và bảo quản các vi sinh vật có hoạt tính sinh học này sau khi thu hoạch từ bình nuôi cấy (ví dụ, bình lên men) là nhỏ giọt dung dịch đặc của tế bào sống vào nitor lỏng sau đó bảo quản viên đông lạnh trong thiết bị làm lạnh ở nhiệt độ -80°C để làm khô lạnh hoặc chuyển sang nơi khác. Phương pháp làm khô lạnh là phương pháp chủ yếu để làm khô nguyên liệu có hoạt tính sinh học nhạy cảm. Các phương pháp khác, chẳng hạn như sấy phun, làm khô bằng dịch lỏng siêu tới hạn, và sấy khô thường không thích hợp với nguyên liệu có hoạt tính sinh học nhạy cảm chẳng hạn như vi khuẩn và virus sống hoặc được làm suy yếu bởi vì nhiệt độ làm khô cao sử dụng trong các phương pháp này gây tổn hại đáng kể cho chính các vi sinh vật. Ngoài ra, các phương pháp này có thể không làm khô đủ nguyên liệu đến yêu cầu cụ thể về độ ẩm còn lại để sản phẩm ổn định, và do đó, có thể cần phải có bước làm khô bổ sung bằng các phương pháp khác.

Trong phương pháp làm khô lạnh, vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học thường được trộn trong dung dịch hoặc huyền phù của chất bảo quản, được làm

đông lạnh, và sau đó được khử nước bằng cách làm thăng hoa trong chân không hoàn toàn. Nhiệt độ thấp của quy trình làm khô lạnh làm giảm phản ứng phân rã của hoạt chất sinh học và làm giảm thiểu sự mất hoạt tính ở dạng khô cuối cùng. Tuy nhiên, yêu cầu về nhiệt độ dưới 0 cần nhiều năng lượng, và tỷ lệ diện tích bề mặt so với thể tích thấp của nguyên liệu đông lạnh đòi hỏi phải sử dụng thời gian làm khô dài (lên đến vài ngày cho mỗi chu kỳ theo mẻ). Tính chất làm khô chậm của quy trình làm khô lạnh cũng tạo điều kiện cho sự hình thành các tinh thể đá, điều này có thể gây tổn hại hoặc làm biến tính hoạt chất sinh học nhạy cảm. Vì lý do này, vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học chẳng hạn như virus, vi khuẩn, và tế bào mà có thành tế bào hoặc màng lipid, đặt ra thách thức đáng kể đối với quy trình làm khô lạnh.

Một tùy chọn để làm giảm sự tạo thành cấu trúc tinh thể đá là bổ sung chất bảo quản cryo vào dung dịch hoạt chất sinh học. Chất bảo quản này là hóa chất có khả năng hòa tan cao, được bổ sung vào chế phẩm để bảo quản màng tế bào và protein nội bào trong quá trình làm đông lạnh và để tăng cường độ ổn định trong quá trình bảo quản. Các chất làm ổn định thông thường đối với vi khuẩn và virus sống bao gồm đường chẳng hạn như sucroza, glyxerol, hoặc sorbitol, ở nồng độ cao đối với nguyên liệu hoặc hoạt chất sinh học tế bào (Morgan et al., 2006; Capela et al., 2006). Tuy nhiên, chất bảo quản này có thể không thâm nhập đủ vào trong tế bào để bảo quản các thành phần hoạt tính bên trong khu vực nội bào. Do đó, thách thức đáng kể vẫn là phát triển quy trình và chế phẩm làm khô tối ưu giúp giảm thiểu lượng mất mát khi làm khô trong khi vẫn đạt được độ ổn định bảo quản thích hợp của nguyên liệu khô.

Một số vấn đề liên quan đến việc làm khô lạnh đã được giải quyết bằng cách sử dụng dạng kết hợp của một số chế phẩm nhất định và làm khô trong chân không ở trạng thái lỏng. Annear (Annear 1962) đã phát triển chế phẩm chứa vi khuẩn trong dung dịch chứa đường và axit amin và quy trình làm khô trong chân không bao gồm bước làm sôi và tạo bọt. Roser et al. (US. Pat 6,964,771) bộc lộ giải pháp làm khô tương tự bằng cách tạo bọt, bao gồm bước cô chất lỏng, tiếp đó là bước làm sôi và tạo bọt cho dung dịch đã cô (xirô) trong chân không. Để làm giảm bớt các tổn hại do sự oxy hóa và biến tính có thể xảy ra trong bước làm sôi, Bronshtein (patent Mỹ số: 5,766,520, 7,153,472) đưa ra công thức bảo quản cải tiến chứa hydrat cacbon và chất hoạt động bề mặt. Việc làm khô

dung dịch bảo quản cũng bao gồm quy trình cô từng bước trong chân không vừa phải trước khi sử dụng chân không mạnh để làm sôi sủi bọt lượng nước còn lại để tạo ra bọt ổn định khô. Để loại bỏ bước làm sôi, Busson và Schroeder (patent Mỹ số 6,534,087) đã đề xuất quy trình làm khô trong chế phẩm ở trạng thái lỏng đối với hoạt chất sinh học không nhạy cảm bằng cách sử dụng lò chân không mà không có bước làm sôi, bằng cách sử dụng áp suất chân không rất nhẹ trên 3999.66 Pa (30 Torr). Sau khi đạt được mức độ khô nhất định mà không có bước làm sôi nguyên liệu, nhiệt được áp dụng ở nhiệt độ lớn hơn 20°C và nguyên liệu đã được làm khô được thu lấy sau chỉ một vài giờ.

Loại quy trình làm khô này, trong đó dung dịch có hoạt tính sinh học được duy trì ở trạng thái lỏng trong toàn bộ quy trình làm khô, có ưu điểm là làm khô nhanh hơn do sự đối lưu của chất lỏng trong bước làm sôi và diện tích bề mặt được thể hiện bằng các bề mặt tạo bọt tăng. Tuy nhiên, bước làm sôi và tạo bọt đòi hỏi nạp lượng nhiệt đáng kể cần thiết để tạo ra sự phun dung dịch. Quy trình làm khô này không thích hợp để làm khô sinh vật nhạy cảm, như virus, tế bào hoặc vi khuẩn sống bởi vì nhiệt tác dụng làm tăng tốc các quy trình enzym (ví dụ, phân giải protein), và các quy trình hóa học (ví dụ, oxy hóa và sự tấn công gốc tự do), mà có thể phá hủy hoạt tính hoặc khả năng sống của nguyên liệu sinh học.

Quy trình làm khô được mô tả trên đây cũng bị giới hạn ở khả năng áp dụng trên quy mô công nghiệp. Để tránh quá trình làm đông lạnh thì quy trình cần phải được tiến hành ở mức chân không thấp hơn (>933.254 Pa (7 Torr)) so với trong các chu kỳ của quy trình làm khô lạnh dạng phun hoặc làm khô lạnh thông thường. Nhược điểm đáng kể nhất của các quy trình trên đây là không có khả năng kiểm soát và hạn chế sự giãn nở của bọt trong bình, khay hoặc lọ nhỏ. Sự phun trào không kiểm soát được và sự tạo bọt quá mức làm cho các quy trình này không thể phát triển trên thực tế thành quy trình có quy mô công nghiệp. Tính chất phun trào và tạo bọt của bước làm sôi dẫn đến một phần nguyên liệu bị bắn tung tóe trên thành bình và vào buồng làm khô. Để làm dịu sự phun trào trong bước làm sôi, Bronshtein (patent Mỹ số: 6,884,866, 6,306,345) đã đề xuất các khoang đặc biệt và quy trình sử dụng nhiệt độ /áp suất được kiểm soát để làm giảm sự quá nhiệt đến mức độ chấp nhận được. Phương pháp khác để chứa bọt phun trào và giải quyết sự tạo bọt quá mức được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số:

2008/0229609, trong đó dung dịch có hoạt tính sinh học được chứa trong dụng cụ chứa hoặc túi được phủ bằng màng thông hơi. Một lần nữa, các quy trình này khó thực hiện ở quy mô công nghiệp và chúng khó có thể lặp lại một cách đáng tin cậy đối với các chế phẩm khác nhau.

Do đó, vẫn cần có chế phẩm bảo quản thích hợp có thể được làm khô ở trạng thái lỏng và phương pháp có thể áp dụng trên quy mô công nghiệp để làm khô vi sinh vật có hoạt tính sinh học như virus, vi khuẩn và tế bào sống hoặc chết, đặc biệt là ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ đông lạnh. Có nhu cầu cụ thể về quy trình làm khô có thể áp dụng ở nhiều quy mô và tiết kiệm chi phí mà cũng thích hợp để áp dụng ngoài ngành công nghiệp dược phẩm như công nghiệp thực phẩm và nông nghiệp. Chế phẩm bảo quản và quy trình làm khô nhẹ là cần thiết để có thể làm khô một cách thỏa đáng mà không tiếp xúc với nhiệt độ cao. Cần có chế phẩm có thể bảo vệ các nguyên liệu sinh học như vậy khi bảo quản ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm cao. Sáng chế, như được mô tả dưới đây, đề xuất giải pháp khắc phục được tất cả các thách thức này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến chế phẩm và phương pháp bảo quản nguyên liệu có hoạt tính sinh học, như peptit, protein, hoóc-môn, vitamin, khoáng chất, thuốc, thuốc diệt vi sinh vật, thuốc diệt nấm, thuốc diệt cỏ, thuốc diệt côn trùng, thuốc diệt tinh trùng, axit nucleic, kháng thể, vắc-xin, và/hoặc vi sinh vật có hoạt tính sinh học như vi khuẩn (lợi khuẩn hoặc vi khuẩn khác), virus và/hoặc huyền phù tế bào, khi bảo quản. Phương pháp làm khô tạo ra quy trình giãn nở có kiểm soát của chế phẩm chứa vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học, chất làm ổn định chế phẩm, và chất bảo quản. Chế phẩm được điều chế bằng cách phân tán toàn bộ các thành phần rắn trong dung dịch, có hoặc không có chân không. Dung dịch được làm lạnh xuống nhiệt độ cao hơn nhiệt độ đông lạnh của nó và được làm khô trong chân không thành chế phẩm khô, mà thể hiện độ ổn định cao bất ngờ. Phương pháp bao gồm bước làm khô sơ cấp chế phẩm ở nhiệt độ và khoảng thời gian mong muốn, và bước làm khô thứ cấp tăng tốc trong độ chân không lớn nhất và nhiệt độ cao, để đạt được độ hoạt động mong muốn cuối cùng của nước trong nguyên liệu khô.

Theo một phương án, chế phẩm chứa lượng đủ của chất làm ổn định chế phẩm, trong đó vi sinh vật được gắn vào. Ví dụ về chất làm ổn định chế phẩm thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, xenluloza axetat phtalat (CAP), carboxy-metyl-xenluloza, pectin, natri alginat, muối của axit alginic, hydroxyl propyl methyl xenluloza (HPMC), methyl xenluloza, caragenan, gồm guar, gồm acaxia, gồm xanthan, gồm locust bean, chitosan và dẫn xuất chitosan, collagen, axit polyglycolic, tinh bột và tinh bột được cải biến, xyclodextrin và oligosacarit (inulin, maltodextrin, dextran, v.v.); và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án cụ thể, chất làm ổn định chế phẩm được ưu tiên là natri alginat. Tốt hơn là, chế phẩm chứa, tính theo tỷ lệ phần trăm khối lượng của tổng khối lượng khô, chất làm ổn định chế phẩm với lượng từ 0,1 đến 10%, tốt hơn nếu là từ 1 đến 6%, tốt hơn nữa nếu là từ 2 đến 4%. Theo phương án khác, chất làm ổn định chế phẩm chứa hỗn hợp của natri alginat và oligosacarit theo tỷ lệ khối lượng là 1:1-10, tốt hơn nữa nếu là 1:1-5 của natri alginat/oligosacarit. Theo phương án khác nữa theo sáng chế, chất làm ổn định chế phẩm được tạo liên kết ngang với ion kim loại có hoá trị hai để tạo ra hydrogel cứng.

Theo phương án khác, chế phẩm chứa lượng đáng kể của chất bảo quản, trong đó vi sinh vật được gắn vào. Ví dụ về chất bảo quản thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, protein như albumin huyết thanh người và bò, lòng trắng trứng, gelatin, globulin miễn dịch, protein đậu tương được phân lập, protein lúa mì, bột sữa không kem, caseinat, protein nước sữa và sản phẩm thủy phân protein bất kỳ; hydrat cacbon bao gồm monosacarit (ví dụ, galactosa, D-manosa, sorboza, v.v.), disacarit (ví dụ, lactosa, trehalosa, sucroza, v.v.), axit amin như lysin, mononatri glutamat, glyxin, alanin, arginin hoặc histidin, cũng như axit amin kỵ nước (tryptophan, tyrosin, leuxin, phenylalanin, v.v.); metylamin như betain; muối tá được như magie sulfat; polyol như rượu trihydric hoặc rượu đường bậc cao, (ví dụ, glyxerin, erythritol, glyxerol, arabitol, xylitol, sorbitol, và manitol); propylen glycol; polyetylen glycol; pluronic; chất hoạt động bề mặt; và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án được ưu tiên, chất bảo quản bao gồm hỗn hợp của disacarit, protein, và sản phẩm thủy phân protein. Theo một phương án cụ thể, chất bảo quản được

ưu tiên là hỗn hợp của trehaloza, chất phân lập protein đậu tương hoặc protein nước sữa và sản phẩm thủy phân của chúng. Tốt hơn là, chế phẩm chứa, tính theo tỷ lệ phần trăm khối lượng của tổng khối lượng khô, trehaloza với lượng từ 10 đến 90%, chất phân lập protein đậu tương hoặc protein nước sữa với lượng từ 0,1 đến 30% và sản phẩm thủy phân protein đậu tương hoặc sữa với lượng từ 0,1 đến 30%. Tốt hơn là trehaloza với lượng từ 20 đến 80%, chất phân lập protein đậu tương hoặc protein nước sữa với lượng từ 0,1 đến 20% và sản phẩm thủy phân protein đậu tương hoặc sữa với lượng từ 1 đến 20%, tốt hơn nữa nếu là trehaloza với lượng từ 40 đến 80%, chất phân lập protein đậu tương hoặc protein nước sữa với lượng từ 0,1 đến 20% và sản phẩm thủy phân protein đậu tương hoặc sữa với lượng từ 1 đến 20%.

Phương pháp theo sáng chế thường bao gồm bước pha trộn, có hoặc không có chân không, dung dịch cô đặc hoặc bột khô của vi sinh vật có hoạt tính sinh học (ví dụ, vắc-xin, vi khuẩn, tảo, virus và/hoặc huyền phù tế bào sống hoặc chết) hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học (ví dụ, peptit, protein, hoóc-môn, vitamin, khoáng chất, thuốc, thuốc diệt vi sinh vật, thuốc diệt nấm, thuốc diệt cỏ, thuốc diệt côn trùng, thuốc diệt tinh trùng, axit nucleic, kháng thể, vắc-xin), chất làm ổn định, và chất bảo quản thành chế phẩm đồng nhất, làm lạnh chế phẩm xuống nhiệt độ cao hơn nhiệt độ đông lạnh của nó, và làm khô trong chân không ở nhiệt độ bảo quản lớn hơn 20°C. Theo sáng chế, quy trình làm khô có thể bao gồm bước làm khô sơ cấp trong chân không ở nhiệt độ bảo quản bằng 20°C hoặc cao hơn, tiếp đó là bước làm khô thứ cấp tăng tốc chế phẩm trong độ chân không lớn nhất và nhiệt độ cao trong khoảng thời gian đủ để làm giảm độ hoạt động của nước trong chế phẩm được làm khô xuống 0,3 Aw hoặc thấp hơn.

Theo một phương án của phương pháp trộn, vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học là ở dạng được làm ổn định khô và được trộn khô tiếp với chất làm ổn định khô và chất bảo quản. Sau đó, hỗn hợp pha trộn khô này được bổ sung vào nước và được trộn trong chân không thích hợp và khuấy trộn để tạo ra huyền phù đặc đồng nhất có tỷ trọng mong muốn.

Theo phương án khác của phương pháp trộn, vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học là ở dạng dung dịch cô đặc hoặc hỗn hợp nhão. Dung dịch được trộn với tất cả các thành phần khác của chế phẩm trước khi bổ sung vào nước.

Theo phương án khác nữa của phương pháp trộn, vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học là ở dạng bột khô. Bột khô được trộn với tất cả các thành phần khác của chế phẩm trước khi bổ sung vào nước.

Theo phương án khác của phương pháp trộn, vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học khô được trộn với chỉ một phần của các thành phần chế phẩm, và hỗn hợp này được bổ sung vào huyền phù đặc đã được tạo thành trước, được điều chế bằng cách bổ sung các thành phần khác của chế phẩm vào nước.

Theo phương án được ưu tiên của phương pháp làm khô, vi sinh vật có hoạt tính sinh học được trộn trong chân không trong dung dịch bao gồm chất làm ổn định chế phẩm và chất bảo quản. Theo một phương án cụ thể, vi sinh vật có hoạt tính sinh học bao gồm vi khuẩn sống (ví dụ, lợi khuẩn). Ví dụ về vi sinh vật thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nấm men như *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* và *Torulopsis*, nấm mốc như *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* và *Torulopsis* và vi khuẩn như các giống *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Kocuriaw*, *Staphylococcus*, *Peptostrepococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weiss ella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* và *Lactobacillus*. Ví dụ cụ thể về vi sinh vật có lợi thích hợp được thể hiện bằng các loài sau đây và bao gồm tất cả các tủy sinh học nuôi cấy trong các loài này: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus coagulans*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. mesentericus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. natto*, *Bacteroides amylophilus*, *Bac. capillosus*, *Bac. ruminicola*, *Bac. suis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *Candida pintolepesii*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus cremoris*, *E. diacety lactis*, *E faecium*, *E. intermedius*, *E. lactis*, *E. muntidi*, *E. thermophilus*, *Escherichia coli*, *Khuyveromyces fragilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. brevis*, *L. case 4* *L. curvatus*, *L. cellobiosus*, *L. delbrueckii ss. bulgaricus*, *L farciminis*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *P. cereviseae (damnosus)*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Prop*, *shertnanii*, *Saccharomyces cereviseae*,

Staphylococcus carnosus, *Staph. xylosus*, *Streptococcus infantarius*, *Strep. salivarius* ss. *thermophilus*, *Strep. Thermophilus* và *Strep. lactis*.

Theo phương pháp được ưu tiên, chế phẩm được trộn trong chân không ở nhiệt độ trong phòng (ví dụ từ 20°C đến 30°C). Sau khi trộn đến đồng nhất, chế phẩm được làm lạnh xuống nhiệt độ cao hơn nhiệt độ đông lạnh của chế phẩm. Thông thường, chế phẩm được làm lạnh xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10°C đến +10°C, tốt hơn nữa nếu là chế phẩm được làm lạnh xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ -5°C đến +5°C. Theo phương án ưu tiên, chế phẩm đã được làm lạnh sau đó được chuyển tới buồng làm khô trong đó được gia nhiệt (20°C hoặc cao hơn) trong khi kiểm soát áp suất chân không ban đầu ở mức độ để duy trì nhiệt độ trước khi làm lạnh ban đầu. Thông thường, áp suất chân không mong muốn là thấp hơn 933.254 Pa (7 Torr) nhưng không nhỏ hơn 399.966 Pa (3 Torr). Các điều kiện được ưu tiên này cho phép đạt được sự giãn nở có kiểm soát của chế phẩm và sự làm khô sơ cấp nhanh hơn tiếp theo của chế phẩm. Để tăng tốc bước làm khô thứ cấp, áp suất chân không lớn nhất được áp dụng và nhiệt độ cung cấp nhiệt có thể còn được nâng lên đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 60°C. Để tăng tối đa độ ổn định của sản phẩm cuối cùng, chế phẩm tốt hơn được làm khô trong khoảng thời gian đủ để làm giảm độ hoạt động của nước trong chế phẩm xuống $A_w=0,3$ hoặc thấp hơn. Theo phương án được ưu tiên theo sáng chế, bước làm khô thứ cấp bao gồm việc loại bỏ nước ở áp suất nhỏ hơn 133.322 Pa (1 Torr), và theo phương án được đặc biệt ưu tiên, ở áp suất nhỏ hơn 26.664 Pa (0,2 Torr).

Chế phẩm ướt có thể ở dạng huyền phù đặc nhớt hoặc các hạt hydrogel có cỡ hạt nằm trong khoảng từ 0,05 đến 10 mm. Chế phẩm được làm khô có thể được sử dụng trực tiếp dưới dạng vảy nhỏ, hoặc được nghiền thành bột có cỡ hạt trung bình từ khoảng 10 μm đến khoảng 1000 μm . Chế phẩm có thể được dùng trực tiếp cho động vật, kể cả người, dưới dạng bột cô đặc, dưới dạng dịch lỏng được hoàn nguyên, (ví dụ, đồ uống), hoặc nó có thể được kết hợp ở dạng vảy nhỏ hoặc bột vào sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn hiện có.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện xu hướng độ ổn định của lợi khuẩn, *L. rhamnosus*, khi được bảo quản ở nhiệt độ 40°C và độ ẩm tương đối là 33%.

Fig.2 thể hiện nhiệt độ quy trình và lượng mất khả năng sống tích lũy đối với quy trình chế phẩm kết thúc ở bước làm khô thứ cấp Aw bằng 0,28.

Fig.3 thể hiện ảnh hưởng của các chất làm ổn định chế phẩm khác nhau đến độ ổn định bảo quản.

Fig.4 thể hiện ảnh hưởng của độ nhớt alginat đến sự giãn nở chế phẩm trong chân không.

Fig.5 thể hiện ảnh hưởng của các dạng kết hợp khác nhau của các chất làm ổn định đến khả năng sống của vi khuẩn.

Fig.6 thể hiện ảnh hưởng của tỷ trọng chế phẩm đến tốc độ giãn nở trong chân không.

Fig.7 thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ trước khi làm lạnh chế phẩm đến sự giãn nở trong chân không.

Fig.8 thể hiện ảnh hưởng của áp suất chân không đến nhiệt độ chế phẩm trong bước làm khô sơ cấp.

Fig.9 thể hiện ảnh hưởng của áp suất chân không đến tốc độ làm khô của chế phẩm.

Fig.10 thể hiện độ ổn định của lợi khuẩn, *L. acidophilus* được làm khô bằng chế phẩm và phương pháp theo sáng chế khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C và độ ẩm tương đối là 33%.

Fig.11 thể hiện sơ đồ của phương pháp sản xuất chế phẩm khô ổn định từ chế phẩm hydrogel theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Cần phải hiểu rằng các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Như được sử dụng trong phần mô tả này và các yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số

ít cũng dùng để chỉ dạng số nhiều trừ khi có quy định khác. Do vậy, ví dụ, khi đề cập đến "protein" tức là cũng bao gồm một protein hoặc dạng kết hợp của hai hoặc nhiều protein; khi đề cập đến "enzym", "vitamin", "vi khuẩn", v.v., tức là cũng bao gồm một đối tượng hoặc hỗn hợp của một vài đối tượng này, và dạng tương tự.

Khi mô tả sáng chế và yêu cầu bảo hộ, các thuật ngữ sau đây được sử dụng theo các định nghĩa được nêu dưới đây.

Nhiệt độ hoặc các điều kiện "môi trường xung quanh" trong phòng là ở thời điểm nhất định bất kỳ trong môi trường nhất định. Thông thường, nhiệt độ môi trường xung quanh trong phòng là 22-25°C, áp suất khí quyển môi trường xung quanh, và độ ẩm môi trường xung quanh được đo một cách dễ dàng và sẽ thay đổi tùy thuộc vào thời gian trong năm, thời tiết và các điều kiện khí hậu, độ cao, v.v..

"Việc tách khí" chỉ việc giải phóng khí từ dung dịch trong chất lỏng khi áp suất riêng phần của khí lớn hơn áp suất áp dụng. Đây không phải là quá trình làm sôi, và có thể thường xảy ra ở áp suất lớn hơn áp suất làm sôi dung dịch. Ví dụ, đồ uống không cồn có ga đóng chai có áp suất riêng phần của CO₂ cao. Việc loại bỏ nắp chai làm giảm áp suất riêng phần và đồ uống nổi bọt mạnh (nó tách khí, nhưng không sôi).

"Bước làm sôi" chỉ sự chuyển pha nhanh từ lỏng thành khí xảy ra khi nhiệt độ của chất lỏng cao hơn nhiệt độ sôi của nó. Nhiệt độ sôi là nhiệt độ tại đó áp suất hơi của chất lỏng bằng áp suất tác dụng. Sự sôi có thể đặc biệt mạnh khi nhiệt được cung cấp cho chất lỏng đã ở điểm sôi của nó.

"Độ hoạt động của nước" hay "Aw" khi đề cập đến chế phẩm được làm khô, chỉ độ khả dụng của nước và biểu thị trạng thái năng lượng của nước trong hệ thống. Nó được định nghĩa là áp suất hơi của nước ở trên mẫu được chia cho áp suất hơi của nước tinh khiết ở cùng nhiệt độ. Nước cất tinh khiết có độ hoạt động của nước chính xác là bằng 1 hay Aw=1,0.

"Độ ẩm tương đối" hay "RH" khi đề cập đến độ ổn định bảo quản chỉ lượng hơi nước trong không khí ở nhiệt độ nhất định. Độ ẩm tương đối thường nhỏ hơn độ ẩm cần thiết để làm bão hòa không khí và được biểu thị theo tỷ lệ phần trăm của độ ẩm bão hòa.

"Làm khô sơ cấp", đối với các quy trình được mô tả ở đây, chỉ bước làm khô xảy ra từ thời điểm áp dụng chân không ban đầu đến thời điểm tại đó bước làm khô thứ cấp bắt đầu. Thông thường, khối làm khô sơ cấp xảy ra bằng cách làm bay hơi diện rộng, trong khi nhiệt độ sản phẩm vẫn thấp hơn đáng kể nhiệt độ của nguồn nhiệt.

"Làm khô thứ cấp", đối với các quy trình được mô tả ở đây, chỉ bước làm khô xảy ra ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ đông lạnh của chế phẩm và gần nhiệt độ của nguồn nhiệt. Trong quy trình làm khô chế phẩm thông thường, bước làm khô thứ cấp làm giảm độ hoạt động của nước trong chế phẩm xuống A_w bằng 0,3 hoặc thấp hơn.

"Vi sinh vật có hoạt tính sinh học," hoặc "vi sinh vật hoặc chế phẩm có hoạt tính về mặt sinh học" chỉ chế phẩm vi sinh vật sống hoặc chết, mà ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của vi sinh vật có hiệu quả rõ rệt. "Vi sinh vật sống ở dạng bột khô" chỉ sinh khối vi khuẩn trong đó ít nhất 10% khối lượng là vi khuẩn sống. "Vi sinh vật chết ở dạng bột khô" chỉ sinh khối vi khuẩn trong đó ít nhất 99,999% là vi khuẩn chết.

"Nguyên liệu có hoạt tính sinh học", "chế phẩm có hoạt tính sinh học", "nguyên liệu có hoạt tính về mặt sinh học" hoặc "chế phẩm có hoạt tính sinh học" chỉ chế phẩm, mà ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của hoạt chất sinh học có hiệu quả rõ rệt. Nguyên liệu có hoạt tính sinh học này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, peptit, protein, hoóc-môn, vitamin, khoáng chất, thuốc, thuốc diệt vi sinh vật, thuốc diệt nấm, thuốc diệt cỏ, thuốc diệt côn trùng, thuốc diệt tinh trùng, axit nucleic, kháng thể, và vắc-xin.

"Chất ổn định hoặc chất làm ổn định" chỉ hợp chất hoặc nguyên liệu được bổ sung vào chế phẩm để làm tăng độ nhớt của chế phẩm ướt hoặc để tạo ra hydrogel. Ví dụ về chất làm ổn định thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polysacarit, như, xenluloza axetat phtalat (CAP), carboxy-metyl-xenluloza, pectin, natri alginat, muối của axit alginic, hydroxyl propyl methyl xenluloza (HPMC), methyl xenluloza, caragenan, gôm guar, gôm acaxia, gôm xanthan, gôm locust bean, chitosan và dẫn xuất chitosan, collagen, axit polyglycolic, tinh bột và tinh bột được cải biến, cyclodextrin và oligosacarit (inulin, maltodextrin, rafinoza, dextran, v.v.) và hỗn hợp của chúng.

"Chất bảo quản" hoặc "chất bảo vệ" hoặc "vật bảo vệ" nói chung chỉ hợp chất hoặc nguyên liệu được bổ sung để đảm bảo hoặc làm tăng độ ổn định của nguyên liệu

có hoạt tính sinh học trong quy trình làm khô và về sau đó, hoặc độ ổn định bảo quản trong thời gian dài của sản phẩm bột khô. Các chất bảo quản thích hợp thường tan dễ dàng trong dung dịch và không làm đặc hoặc polyme hóa khi tiếp xúc với nước. Các chất bảo quản thích hợp được mô tả dưới đây và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, protein như albumin huyết thanh người và bò, protein nước sữa, protein đậu tương, caseinat, gelatin, globulin miễn dịch, hydrat cacbon bao gồm monosacarit (galactosa, D-manoza, sorboza, v.v.), disacarit (lactoza, trehaloza, sucroza, v.v.), axit amin như mononatri glutamat, lyzin, glyxin, alanin, arginin hoặc histidin, cũng như axit amin kỵ nước (tryptophan, tyrosin, leuxin, phenylalanin, v.v.); metylamin như betain; muối tá dược như magie sulfat; polyol như rượu trihydric hoặc rượu đường bậc cao (ví dụ, glyxerin, erythritol, glyxerol, arabitol, xylitol, sorbitol, và manitol); propylen glycol; polyetylen glycol; pluronic; chất hoạt động bề mặt, và hỗn hợp của chúng.

Chế phẩm hoặc hợp phần "ổn định" là chế phẩm hoặc hợp phần trong đó vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học ở trong đó về cơ bản giữ được khả năng sống, và/hoặc hoạt tính sinh học của nó khi bảo quản. Độ ổn định có thể được đo ở các điều kiện nhiệt độ và độ ẩm được chọn trong khoảng thời gian được chọn. Phân tích xu hướng có thể được sử dụng để đánh giá thời hạn sử dụng mong đợi trước khi nguyên liệu thực sự được bảo quản trong khoảng thời gian đó. Đối với vi khuẩn sống, ví dụ, độ ổn định được xác định dưới dạng thời gian cần để mất 1 log CFU/g chế phẩm khô trong các điều kiện nhiệt độ, độ ẩm và khoảng thời gian được xác định trước.

"Khả năng sống" đối với vi khuẩn, chỉ khả năng để tạo ra khuẩn lạc (CFU hay đơn vị tạo thành khuẩn lạc) trên môi trường dinh dưỡng thích hợp cho sự sinh trưởng của vi khuẩn. Khả năng sống, đối với virus, chỉ khả năng lây nhiễm và sinh sản trong tế bào chủ thích hợp, dẫn đến sự tạo thành vết tan trên lớp phủ tế bào chủ.

Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế giải quyết vấn đề về việc tạo ra các quy trình làm khô trên quy mô công nghiệp và hiệu quả về chi phí để sản xuất chế phẩm khô chứa vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học, như vắc-xin sống hoặc chết, vi khuẩn, tảo, virus và/hoặc huyền phù tế bào, peptit, protein, hoóc-môn, vitamin, khoáng chất, thuốc, thuốc diệt vi sinh vật, thuốc diệt nấm, thuốc diệt cỏ, thuốc diệt côn trùng, thuốc diệt tinh trùng, axit nucleic, kháng thể, vắc-xin có thời hạn sử dụng kéo dài đáng

kể ở trạng thái khô. Sáng chế đề xuất chế phẩm chứa vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học với chất làm ổn định và chất bảo quản trong dung dịch, làm lạnh chế phẩm này xuống nhiệt độ cao hơn nhiệt độ đông lạnh của nó, và làm ổn định chế phẩm bằng cách loại bỏ hơi ẩm trong chế độ áp suất giảm trong khi cung cấp nhiệt cho chế phẩm.

Hầu hết sự mất khả năng sống của vi sinh vật trong quy trình làm khô có thể được cho là do sự kết hợp của áp lực đông lạnh-tan đông và sự tạo thành tinh thể đá, áp lực thẩm thấu và oxy hóa cao, lực trượt và năng lượng giải phóng trong quá trình sủi bong bóng có liên quan đến "bước làm sôi" dung dịch dưới áp suất làm khô thấp và nhiệt độ cao. Sáng chế đề xuất chế phẩm và quy trình làm khô trên quy mô công nghiệp mà làm giảm thiểu lượng mất mát trong quá trình làm khô và bảo quản vi sinh vật có hoạt tính sinh học trong các điều kiện bảo quản thô sơ sau đó.

Chế phẩm theo sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm của vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học, chất làm ổn định và chất bảo quản trong nhớt dung dịch. Chế phẩm theo sáng chế được phát hiện là vốn đã khác biệt về cấu trúc và chức năng vật lý với chế phẩm không nhớt hoặc chế phẩm cô đặc được làm khô mà không làm lạnh trước. Ví dụ, các chế phẩm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này ban đầu "được tạo bọt" để tạo điều kiện thuận lợi cho việc làm khô hiệu quả. Bước tạo bọt nói chung dẫn đến sự sôi và sự phun trào mạnh của dung dịch mà là kết quả không thể tránh khỏi của việc làm khô trong chân không ở trạng thái lỏng và do đó, chỉ có thể đạt được khả năng tải rất thấp của nguyên liệu trong lọ nhỏ hoặc bình (xem tài liệu, ví dụ, Patent Mỹ số 6,534,087, trong đó độ đặc của sản phẩm được tạo bọt cuối cùng nhỏ hơn 2 mm). Chế phẩm và phương pháp làm khô theo sáng chế chỉ cho phép sự giãn nở giới hạn và có kiểm soát của chế phẩm, nhờ đó làm cho có thể tải nguyên liệu nhiều hơn nhiều cho mỗi diện tích làm khô và, do đó, có thể dễ dàng nâng quy mô để sản xuất khối lượng lớn của nguyên liệu.

Vi sinh vật đơn bào đã được thể hiện là đặc biệt có lợi nhờ chế phẩm và phương pháp làm khô theo sáng chế. Theo một phương án, vi sinh vật có hoạt tính sinh học theo sáng chế là lợi khuẩn. Chế phẩm được điều chế theo hợp phần và phương pháp theo sáng chế bao gồm bước thu lấy lợi khuẩn sống trong dung dịch cô đặc, hỗn hợp nhão,

viên đông lạnh hoặc bột khô. Trộn lợi khuẩn trong chân không với chất làm ổn định và chất bảo quản, làm lạnh chế phẩm xuống nhiệt độ cao hơn nhiệt độ đông lạnh của nó, tác dụng áp suất chân không đủ để duy trì nhiệt độ trước khi làm lạnh đó và cung cấp nguồn nhiệt 20°C và cao hơn để tạo điều kiện thuận lợi cho việc loại bỏ nước. Việc duy trì nhiệt độ trước khi làm lạnh của chế phẩm có thể là bằng cách dẫn nhiệt ra khỏi chế phẩm, và/hoặc bằng cách làm mất nhiệt ẩn do sự bay hơi nước. Để tăng tốc hơn nữa quy trình làm khô, bước làm khô thứ cấp được áp dụng, ở độ chân không cao hơn lên đến 13.332 Pa (0,1 Torr) và ở nhiệt độ cao lên đến 70°C, để tạo ra chế phẩm cuối cùng có độ hoạt động của nước là A_w bằng 0,3 hoặc thấp hơn. Chế phẩm này có thể vẫn ổn định trong các điều kiện bảo quản 40°C và 33% RH trong 60 ngày hoặc lâu hơn (xem Fig.1). Các quy trình cụ thể theo sáng chế đã cho thấy là làm cho các tế bào giữ được khả năng sống của chúng một cách bất ngờ vượt xa khả năng sống của các tế bào theo các quy trình làm khô đã được thiết lập. Lượng mất khả năng sống ban đầu qua toàn bộ quy trình làm khô theo sáng chế chỉ là 0,3 log (xem Fig.2).

Các thành phần để điều chế chế phẩm bột khô ổn định

Các thành phần được trộn với vi sinh vật hoặc nguyên liệu được ưu tiên để điều chế chế phẩm bột khô theo sáng chế, bao gồm chất làm ổn định và chất bảo quản. Các thành phần này, khi được trộn với vi sinh vật hoặc nguyên liệu được ưu tiên có hoạt tính sinh học, có thể được xử lý theo phương pháp theo sáng chế để tạo ra lượng lớn chế phẩm khô ổn định để bảo quản và sử dụng vi sinh vật. Chất làm ổn định chế phẩm có thể bao gồm hỗn hợp của polysacarit và oligosacarit. Polysacarit được ưu tiên, đặc biệt là để làm ổn định vi sinh vật sống, là alginat. Bởi vì đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng alginat tốt hơn so với polysacarit khác như pectin và gôm acacia trong việc làm giảm lượng mất mát khi làm khô của sinh vật nhạy cảm như lợi khuẩn (Fig.3). Alginat cũng được ưu tiên bởi vì tính chất tạo thành hydrogel của nó với kim loại không độc ở nhiệt độ thấp. Alginat cũng được phát hiện thấy là làm ổn định một cách hiệu quả chế phẩm trong chân không, bằng cách tạo ra độ nhớt thích hợp cho chế phẩm và cho phép sự giãn nở có kiểm soát của chế phẩm ở độ nhớt cụ thể (Fig.4).

Việc kết hợp oligosacarit với alginat cũng được phát hiện là đóng góp hơn nữa vào độ ổn định tổng thể của chế phẩm. Fig.5 thể hiện ảnh hưởng của các dạng kết hợp

khác nhau của alginat và oligosacarit đến khả năng ổn định bảo quản. Dạng kết hợp của alginat và inulin là dạng kết hợp được ưu tiên xét về tác dụng bảo quản lâu dài của nó đối với lợi khuẩn. Theo một phương án theo sáng chế, ít nhất một chất làm ổn định chế phẩm tốt hơn là gồm mà có thể tạo thành hydrogel cứng bằng cách liên kết ngang với ion kim loại.

Chất bảo quản theo sáng chế có thể bao gồm các protein, peptit, đường, rượu đường và axit amin khác nhau. Chất bảo quản tốt hơn là chất bảo quản mà không làm tinh thể hóa và/hoặc làm mất ổn định nguyên liệu có hoạt tính về mặt sinh học trong chế phẩm ở nhiệt độ đông lạnh (ví dụ, -20°C). Có thể có lợi khi bao gồm hai hoặc nhiều chất bảo quản khác nhau để ức chế sự tạo thành của tinh thể và làm ổn định chế phẩm nguyên liệu có hoạt tính sinh học đã được làm khô trong các điều kiện bảo quản trong khoảng thời gian dài.

Chế phẩm ướt có thể bao gồm lượng đáng kể của chất rắn tổng số (các thành phần không có dung môi, như nước). Một phần chính của chất rắn tổng số có thể gồm nguyên liệu có hoạt tính sinh học, chất làm ổn định và chất bảo quản.

Ví dụ, nguyên liệu có hoạt tính sinh học có thể có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 2 đến 50 phần trăm khối lượng, chất làm ổn định từ khoảng 1 đến 20 phần trăm khối lượng, và chất bảo quản từ khoảng 20 đến 80 phần trăm khối lượng. Theo ví dụ khác, chất làm ổn định có thể có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10 phần trăm khối lượng, và chất bảo quản từ khoảng 10 đến 40 phần trăm khối lượng. Tốt hơn là, chế phẩm ướt cần có hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ khoảng 5% đến 80%; tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ khoảng 30% đến 60%. Độ nhớt của chế phẩm theo sáng chế thường lớn hơn 1000 centipoase (cP); tốt hơn nữa nếu, lớn hơn 10.000 cP và nhỏ hơn 450.000; và tốt nhất là lớn hơn 30.000 cP và nhỏ hơn 100.000 cP.

Độ nhớt của chế phẩm theo sáng chế có thể cao bằng 450.000 cP, với điều kiện là chất bảo quản được hòa tan hoàn toàn trong dung dịch. Huyền phù đặc đồng nhất và có độ nhớt cao chứa lượng đáng kể của chất rắn tổng số có thể đạt được ở nhiệt độ cao, tùy thuộc vào độ nhạy nhiệt độ và độ ẩm của nguyên liệu có hoạt tính sinh học. Ví dụ, chế phẩm tế bào sống chứa 30-60% chất rắn tổng số có thể được trộn ở nhiệt độ cao

bằng khoảng 35-40°C và việc trộn được tiến hành cho đến khi toàn bộ chất bảo quản được hòa tan hoàn toàn.

Phương pháp điều chế chế phẩm khô ổn định

Phương pháp điều chế chế phẩm khô ổn định để bảo quản vi sinh vật có hoạt tính sinh học bao gồm, thu lấy giống cấy sống của vi sinh vật cụ thể trong dung dịch cô đặc, hỗn hợp nhão, viên đông lạnh hoặc bột khô (được làm ổn định hoặc theo cách khác). Việc điều chế chế phẩm được thực hiện bằng cách trộn, trong chân không, vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học với chất làm ổn định và chất bảo quản trong dung dịch, làm lạnh chế phẩm xuống nhiệt độ không cao hơn 10°C trên nhiệt độ đông lạnh của nó, và làm khô chế phẩm bằng cách làm bay hơi hơi ẩm dưới áp suất giảm trong khi cung cấp nhiệt cho chế phẩm.

Theo một phương án, ví dụ, chế phẩm chứa vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học, chất làm ổn định chế phẩm, và chất bảo quản được trộn đến đồng nhất, trong độ chân không thấp khoảng từ 1333.22 Pa đến 6666.1 Pa (từ 10 Torr đến 50 Torr), trong dung dịch. Fig.6 thể hiện ảnh hưởng của các tỷ trọng khác nhau của chế phẩm đến sự giãn nở của nó trong chân không. Việc đưa không khí vào trong quá trình trộn các thành phần chế phẩm trong dung dịch dẫn đến sự tạo bọt mạnh và không kiểm soát được ngay cả ở áp suất chân không tương đối cao. Bước trộn trong chân không theo sáng chế khác phục được vấn đề này bằng cách loại bỏ việc đưa không khí hoặc khí vào dung dịch chế phẩm, nhờ đó làm triệt tiêu sự tạo bọt mạnh và không kiểm soát được cho dung dịch.

Sau đó, dung dịch được làm lạnh xuống đến nhiệt độ trên điểm đông lạnh của nó (thường nằm trong khoảng từ -5°C đến +5°C). Fig.7 thể hiện ảnh hưởng của việc làm lạnh trước dung dịch chế phẩm đến sự giãn nở của nó trong áp suất chân không. Đã ngạc nhiên và bất ngờ phát hiện ra rằng quá trình sôi có thể được triệt tiêu một cách hiệu quả ngay cả trong áp suất chân không tương đối cao và sự giãn nở của chế phẩm được kiểm soát tốt hơn khi nhiệt độ dung dịch được làm giảm xuống không quá 10°C trên nhiệt độ đông lạnh của nó. Như có thể thấy từ Fig.7, áp suất chân không 399.966 Pa (3 Torr) có thể được áp dụng mà không tạo bọt mạnh với điều kiện là chế phẩm được làm lạnh xuống +5°C và tốt hơn là xuống -3°C.

Ngay sau khi được làm lạnh, chế phẩm được làm khô trong độ chân không đủ (ví dụ, khoảng 399.966 Pa (3 Torr)) để duy trì nhiệt độ trước khi làm lạnh trong bước làm khô sơ cấp. Fig.8 thể hiện ảnh hưởng của áp suất chân không được tác dụng đến nhiệt độ của dung dịch chế phẩm. Ở áp suất chân không tương đối cao trên 1066.576 Pa (8 Torr), nhiệt độ chế phẩm được tăng lên trên 6°C và sẽ tiếp tục tăng nhanh đến nhiệt độ giòn hoặc bùng. Đồng thời, dung dịch sẽ tiếp tục tạo bọt và giãn nở hơn nữa. Phương án này khác với giải pháp kỹ thuật đã biết được bàn luận trên đây (xem tài liệu, ví dụ, Patent Mỹ số 6,534,087, trong đó áp suất chân không được tác dụng nằm trong khoảng từ 399.966 Pa đến 933.254 Pa (từ 3 đến 7 Torr) và thậm chí cao hơn), trong đó áp suất chân không mạnh hơn được áp dụng (<399.966 Pa (3 Torr)) trong khi kiểm soát được sự giãn nở của chế phẩm. Quy trình này dẫn đến tốc độ làm khô nhanh hơn đáng kể (xem Fig.9) và mang lại khả năng tải cao của chế phẩm. Theo phương án này, sự tạo bọt và sôi mạnh bị triệt tiêu ngay cả ở áp suất chân không thấp hơn nhiều bởi vì phương pháp theo sáng chế đề xuất a) chế phẩm cụ thể có sự giãn nở có kiểm soát trong chân không, b) phương pháp loại bỏ được việc đưa không khí vào chế phẩm trong quá trình trộn và c) về cơ bản làm lạnh trước chế phẩm.

Phương pháp thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm việc tạo bọt mạnh và/hoặc bắn tung tóe và sôi mãnh liệt mà có thể gây tổn hại cho sinh vật nhạy cảm và gây khó khăn khi áp dụng trên quy mô công nghiệp. Ngoài ra, việc tách khí hoàn toàn và hiệu quả của huyền phù đặc nhớt là khó và có thể đòi hỏi khoảng thời gian kéo dài. Các trở ngại này được giải quyết bởi sáng chế bằng cách trước hết áp dụng quy trình trộn hoàn chỉnh trong độ chân không thấp để loại bỏ việc đưa khí bị cuốn theo vào chế phẩm ở khu vực thứ nhất. Sau đó, lượng nhỏ bất kỳ của khí hòa tan mà có thể vẫn còn trong chế phẩm được loại bỏ nhẹ nhàng, cho phép chế phẩm giãn nở vừa phải trong độ chân không thấp. Bước làm lạnh trước bổ sung của chế phẩm xuống nhiệt độ cao hơn nhiệt độ đông lạnh của nó mang lại sự kiểm soát bổ sung đối với tốc độ giãn nở và nhờ đó cho phép khả năng tải nhiều hơn nhiều cho mỗi diện tích làm khô so với khả năng tải trong các giải pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau khi giai đoạn làm khô sơ cấp hoàn thành, chế phẩm khô được làm ổn định có thể được giữ ở nhiệt độ làm khô thứ cấp cao (lên đến 70°C) và áp suất chân không nhỏ hơn 26.664 Pa (0,2 Torr) để hoàn tất việc làm khô chế phẩm trong thời gian rất ngắn.

Phương án khác theo sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm hydrogel để bảo quản vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học. Ví dụ, chế phẩm chứa lợi khuẩn ở dạng bột khô, chất làm ổn định và chất bảo quản, được trộn trong dung dịch, được liên kết ngang với hydrogel bằng cách bổ sung ion kim loại hoặc cation hoá trị hai và sau đó được làm khô trong độ chân không và nhiệt độ thấp như được mô tả trên đây. Nhiệt độ trước khi làm lạnh của chế phẩm có thể được duy trì bằng cách dẫn nhiệt ra khỏi chế phẩm, và/hoặc bằng cách làm mất nhiệt ẩn do sự bay hơi nước.

Theo một phương án cụ thể theo sáng chế, ví dụ, chế phẩm bao gồm giống cây mới cô đặc hoặc đông lạnh hoặc khô của lợi khuẩn sống trong dung dịch chứa từ 1 đến 2,5% natri alginat (tốt hơn là 1,5% natri alginat), từ 1% đến khoảng 5% inulin (tốt hơn là 2,5% inulin), từ 20% đến 60% trehaloza (tốt hơn là 40% trehaloza) và từ 3% đến 15% sản phẩm thủy phân casein (tốt hơn là 8% sản phẩm thủy phân casein). Chế phẩm được trộn trong chân không ở nhiệt độ cao hơn một chút so với nhiệt độ trong phòng (thông thường nằm trong khoảng từ 25°C đến 37°C) cho đến khi toàn bộ các thành phần này đều được hòa tan hoàn toàn.

Theo một phương án bổ sung theo sáng chế, toàn bộ các thành phần được hòa tan trong dung dịch ở nhiệt độ cao, sau đó huyền phù đặc được làm lạnh xuống đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến -5°C và bột khô của vi sinh vật sống được trộn trong cho đến khi toàn bộ các thành phần này được hòa tan hoàn toàn. Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc trộn bột vi sinh vật sống khô và để ngăn ngừa sự vón cục, lượng nhỏ trehaloza có thể được bổ sung vào bột khô (thông thường, hỗn hợp chứa các phần bằng nhau của bột khô và trehaloza là đủ).

Huyền phù đặc chế phẩm được trải lên trên khay với khả năng tải khoảng 200 g/sq ft và khay được đặt trên giá trong thiết bị làm khô lạnh. Nhiệt độ giá được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 0 đến -5°C (tốt hơn là -2°C) và huyền phù đặc được để lạnh xuống nhiệt độ đó. Sau đó, áp suất chân không nằm trong khoảng từ 133.322 Pa đến 666.610 Pa (từ 1 đến 5 Torr) (tốt hơn là 399.966 Pa (3 Torr)) được áp dụng và nhiệt độ giá được tăng lên đến nằm trong khoảng từ 20° đến 45°C (tốt hơn là 30°C) để truyền dẫn nhiệt. Nhiệt độ chế phẩm vẫn ở khoảng nhiệt độ từ 0 đến -5°C trong bước làm bay hơi sơ cấp để ngăn mẫu không bị đông lạnh. Bước làm khô thứ cấp ở độ chân không lớn

nhất là 13.332 Pa (0,1 Torr) và nhiệt độ giá là 40°C được bắt đầu khi nhiệt độ sản phẩm đạt được khoảng +10°C. Toàn bộ quy trình làm khô diễn ra trong khoảng 4 giờ, tại thời điểm đó, sản phẩm được thu hoạch và độ hoạt động của nước là ở A_w -0,3 hoặc thấp hơn.

Theo phương án khác theo sáng chế, khay đã chịu tải và được làm lạnh trước xuống -2°C trong phòng lạnh sau đó ngay lập tức được đưa vào trong thiết bị làm khô lò chân không để truyền nhiệt bức xạ. Sau đó, bước làm khô sơ cấp và bậc hai được áp dụng như được mô tả trên đây để truyền dẫn nhiệt.

Điều chế chế phẩm

Chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm vi sinh vật sống mới, đông lạnh hoặc khô được bào chế thành dung dịch hoặc huyền phù chứa chất làm ổn định chế phẩm và chất bảo quản. Chất làm ổn định chế phẩm và/hoặc nồng độ cao của chất bảo quản có thể được hoà tan vào dung dịch nước được gia nhiệt có khuấy trước khi làm nguội và trộn với vi sinh vật có hoạt tính sinh học. Vi sinh vật, như virus hoặc vi khuẩn được nuôi cấy, có thể được cô và được tách ra khỏi môi trường nuôi cấy bằng cách ly tâm hoặc lọc, sau đó được trộn trực tiếp vào chế phẩm theo sáng chế, hoặc được bổ sung với chất bảo quản cryo thông thường được nhỏ giọt vào nitơ lỏng và viên đông lạnh nhỏ được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi được trộn thành chế phẩm. Theo cách khác, viên đông lạnh có thể được làm khô lạnh, được nghiền thành bột mịn, được đóng gói trong túi kín khí và được bảo quản lạnh cho đến khi được trộn trong chế phẩm theo sáng chế. Theo một phương án theo sáng chế, tổng lượng nước trong chế phẩm được cung cấp trong chất lỏng của sinh vật sống được cô và huyền phù sinh vật sống được duy trì ở nhiệt độ cao hơn một chút so với nhiệt độ trong phòng. Các thành phần khô của chất làm ổn định chế phẩm và chất bảo quản được trộn cùng với nhau và sau đó được bổ sung từ từ vào huyền phù ẩm của sinh vật sống. Huyền phù chế phẩm được khuấy nhẹ trong độ chân không thấp trong thiết bị khuấy vệ tinh cho đến khi tất cả các thành phần được phân tán hoàn toàn và thu được huyền phù đặc đồng đều.

Theo phương án khác theo sáng chế, vi sinh vật có hoạt tính sinh học là ở dạng bột khô và được trộn trước khô với các thành phần chế phẩm trước khi hỗn hợp khô thu được được bổ sung vào nước ở nhiệt độ cao hơn một chút so với nhiệt độ trong phòng.

Vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học có thể mang lại hoạt tính sinh học bất kỳ, như hoạt tính enzym, sự gây đáp ứng miễn dịch, sự nhân tế bào, lây nhiễm, ức chế sự sinh trưởng tế bào, kích thích sự sinh trưởng tế bào, tác dụng trị liệu, tác dụng dược lý, tác dụng kháng khuẩn, và/hoặc dạng tương tự. Vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học có thể là các tế bào không sống hoặc liposom hữu ích làm vắc-xin hoặc chất chuyển thuốc cho chất trị liệu. Vi sinh vật có hoạt tính sinh học theo sáng chế có thể là virus sống và virus sống được làm suy yếu và/hoặc dạng tương tự.

Chất làm ổn định chế phẩm mang lại sự ổn định cấu trúc cho chế phẩm và/hoặc lợi ích bảo quản vật lý và hóa học cho vi sinh vật có hoạt tính sinh học. Chất làm ổn định có thể mang lại độ nhớt đặc cho chế phẩm và sự kiểm soát tốt hơn đối với các tính chất giãn nở của nó trong áp suất chân không và làm tăng độ bền cấu trúc cho chế phẩm được làm khô theo sáng chế.

Chất bảo quản có thể bao gồm nhiều protein, sản phẩm thủy phân protein, đường, rượu đường và axit amin. Ví dụ, đường như sucroza hoặc trehaloza có thể bao quanh về mặt vật lý nguyên liệu có hoạt tính sinh học để tăng cường sự lưu giữ cấu trúc phân tử qua quy trình làm khô và truyền độ cứng cấu trúc cho chất nền vô định hình ở trạng thái khô. Chất bảo quản có thể thay thế sự mất nước hydrat hoá trong quá trình làm khô, để ngăn ngừa việc làm tổn hại đối với màng tế bào và sự biến tính của enzym. Chức năng khác của chất bảo quản có thể bao gồm bảo quản nguyên liệu có hoạt tính sinh học khỏi sự tiếp xúc với ánh sáng gây hại, oxy, chất oxy hóa và hơi ẩm. Hầu hết các chất bảo quản có thể được hòa tan một cách dễ dàng trong dung dịch với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 phần trăm khối lượng đến khoảng 60 phần trăm khối lượng.

Làm lạnh trước chế phẩm

Chế phẩm theo sáng chế có thể được làm lạnh trước trước khi tác dụng áp suất chân không của quy trình làm khô, để tạo ra lợi ích như làm đặc hơn nữa chế phẩm huyền phù đặc, sự kiểm soát tốt hơn đối với sự giãn nở của chế phẩm dưới áp suất chân không thấp, sự làm ổn định vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học, và/hoặc tăng cường sự thẩm thấu các thành phần chế phẩm qua màng tế bào. Việc làm lạnh có thể được áp dụng bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, việc làm lạnh có thể là bằng cách tiếp xúc và dẫn nhiệt với các bề mặt lạnh, sự mất

hiệt ẩm, và/hoặc các kỹ thuật tương tự. Thông thường, chế phẩm được giữ trong bình hoặc trải trên khay kim loại và đặt tiếp xúc với bề mặt có nhiệt độ được kiểm soát hoặc buồng trong đó chúng cân bằng với nhiệt độ được kiểm soát. Thông thường, chế phẩm theo sáng chế có thể được làm lạnh trước xuống nhiệt độ cao hơn nhiệt độ đông lạnh của nó (ví dụ, nằm trong khoảng từ -5°C đến $+5^{\circ}\text{C}$).

Làm khô sơ cấp chế phẩm

Các quy trình thông thường để bảo quản vi sinh vật có hoạt tính sinh học như, vi sinh vật sống hoặc được làm suy yếu bao gồm việc kết hợp các điều kiện đông lạnh và chân không mà có thể dẫn đến làm tổn hại màng và sự biến tính của các thành phần tế bào. Các giải pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này chỉ dẫn về việc sử dụng áp suất chân không cao hơn (ví dụ, nhỏ hơn 13332.2 Pa (100 Torr)), việc bổ sung chất bảo quản cryo cụ thể, bước cô để thu được dung dịch đặc (xirô), và/hoặc nhiệt độ ban đầu cao hơn để ngăn ngừa đông lạnh. Việc sử dụng chế phẩm và các thông số quy trình theo sáng chế khắc phục được các hạn chế này và cho phép khả năng tải cao hơn cho mỗi diện tích làm khô để cải thiện một cách đáng kể năng suất công nghiệp.

Chế phẩm theo sáng chế được làm khô bằng cách làm bay hơi. Việc loại bỏ dung môi (hơi ẩm) khỏi môi trường khí xung quanh chế phẩm có thể được thực hiện bằng cách ngưng tụ hoặc sấy khô. Việc làm bay hơi dung môi khỏi chế phẩm có thể tăng tốc việc làm khô sơ cấp chế phẩm dưới áp suất chân không thấp. Sự giãn nở có kiểm soát của chế phẩm giúp tăng tốc việc làm khô sơ cấp chế phẩm bằng cách truyền nhanh dung môi ra khỏi chế phẩm. Sự giãn nở có kiểm soát của chế phẩm đạt được bằng cách tách khí nhẹ nhàng (không làm sôi) của khí hòa tan còn lại khi việc làm khô chân không được áp dụng. Điều mong muốn là không làm sôi hoặc tạo bọt mạnh chế phẩm bởi vì các lỗ hổng và lực trượt có liên quan đến sự tạo thành bong bóng trong quá trình sôi và/hoặc chế phẩm có thể tràn ra khỏi dụng cụ chứa hoặc có ảnh hưởng bất lợi đến vi sinh vật có hoạt tính sinh học.

Khi bước làm khô sơ cấp diễn ra, cấu trúc chế phẩm được làm ổn định. Nhiệt được cung cấp trong buồng làm khô bù cho sự mất nhiệt ẩm gây ra bởi sự bay hơi dung môi và nhiệt độ chế phẩm được duy trì trong khoảng 10°C trên nhiệt độ đông lạnh của nó. Tại một số thời điểm trong quá trình làm khô sơ cấp, tốc độ bay hơi của dung môi

chậm và nhiệt độ chế phẩm bắt đầu tăng lên do sự cung cấp thừa nhiệt trong buồng làm khô. Thời điểm này chỉ báo sự kết thúc của bước làm khô sơ cấp theo sáng chế. Vì dung môi được lấy ra khỏi chế phẩm, chất bảo quản trong dung dịch trở nên đặc và dày hơn cho đến khi nó ngừng chảy dưới dạng chất lỏng. Chế phẩm vô định hình và/hoặc thủy tinh bảo toàn cấu trúc chế phẩm ổn định.

Làm khô thứ cấp

Bước làm khô thứ cấp chế phẩm ổn định về mặt cấu trúc loại bỏ hơi ẩm bị bẫy hoặc liên kết còn dư và tạo ra chế phẩm ổn định khi bảo quản trong khoảng thời gian kéo dài ở nhiệt độ môi trường. Bước làm khô thứ cấp bao gồm việc sử dụng nhiệt độ cao và chân không mạnh trong khoảng thời gian từ vài giờ đến vài ngày. Theo phương án được ưu tiên, khoảng thời gian cần để hoàn tất bước làm khô thứ cấp là gấp đôi khoảng thời gian của bước làm khô sơ cấp. Tốt hơn là, độ hoạt động của nước trong chế phẩm khi kết thúc bước làm khô thứ cấp là A_w nhỏ hơn 0,3. Nhiệt độ làm khô có thể nằm trong khoảng từ khoảng nhiệt độ trong phòng đến khoảng 70°C. Quy trình làm khô thứ cấp thông thường đối với nhiều vi sinh vật có hoạt tính sinh học có thể bao gồm việc nâng nhiệt độ từ khoảng 30°C đến khoảng 40°C, và giữ từ khoảng 30 phút đến khoảng 24 giờ (tốt hơn là từ khoảng 30 phút đến khoảng 4 giờ), để tạo ra chế phẩm được làm khô ổn định có độ hoạt động của nước nhỏ hơn A_w bằng 0,3. Theo một phương án cụ thể của bước làm khô thứ cấp, nhiệt độ làm khô được nâng từ từ từ các điều kiện làm khô sơ cấp với tốc độ mà có thể còn bảo toàn thêm hoạt tính của sinh vật sống như vi sinh vật sống. Chân không mạnh có thể được cung cấp trong quy trình làm khô thứ cấp để thúc đẩy tốc độ loại bỏ nước để làm giảm hàm lượng hơi ẩm dư. Chân không trong quy trình làm khô thứ cấp có thể là nhỏ hơn 133.322 Pa (1 Torr) và, tốt hơn nếu, nhỏ hơn khoảng 26.664 Pa (0,2 Torr).

Phương pháp làm khô theo sáng chế dẫn đến việc vi sinh vật có hoạt tính về mặt sinh học hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học được bọc lại trong chất nền thủy tinh vô định hình, nhờ đó ngăn ngừa sự tháo xoắn protein và làm chậm đáng kể sự tương tác phân tử hoặc phản ứng chéo, do độ hoạt động của hợp chất và các phân tử khác bị giảm mạnh trong chế phẩm thủy tinh vô định hình. Chừng nào mà chất rắn vô định hình ở nhiệt độ dưới nhiệt độ chuyển tiếp thủy tinh của nó và hơi ẩm dư vẫn còn tương đối thấp

(tức là, dưới A_w 0,3), vi sinh vật có hoạt tính sinh học không bền có thể vẫn còn tương đối ổn định. Cần phải lưu ý rằng việc đạt được trạng thái thủy tinh không phải là điều kiện tiên quyết đối với độ ổn định thời gian dài vì một số vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học có thể sống tốt hơn ở trạng thái kết tinh hơn.

Điều chế bột khô

Chế phẩm được làm khô có thể được sử dụng theo cách gộp chung toàn bộ (*en bloc*), được cắt thành hình dạng và kích thước mong muốn, hoặc được nghiền vỡ và được nghiền thành bột chảy tự do để dễ dàng cho bước xử lý tiếp sau như kết tụ ẩm hoặc khô, tạo hạt, tạo viên nén, nén, tạo viên tròn hoặc dạng bất kỳ khác của quy trình phân phối. Các quy trình nghiền vỡ, nghiền, mài hoặc nghiền bột đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, máy nghiền búa, máy nghiền va đập, máy nghiền phun, máy nghiền định ghim, máy nghiền Wiley, hoặc thiết bị nghiền tương tự có thể được sử dụng.

Cỡ hạt được ưu tiên nhỏ hơn khoảng 1000 μm và tốt hơn là nhỏ hơn 500 μm .

Chế phẩm và phương pháp được mô tả ở đây bảo toàn hoạt tính sinh học của vi sinh vật có hoạt tính về mặt sinh học hoặc nguyên liệu hoạt tính sinh học đã được bọc. Ví dụ, chế phẩm được thử nghiệm về độ ổn định bằng cách đưa chúng vào điều kiện nhiệt độ cao (ví dụ 40°C) và độ ẩm cao (ví dụ RH 33%) và xác định hoạt tính sinh học của chế phẩm. Như một ví dụ đối với lợi khuẩn sống, kết quả của các nghiên cứu này chứng tỏ rằng vi khuẩn được phối trộn trong các chế phẩm này ổn định trong ít nhất 60 ngày (xem Fig.1). Độ ổn định được xác định dưới dạng thời gian làm mất hiệu lực một log CFU/g. Chế phẩm này ổn định thậm chí khi sử dụng nồng độ cao của nguyên liệu có hoạt tính về mặt sinh học. Do vậy, các chế phẩm này có ưu điểm ở chỗ chúng có thể được vận chuyển và được bảo quản ở nhiệt độ bằng hoặc cao hơn nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian dài.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây chỉ nhằm mục đích minh họa, mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Điều chế chế phẩm khô được trộn trước:

Một số hỗn hợp trộn sẵn của chế phẩm được điều chế theo Bảng 1. Trehaloza thu được từ Cargill Minneapolis, MN. Chất phân lập protein đậu tương thu được từ Fearn Natural Foods, Mequon, WI. Chất cô protein nước sữa thu được từ Agri-Mark Inc., Middlebury, VT. Sản phẩm thủy phân casein thu được từ Marcor, Carlstadt, NJ, và natri alginat thu được từ ISP Corp., Wayne, NJ. Tất cả các thành phần được kết hợp cùng với nhau và được trộn đều (Bảng 1).

Bảng 1. Các thành phần hỗn hợp trộn sẵn của chế phẩm (phần trăm khối lượng)

Thành phần	Hỗn hợp trộn sẵn đậu tương	Hỗn hợp trộn sẵn nước sữa	Hỗn hợp trộn sẵn sản phẩm thủy phân protein
Natri Alginat	3,0	3,0	3,0
Inulin	5,0	5,0	5,0
Trehaloza	75,3	75,3	75,3
Chất phân lập protein đậu tương	14	----	----
Chất cô protein nước sữa	----	14	----
Sản phẩm thủy phân casein	2,7	2,7	16,7

Ví dụ 2

Bột khô ổn định chứa lợi khuẩn:

Lactobacillus Acidophilus (100 g chất cô đông lạnh từ sản phẩm lên men trong phòng thí nghiệm) được làm tan đông ở nhiệt độ 37°C. Hỗn hợp trộn sẵn của sản phẩm thủy phân protein (100g, bảng 1) được bổ sung từ từ vào huyền phù đặc của lợi khuẩn đã được làm tan đông trong thiết bị khuấy vệ tinh kép có vỏ bọc (DPM, 1qt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA,). Việc trộn được tiến hành trong độ chân không thấp (3333.05 Pa (25 Torr)) ở tốc độ 40 vòng/phút và 37°C trong 10 phút. Huyền phù đặc đồng nhất được trải đều trên khay với khả năng tải 200 g/sq ft và khay được đặt trên giá trong thiết bị làm khô lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Nhiệt độ giá được đặt cao hơn nhiệt độ đông lạnh của huyền phù đặc ở -5°C để làm lạnh, nhưng không làm đông, huyền phù đặc. Áp suất chân không (399.966 Pa (3 Torr)) được áp dụng khi nhiệt

độ chế phẩm đạt được khoảng -1°C . Huyền phù đặc bắt đầu khử khí nhẹ khi chân không đạt được khoảng 933.254 Pa (7 Torr). Khi chân không đạt được 399.966 Pa (3 Torr), nhiệt độ giá được tăng lên đến 50°C . Nhiệt độ chế phẩm vẫn ở từ khoảng -1°C đến khoảng $+5^{\circ}\text{C}$ trong 50 phút đầu của bước làm khô sơ cấp. Ngay khi nhiệt độ chế phẩm được tăng lên $+10^{\circ}\text{C}$, bước làm khô thứ cấp được bắt đầu. Độ chân không lớn nhất là 13.332 Pa (0,1 Torr) được áp dụng trong khi nhiệt độ giá vẫn tiếp tục duy trì ở 50°C . Bước làm khô thứ cấp được tiếp tục trong 100 phút nữa, tại thời điểm đó, quy trình làm khô được kết thúc và chế phẩm khô được lấy ra khỏi thiết bị làm khô lạnh. Độ hoạt động của nước trong chế phẩm khô tại thời điểm này là $A_w=0,23$ khi đo bằng thiết bị Hygropalm Awl (Rotonic Instrument Corp., Huntington, NY.).

Lượng mất khả năng sống trong các quy trình tạo chế phẩm, điều chế, và làm khô được thể hiện trên Fig.9. Lượng mất khả năng sống trong quá trình điều chế chế phẩm là 0,26 log và 0,34 log trong quy trình làm khô và tổng lượng mất khả năng sống tích lũy là 0,6 log.

Fig.10 thể hiện độ ổn định bảo quản của chế phẩm khô trong các điều kiện bảo quản được tăng lên là 37°C và RH 33%. Sau bốn tuần ở các điều kiện bảo quản này, lượng mất khả năng sống của lợi khuẩn được làm ổn định trong chế phẩm theo sáng chế chỉ là 0,8 log.

Ví dụ 3

Điều chế chế phẩm hydrogel:

Huyền phù đặc lợi khuẩn cô đặc được điều chế theo ví dụ 2 nhưng sử dụng hỗn hợp trộn sẵn của protein nước sữa theo bảng 1. 0,5 g diaxit canxi phosphat được bổ sung vào huyền phù đặc này, tiếp đó là 0,5 g gluconolacton. Huyền phù đặc được để cho hóa cứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ nữa để tạo ra hydrogel rắn. Gel cứng được cắt lát mỏng thành sợi mảnh và dài, sử dụng dụng cụ cắt lát mỏng/dụng cụ xé vụn có trên thị trường. Các sợi mảnh được nạp lên khay với khả năng tải 200g/sq ft và được đặt trong thiết bị làm khô lạnh để làm khô như được mô tả trong ví dụ 2. Bốn giờ sau khi thiết lập độ chân không lớn nhất là 13.332 Pa (0,1 Torr), sản phẩm đã được làm khô được lấy ra khỏi thiết bị làm khô lạnh. Độ hoạt động của nước (A_w) trong chế phẩm là

0,05 (đo được bằng HygroPalm Awl, Rotonc Huntington, NY). Chế phẩm khô được nghiền tiếp thành bột mịn bằng cách sử dụng thiết bị nghiền búa tiêu chuẩn và được sàng qua sàng từ 50 đến 250 micron. Fig.11 thể hiện sơ đồ của phương pháp sản xuất chế phẩm khô ổn định từ chế phẩm hydrogel theo sáng chế.

Ví dụ 4

Điều chế thức ăn cho vật nuôi chứa lợi khuẩn:

Thức ăn cho vật nuôi dạng viên tròn có trên thị trường dùng cho chó được làm khô trong lò đối lưu đến độ hoạt động của nước là 0,1, và sau đó được phủ bằng chế phẩm khô ổn định chứa lợi khuẩn được điều chế như được mô tả trong ví dụ 3. Viên tròn khô được phun với khoảng 5% màng chống ẩm có nguồn gốc từ chất béo (hỗn hợp của 40% mỡ gà, 40% bơ cacao và 20% sáp ong), được trộn trong cốc trống với chế phẩm bột khô (thường với lượng bằng 0,1-0,5% của tổng lượng thức ăn cho vật nuôi để tạo ra liều lượng 10. sup.8 CFU/g), và cuối cùng được phun lớp phủ bổ sung của màng chống ẩm có nguồn gốc từ chất béo. Tổng lượng lớp phủ là khoảng 15% (của thức ăn cho vật nuôi). Thời gian phủ là khoảng 30 phút.

Ví dụ 5

Điều chế thức ăn cho cá chứa một số lợi khuẩn:

Thức ăn cho cá được tạo viên theo sáng chế được điều chế bằng hỗn hợp của một số lợi khuẩn. Chế phẩm lợi khuẩn khô ổn định chứa hỗn hợp của *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* và *Bifidobacterium lactis* được điều chế như được mô tả trong ví dụ 2. Thức ăn môi có trên thị trường cho cá hồi (Zeigler Bros., Gardners, PA) trước tiên được làm khô trong lò đối lưu đến độ hoạt động của nước là 0,1, và sau đó được phủ bằng chế phẩm lợi khuẩn trong cốc trống. Viên tròn (100 g) trước tiên được phun với khoảng 5% khối lượng màng chống ẩm có nguồn gốc từ chất béo (hỗn hợp của 40% dầu cá, 40% bơ cacao và 20% sáp ong), sau đó được trộn với 1 g chế phẩm lợi khuẩn khô ổn định (để đạt được liều lượng 10^7 cfu/g thức ăn), và cuối cùng được phun lớp phủ bổ sung là màng chống ẩm có nguồn gốc từ chất béo. Tổng lượng lớp phủ là khoảng 10% thức ăn cho cá.

Ví dụ 6

Sữa công thức chứa chế phẩm khô theo sáng chế:

Chế phẩm khô ổn định chứa *Lactobacillus GG* (Valio Corp, Finland) được điều chế theo Ví dụ 2 tiếp đó được sàng thành hai nhóm cỡ hạt (trên 50 μm và dưới 150 μm). Sữa công thức được điều chế bằng cách trộn 99 g Nutramigen (Mead Johnson; Evansville, IL) với 0,1 g hạt kích thước nhỏ (dưới 50 μm). Sản phẩm cuối cùng chứa khoảng 10 cfu *Lactobacillus GG* cho mỗi 100 g sữa công thức.

Ví dụ 7

Bột khô ổn định chứa enzym:

Chế phẩm hydrogel chứa 40 phần trăm khối lượng là Savinaza (Novozymes, Đan Mạch) được điều chế bằng cách trộn, trong độ chân không thấp, 60 g hỗn hợp trộn sẵn của chế phẩm sản phẩm thủy phân protein (Bảng 1) và 40 g savinaza trong 100 g dung dịch nước. Chế phẩm ướt được làm khô trong lò chân không ở nhiệt độ làm khô bằng 50°C. Để xác định khả năng tải và độ ổn định bảo quản của chế phẩm được làm khô: mẫu khô được cân một cách chính xác (<100 mg) trong ống vi ly tâm. 200 μl dimethyl sulfoxit (DMSO) được bổ sung. Chế phẩm được hòa tan trong chất đệm DMSO bằng cách tạo xoáy. 0,8 ml dung dịch chứa NaOH 0,05 N, SDS 0,5% và axit xitric 0,075 M (muối trinati) được bổ sung vào mẫu này. Ống được nghiền siêu âm trong 10 phút ở nhiệt độ 45°C, tiếp đó là ly tâm nhanh ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần phân ước của dung dịch DMSO/NaOH/SDS/Xitrat sạch được lấy vào các lỗ của vi đĩa và được phân tích về hàm lượng protein bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm Bradford. Độ ổn định bảo quản của chế phẩm enzym ổn định cao hơn một cách đáng kể so với enzym khô không có chế phẩm theo sáng chế.

Ví dụ 8

Bột khô ổn định chứa vitamin A:

Chế phẩm hydrogel chứa 50 phần trăm khối lượng là Vitamin A (BASF Corp., Florham Park, NJ) được điều chế bằng cách trộn, dưới chân không 3333.05 (25 Torr), 50 g hỗn hợp trộn sẵn của chế phẩm protein đậu tương (Bảng 1) và 50 g bột vitamin A trong 100 g dung dịch nước. Chế phẩm ướt được làm lạnh trước xuống -5°C, sau đó được trải trên khay với khả năng tải 200g/sq ft và được làm khô trong lò chân không ở

áp suất chân không ban đầu 399.966 Pa (3 Torr) và nhiệt độ bằng 70°C, tiếp đó là bước chân không lớn nhất 26.664 Pa (0,2 Torr) ở 70°C ngay khi nhiệt độ chế phẩm đạt đến 5°C.

Ví dụ 9

Điều chế mồi dùng cho loài xâm lấn:

Mồi được tạo viên dùng cho loài xâm lấn hướng đích đặc hiệu theo sáng chế được điều chế chứa chất trừ loài gây hại. Hỗn hợp trộn sẵn của protein nước sữa trong Bảng 1 được bổ sung vào 200 gm nước. Dung dịch này được bổ sung 90 gm rotenon và 0,5 gm diaxit canxi phosphat, tiếp đó là 0,5 gm gluconolacton. Huyền phù đặc được để hóa cứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Gel cứng được cắt lát mỏng thành sợi mảnh và dài bằng dụng cụ cắt lát mỏng/dụng cụ xé vụn. Các sợi mảnh được nạp lên khay và được đặt trong thiết bị sấy lò chân không. Việc làm khô được dừng lại sau khi đạt được độ hoạt động của nước là 0,10. Chế phẩm khô được nghiền đến sự phân bố cỡ hạt thích hợp cho đặc tính kích thước mồi dùng cho loài cụ thể được nhắm đích.

Ví dụ 10

Điều chế chất trừ loài gây hại được bảo quản trong chế phẩm tan trong nước:

Chế phẩm dạng hạt hòa tan được bảo quản của chất trừ loài gây hại mà mặt khác sẽ bị phân hủy bởi các thành phần khác trong chế phẩm trong quá trình bảo quản được điều chế bằng quy trình theo sáng chế. Hỗn hợp trộn sẵn của protein đậu tương trong Bảng 1 được bổ sung vào 200 g nước. Dung dịch này được bổ sung 80 g chế phẩm khô của chất trừ loài gây hại nhạy cảm. Huyền phù đặc được chuyển tới thiết bị sấy lò chân không và được làm khô đến độ hoạt động của nước là 0,1. Chế phẩm khô được nghiền đến kích thước mong muốn và được đóng gói.

Ví dụ 11

Điều chế chất trừ loài gây hại được bảo quản trong chế phẩm không tan trong nước:

Chế phẩm dạng hạt không tan được bảo quản của chất trừ loài gây hại mà mặt khác sẽ bị phân hủy bởi các thành phần khác trong chế phẩm trong quá trình bảo quản được điều chế với chế phẩm và phương pháp theo sáng chế. Hỗn hợp trộn sẵn của protein

đậu tương trong Bảng 1 được bổ sung vào 200 g nước. Dung dịch này được bổ sung 90 g chế phẩm khô của chất trừ loài gây hại nhạy cảm và 0,5 g diaxit canxi phosphat, tiếp đó là 0,55 g gluconolacton. Huyền phù đặc được để hóa cứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ, và sau đó được cắt lát mỏng thành sợi mảnh, dài bằng dụng cụ cắt lát mỏng/dụng cụ xé vụn. Các sợi mảnh được nạp lên khay và được làm khô trong thiết bị sấy lò chân không để đạt được độ hoạt động của nước là 0,1. Chế phẩm khô được nghiền tiếp đến sự phân bố cỡ hạt mong muốn và được đóng gói.

Ví dụ 12

Mười (10) gam *Lactobacillus Rhamnosus GG* khô được trộn với 100 g hỗn hợp trộn sẵn của sản phẩm thủy phân protein của Ví dụ 1 (bảng 1). Hỗn hợp khô này được bổ sung từ từ vào 100 gm nước đã được khử ion ở nhiệt độ 35°C trong thiết bị khuấy vệ tinh kép có vỏ bọc, và được trộn trong 10 phút ở tốc độ 40 vòng/phút. Huyền phù đặc đồng nhất được trải đều trên khay với khả năng tải 100 gm/ sq ft, và khay được đặt trên giá trong thiết bị làm khô lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Nhiệt độ giá được đặt ở 5°C để làm lạnh huyền phù đặc. Chân không được áp dụng để làm giảm áp suất đến 399.966 Pa (3 Torr), tại thời điểm đó nhiệt độ giá được nâng lên đến 30°C. Sau 2 giờ áp suất được làm giảm tiếp xuống còn 19.998 Pa (150 miliTorr) với nhiệt độ giá vẫn được giữ ở 30°C. Việc làm khô được tiếp tục trong 3 giờ nữa, tại thời điểm đó, nhiệt độ sản phẩm được nâng lên trong khoảng 2°C của nhiệt độ giá. Sau đó, sản phẩm đã được làm khô được lấy ra khỏi thiết bị làm khô lạnh và độ hoạt động của nước của chế phẩm khô tại điểm này được đo bằng thiết bị Hygropalm Awl. Lượng mất khả năng sống trong các quá trình tạo chế phẩm, điều chế và làm khô được đo và được ghi lại. Thử nghiệm độ ổn định bảo quản của chế phẩm khô được tiến hành trong các điều kiện bảo quản được tăng lên là 32°C và RH 20 %. Kết quả của thử nghiệm ở nhiệt độ 30°C, và cũng như là thử nghiệm được lặp lại ở nhiệt độ 40°C được thể hiện dưới đây.

Độ hoạt động của nước sau khi làm khô	0,25	0,26
Lượng mất mát trong quá trình làm khô	0,5 log	0,7 log
Lượng mất mát trong quá trình bảo quản	0,4 log	0 0,7 log

Ví dụ 13

Hai mươi (20) gam *Lactobacillus Rhamnosus GG* khô được trộn với 100 g hỗn hợp trộn sẵn của protein nước sữa trong Ví dụ 1. Hỗn hợp khô này được bổ sung từ từ vào 100 gm nước đã được khử ion ở nhiệt độ 35°C trong thiết bị khuấy vệ tinh kép có vỏ bọc, và được trộn trong 10 phút ở tốc độ 40 vòng/phút. Huyền phù đặc đồng nhất được trải đều trên khay với khả năng tải 100 gm/ sq ft, và khay được đặt trên giá trong thiết bị làm khô lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Nhiệt độ giá được đặt ở 5°C để làm lạnh huyền phù đặc. Chân không được áp dụng để làm giảm áp suất đến 399.966 Pa (3 Torr), tại thời điểm đó nhiệt độ giá được nâng lên đến 30°C. Sau 2 giờ, áp suất được làm giảm xuống còn 19.998 Pa (150 miliTorr) với nhiệt độ giá vẫn được giữ ở 30°C. Việc làm khô được tiếp tục trong 3 giờ nữa, tại thời điểm đó, nhiệt độ sản phẩm được nâng lên trong khoảng 2°C của nhiệt độ giá. Sau đó, sản phẩm đã được làm khô được lấy ra khỏi thiết bị làm khô lạnh và độ hoạt động của nước của chế phẩm khô tại điểm này được đo bằng thiết bị Hygropalm Awl. Lượng mất khả năng sống trong các quá trình tạo chế phẩm, điều chế và làm khô được đo và được ghi lại.

Thử nghiệm độ ổn định bảo quản chế phẩm khô được tiến hành trong các điều kiện bảo quản được tăng lên là 32°C và RH 20 %.

Kết quả của thử nghiệm ở nhiệt độ 30°C và cũng như là của thử nghiệm được lặp lại, nhưng tiến hành ở nhiệt độ 40°C được thể hiện dưới đây:

Độ hoạt động của nước sau khi làm khô	0,23	0,26
Lượng mất mát trong quá trình làm khô	0,6 log	0,7 log
Lượng mất mát trong quá trình bảo quản	0,8 log	0,7 log

Ví dụ 14

Mười (10) gam *Lactobacillus acidophilis* khô được trộn với 10 gm trehaloza và được đặt nhanh sang bên cạnh trong khi 65,3 gm trehaloza, 3 gm natri alginat, 5 gm inulin và 16,7 gm sản phẩm thủy phân nước sữa được trộn cùng với nhau ở dạng bột khô và được bổ sung từ từ vào 100 gm nước đã được khử ion ở nhiệt độ 35°C trong thiết

bị khuấy vệ tinh kép có vỏ bọc, và được trộn trong 5 phút ở tốc độ 40 vòng/phút. Huyền phù đặc này được bổ sung hỗn hợp trộn sẵn khô của *Lactobacillus acidophilis* và trehaloza, và tiếp tục trộn trong 5 phút nữa ở nhiệt độ 35°C. Huyền phù đặc đồng nhất được trải đều trên khay với khả năng tải 100 gm/ sq ft, và khay được đặt trên giá trong thiết bị làm khô lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Nhiệt độ giá được đặt ở 5°C để làm lạnh huyền phù đặc. Chân không được áp dụng để làm giảm áp suất đến 399.966 Pa (3 Torr), tại thời điểm đó nhiệt độ giá được nâng lên đến 30°C. Sau 2 giờ, áp suất được làm giảm xuống còn 19.998 Pa (150 miliTorr) với nhiệt độ giá vẫn được giữ ở 30°C. Việc làm khô được tiếp tục trong 3 giờ nữa, tại thời điểm đó, nhiệt độ sản phẩm được nâng lên trong khoảng 2°C của nhiệt độ giá. Sản phẩm đã được làm khô được lấy ra khỏi thiết bị làm khô lạnh và độ hoạt động của nước trong chế phẩm khô tại điểm này được đo bằng cách sử dụng thiết bị Hygropalm Awl. Lượng mất khả năng sống trong các quá trình tạo chế phẩm, điều chế và làm khô được đo và được ghi lại. Thử nghiệm độ ổn định bảo quản của chế phẩm khô được tiến hành trong các điều kiện bảo quản được tăng lên 32°C và RH 20 %. Kết quả của thử nghiệm trong đó thiết bị sấy được duy trì ở nhiệt độ 30°C và được so sánh với kết quả của thử nghiệm trong đó thiết bị sấy được duy trì ở nhiệt độ 50°C được thể hiện trong bảng dưới đây.

Độ hoạt động của nước sau khi làm khô	0,23	0,26
Lượng mất mát trong quá trình làm khô	0,6 log	0,7 log
Lượng mất mát trong quá trình bảo quản	0,8 log	0,9 log

Ví dụ 15

Mười (10) gam *Lactobacillus acidophilis* khô được trộn với 10 gm trehaloza và được đặt nhanh sang bên cạnh trong khi 65,3 gm trehaloza, 3 gm natri alginat, 5 gm inulin và 16,7 gm sản phẩm thủy phân nước sữa được trộn cùng với nhau ở dạng bột khô và được bổ sung từ từ vào 100 gm nước đã được khử ion ở nhiệt độ 50°C trong thiết bị khuấy vệ tinh kép có vỏ bọc, và được trộn trong 5 phút ở tốc độ 40 vòng/phút. Huyền phù đặc được làm lạnh xuống đến 4°C. Huyền phù đặc đã được làm lạnh này được bổ sung hỗn hợp trộn sẵn của *Lactobacillus acidophilis* và trehaloza, và tiếp tục trộn trong

5 phút nữa ở nhiệt độ 4°C. Huyền phù đặc đồng nhất được trải đều trên khay với khả năng tải 100 gm/ sq ft, và khay được đặt trên giá trong thiết bị làm khô lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Nhiệt độ giá được đặt ở 5°C để duy trì nhiệt độ của huyền phù đặc lạnh. Chân không được áp dụng để làm giảm áp suất đến 399.966 Pa (3 Torr), tại thời điểm đó, nhiệt độ giá được nâng lên đến 30°C. Sau 2 giờ, áp suất được làm giảm xuống còn 19.998 Pa (150 miliTorr) với nhiệt độ giá vẫn được giữ ở 30°C. Việc làm khô được tiếp tục trong 3 giờ nữa, tại thời điểm đó, nhiệt độ sản phẩm được nâng lên trong khoảng 2°C của nhiệt độ giá. Sản phẩm đã được làm khô được lấy ra khỏi thiết bị làm khô lạnh. Độ hoạt động của nước trong chế phẩm khô ở điểm này là $A_w=0,23$ khi đo bằng thiết bị Hygropalm Awl. Lượng mất khả năng sống trong các quá trình tạo chế phẩm, điều chế và làm khô tổng cộng là 0,6 log.

Ví dụ 16

Một trăm (100) gam hỗn hợp trộn sẵn đậu tương được bổ sung từ từ vào 100 gm nước đã được khử ion ở nhiệt độ 35°C trong thiết bị khuấy vệ tinh kép có vỏ bọc, và được trộn trong 10 phút ở tốc độ 40 vòng/phút. Mười (10) gam *Bifidobacterium lactis* Bb- 12 khô được bổ sung từ từ có khuấy trộn ở 20 vòng/phút và huyền phù đặc được trộn trong 5 phút nữa. Huyền phù đặc đồng nhất được trải đều trên khay với khả năng tải 100 gm/ sq ft, và khay được đặt trên giá trong thiết bị làm khô lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Nhiệt độ giá được đặt ở 5°C để làm lạnh huyền phù đặc. Chân không được áp dụng để làm giảm áp suất đến 399.966 Pa (3 Torr), tại thời điểm đó, nhiệt độ giá được nâng lên đến 30°C. Sau 2 giờ, áp suất được làm giảm xuống còn 19.998 Pa (150 miliTorr) với nhiệt độ giá vẫn được giữ ở 30°C. Việc làm khô được tiếp tục trong 3 giờ nữa, tại thời điểm đó, nhiệt độ sản phẩm được nâng lên trong khoảng 2°C của nhiệt độ giá. Sản phẩm đã được làm khô được lấy ra khỏi thiết bị làm khô lạnh và độ hoạt động của nước trong chế phẩm khô tại thời điểm này là $A_w=0,26$ khi đo bằng thiết bị Hygropalm Awl. Lượng mất khả năng sống trong các quá trình tạo chế phẩm, điều chế và làm khô tổng cộng là 0,7 log.

Thử nghiệm độ ổn định bảo quản của chế phẩm khô trong các điều kiện bảo quản được tăng lên 32°C và RH 20 % thể hiện lượng mất khả năng sống của lợi khuẩn được làm ổn định trong chế phẩm theo sáng chế chỉ là 0,7 log sau bốn tuần.

Ví dụ 17

Các thông số giống như trong ví dụ #1, ngoại trừ việc trộn được thực hiện trong thiết bị khuấy Ross là ở 25 in-sơ chân không để tạo ra huyền phù đặc tỷ trọng 1,2 gm/cc. Độ hoạt động của nước trong chế phẩm khô tại thời điểm này là $A_w=0,26$ khi đo bằng thiết bị Hygropalm Awl. Lượng mất khả năng sống trong các quá trình tạo chế phẩm, điều chế và làm khô tổng cộng là 0,5 log.

Thử nghiệm độ ổn định bảo quản của chế phẩm khô trong các điều kiện bảo quản được tăng lên 32°C và RH 20 % thể hiện lượng mất khả năng sống của lợi khuẩn được làm ổn định trong chế phẩm theo sáng chế chỉ là 0,7 log sau bốn tuần.

Ví dụ 18

Một trăm (100) gam chất cô dạng lỏng mới của vi khuẩn LGG (chứa 10% chất rắn và còn lại là nước) được bổ sung vào thiết bị khuấy vệ tinh kép có vỏ bọc và được làm ấm tới 35°C. Bổ sung từ từ vào đó 100 g hỗn hợp trộn sẵn nước sữa (bảng 1). Huyền phù đặc thu được được trộn trong 10 phút ở tốc độ 40 vòng/phút. Huyền phù đặc đồng nhất được trải đều trên khay với khả năng tải 100 gm/ sq ft, và khay được đặt trên giá trong thiết bị làm khô lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Nhiệt độ giá được đặt ở 5°C để làm lạnh huyền phù đặc. Chân không được áp dụng để làm giảm áp suất đến 399.966 Pa (3 Torr), tại thời điểm đó, nhiệt độ giá được nâng lên 30°C. Sau 2 giờ, áp suất được làm giảm xuống còn 19.998 Pa (150 miliTorr) với nhiệt độ giá vẫn được giữ ở 30°C. Việc làm khô được tiếp tục trong 3 giờ nữa, tại thời điểm đó, nhiệt độ sản phẩm được nâng lên trong khoảng 2°C của nhiệt độ giá. Sản phẩm đã được làm khô được lấy ra khỏi thiết bị làm khô lạnh. Độ hoạt động của nước trong chế phẩm khô tại thời điểm này là $A_w=0,25$ khi đo bằng thiết bị Hygropalm Awl. Lượng mất khả năng sống trong các quá trình tạo chế phẩm, điều chế và làm khô tổng cộng là 0,5 log. Thử nghiệm độ ổn định bảo quản của chế phẩm khô trong các điều kiện bảo quản được tăng lên 32°C và RH 20% thể hiện lượng mất khả năng sống của lợi khuẩn được làm ổn định trong chế phẩm theo sáng chế chỉ là 0,4 log sau bốn tuần.

Ví dụ 19

Một trăm (100) gam chất cô đông lạnh, chưa được làm tan đông của *Lactobacillus Rhamnosus GG* (LGG) và 100g hỗn hợp trộn sẵn của sản phẩm thủy phân protein được bổ sung vào thiết bị khuấy vệ tinh kép có vỏ bọc (DPM, 1pt, Ross Engineering, Inc., Savannah, GA). Quy trình này cũng có thể được thực hiện bằng cách làm tan đông chất cô đông lạnh trước tiên. Việc trộn được tiến hành ở tốc độ 40 vòng/phút và 37°C trong 10 phút. Huyền phù đặc đồng nhất được đo độ nhớt (máy đo độ nhớt Brookfield, Model # LVDVE115, Brookfield Engineering Laboratories, Inc.), và sau đó được trải đều trên khay với khả năng tải 100g/sq ft. Các thông số độ nhớt đối với giới hạn độ nhớt cao là: 300g mẫu trong cốc Pyrex dung tích 400mL, 33-37°C, Spindle #64, tốc độ 1,0 vòng/phút, hoạt động mà không có chân bảo vệ. Sau đó, khay được đưa vào tủ lạnh -4°C để làm lạnh trong 30 phút. Sau khi làm lạnh, bước làm khô được bắt đầu bằng cách sử dụng thiết bị làm khô lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY) với nhiệt độ giá được đặt ở 30°C trong suốt quá trình, và áp suất 373.302 Pa (2800mTorr) trong ít nhất 2,5 giờ. Sau ít nhất 2,5 giờ, áp suất được giảm xuống 13.332 Pa (100mTorr) trong ít nhất 2,5 giờ nữa. Thử nghiệm này được lặp lại với hai mẻ khác nhau của dịch lên men LGG, và bao gồm bước rửa một mẻ bằng 3% DMV và Hoàn nguyên bằng nước khử ion trước khi bổ sung hỗn hợp trộn sẵn của sản phẩm thủy phân.

Mẫu	CFU/g sản phẩm cuối cùng	Lượng mất mát trong quá trình làm khô	Độ nhớt của huyền phù đặc (cP)
Mẻ LGG # 1	2,20 x 10 ⁺¹⁰	0,61	410.000
Mẻ LGG # 2	7,00 x 10 ⁺¹⁰	0,48	N/A
Rửa mẻ LGG # 2	1,38 x 10 ⁺¹¹	0,21	319.000

Các thông số độ nhớt đối với giới hạn độ nhớt trung bình là: 300g mẫu trong cốc Pyrex dung tích 400mL, 33-37°C, Spindle #64, tốc độ 5,0 vòng/phút, hoạt động mà không có chân bảo vệ.

Mẫu	CFU/g sản phẩm cuối cùng	Lượng mất mát trong quá trình làm khô	Độ nhớt của huyền phù đặc (cP)
Mẻ LGG # 4	1,39x 10 ⁺¹¹	0,18	58.100
Rửa mẻ LGG # 4	1,31x10 ⁺¹¹	0,23	36.200

Ví dụ 20

Một trăm (100) gam chất cô đông lạnh của *Lactobacillus Rhamnosus GG* (LGG) được làm tan đông ở nhiệt độ 37°C và được bổ sung vào thiết bị khuấy vệ tinh kép có vỏ bọc (DPM, 1pt, Ross Engineering, Inc., Savannah, GA). Bổ sung vào đó 100g hỗn hợp trộn sẵn của sản phẩm thủy phân protein. Chất cô đông lạnh chưa được làm tan đông cũng có thể được sử dụng. Việc trộn được tiến hành ở tốc độ 40 vòng/phút và 37°C trong 10 phút, và sau đó huyền phù đặc được trải đều ra các khay với khả năng tải 100g/sq ft. Sau đó, khay này được đưa vào tủ lạnh -4°C để làm lạnh trong 30 phút. Sau khi làm lạnh, bước làm khô được bắt đầu bằng cách sử dụng thiết bị làm khô lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY) với nhiệt độ giá được đặt ở 30°C trong suốt quá trình, và áp suất 373.302 Pa (2800mTorr) trong ít nhất 2,5 giờ. Sau ít nhất 2,5 giờ, áp suất được giảm đến 13.332 Pa (100mTorr) trong ít nhất 2,5 giờ nữa. Quy trình giống như vậy được áp dụng cho 10g nguyên liệu LGG được làm khô (được tạo bột), mà được trộn vào 100g sản phẩm thủy phân protein. Sau đó, hỗn hợp khô này được bổ sung từ từ vào 90g nước được khử ion trong thiết bị khuấy vệ tinh kép có vỏ bọc.

Mẫu	Lượng mất mát trong quá trình làm khô (log)
Sản phẩm cuối cùng LGG khô/MM	1,26
Sản phẩm cuối cùng chất cô LGG đông lạnh/MM	1,46

Ví dụ 21

Bột khô ổn định chứa enzym:

Bốn mươi (40) gam enzym phân giải protein (Novozymes, Đan mạch) dưới dạng bột khô được trộn với 60 g hỗn hợp trộn sẵn đậu tương (Bảng 1). Hỗn hợp khô này được bổ sung từ từ vào 100 g nước đã được khử ion ở nhiệt độ 35°C trong thiết bị khuấy vệ tinh kép có vỏ bọc, và được trộn trong 10 phút ở tốc độ 40 vòng/phút. Huyền phù đặc đồng nhất được trải đều trên khay với khả năng tải 100 gm/ sq ft, và khay được đặt trên giá trong thiết bị làm khô lạnh (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Nhiệt độ giá được đặt ở 5°C để làm lạnh huyền phù đặc. Chân không được áp dụng để làm giảm áp suất đến 399.966 Pa (3 Torr), tại thời điểm đó, nhiệt độ giá được nâng lên đến 60°C. Sau 1

giờ, áp suất được làm giảm xuống còn 19.998 Pa (150 miliTorr) với nhiệt độ giá vẫn được giữ ở 60°C. Việc làm khô được tiếp tục trong 1 giờ nữa, tại thời điểm đó, nhiệt độ sản phẩm được nâng lên trong khoảng 2°C của nhiệt độ giá. Sản phẩm đã được làm khô được lấy ra khỏi thiết bị làm khô lạnh. Để xác định khả năng tải và độ ổn định bảo quản của chế phẩm đã được làm khô: mẫu khô được cân một cách chính xác (<100 mg) trong ống vi ly tâm và 200µg dimetyl sulfoxit (DMSO) được bổ sung. Chế phẩm được hòa tan trong chất đệm DMSO bằng cách tạo xoáy. Bổ sung 0,8 ml dung dịch chứa NaOH 0,05N, SDS 0,5% và axit xitric 0,075M (muối trinati) vào mẫu này. Ống được nghiền siêu âm trong 10 phút ở nhiệt độ 45°C, tiếp đó là ly tâm nhanh ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần phân ước của dung dịch DMSO/NaOH/SDS/xitrat sạch được lấy vào các lỗ của vi đĩa và được phân tích về hàm lượng protein bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm Bradford. Độ ổn định bảo quản của chế phẩm enzym ổn định cao hơn một cách đáng kể so với enzym khô không có chế phẩm theo sáng chế.

Tài liệu tham khảo

Nội dung của các tài liệu tham khảo nêu ở đây được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

6,964,771 Method for stably incorporating substances within dry, foamed glass matrices. September 1997. Roser et al.

5,766,520 Preservation by formulation formation. June 1998. Bronshtein

6,534,087 Process for preparing a pharmaceutical composition.

June 2001. Busson and Schroeder.

6,884,866 Bulk drying and the effects of inducing bubble nucleation. April 2005. Bronshtein.

7,153,472 Preservation and formulation of living cells for storage and delivery in hydrophobic carriers December, 2006 Bronshtein

20080229609 Preservation by Vaporization. June 2005. Bronshtein

6,306,345 Industrial scale barrier technology for preservation of sensitive biological materials at ambient temperatures October 2001. Bronshtein et al.

Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., Vesey, G. 2006. Preservation of micro-organisms by drying; a review. J. Microbiol. Methods. 66(2):183-93.

Capela, P., Hay, T. K. C, & Shah, N. P. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Research International, 39(3) 203-211).

Annear, 1962. The Preservation of Leptospire by Drying From the Liquid State, J. Gen. Microbiol, 27:341-343.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm khô dùng để bảo quản vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học chứa (i) vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học (ii) ít nhất hai chất làm ổn định, và (iii) ít nhất hai chất bảo quản, trong đó vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học này là lợi khuẩn;

trong đó ít nhất hai chất làm ổn định bao gồm natri alginat và inulin;

trong đó ít nhất hai chất bảo quản bao gồm disacarit và một hoặc cả hai chất trong số protein và sản phẩm thủy phân protein, và trong đó vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học được bọc lại trong chất nền thủy tinh vô định hình.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất hai chất làm ổn định cùng nhau có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1 phần trăm khối lượng đến khoảng 20 phần trăm khối lượng.

3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó các chất bảo quản có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 20 phần trăm khối lượng đến khoảng 80 phần trăm khối lượng.

4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó tổng lượng của các chất bảo quản nằm trong khoảng từ 20 đến 70 phần trăm khối lượng.

5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học bao gồm lợi khuẩn, disacarit bao gồm trehaloza và sản phẩm thủy phân protein bao gồm sản phẩm thủy phân casein.

6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được điều chế từ giống cây mới hoặc đông lạnh hoặc khô chứa lợi khuẩn sống trong dung dịch chứa từ natri alginat với lượng từ 1% đến 2,5%, inulin với lượng từ 1% đến 5%, trehaloza với lượng từ 20% đến 60%, và sản phẩm thủy phân casein với lượng từ 3% đến 15%.

7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học bao gồm lợi khuẩn và trong đó chế phẩm này bị mất hiệu lực tối đa 1 log CFU/g trong khoảng thời gian 60 ngày ở nhiệt độ 40°C và độ ẩm tương đối là 33%.

8. Phương pháp điều chế chế phẩm khô theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, bao gồm các bước:

(i) kết hợp trong chân không vi sinh vật hoặc nguyên liệu có hoạt tính sinh học, ít nhất hai chất làm ổn định và ít nhất hai chất bảo quản trong dung môi chứa nước;

(ii) làm lạnh hỗn hợp của bước (i) xuống nhiệt độ cao hơn nhiệt độ đông lạnh của nó;

(iii) làm khô sơ cấp hỗn hợp đã được làm lạnh trong chân không ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ đông lạnh của nó; và

(iv) làm khô thứ cấp hỗn hợp trong chân không ở nhiệt độ bằng 20°C hoặc cao hơn trong khoảng thời gian đủ để làm giảm độ hoạt động của nước trong hỗn hợp xuống $A_w = 0,3$ hoặc thấp hơn.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó bước làm khô sơ cấp và thứ cấp hỗn hợp được thực hiện bằng cách làm bay hơi.

10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó bước làm khô thứ cấp được bắt đầu khi nhiệt độ của hỗn hợp được tăng lên ít nhất 10°C cao hơn nhiệt độ làm khô ban đầu của nó.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 10, trong đó hỗn hợp đã được làm khô được cắt, được nghiền vỡ, được nghiền hoặc được tán thành bột chảy tự do.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó cỡ hạt của hỗn hợp đã được làm khô nhỏ hơn khoảng 1000 μm .

13. Phương pháp theo điểm 8, trong đó sản phẩm của bước (i) có độ nhớt nằm trong khoảng từ 10.000 cP đến khoảng 450.000 cP.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó hỗn hợp đã được làm khô được cắt, được nghiền vỡ, được nghiền hoặc được tán thành bột chảy tự do.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó cỡ hạt của hỗn hợp đã được làm khô nhỏ hơn khoảng 1000 μm .

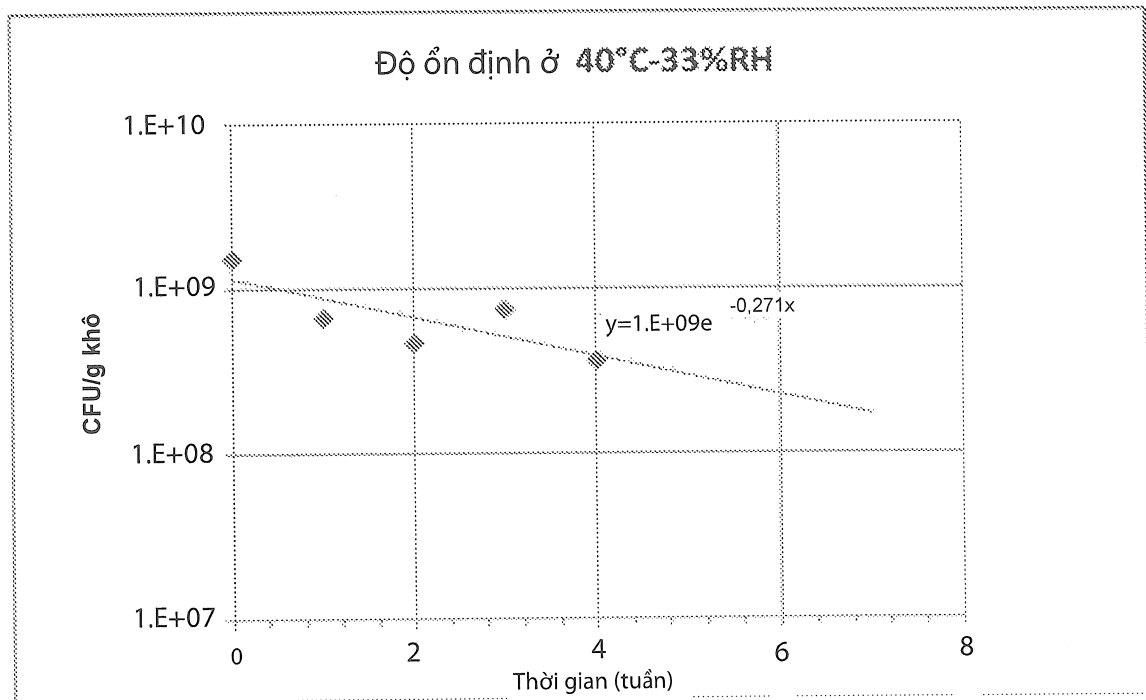


Fig.1

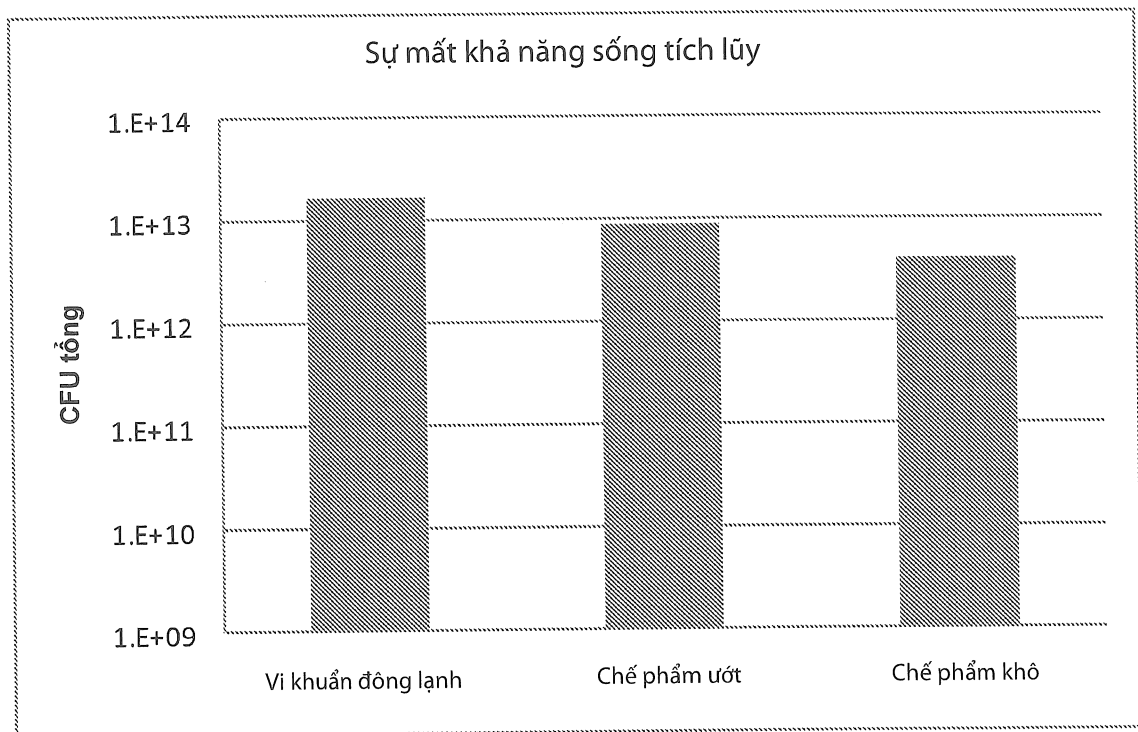


Fig.2

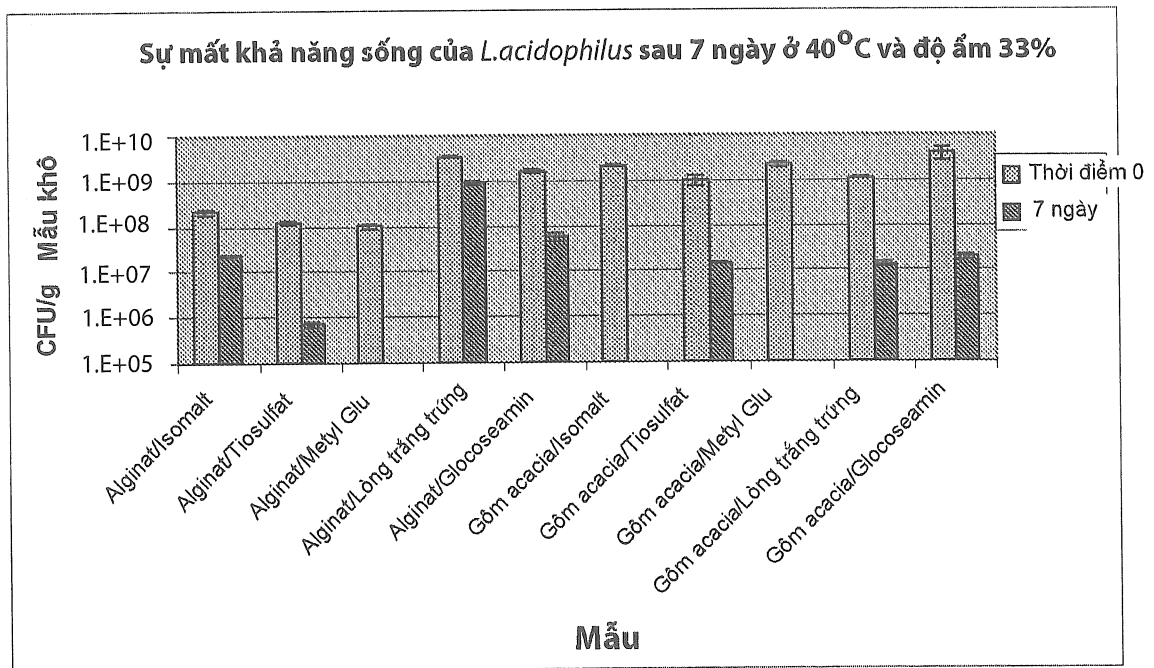


Fig.3

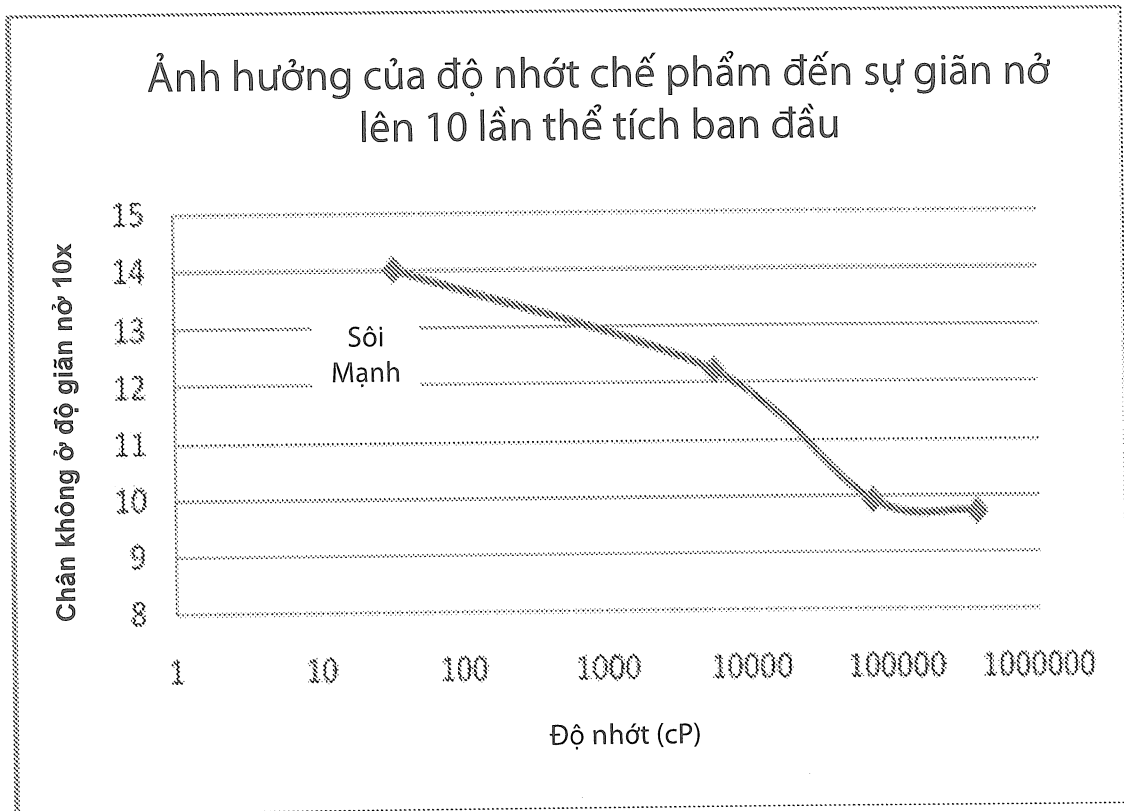


Fig.4

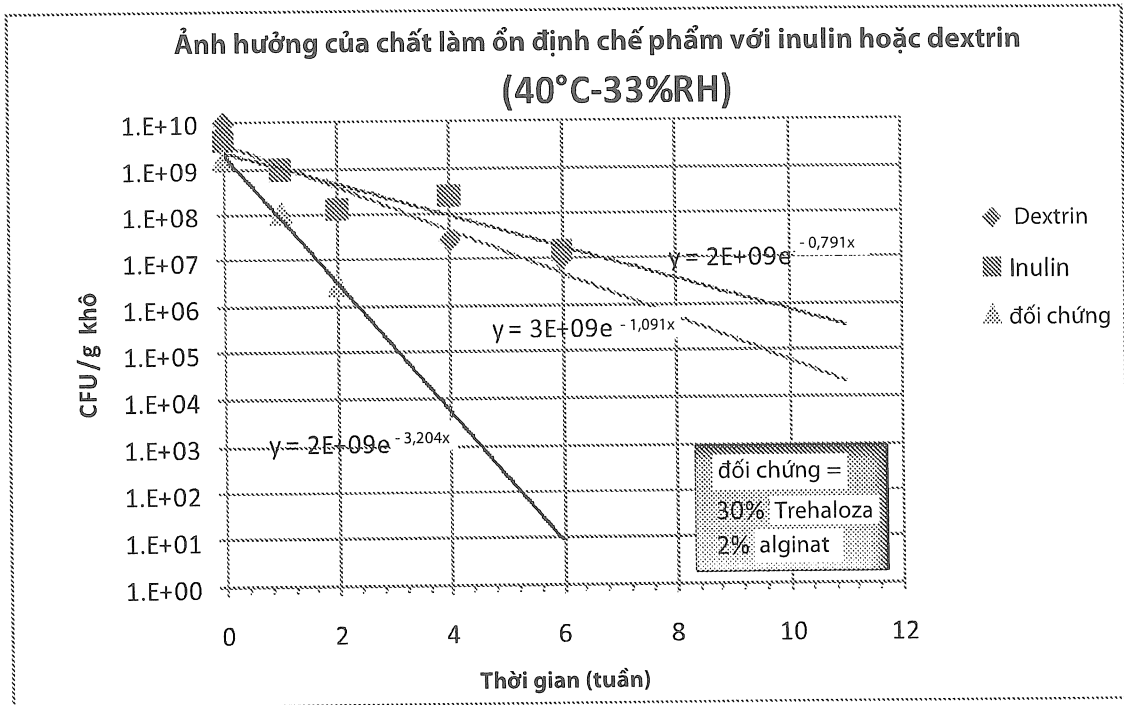


Fig.5

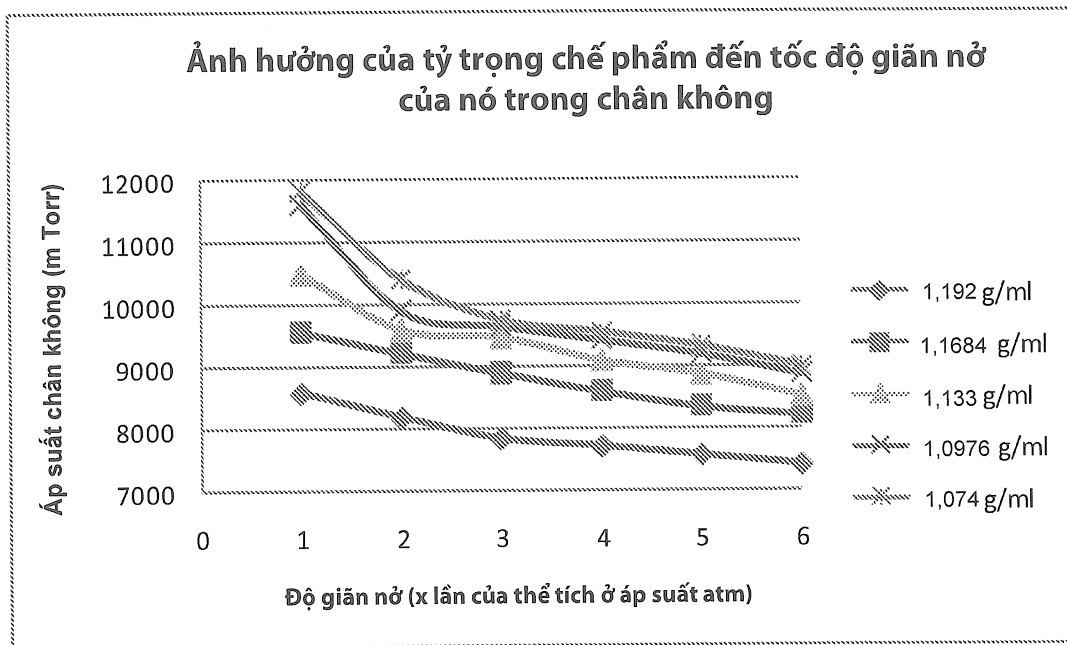


Fig.6

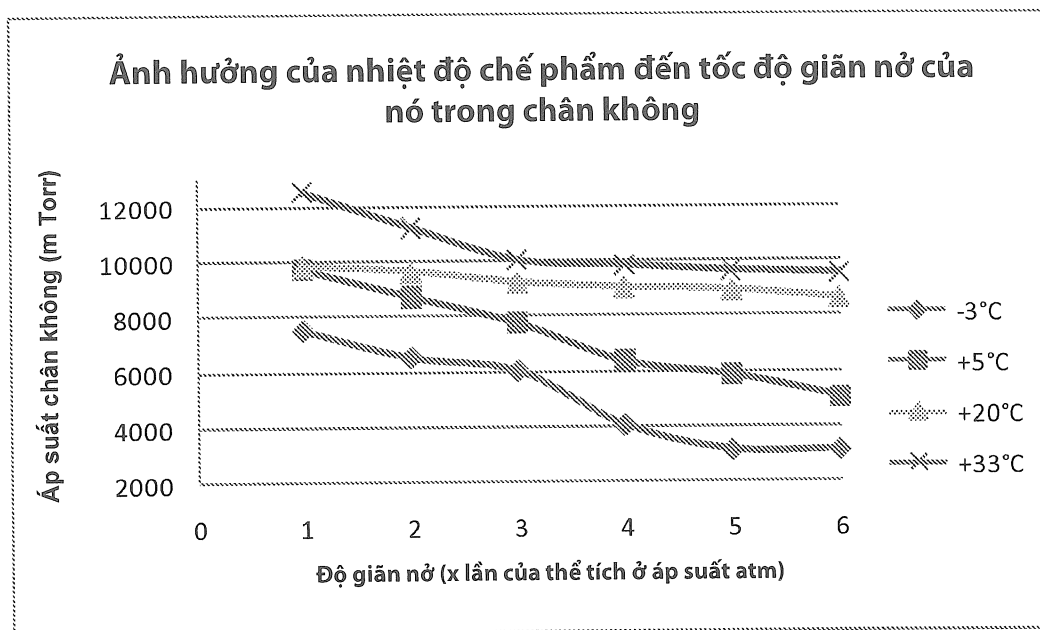


Fig.7

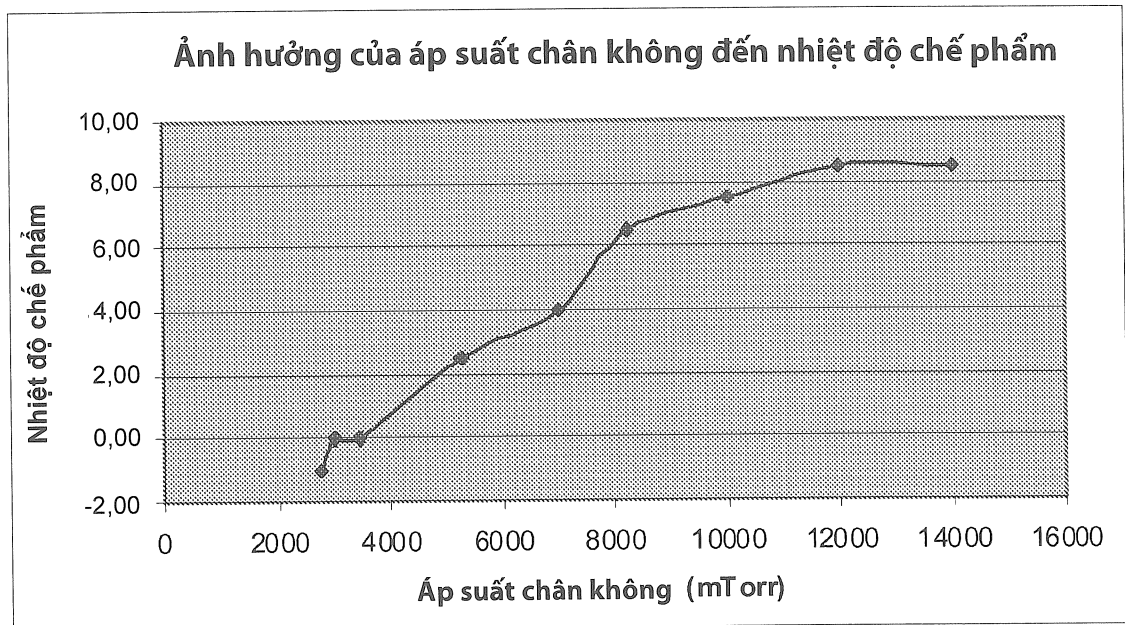


Fig.8

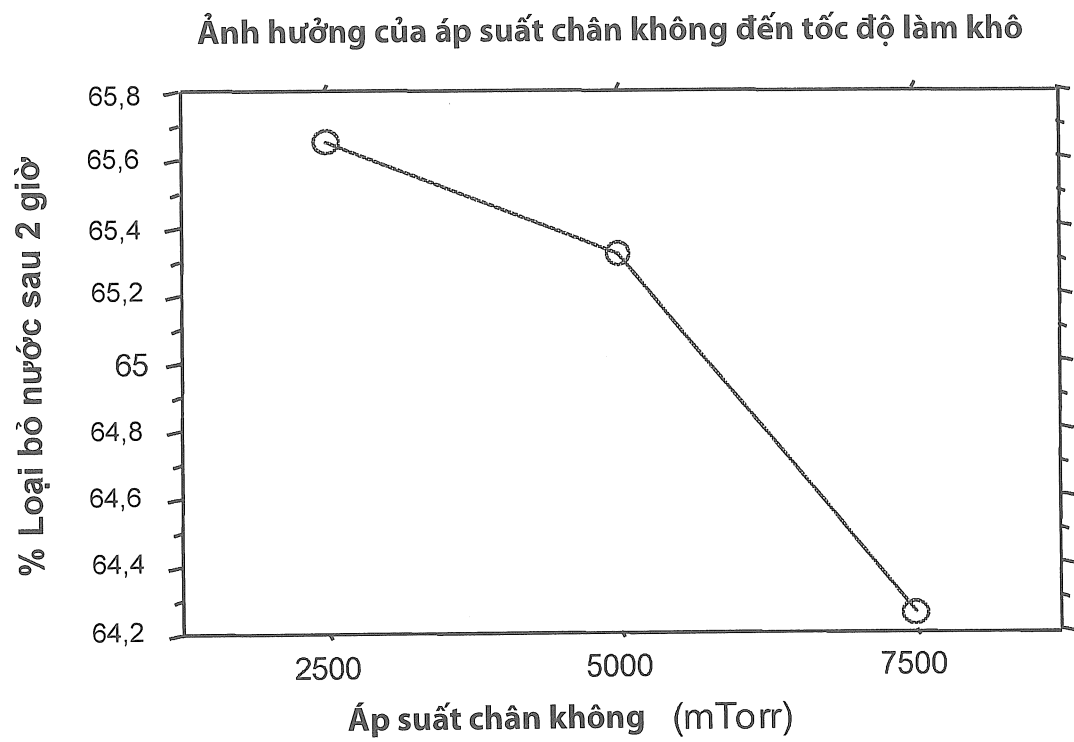


Fig.9

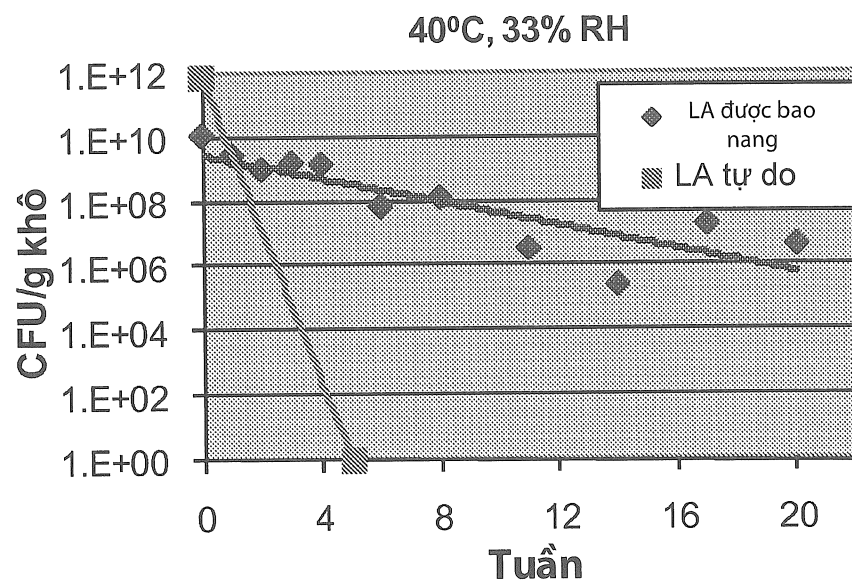


Fig.10

Sơ đồ quy trình điều chế và làm khô chế phẩm hydrogel theo sáng chế

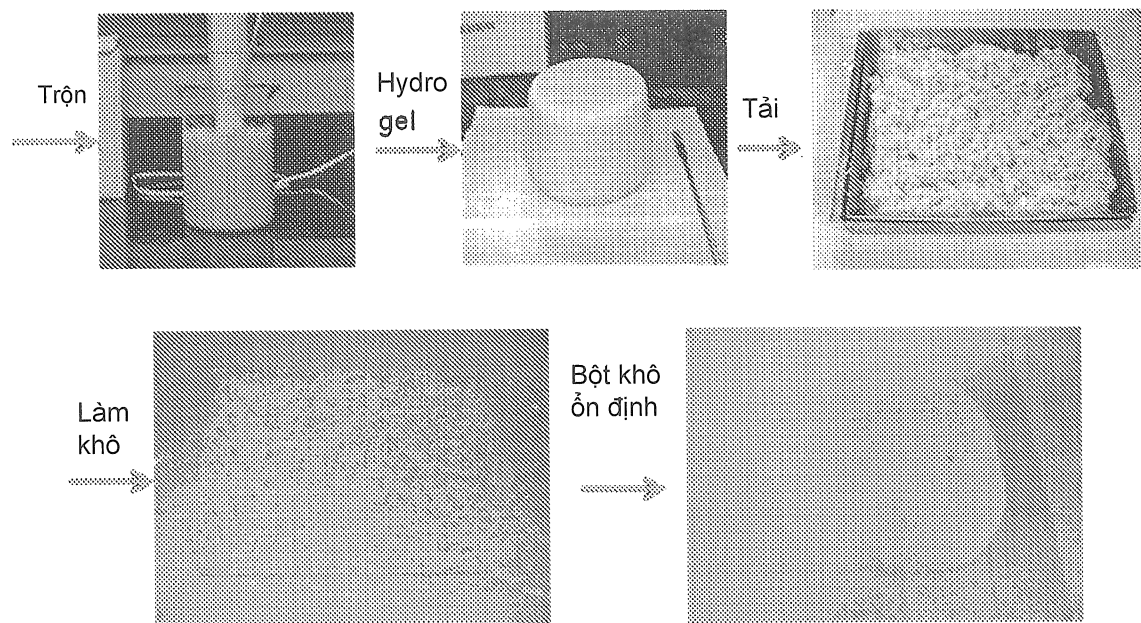


Fig.11