



(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)



1-0033287

(51)⁷ A61K 35/742

(13) B

(21) 1-2017-00085

(22) 29/08/2015

(86) PCT/US2015/047608 29/08/2015

(87) WO/2016/033572 03/03/2016

(30) 62/043,599 29/08/2014 US; 62/063,453 14/10/2014 US

(45) 25/09/2022 414

(43) 25/04/2017 349A

(73) SAMI LABS LIMITED (IN)

19/1 & 19/2, 1st Main, 2nd Phase, Peenya Industrial Area, Bangalore 560058, India

(72) MAJEED, Muhammed (US); ARUMUGAM, Sivakumar (IN); ALI, Furqan (IN).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐỒNG NUÔI CÂY BACILLUS COAGULANS MTCC 5856 VỚI SỢI THỰC VẬT

(57) Sáng chế đề cập đến (i) hoạt tính thúc đẩy sinh trưởng của các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật đến vi khuẩn *Bacillus coagulans* MTCC 5856; (ii) việc kết hợp sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật với vi khuẩn *Bacillus coagulans* MTCC 5856 để ức chế vi khuẩn Gram âm gây bệnh và (iii) khả năng sản xuất các axit béo chuỗi ngắn (short chain fatty acids-SCFA) của vi khuẩn *Bacillus coagulans* MTCC 5856 sử dụng các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, sáng chế đề cập đến vi khuẩn *Bacillus coagulans* (vi khuẩn axit lactic). Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến (i) hoạt tính thúc đẩy sinh trưởng của các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật đến *Bacillus coagulans* MTCC 5856; (ii) việc sản xuất các axit béo chuỗi ngắn (SCFA) bằng *Bacillus coagulans* MTCC 5856 sử dụng các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật và (iii) việc kết hợp sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật với *Bacillus coagulans* MTCC 5856 để ức chế vi khuẩn Gram âm gây bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc kết hợp lợi khuẩn (vi khuẩn có lợi) đa chủng và thức ăn cho lợi khuẩn giúp tăng cường hỗ trợ hệ miễn dịch là các kiến thức đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Đặc biệt là việc kết hợp lợi khuẩn với các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật để tạo ra synbiotic đã được ghi nhận là phương pháp trị liệu đầy hứa hẹn. (Stig Bengmark and Robert Martindale. "Prebiotics and Synbiotics in Clinical Medicine". Nutr Clin Pract quyển 20, trang 244-261, tháng 4 năm 2005). Thành công của phương pháp này phụ thuộc vào việc chọn lựa cẩn thận chủng lợi khuẩn mà số lượng sống sót của chúng tăng lên đáng kể nhờ các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật mà có khả năng chống lại cả sự thủy phân axit và enzym trong đường ruột. Những nghiên cứu vô cùng quan trọng để điều chỉnh hiệu quả của động vật chủ sử dụng chế độ ăn synbiotic đã đưa ra chỉ dẫn rằng còn nhiều hạn chế trong việc sử dụng và tiêu hóa sợi bằng vi khuẩn xét về khả năng vi khuẩn xâm nhập tới cơ chất, đặc tính vật lý và hóa học của sợi (thức ăn thô cho gia súc) và động học của quá trình tiêu hóa (Gahriella A. Varga and Eric S, Kolver, "Microbial and Animal Limitations to Fiber Digestion and Utilization", J Nutr 1 tháng 5 năm 1997, vol 127 số 5 819S-823S).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích chính của sáng chế là đánh giá hiệu quả của các sợi tự nhiên được chọn (có khả năng chống lại sự thủy phân axit và enzym) trong việc tăng số lượng *Bacillus coagulans* MTCC 5856 sống sót.

Mục đích khác của sáng chế là đánh giá khả năng của chế phẩm synbiotic (sợi tự

nhiên và *Bacillus coagulans* MTCC 5856) để ức chế vi khuẩn Gram âm gây bệnh.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đánh giá khả năng của chế phẩm synbiotic (sợi tự nhiên và *Bacillus coagulans* MTCC 585) để sản xuất axit béo chuỗi ngắn mong muốn, đặc tính này có ảnh hưởng lớn tới các ứng dụng trị liệu.

Sáng chế hoàn thành được các mục đích đã nêu và tiếp tục đề xuất các ưu thế liên quan.

Được bộc lộ trong sáng chế là (i) hoạt tính thúc đẩy sinh trưởng của các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật đến *Bacillus coagulans* MTCC 5856; (ii) việc kết hợp của các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật và *Bacillus coagulans* MTCC 5856 để ức chế vi khuẩn Gram âm gây bệnh và (iii) việc sản xuất các axit béo chuỗi ngắn (SCFA) bằng *Bacillus coagulans* MTCC 5856 sử dụng các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật.

Các đặc tính và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ những mô tả chi tiết dưới đây, được kết hợp với các hình vẽ đính kèm nhằm mục đích minh họa, bằng cách lấy ví dụ, các phương án quan trọng của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các Fig 1A, 1B và 1C là đồ thị mô tả khả năng tăng số lượng khuẩn lạc *Bacillus coagulans* MTCC 5856 sống sót khi chỉ có mặt các loại sợi tự nhiên khác nhau (% trọng lượng/thể tích).

Các Fig 2A, 2B, 2C là đồ thị mô tả khả năng tăng số lượng khuẩn lạc *Bacillus coagulans* MTCC 5856 sống sót khi có mặt của các loại sợi tự nhiên khác nhau (% trọng lượng/trọng lượng) trong môi trường MRS (không có đường dextroza) (0,5, 1,2, 2,0% trọng lượng/thể tích).

Fig 3 là đồ thị mô tả khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *E.coli* ATCC 25922 bằng *Bacillus coagulans* MTCC 5856 khi đồng nuôi cấy hai vi khuẩn này trong môi trường sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật. Giá trị tổng số sống sót trung bình được thể hiện dưới dạng $\log_{10}$ cfu/ml.

Fig 4 thể hiện đọc kết quả sắc ký các axit béo chuỗi ngắn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo phương án được ưu tiên nhất, sáng chế đề xuất phương pháp giúp tăng số

lượng khuẩn lạc *Bacillus coagulans* MTCC 5856 sống sót, phương pháp này gồm bước cho *Bacillus coagulans* MTCC 5856 sinh trưởng với sự có mặt của các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật được chọn từ nhóm bao gồm các sợi trong hạt *Trigonella foenum-graecum* (cỏ cà ri), các sợi trong hạt *Lycium barbarum*, sợi trong hạt *Linum usitatissimum* (cây lanh), sợi trong *Cocus nucifera* (quả dừa), sợi trong củ *Zingiber officinale* (gừng), sợi trong quả *Emblica officinalis* (me rừng), sợi trong *Plantago ovata* (cây mã đề) và sợi trong hạt *Vaccinium oxycoccos* (cây nam việt quất).

Theo một phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế vi khuẩn Gram âm gây bệnh, phương pháp này bao gồm bước đem vi khuẩn Gram âm này tiếp xúc với *Bacillus coagulans* MTCC 5856 đồng nuôi cấy với các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật được chọn từ nhóm bao gồm các sợi trong hạt *Trigonella foenum-graecum* (cỏ cà ri), các sợi trong hạt *Lycium barbarum*, sợi trong hạt *Linum usitatissimum* (cây lanh), sợi trong *Cocus nucifera* (quả dừa), sợi trong củ *Zingiber officinale* (gừng), sợi trong quả *Emblica officinalis* (me rừng), sợi trong *Plantago ovata* (cây mã đề) và sợi trong hạt *Vaccinium oxycoccos* (cây nam việt quất).

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất các axit béo chuỗi ngắn bằng cách đồng nuôi cấy *Bacillus coagulans* MTCC 5856 với sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật được chọn từ nhóm gồm các sợi trong hạt *Trigonella foenum-graecum* (cỏ cà ri), các sợi trong hạt *Lycium barbarum*, sợi trong hạt *Linum usitatissimum* (cây lanh), sợi trong *Cocus nucifera* (quả dừa), sợi trong củ *Zingiber officinale* (gừng), sợi trong quả *Emblica officinalis* (me rừng), sợi trong *Plantago ovata* (cây mã đề) và sợi trong hạt *Vaccinium oxycoccos* (cây nam việt quất). Theo phương án thay thế, sáng chế cũng đề xuất phương pháp bảo vệ chống bệnh béo phì do chế độ ăn và kháng insulin trong đường ruột động vật có vú bằng cách cung cấp chế phẩm có chứa *Bacillus coagulans* MTCC 5856 và sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật được chọn từ nhóm bao gồm các sợi trong hạt *Trigonella foenum-graecum* (cỏ cà ri), các sợi trong hạt *Lycium barbarum*, sợi trong hạt *Linum usitatissimum* (cây lanh), sợi trong *Cocus nucifera* (quả dừa), sợi trong củ *Zingiber officinale* (gừng), sợi trong quả *Emblica officinalis* (me rừng), sợi trong *Plantago ovata* (cây mã đề) và sợi trong hạt *Vaccinium oxycoccos* (cây nam việt quất) để mang lại hiệu quả bảo vệ chống lại bệnh béo phì do chế độ ăn và kháng insulin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ cụ thể dưới đây giúp minh họa cho các phương án ưu tiên đã nêu trong sáng chế.

Ví dụ 1: Phương pháp điều chế sợi.

Sợi trong hạt *Trigonella foenum-graecum* (cỏ cà ri)

Hạt của *Trigonella foenum-graecum* (còn được biết đến với tên gọi cỏ cà ri) được thu mua từ chợ địa phương và nghiền nhỏ thành bột (có thể đi qua được sàng 10 mesh. Tiếp theo, bốn thể tích n-hexan được thêm vào 100 gm bột của hạt *Trigonella foenum-graecum* và chiết ở nhiệt độ hồi lưu. Một phần n-hexan được lọc bằng máy lọc Whatman số 1 và tiến hành lọc lại 3 lần cùng một dịch chiết thu được. Sau khi chiết, bã được sấy khô tại nhiệt độ 80°C trong 5 giờ và sau đó được nghiền nhỏ thành bột có thể đi qua sàng 40 mesh. Theo một phương pháp khác, mỡ hoặc dầu của hạt cà ri được loại bỏ bằng phương pháp chiết lỏng siêu tới hạn sử dụng CO₂ lỏng làm dung môi. Để tăng hàm lượng sợi thực phẩm (Galactomannan), tiến hành thủy phân bằng enzym sử dụng enzym xenlulaza như trong lưu đồ. Hàm lượng galactomannan được xác định bằng kit Megazyme (K_GALM 03/11) theo như hướng dẫn của nhà sản xuất (Megazyme International Ireland, Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, IRELAND).

Sợi trong hạt *Lycium barbarum*

Kỷ tử, quả kỷ tử hay cầu kỷ tử là một loại quả thuộc loài *Lycium barbarum*. Quả của loài *Lycium barbarum* được sấy khô và sau đó tách hạt ra và nghiền nhỏ thành bột. Tiếp theo, bốn thể tích n-hexan được thêm vào 100 gm bột *Lycium barbarum* và chiết tại nhiệt độ hồi lưu. Một phần n-hexan được lọc bằng máy lọc Whatman số 1 và tiến hành lọc lại 3 lần cùng một dịch chiết thu được. Sau khi chiết, bã được sấy khô tại nhiệt độ 80°C trong 5 giờ và sau đó nghiền nhỏ để thu được bột có thể đi qua sàng 60 mesh). Xác định hàm lượng sợi thực phẩm tổng số bằng phương pháp enzym-khối lượng (AOAC 985.29).

Sợi trong hạt *Linum usitatissimum* (cây lanh).

Hạt của *Linum usitatissimum* (còn được biết đến với tên thường gọi là hạt lanh hay cây lanh) được thu mua và nghiền nhỏ thành bột (có thể đi qua sàng 10 mesh). Tiếp theo, bốn thể tích n-hexan được thêm vào 100 gm bột hạt *Linum usitatissimum* và chiết ở nhiệt độ hồi lưu. Một phần n-hexan được lọc bằng máy lọc Whatman số 1 và tiến hành lọc lại 3 lần cùng một dịch chiết thu được. Sau khi chiết, bã được sấy khô tại nhiệt độ 80°C trong 5 giờ và sau đó được nghiền thành bột có thể đi qua sàng 40 mesh. Xác định hàm lượng sợi thực phẩm tổng số bằng phương pháp enzym-khối lượng (AOAC 985.29).

Sợi trong *Cocos nucifera*

Quả dừa trưởng thành được thu mua từ chợ địa phương và sấy khô. Sau đó, nội nhũ (cùi dừa) được thái thành nguyên liệu có kích thước đồng nhất. Tiếp theo, bốn thể tích n-hexan được thêm vào vào 100 gm vật liệu *Cocos nucifera* và chiết ở nhiệt độ hồi lưu. Một phần n-hexan được lọc bằng máy lọc Whatman số 1 và tiến hành lọc lại 3 lần cùng một dịch chiết thu được. Sau khi chiết, bã được sấy khô tại nhiệt độ 80°C trong 5 giờ và sau đó được nghiền thành bột có thể đi qua sàng 60 mesh. Xác định hàm lượng sợi thực phẩm tổng số bằng phương pháp enzym-khối lượng (AOAC 985.29).

Sợi trong củ *Zingiber officinale* (gừng)

Củ *Zingiber officinale*, rễ gừng hoặc thậm chí là cây gừng được sấy khô và nghiền nhỏ thành bột (có thể đi qua sàng 10 mesh). Tiếp theo, bốn thể tích n-hexan được thêm vào 100 gm bột củ *Zingiber officinale* và chiết ở nhiệt độ hồi lưu. Một phần n-hexan được lọc bằng máy lọc Whatman số 1 và tiến hành lọc lại 3 lần cùng một dịch chiết thu được. Theo một phương pháp khác, mỡ hoặc dầu của hạt cây cỏ cà ri được loại bỏ bằng phương pháp chiết lỏng siêu tới hạn sử dụng CO₂ lỏng làm dung môi. Sau khi chiết, bã được sấy khô tại nhiệt độ 80°C trong 5 giờ và sau đó được nghiền nhỏ để thành bột có thể đi qua sàng 40 mesh. Xác định hàm lượng sợi thực phẩm tổng số bằng phương pháp enzym-khối lượng (AOAC 985.29).

Sợi trong quả *Emblica officinalis* (me rừng)

Emblica officinalis (*Phyllanthus emblica*), cũng còn được biết đến với tên khác là me rừng, me mận, chùm ruột núi, cây lý gai Ấn Độ, cây Malacca hoặc amla từ Sanskrit

amalika. Quả của loài *Emblica officinalis* được thu mua từ chợ địa phương sau đó được sấy khô và nghiền thành bột và rây qua sàng 60 mesh. Bột này sau đó được sử dụng để chiết lấy các sợi như được thể hiện trong Fig.2. Xác định hàm lượng sợi thực phẩm tổng số bằng phương pháp enzym-khối lượng (AOAC 985.29).

Ví dụ 2: Sự thủy phân axit.

2 gam sợi tự nhiên trên cơ sở loài thực vật được liệt kê trong bảng 1 được hòa tan trong 100 ml HCl (0,10 M) và ủ tại nhiệt độ 37°C, cùng lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong 180 phút. Các mẫu được lấy tại các thời điểm 0, 30, 60, 90, 120 và 180 phút sau khi ủ. Fructooligosaccarit (FOS; tata Chemicals, India) được sử dụng trong nghiên cứu này như một chất tham chiếu để so sánh với sợi tự nhiên và tinh bột (tinh bột khoai tây hòa tan, HiMedia Mumbai, India) được sử dụng làm chất đối chứng. Hàm lượng cacbohydrat khử tăng lên được đo bằng chất phản ứng Dinitrosalicylat (Nilsson and Bjorek 1988, Journal of Nutrition 118, 1482-1486).

Bảng 1

Hàm lượng sợi thực phẩm trong sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật

STT	Sợi tự nhiên	Sợi thực phẩm (% , trọng lượng/trọng lượng)		
		Sợi hòa tan	Sợi không hòa tan	Tổng số
1	Sợi trong hạt <i>Trigonella foenum-graecum</i> (cỏ cà ri)	65,42 ± 1,2	5,41 ± 0,4	75,24 ± 1,2
2	Sợi trong hạt <i>Lycium barbarum</i>	ND	38,05 ± 0,9	39,71 ± 1,1
3	Sợi trong hạt <i>Linum usitatissimum</i> (cây lanh)	34,68 ± 0,4	12,73 ± 0,1	50,21 ± 1,5
4	Sợi trong <i>Cocos nucifera</i>	33,16 ± 0,7	36,16 ± 0,2	65,41 ± 1,7
5	Sợi từ củ <i>Zingiber officinale</i> (gừng)	ND	41,55 ± 0,7	42,18 ± 0,8
6	Sợi trong quả <i>Emblica officinalis</i> (me rừng) - Phần tan - Phần không tan	10,15 ± 0,2	41,58 ± 0,5	52,07 ± 1,4
		19,04 ± 0,5	1,527 ± 0,1	22,29 ± 0,4
		27,05 ± 0,7	3,55 ± 0,1	33,03 ± 0,7
7	Sợi trong <i>Plantago ovata</i> (cây mã đề)	51,13 ± 0,8	30,24 ± 0,8	83,24 ± 1,5
8	Sợi trong hạt <i>Vaccinium oxycoccos</i> (cây nam việt quất)	10,21 ± 0,6	39,81 ± 0,7	51,92 ± 1,3

ND: Không phát hiện được; hàm lượng sợi thực phẩm tổng số được xác định bằng phương pháp enzym-khoi lượng (AOAC 985.29)

Bảng 2: Trình bày hiệu quả của quá trình thủy phân axit trong các sợi tự nhiên có trong thực vật bằng (HCl 0,1M; tại 37°C 100 vòng/phút).
Đo lượng đường khử tổng số bằng axit Dinitrosalicylic (DNSA).

Bảng 2.

STT	Sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật	Phần trăm lượng đường khử tổng số					
		0 phút	30 phút	60 phút	90 phút	120 phút	180 phút
1	Sợi từ hạt cây cà ri	3,79±0,1	3,90±0,1	3,95±0,09	3,33±0,1	4,22±0,2	4,45±0,1
2	Sợi trong hạt <i>Lycium barbarum</i>	11,91±0,2	12,05±0,2	12,98±0,3	11,91±0,4	12,98±0,3	12,51±0,2
3	Sợi trong hạt lanh	1,24±0,1	1,89±0,09	1,97±0,1	2,10±0,1	1,98±0,1	2,21±0,1
4	Sợi trong quả dừa	6,11±0,09	6,51±0,2	7,25±0,1	8,35±0,2	9,95±0,2	10,05±0,5
5	Sợi trong củ gừng	4,02±0,1	7,24±0,5	7,89±0,3	8,1±0,7	7,8±0,2	7,5±0,3
6	Sợi trong quả me rừng (tan+không tan)	16,59±0,2	16,14±0,7	16,84±0,3	15,16±0,4	17,12±0,6	16,98±0,6
7	Sợi trong quả me rừng hòa tan	19,96±0,3	24,75±0,5	24,13±0,6	23,42±0,7	22,76±0,8	23,17±0,1
8	Sợi trong quả me rừng không tan	6,98±0,1	6,74±0,1	6,92±0,2	6,95±0,2	7,18±0,1	7,60±0,1
9	Sợi trong Vỏ mã đề	0,62±0,01	1,11±0,09	1,28±0,04	1,42±0,1	1,51±0,1	1,62±0,1
10	Sợi trong hạt cây nam việt quất	19,70±0,4	19,15±0,3	20,50±0,9	19,76±0,7	19,67±0,9	20,60±0,8
11	Fructooligosaccarit (FOS)	1,48±0,1	6,29±0,1	8,96±0,1	9,63±0,2	10,47±0,2	12,52±0,4
12	Tinh bột ngô hòa tan	7,60±0,2	21,43±0,2	21,03±0,5	25,05±0,7	27,11±0,7	34,20±0,3

Ví dụ 3: Thủy phân enzym

Hòa tan 100 mg Pancreatin thu từ tuyến tụy lợn 4 x USP (Sigma- Aldrich Corporation St Louis MO, USA) vào 100 ml dung dịch đệm photphat (50 mM; pH 7,0). Sau đó, hòa tan 2gm sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật vào dung dịch Pancreatin ở trên và ủ tại nhiệt độ 37°C, lắc với vận tốc 100 vòng/phút trong 180 phút. Lấy mẫu tại các thời điểm 0, 30, 60, 90, 120 và 180 phút sau khi ủ. FOS được sử dụng trong nghiên cứu này như một chất tham chiếu để so sánh với sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật và tinh bột được sử dụng làm chất đối chứng. Hàm lượng cacbohydrat khử tăng lên được đo bằng chất phản ứng Dinitrosalicylat (Oku et al. 1984. Journal of Nutrition 114, 1574- 1581). Hiệu quả thủy phân enzym (0,1% Pancreatin trong 20mM PBS pH 7,0; 37°C, 100 vòng/phút) của sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật được trình bày trong bảng 3. Xác định lượng đường khử tổng số bằng axit Dinitrosalicylat (DNSA).

Bảng 3

STT	Sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật	Phần trăm lượng đường khử tổng số					
		0 phút	30 phút	60 phút	90 phút	120 phút	180 phút
1	Sợi từ hạt cây cà ri	7,20±0,1	8,15±0,1	11,85±0,8	11,35±0,8	10,55±0,1	10,70±0,2
2	Sợi trong hạt <i>Lycium barbarum</i>	11,86±0,2	18,11±0,8	17,85±0,2	17,75±0,4	17,35±0,8	18,21±0,4
3	Sợi trong hạt lạnh	1,12±0,1	2,56±0,05	2,57±0,1	2,98±0,1	2,78±0,08	2,88±0,04
4	Sợi trong quả dừa	8,85±0,2	11,65±0,2	14,25±0,5	13,60±0,2	10,90±0,4	11,05±0,08
5	Sợi trong củ gừng	4,14±0,09	6,94±0,2	7,12±0,3	7,31±0,4	6,81±0,1	6,82±0,09
6	Sợi trong quả me rừng (tan+không tan)	16,05±0,6	16,94±0,2	16,48±0,2	15,96±0,2	17,40±0,5	16,53±0,7
7	Sợi trong quả me rừng hòa tan	20,10±0,7	22,18±0,8	20,51±0,4	20,90±0,8	23,72±0,8	23,07±0,5
8	Sợi trong quả me rừng không tan	7,12±0,1	7,58±0,3	7,94±0,6	8,19±0,1	8,38±0,01	8,45±0,1
9	Sợi trong Vỏ mã đề	1,05±0,1	2,21±0,1	2,26±0,1	2,28±0,02	2,29±0,05	3,07±0,1
10	Sợi trong hạt cây nam việt quất	19,74±0,9	21,99±0,8	24,33±0,3	23,95±0,4	23,58±0,4	23,85±0,7
11	Fructooligosaccard (FOS)	1,10±0,01	3,37±0,09	3,12±0,09	3,01±0,1	3,43±0,09	3,34±0,08
12	Tinh bột ngô hòa tan	7,45±0,05	52,56±0,9	54,06±1,1	52,29±1,2	52,10±1,5	54,52±1,1

Ví dụ 4: Hoạt tính thúc đẩy sinh trưởng của sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật đến *Bacillus coagulans* MTCC 5856

Từng khuẩn lạc đã phân lập của *Bacillus coagulans* MTCC 5856 được cấy vào môi trường nước luộc thịt MRS (pH 7,0 $\pm$ 20; Himedia, Mumbai, India) và được ủ tại nhiệt độ 37°C lắc ở tốc độ 120 vòng/phút qua đêm. Điều chế một mình sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật (0,5, 1,0, 2,0%, khối lượng/thể tích) và môi trường nuôi cấy MRS (không chứa dextrozo) (0,5, 1,0, 2,0%, khối lượng/thể tích). Môi trường nuôi cấy nước luộc thịt MRS và môi trường MRS (không chứa dextrozo) cũng được điều chế riêng rẽ. Tương tự như vậy, Fructooligosaccharit (FOS) được sử dụng trong nghiên cứu này như một chất tham chiếu để so sánh với sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật. pH cuối cùng của tất cả các môi trường được điều chỉnh về giá trị 7,0. Năm phần trăm môi trường sinh trưởng qua đêm của *Bacillus coagulans* MTCC 5856 được chia đều vào tất cả các bình tam giác và ủ tại nhiệt độ 37°C lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong hơn 24 giờ. Các giá trị pH tại thời điểm 0 giờ ủ và sau khi lên men (24 giờ) được ghi lại. Các mẫu được pha loãng liên tiếp trong dung dịch nước muối vô trùng và số lượng sống sót được đếm bằng cách cấy trên môi trường thạch chiết xuất nấm men glucoso (HiMedia, Mumbai, India) tại 0 giờ và sau lên men (24 giờ). Các đĩa được ủ tại nhiệt độ 37°C từ 48 giờ đến 72 giờ. Mỗi phân tích được tiến hành lặp lại 3 lần tại 2 thời điểm khác nhau. Giá trị số lượng sống sót trung bình được thể hiện dưới dạng log₁₀ cfu/ral (Các Fig 1.a, 1b và 1c).

Ví dụ 5: Ưc chế sinh trưởng của vi khuẩn *E.coli*

Thử nghiệm in vitro được thiết kế để đánh giá hiệu quả của các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật đối với lợi khuẩn *Bacillus coagulans* MTCC 5856 trong việc ức chế vi khuẩn Gram âm gây bệnh *E.coli*. Tóm lại là, cho 2,0 gam các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật được thêm vào 100 ml nước khử khoáng. Đối với các sợi trong vỏ mã đề và sợi trong hạt lanh thì cho 0,5 gm vào 100 ml dung dịch nước khử khoáng do đặc tính keo hóa cao. Giá trị pH được điều chỉnh thành 7,0 $\pm$ 0,2 và được hấp tại nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Sau khi khử trùng, khí enzym khử oxi Oxidaza (Oxyrase for Broth Oxyrase, Inc, Mansfield, OH, USA) được thêm vào mỗi bình tam giác. *Bacillus coagulans* MTCC 5856 sinh trưởng trong môi trường thạch chiết xuất nấm men glucoso (Himedia,

Mumbai, India) và *E.coli* ATCC 25922 sinh trưởng trong môi trường thạch đậu nành Trypticaza (HiMedia, Mumbai, India). Từng khuẩn lạc đã phân lập của cả hai môi trường nuôi cấy được sử dụng và điều chỉnh độ đục của huyền phù vi khuẩn về độ đục chuẩn 0,5 McFarland (tương đương $1,5 \times 10^8$ đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU)/ml). Bổ sung thêm 1 ml vi khuẩn *E. Coli* ATCC 25922 vào bình tam giác có chứa sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật. Tương tự, một nhóm khác gồm 1 ml vi khuẩn *E. Coli* ATCC 25922 và 1 ml *B. coagulans* MTCC 5856 được thêm vào bình tam giác có chứa sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật. Các bình tam giác được ủ tại nhiệt độ 37°C lắc với vận tốc 100 vòng/phút trong 24 giờ. Các mẫu được pha loãng liên tiếp trong dung dịch nước muối vô trùng và số lượng *E. Coli* ATCC 25922 sống sót được đếm bằng cách cấy trên đĩa thạch Eosin Methylene Blue (thạch EMB; HiMedia, Mumbai, India) tại 0 giờ và sau khi lên men (24 giờ). Các đĩa được ủ tại nhiệt độ 37°C trong 48 giờ. Mỗi phân tích được thực hiện 3 lần tại các thời điểm khác nhau. Giá trị số lượng sống sót trung bình được biểu hiện dưới dạng $\log_{10}$ cfu/ml (Fig.3).

Ví dụ 6: Sự sản xuất SCFA bằng *Bacillus coagulans* MTCC 5856 sử dụng các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật.

Tiến hành lên men *in vitro* với *Bacillus coagulans* MTCC 5856 bằng các phương pháp được miêu tả bởi McBurney và Thompson (McBurney MI và Thompson LU. (1987) Effect of human faecal inoculum on *in vitro* fermentation variables. Brit J Nutr 58: 233-243) với một vài sự thay đổi. Tóm lại là, 2,0 gam glucoza hoặc các sợi tự nhiên trên cơ sở thực vật được thêm vào 100 ml nước khử khoáng. Đối với các sợi trong vỏ mã đề và sợi trong hạt lanh thì cho 0,5 gm vào 100 ml dung dịch nước khử khoáng do đặc tính keo hóa cao. Giá trị pH được điều chỉnh thành $7,0 \pm 0,2$ và được hấp tại nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Sau khi khử trùng, enzym khử oxi Oxidaza (Oxyrase® for Broth , Oxyrase, Inc, Mansfield, OH, USA) được thêm vào mỗi bình tam giác, để làm giảm các điều kiện kỵ khí. Năm phần trăm môi trường nuôi cấy qua đêm *Bacillus coagulans* MTCC 5856 được cấy vào tất cả các bình tam giác và ủ ở nhiệt độ 37°C, lắc nhẹ trong 24 giờ. Các bình được đóng chặt, và được bịt kín bằng parafilm để duy trì các điều kiện kỵ khí đã tạo ra bởi enzym bổ sung. Giá trị pH tại thời điểm ủ 0 giờ và sau lên men (24 giờ) được ghi lại. 1 ml đồng sunfat (10g/l) được thêm vào mỗi mẫu để ức chế không cho vi sinh vật tiếp tục sinh trưởng (Sigma, St. Louis, MO, USA). Tiến hành phân tích các

axit béo chuỗi ngắn trong các mẫu lên men đã nêu theo các tham số sau đây.

Các chất phản ứng.

1. Diethyl Ete (cấp độ AR)
2. H₂SO₄
3. Nước RO
4. Natri Clorua (cấp độ AR)

Các điều kiện tiến hành sắc ký

Lò:

Tốc độ	Nhiệt độ	Thời gian lưu
Ban đầu	80°C	1 phút
8°C/phút	200°C	2 phút

1. Nhiệt độ sau chạy 220°C
2. Thời gian trễ 5,0 phút
3. Thời gian chạy 18,00 phút

Đầu vào

Thể tích tiêm	1 µl
Nhiệt độ	250°C
Phương thức	Chia dòng
Tỉ lệ chia dòng	10:1

Cột sắc ký

1. DB-FF AP (axit terephthalic bị biến đổi poly etylen Glycol)
2. Kích thước: 30,00m x 250,00 mm x 0,25 µm.
3. Khí mang : Nitơ
4. Lưu lượng dòng: 1,0 ml / phút

Đầu dò

1. Loại

phân tích ngọn lửa FID

2. Nhiệt độ	350°C
3. Lưu lượng dòng hydro	30,0ml/phút
4. Lưu lượng dòng không khí	300,0 ml/phút
5. Lưu lượng dòng hỗ trợ	5,0 ml/phút

Chuẩn bị dung dịch mẫu

Cân chính xác 100 mg mỗi mẫu axit béo (axit axetic, axit propionic và axit butyric) vào bình tam giác có thể tích 100 ml và pha loãng trong 50 ml nước và làm đến vạch bằng nước và trộn đều (dung dịch cấp). Tiếp theo, pha loãng 10 ml dung dịch cấp được pha loãng với nước thành 100 ml dung dịch và đem trộn kỹ để thu được dung dịch mẫu. Chiết 5 ml dung dịch mẫu như được mô tả dưới đây.

1. Lấy 5 ml dung dịch mẫu/mẫu
2. Bổ sung thêm 5ml nước vào dung dịch mẫu và quay trong 0,5 phút.
3. Điều chỉnh giá trị pH về 1-1,5 bằng dung dịch H_2SO_4 3M quay 0,5 phút.
4. Giữ diethyl ete tại nhiệt độ $-20^\circ C$ trong 1 giờ trước khi thêm vào mẫu/ dung dịch mẫu.
5. Bổ sung thêm 10 ml diethyl ete và quay trong 1 phút.
6. Bổ sung thêm 4 gam natri clorua và quay trong 1 phút.
7. Ly tâm để tách lớp nước và lớp diethyl.
8. Chuyển 1,0 ml lớp diethyl ete vào lọ GC và tiêm

Quy trình:

1 μ l mỗi dịch chiết dung dịch mẫu đã chiết được tiêm vào trong sắc ký 3 lần và ghi lại đáp ứng của các đỉnh (peak) chính tạo ra do axit axetic, axit propionic, axit butyric. % độ lệch chuẩn tương đối trong diện tích của các đỉnh do axit axetic, axit propionic, axit butyric được tiêm 3 lần không vượt quá 2,0%. Tiêm 1,0 μ l mỗi dịch chiết dung dịch mẫu vào sắc ký. Hàm lượng axit axetic, axit propionic, axit butyric được tính toán như sau.

Hàm lượng của từng axit theo ppm	Diện tích mẫu x nồng độ chuẩn (ppm) Diện tích mẫu
----------------------------------	--

Kết quả của phương pháp phân tích sắc ký được trình bày trong các Fig 4 và 5.

Mặc dù sáng chế được mô tả cùng với các tham chiếu đến các phương án ưu tiên, nó được hiểu một cách rõ ràng bởi những người có kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật mà ở lĩnh vực đó sáng chế không bị giới hạn. Thêm vào đó, phạm vi của sáng chế chỉ được sáng tỏ khi kết hợp với yêu cầu bảo hộ đính kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp đồng nuôi cấy *Bacillus coagulans* MTCC 5856 với sợi thực vật, trong đó phương pháp này bao gồm bước đồng nuôi cấy *Bacillus coagulans* MTCC 5856 với sợi thực vật được chọn từ nhóm bao gồm sợi trong hạt *Trigonella foenum-graecum* (cỏ cà ri), các sợi trong hạt *Lycium barbanun*, sợi trong hạt *Linum usitatissimum* (cây lanh), sợi trong *Cocus nucifera* (quả dừa), sợi trong củ *Zingiber officinale* (gừng), sợi trong quả *Emblica officinalis* (me rừng), sợi trong *Plantago ovata* (cây mã đề) và sợi trong hạt *Vaccinium oxycoccos* (cây nam việt quất).
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó số lượng khuẩn lạc *Bacillus coagulans* MTCC 5856 sống sót bằng cách đồng nuôi cấy tăng lên so với *Bacillus coagulans* MTCC 5856 được nuôi cấy trong điều kiện không có sợi thực vật.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước điều chế chế phẩm chứa *Bacillus coagulans* MTCC 5856 và sợi thực vật.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước đồng nuôi cấy được thực hiện trong điều kiện lên men để sản xuất axit béo chuỗi ngắn.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó axit béo chuỗi ngắn là một hoặc nhiều axit được chọn từ nhóm bao gồm axit axetic, axit propionic, và axit butyric.
6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó *Bacillus coagulans* MTCC 5856 và sợi thực vật được lên men trong điều kiện kỵ khí.

FIG. 1a

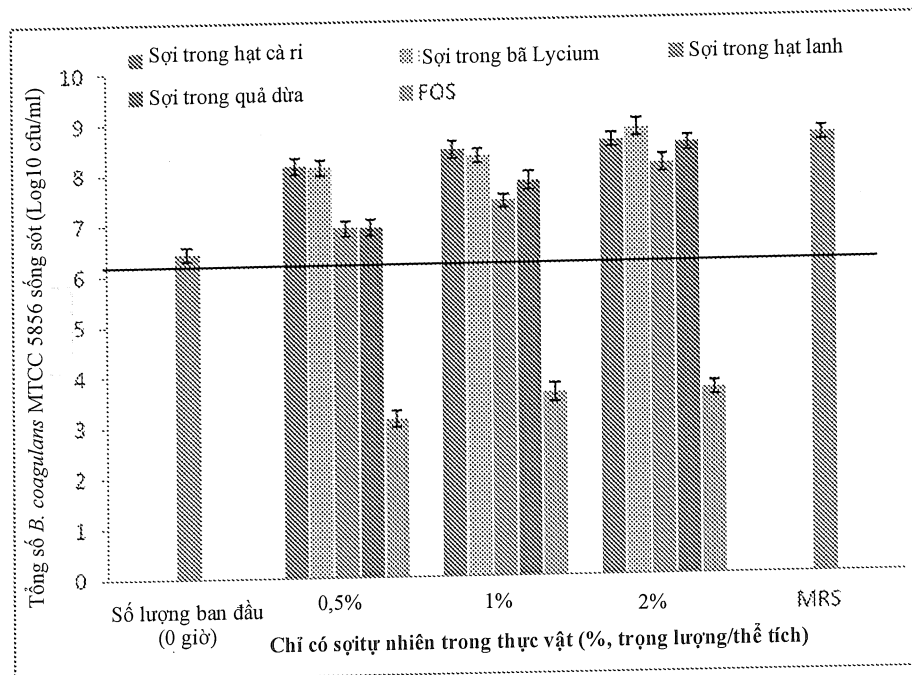


FIG. 1b

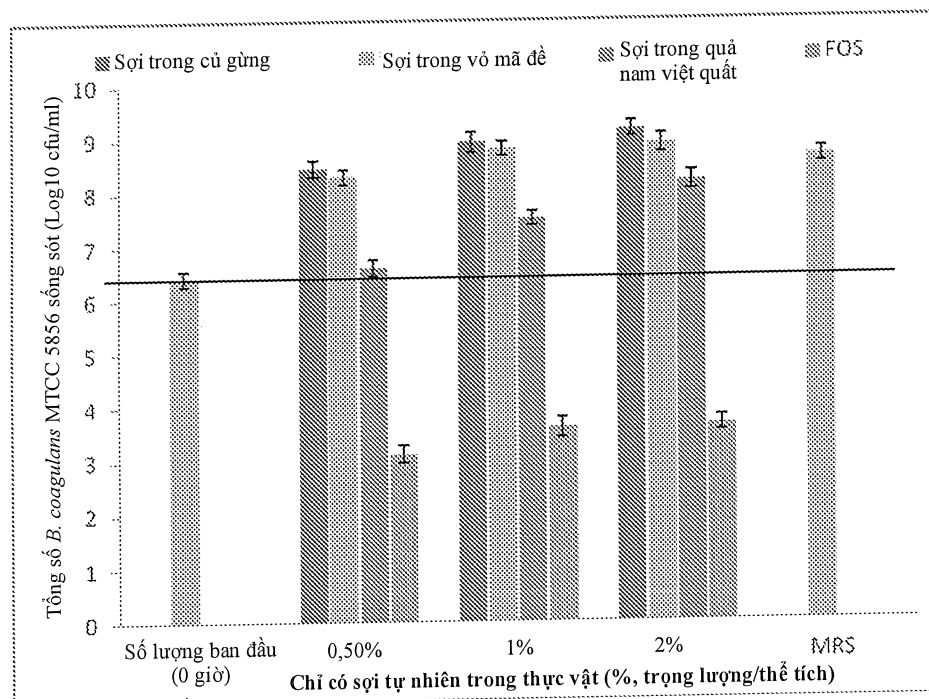


FIG. 1c

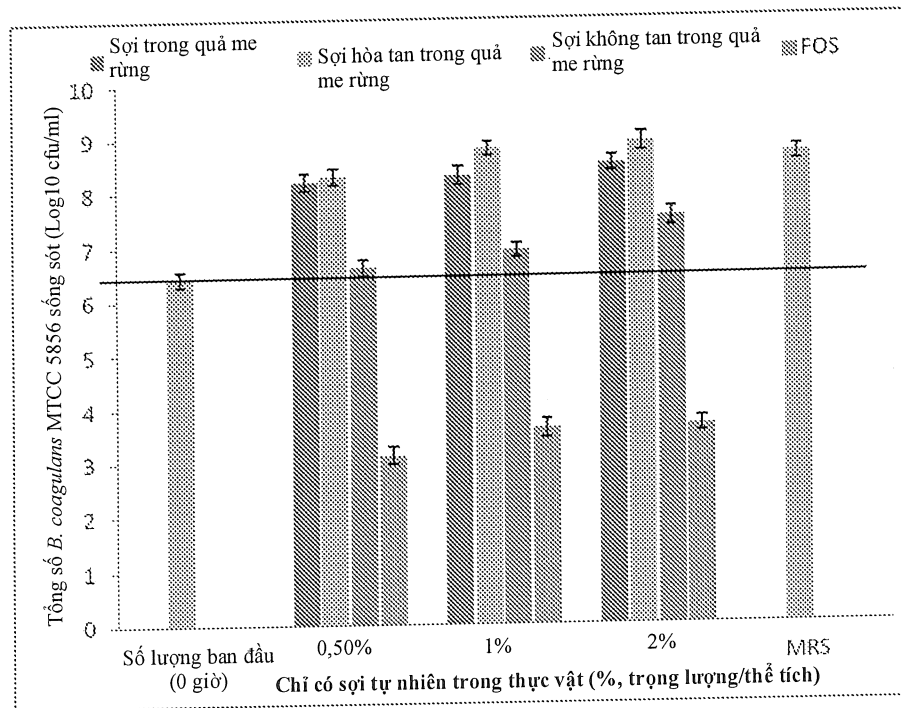


FIG. 2a

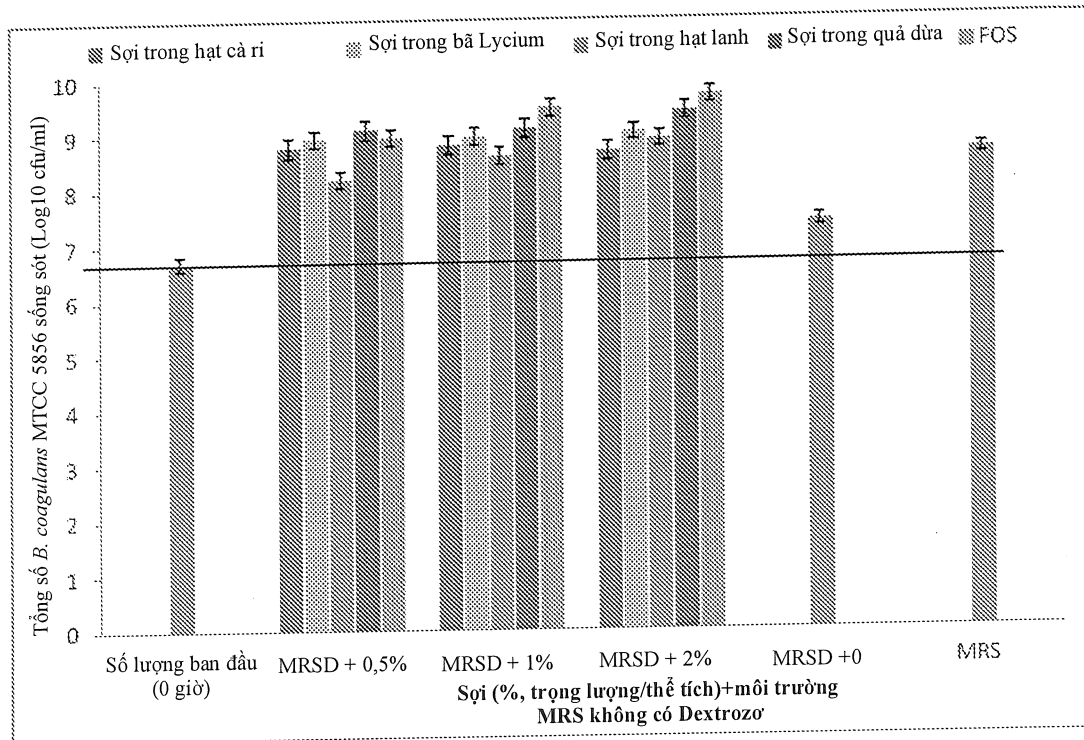


FIG.2b

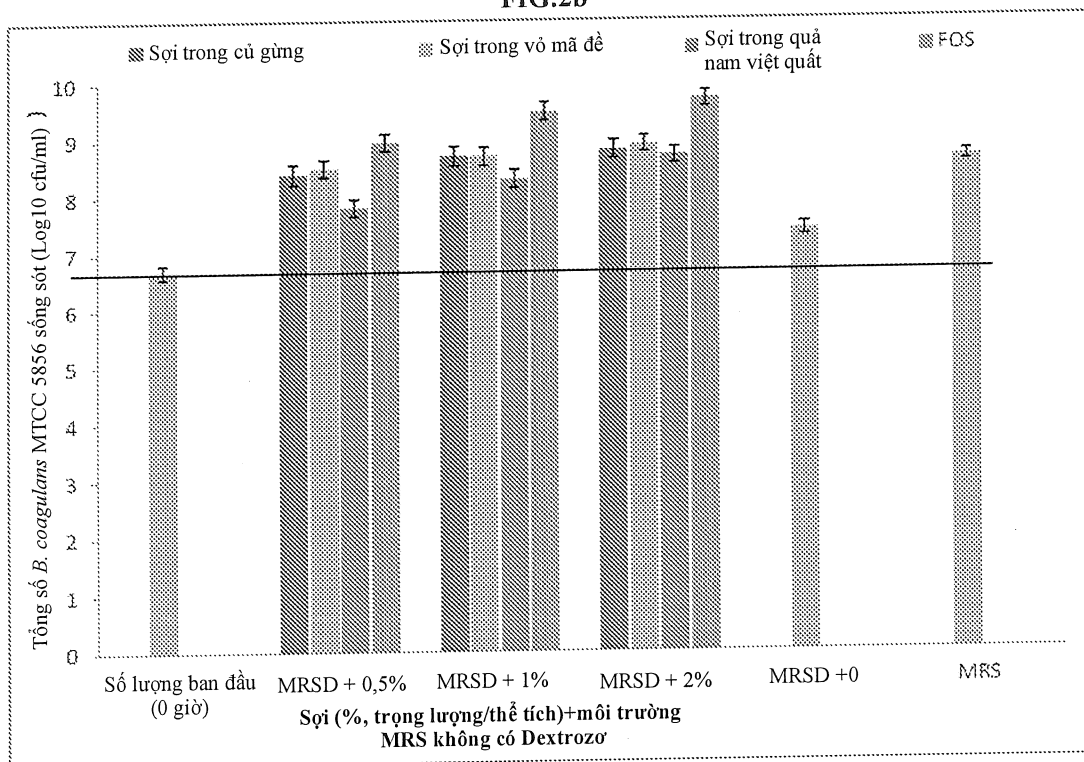


FIG. 2c

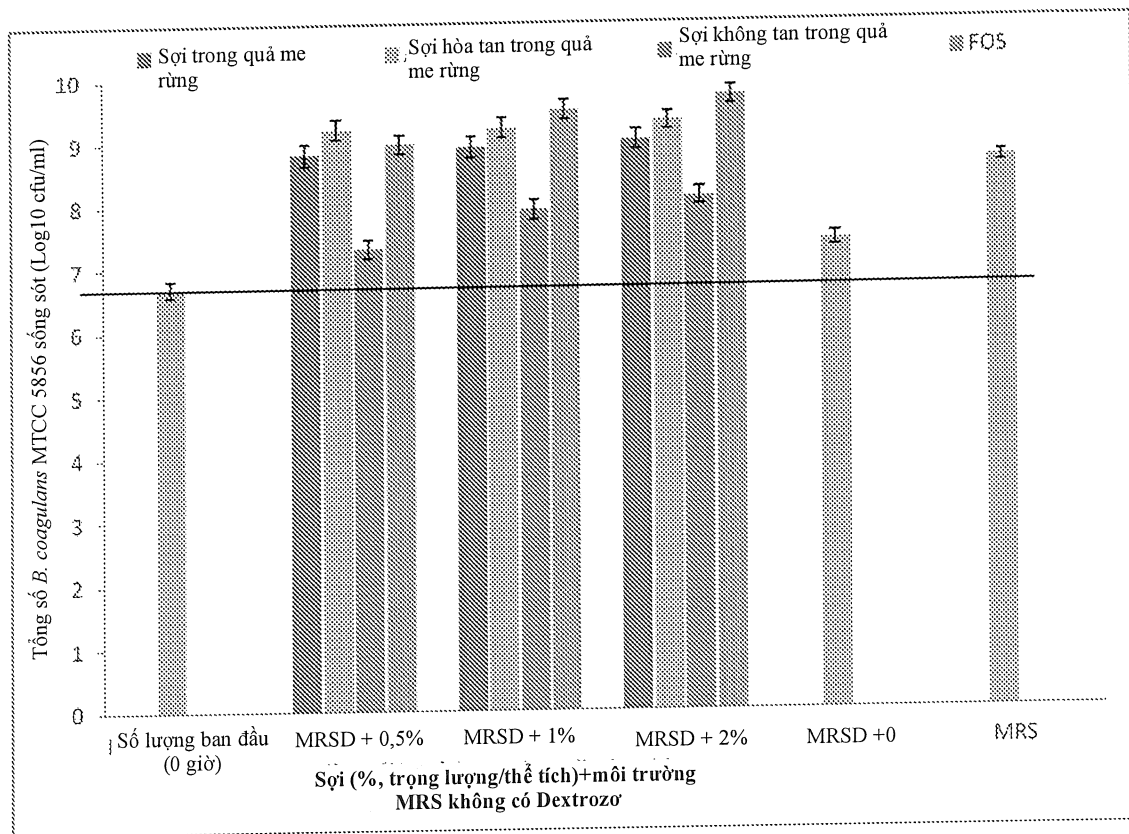


FIG. 3

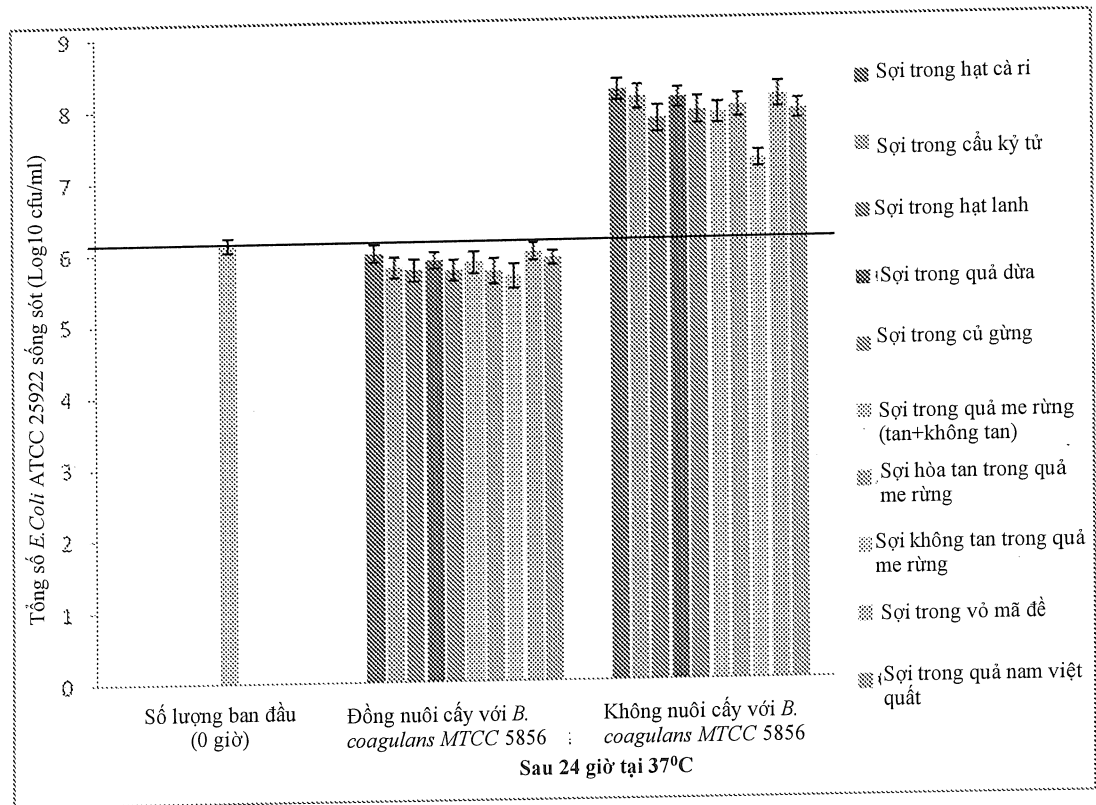


FIG. 4

