



(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)



1-0033596

(51)⁷ A01N 1/02; C12N 1/04; A61K 35/74

(13) B

(21) 1-2016-00404

(22) 02/07/2014

(86) PCT/EP2014/064087 02/07/2014

(87) WO2015/000972 A1 08/01/2015

(30) 13174681.0 02/07/2013 EP

(45) 25/10/2022 415

(43) 27/06/2016 339A

(73) Austrianova Singapore Pte Ltd. (SG)

20 Biopolis way #05-518 Centros Singapore 138688

(72) Salmons Brian (SG); Dangerfield John A (SG); Guenzburg Walter H (AT).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Gia Việt (GIAVIET CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO TẾ BÀO ĐƯỢC NANG HÓA ĐỂ ĐÔNG KHÔ

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp đông khô tế bào được nang hóa, phương pháp này có ít nhất hai bước ủ liên tiếp, trong đó tế bào được nang hóa này được ủ ở mỗi bước trong dung dịch ủ có chứa chất bảo quản đông lạnh trong thời gian phù hợp, trong đó nồng độ chất bảo quản đông lạnh trong dung dịch ủ được gia tăng theo mỗi bước ủ kế tiếp. Sáng chế cũng đề xuất tế bào đã đông khô thu được từ phương pháp này cũng như đề xuất các ứng dụng khác nhau của tế bào này để làm thuốc, phụ gia cho thực phẩm hoặc phụ gia cho mỹ phẩm. Sáng chế cũng đề xuất hợp phần chứa sữa đã tách chất béo, glyxerol và carbohydrat.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp đông khô tế bào được nang hóa. Sáng chế còn đề xuất tế bào đã được đông khô thu được từ phương pháp này cũng như hợp phần chứa tế bào bao nang đã đông khô này và các ứng dụng khác nhau của các tế bào này chẳng hạn như làm dược phẩm, làm thực phẩm thuốc bổ dưỡng, làm phụ gia cho thực phẩm hay làm phụ gia cho mỹ phẩm. Sáng chế còn đề xuất các hợp phần mới chứa sữa đã tách chất béo, glyxerol và carbohydrat và các hợp phần này có thể được sử dụng để đông khô tế bào.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), probiotic là các vi sinh vật sống mà khi được sử dụng ở lượng phù hợp sẽ tạo ra tác dụng có lợi cho sức khỏe vật chủ. Cụ thể, vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* tăng cường sức khỏe ruột, vấn đề chính của sức khỏe vật chủ. Sản phẩm probiotic cần trải qua các bước xử lý để đảm bảo tính ổn định và sức sống của các sản phẩm này. Các sản phẩm này có thể bị ảnh hưởng tiêu cực trong quá trình bảo quản và trong lúc đi qua ống dạ dày ruột khi ăn.

Nhiều sản phẩm probiotic được đông khô để bảo quản cho đến khi được sử dụng. Có nghĩa là các tế bào này được đông khô sâu trước tiên và sau đó loại nước trong chân không. Quá trình đông khô này là thiết yếu để duy trì tính ổn định và sức sống của vi khuẩn probiotic khi làm phụ gia cho thực phẩm, thực phẩm chức năng hay thực phẩm thuốc bổ dưỡng.

Về mặt kỹ thuật, đông khô, còn được biết dưới tên gọi là kỹ thuật đông khô nhanh hay đông khô, có thể được hiểu là kỹ thuật làm lạnh mẫu chất lỏng, dẫn đến sự chuyển hóa dung dịch có khả năng đông khô thành dạng băng, kết tinh các chất tan có khả năng kết tinh được và hình thành chất nền vô định hình chứa các chất tan không có khả năng kết tinh đã gắn kết với hỗn hợp chưa đông khô, sau đó là làm bay hơi (thăng hoa) nước khỏi chất nền vô định hình. Quá trình bay hơi (thăng hoa) nước đóng băng trong vật liệu thường được tiến hành bằng cách giảm áp ở môi trường xung quanh để nước đã đóng băng trong vật liệu này được thăng hoa trực tiếp từ pha rắn

sang pha khí. Ưu điểm lớn của kỹ thuật đông khô là duy trì được chất liệu ổn định cho quá trình bảo quản.

Ngoài ra, đông khô có ưu điểm là không có nguy cơ làm tan rã tế bào được nang hóa (Santivarangkna, C., Kulozik, U. and Foerst, P. (2007) Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress*, 23(2), 302-315). Tỷ lệ chết đáng kể tế bào vi khuẩn được biết sau khi đông khô là do mất tính nguyên vẹn ở màng và sự thoái biến các đại phân tử. Xem tài liệu: Franks, F. (1995) "Protein destabilization at low temperatures". *Advances in Protein Chemistry*, 46, 105-139; Thammavongs, et al (1996) "Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: Growth at low temperatures and freezing/thawing challenge" *Letter in Applied Microbiology*, 23(6), 398-402; De Angelis, M. and Gobbetti, M. (2004) "Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review" *Proteomics*, 4(1), 106-122.

Đã biết là việc nang hóa vi khuẩn trong xenluloza sulphat có khả năng tạo ra tác dụng bảo vệ cho vi khuẩn khi đông khô. Nghiên cứu đã tiến hành với alginat-chitosan là vật liệu bao nang và thấy rằng những viên nang này phòng lên khi ủ trong dịch ruột mô phỏng (PaulrajKanmani, R. Satish Kumar, N. Yuvaraj, K. A. Paari, V. Pattukumar, and Venkatesan Arul (2011) Cryopreservation and Microencapsulation of a Probiotic in Alginate-chitosan Capsules Improves Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, (16) 1106-1114. Kanmani và cộng sự cũng đề cập trong nghiên cứu này là những viên nang bọc natri alginat-chitosan đã co lại 10% khi tiếp xúc với dịch dạ dày mô phỏng.

Vì vậy, tác dụng có hại của quá trình đông khô lên tế bào như tế bào vi khuẩn có thể loại bỏ bằng cách tạo vi nang bằng natri xenluloza sulphat vì vật liệu bao nang này có thể tạo ra tính ổn định đã nâng cao cho các viên nang và sức sống cao hơn cho vi khuẩn được nang hóa này. Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu khắc phục tác dụng có hại của quá trình đông khô lên những tế bào như tế bào vi khuẩn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế giải quyết nhu cầu này bằng cách đề xuất phương pháp mới đông khô những tế bào được nang hóa, đề xuất tế bào được nang hóa thu được từ phương pháp

này và các ứng dụng khác nhau của tế bào được nang hóa này và của các hợp phần chứa những tế bào được nang hóa này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp đông khô tế bào đã bao nang, phương pháp này có ít nhất hai bước ử liên tiếp, trong đó tế bào được nang hóa được ử ở mỗi bước trong dung dịch ử chứa chất bảo quản đông lạnh trong thời gian phù hợp, trong đó nồng độ chất bảo quản đông lạnh ở dung dịch ử được gia tăng với mỗi bước ử tiếp theo.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất tế bào nang hóa đông khô được thu nhận từ phương pháp đông khô tế bào đã bao nang theo mô tả.

Khía cạnh thứ ba của sáng chế đề xuất hợp phần chứa chất mang phù hợp và tế bào được nang hóa thu được từ phương pháp đông khô tế bào được nang hóa. Phương án tiêu biểu cho hợp phần này có thể là thực phẩm chức năng cho người và động vật, chế phẩm xà phòng, mỹ phẩm hay dược phẩm.

Khía cạnh thứ tư đề xuất phương pháp điều trị hay phòng ngừa chứng tiêu chảy, chứng tiêu chảy do kháng sinh gây nên, viêm khớp, chứng béo phì, hội chứng ruột bị kích thích, chứng ợ chua, hội chứng mệt mỏi mạn tính, ung thư dạ dày ruột và các dạng bệnh lý khác do mất cân bằng quần thể vi khuẩn ở ruột gây nên, phương pháp này có bước cho cá thể sử dụng tế bào bao nang đã đông khô hay hợp phần có chứa tế bào này.

Khía cạnh thứ năm đề xuất việc sử dụng tế bào đã bao nang được đông khô hoặc hợp phần chứa tế bào này như đã đề cập để điều trị hay phòng ngừa chứng tiêu chảy, tiêu chảy do kháng sinh gây ra, viêm khớp, chứng béo phì, hội chứng ruột bị kích thích, chứng ợ chua, hội chứng mệt mỏi mạn tính, ung thư dạ dày ruột và các dạng bệnh lý khác do sự mất cân bằng quần thể vi khuẩn ở ruột gây nên.

Khía cạnh nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng tế bào được nang hóa đã đông khô hoặc hợp phần chứa tế bào được nang hóa đã đông khô như được mô tả ở đây làm được phẩm, phụ gia thực phẩm hay phụ gia cho mỹ phẩm. Theo phương án tiêu biểu của sáng chế, khi sử dụng làm phụ gia cho thực phẩm, thực phẩm này có thể là các sản phẩm từ sữa như sữa chua yoghurt, pho mát của các nông trại, hay bơ sữa. Theo

phương án khác, khi được sử dụng làm phụ gia thực phẩm, tế bào được nang hóa đã đông khô hay hợp phần chứa tế bào được nang hóa đã đông khô như được mô tả ở đây được bảo quản trong ngăn chứa riêng của túi đựng thực phẩm.

Khía cạnh nữa đề xuất phương pháp điều chế tế bào được nang hóa để đông khô, phương pháp này có ít nhất hai bước ử liên tiếp, trong đó tế bào được nang hóa này được ử ở mỗi bước ử trong dung dịch ử có chứa chất bảo quản đông lạnh trong thời gian thích hợp, trong đó nồng độ chất bảo quản đông lạnh trong dung dịch ử được gia tăng trong mỗi bước ử tiếp theo.

Khía cạnh nữa đề xuất tế bào nhân sơ nang hóa đã đông khô hoặc tế bào nấm men nang hóa đã đông khô.

Khía cạnh nữa đề xuất hợp phần phù hợp để làm lạnh các tế bào, hợp phần này có chứa sữa đã tách chất béo, glyxerol và carbohydrat.

Khía cạnh nữa đề xuất phương pháp điều chế tế bào được nang hóa để đông khô, phương pháp này có bước ử tế bào tế bào được nang hóa trong hợp phần chứa sữa đã tách chất béo, glyxerol và carbohydrat.

Khía cạnh nữa đề xuất việc sử dụng hợp phần chứa sữa đã tách chất béo, glyxerol và carbohydrat để điều chế tế bào được nang hóa cho đông khô.

Khía cạnh nữa đề xuất việc sử dụng hợp phần chứa sữa đã tách chất béo, glyxerol và carbohydrat để làm lạnh tế bào được nang hóa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn khi đọc phần mô tả chi tiết cùng ví dụ minh họa và hình vẽ kèm theo sau đây, trong đó:

Fig. 1 là ảnh chụp kính hiển vi tế bào *Lactobacillus acidophilus* đã được nang hóa dạng đông khô sau khi được xử lý bằng phương pháp của sáng chế có sử dụng bột sữa đã tách chất béo 5% và glyxerol 1% làm chất bảo quản đông lạnh, trong đó những tế bào này được ử ở mỗi bước ử trong dung dịch ử có chứa chất bảo quản đông lạnh với nồng độ được gia tăng. Nồng độ gia tăng của chất bảo quản đông lạnh được tạo ra bằng cách pha loãng nhiều bậc ở mỗi bước ử dung dịch sinh trưởng vi khuẩn từ 100%

xuống 50% xuống 25% xuống 12,5% xuống 6,25% xuống 3,125% xuống 0% bằng dung dịch chất bảo quản đông lạnh (bột sữa đã tách chất béo và glyxerol 1%);

Fig. 2 là tác dụng bảo vệ của các nang cho vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* trong quá trình đông khô, bằng cách sử dụng dung dịch ủ chứa sữa đã tách chất béo và glyxerol (sữa đã tách chất béo 5% và glyxerol 1% trong nước) làm chất bảo quản đông lạnh. Tác dụng bảo vệ được kiểm nghiệm bằng cách kiểm tra sức sống tế bào sau khi tái hydrat hóa vi khuẩn đã đông khô. Sức sống tế bào này được đem so sánh với tiêu chuẩn tham chiếu là vi khuẩn mới nang hóa và được biểu diễn dưới dạng % sống.

Fig. 3 là biểu đồ so sánh hai dung dịch ủ/môi trường làm lạnh khác nhau (dung dịch ủ 1: môi trường de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) chứa DMSO là chất bảo quản đông lạnh, dung dịch ủ 2: sữa đã tách chất béo 5% và glyxerol 1% trong nước) theo tỷ lệ sống của vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* trong quá trình đông khô;

Fig. 4 là ảnh chụp trên kính hiển vi các nang trống đã được tái hydrat hóa sau đông khô. Môi trường làm lạnh đã được sử dụng là sữa đã tách chất béo cùng với glyxerol 1%. Bước làm lạnh được thực hiện trong nitơ lỏng trước khi đông khô

Fig. 5 là ảnh chụp trên kính hiển vi nang trống đã được tái hydrat hóa sau khi đông khô. Môi trường đông khô đã sử dụng là sữa đã tách chất béo với glyxerol 1%. Bước làm lạnh được thực hiện trong bể ethanol/đá khô trước khi đông khô.

Fig. 6 là ảnh chụp trên kính hiển vi nang trống đã đông khô trong nước muối được đệm phosphat (PBS) không có chất bảo quản đông lạnh với bước đông khô sơ cấp được thực hiện trong bể ethanol/đá khô;

Fig. 7 là ảnh chụp trên kính hiển vi nang trống đã đông khô trong PBS với DMSO 10%, với bước đông khô sơ bộ được thực hiện trong bể ethanol/đá khô;

Fig. 8 là ảnh chụp trên kính hiển vi nang trống đã đông khô trong MRS không có chất bảo quản đông lạnh, và bước làm lạnh sơ bộ được thực hiện trong nitơ lỏng;

Fig. 9 là ảnh chụp trên kính hiển vi nang trống đã đông khô trong MRS không có chất bảo quản đông lạnh, và bước làm lạnh được thực hiện trong bể ethanol/đá khô;

Fig. 10 là kết quả của phương pháp đông khô theo sáng chế có sử dụng hỗn hợp sữa tách chất béo 5%, glyxerol 1% và trehaloza 10% làm chất bảo quản đông lạnh cả dưới dạng dung dịch ủ cho lần ủ tiếp theo với chất bảo quản đông lạnh có các nồng độ gia tăng lần dưới dạng dung dịch đông khô. Những mẫu sau được sử dụng trong thử nghiệm này: 1) Mẫu *Lactobacillus* tự do (không bao nang) đã đông khô với sữa đã tách chất béo/glyxerol/trehaloza (hình thoi sẫm màu), 2) Mẫu *Lactobacillus* tự do đã đông khô không có sữa đã tách chất béo/glyxerol/trehalose (hình chữ nhật sẫm màu), 3) Mẫu vi khuẩn *Lactobacillus* được nang hóa đông khô bằng phương pháp của sáng chế với dịch cô đặc của sữa đã tách chất béo, glyxerol và trehaloza là chất bảo quản đông lạnh trong dung dịch ủ (hình chữ thập) (các nồng độ gia tăng của chất bảo quản đông lạnh được thu nhận bằng cách pha loãng nhiều bậc trong từng bước ủ dung dịch sinh trưởng vi khuẩn từ 100% xuống 50% xuống 25% xuống 12,5% xuống 6,25% xuống 3,125% xuống 0% với dung dịch chất bảo quản đông lạnh (bột sữa đã tách chất béo 5%, glyxerol 1% và trehaloza 10 %), 4) mẫu vi khuẩn *Lactobacillus* được nang hóa đông khô không có trehaloza (tam giác sẫm màu). Thời điểm các mẫu được tái hydrat hóa là 1, 2, 3, 4, 6, 7 và 8 tuần sau đông khô để đánh giá sức sống của vi khuẩn sau quá trình bảo quản lạnh có hoặc không có trehaloza trong thời gian 2 tháng ở nhiệt độ phòng trong sau khi đông khô. Mỗi điểm số liệu trên Fig. 10 là giá trị trung bình của hai mẫu giống nhau đã đông khô (mỗi mẫu được kiểm tra bốn lần) trừ hai ngoại lệ: vi khuẩn tự do với trehaloza 10% ở tuần 6 và vi khuẩn được nang hóa với trehaloza 10% ở tuần 8. RFU = đơn vị phát huỳnh quang tương đối.

Fig. 11 là các nang *Lactobacillus casei* ở các thời điểm khác nhau sau khi bao nang và đông khô, trong đó Fig. 11A là các nang *Lactobacillus casei* ngay sau khi nang hóa, Fig. 11B là các nang *Lactobacillus casei* một ngày sau khi nang hóa và trước khi đông khô, và Fig. 11C là các nang *Lactobacillus casei* đông khô đã tái hydrat hóa.

Fig. 12 so sánh sức sống của các nang *Lactobacillus casei* một ngày trước và sau đông khô.

Fig. 13 là các nang *Bifidobacterium infantis* ở các thời điểm khác nhau sau nang hóa và đông khô, trong đó Fig. 13A là các nang *Bifidobacterium infantis* một

ngày sau khi nang hóa và trước đông khô, và Fig. 13B là các nang *Bifidobacterium infantislongum* đông khô đã tái hydrat hóa.

Fig. 14 so sánh sức sống của các nang *Bifidobacterium infantislongum* một ngày trước và sau đông khô.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp đông khô tế bào đã bao nang, trong đó phương pháp này có ít nhất hai bước ủ liên tiếp. Ở mỗi bước ủ, tế bào được nang hóa này được ủ trong dung dịch ủ chứa chất bảo quản đông lạnh trong thời gian phù hợp, trong đó nồng độ chất bảo quản đông lạnh trong dung dịch ủ được gia tăng ở mỗi bước ủ tiếp theo. Tác giả sáng chế đã phát hiện ra tác dụng bảo vệ của phương pháp này đối với tính nguyên vẹn (cấu trúc) của các nang (chất liệu nang hóa) cả trước và trong khi đông khô. Ngoài ra, thời gian của độ vững bền bảo quản của các nang chứa tế bào được bao nang này sẽ được kéo dài và sức sống của tế bào được nang hóa được gia tăng đáng kể (xem phần Ví dụ thực hiện sáng chế). Ở mức độ cơ chế hoạt động, không bị ràng buộc bởi lý thuyết, tác giả tin là khi cho tế bào được nang hóa vào ít nhất hai bước ủ liên tiếp theo phương pháp của sáng chế sẽ làm cho các nang không bị “xẹp vỡ”.

Có thể thực hiện gia tăng nồng độ chất bảo quản đông lạnh (lưu ý là thuật ngữ “chất bảo quản đông lạnh” theo sáng chế chỉ một chất bảo quản đông lạnh hoặc hỗn hợp/tổ hợp của hai hoặc nhiều chất bảo quản đông lạnh) trong dung dịch ủ trong suốt hai bước ủ liên tiếp bằng nhiều cách. Ví dụ, có thể thêm dung dịch nguyên liệu chất bảo quản đông lạnh vào hỗn dịch tế bào được nang hóa, cho mỗi bước ủ. Ví dụ, nếu sử dụng chất bảo quản đông lạnh là DMSO, formamit, N-metylaxetamit (MA), hay propandiol, có thể sử dụng dung dịch nguyên liệu chất bảo quản đông lạnh tinh khiết (dung dịch nguyên liệu 100 %) và ở mỗi bước ủ cho thêm lượng nhất định dung dịch nguyên liệu này vào hỗn dịch tế bào để gia tăng nồng độ chất bảo quản đông lạnh (xem Ví dụ 1 trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế). Theo cách khác, chẳng hạn, có thể sử dụng dung dịch trong đó tế bào được nang hóa được cho đông khô (nghĩa là dung dịch làm lạnh hoặc môi trường bảo quản lạnh) dưới dạng dung dịch nguyên liệu ban đầu để có được sự gia tăng nồng độ chất bảo quản đông lạnh. Cách sử dụng dung dịch

làm lạnh cuối cùng cho mục đích này có ưu điểm là không cần điều chế thêm dung dịch nguyên liệu cho bước ủ tiếp theo. Phương pháp này đơn giản hóa cách xử lý các bước ủ trong đó sử dụng hỗn hợp các chất bảo quản đông lạnh, chẳng hạn hỗn hợp bột sữa đã tách chất béo với glyxerol hoặc hỗn hợp bột sữa đã tách chất béo, glyxerol và carbohydrat như sucroza hoặc trehaloza. Trong trường hợp như vậy, dung dịch làm lạnh đã điều chế (ví dụ sữa đã tách chất béo 5% (khối lượng/thể tích) và nước glyxerolin 1% (thể tích/thể tích) hoặc dung dịch nước của sữa đã tách chất béo 5% (khối lượng/thể tích), glyxerol 1% (thể tích/thể tích) và dung dịch carbohydrat 10% (khối lượng/thể tích) như sucroza hoặc trehaloza), được sử dụng để “pha loãng nhiều bậc” môi trường bảo quản tế bào được nang hóa ở mỗi bước ủ. Ví dụ, có thể thực hiện “pha loãng nhiều bậc” như sau. Lấy từ lọ đựng ra một nửa thể tích môi trường tế bào trong đó có tế bào được nang hóa, và cho vào một lượng tương đương dung dịch làm lạnh ở bước ủ thứ nhất. Sau đó, ủ tế bào được nang hóa trong thời gian mong muốn và sau đó lại lấy ra 50% thể tích hỗn hợp ủ và thay bằng lượng thể tích tương đương dung dịch làm lạnh cho bước ủ thứ hai. Có thể lặp lại công đoạn này thường xuyên nếu muốn, nhờ vậy gia tăng nồng độ chất bảo quản đông lạnh cho mỗi bước ủ. Nếu cần, có thể thực hiện bước ủ cuối cùng trong dung dịch làm lạnh.

Thuật ngữ “đông khô” còn được biết là đông khô nhanh hay làm khô ở nhiệt độ thấp, được sử dụng theo nghĩa thông thường nghĩa là gồm quá trình làm lạnh mẫu chất lỏng, dẫn đến sự chuyển hóa dung dịch có khả năng đông khô thành đá, kết tinh các chất tan có khả năng kết tinh và hình thành chất nền vô định hình chứa các chất tan không có khả năng kết tinh đã gắn với hỗn hợp chưa bị đóng băng, sau đó là bay hơi (thăng hoa) nước từ chất nền vô định hình này. Trong quá trình này, sự bay hơi (thăng hoa) của nước đã đóng băng trong nguyên liệu thường được thực hiện trong điều kiện giảm áp suất xung quanh để cho nước đã đóng băng trong nguyên liệu được thăng hoa trực tiếp từ pha rắn sang pha khí. Đông khô thường bao gồm các bước xử lý sơ bộ, làm lạnh, đông khô sơ bộ và đông khô thứ cấp.

Xử lý sơ bộ là phương pháp bất kỳ xử lý sản phẩm cần làm, ở đây là xử lý tế bào được nang hóa, trước khi làm lạnh. Bước xử lý sơ bộ này có thể, chẳng hạn là rửa tế bào, thay đổi thành phần chế phẩm (tức là bổ sung các thành phần để gia tăng tính ổn

định và/hoặc nâng cao khả năng xử lý), hay làm giảm lượng dung môi có áp suất bay hơi cao hoặc gia tăng diện tích bề mặt.

Bước làm lạnh bao gồm phương pháp bất kỳ phù hợp để làm lạnh tế bào được nang hóa. Ở quy mô nhỏ, chẳng hạn trong phòng thử nghiệm, có thể làm lạnh bằng cách đặt nguyên liệu trong bình đông khô và quay bình này trong bể chứa, còn được gọi là thùng làm lạnh, thùng này làm lạnh theo cơ chế cơ học, bằng hỗn hợp đá khô với rượu như metanol hay etanol, hoặc bằng nitơ lỏng. Tất nhiên cũng có thể sử dụng các thiết bị đông khô có bán trên thị trường như Thermo Scientific® Modulyo Freeze-Dry System do Thermo Fisher Scientific Inc cung cấp. Ở quy mô lớn, thường làm lạnh bằng cách sử dụng máy đông khô có kiểm soát nhiệt độ bán trên thị trường. Làm lạnh tế bào được nang hóa thường được tiến hành với tốc độ làm lạnh nhanh, để tránh hình thành tinh thể băng. Thường thì nhiệt độ làm lạnh nằm trong khoảng từ -50°C đến -80°C .

Bước tiếp theo là sấy sơ bộ. Trong pha này, áp suất được hạ thấp (thường nằm trong vài milliba), và cấp lượng nhiệt vào nguyên liệu đủ để nước thăng hoa. Lượng nhiệt cần thiết được tính bằng cách sử dụng ẩn nhiệt thăng hoa của phân tử cần làm thăng hoa. Trong giai đoạn sấy sơ bộ này, khoảng 95% nước trong nguyên liệu được thăng hoa. Pha này có thể diễn biến chậm (vài ngày trên quy mô công nghiệp), vì nếu cấp quá nhiều nhiệt thì cấu trúc nguyên liệu sẽ bị biến đổi.

Bước đông khô thứ cấp tiếp theo có thể là bước cuối trong quá trình đông khô. Pha đông khô thứ cấp này nhằm loại nốt, nếu có, các phân tử nước chưa đóng băng, vì băng đã được loại trong pha đông khô sơ cấp. Để phá vỡ mối tương tác lý-hóa bất kỳ đã hình thành giữa phân tử nước và nguyên liệu đã đóng băng, trong pha này nhiệt độ thường cao hơn ở pha đông khô sơ cấp, và thậm chí có thể cao hơn 0°C . Thông thường áp suất cũng được hạ thấp trong giai đoạn này để tạo điều kiện cho giải hấp (thường trong khoảng microba, hoặc là phân số (giá trị không nguyên) tính theo pascal). Sau khi quá trình đông khô kết thúc, lớp chân không thường bị phá vỡ bằng khí trơ, như nitơ, trước khi đóng gói tế bào được nang hóa đã đông khô và/hoặc bảo quản để sử dụng tiếp.

Như đã rõ ở trên, phương pháp theo sáng chế là “xử lý sơ bộ” và chuyên gia trong lĩnh vực sẽ hiểu được và có thể sử dụng cùng với phương pháp đã biết trong lĩnh vực làm lạnh và đông khô chất liệu như với các chất liệu là tế bào tự do hoặc tế bào được nang hóa được đề cập ở đây.

Theo đó, vì ít nhất hai bước ủ liên tiếp có thể được thực hiện cùng với các phương pháp phù hợp bất kỳ sau các bước đông khô, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế tế bào được nang hóa cho đông khô, trong đó phương pháp này có ít nhất hai bước ủ liên tiếp, trong đó tế bào được nang hóa được ủ ở mỗi bước ủ trong dung dịch ủ có chứa chất bảo quản đông lạnh trong thời gian phù hợp, trong đó nồng độ chất bảo quản đông lạnh trong dung dịch ủ được gia tăng ở mỗi bước ủ tiếp theo. Vì vậy, mặc dù sáng chế sẽ giải thích phương pháp đông khô một cách chi tiết dưới đây, cần hiểu rằng mọi phương án này là tương đương với phương pháp điều chế tế bào được nang hóa để đông khô như được xác định ở đây.

Theo sáng chế, có thể thực hiện số lượng ít nhất hai bước ủ liên tiếp nhiều đến mức miễn là số lượng này đủ để tạo ra tác dụng mong muốn lên, chẳng hạn, sức sống tế bào được nang hóa sau đông khô. Theo phương án minh họa, phương pháp này có 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 bước ủ, trong đó nồng độ chất bảo quản đông lạnh được gia tăng ở mỗi bước ủ. Mỗi bước ủ có thể được thực hiện với thời lượng thích hợp, chẳng hạn với lượng thời gian đủ để có được độ ổn định dài hạn mong muốn cho các nang và/hoặc sức sống của tế bào được nang hóa. Thời gian ủ cũng như số bước ủ phù hợp có thể được xác định bằng thực nghiệm, chẳng hạn bằng cách đánh giá sức sống của tế bào được nang hóa sau đông khô và tiếp theo (sau một thời gian nhất định) là tái hydrat hóa (ngâm nước) các tế bào này (xem phần Ví dụ thực hiện sáng chế). Theo một phương án, thời gian ủ thường từ khoảng vài phút đến vài giờ cho một bước ủ (xem phần Ví dụ thực hiện trong đó tế bào vi khuẩn được ủ trong khoảng 25 phút cho mỗi bước ủ). Có thể ủ không cần khuấy nhưng cũng có thể có khuấy (như lắc hay quay ống) để nâng cao khả năng hấp thu chất bảo quản đông lạnh cho chất liệu nang hóa và những tế bào này.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, sử dụng cùng một chất bảo quản đông lạnh hoặc hỗn hợp của nhiều chất bảo quản đông lạnh cho mỗi bước ủ. Chất

bảo quản đông lạnh có thể là chất bất kỳ có khả năng tạo ra tác dụng bảo vệ chống bị phá hủy cho chất liệu bao nang được sử dụng hay tế bào được nang hóa trong quá trình đông khô. Ví dụ về những chất bảo quản đông lạnh phù hợp là, nhưng không chỉ giới hạn ở, sữa đã tách chất béo, glyxerol, đimetylsulfoxit (DMSO), formamit, hỗn hợp của formamit và DMSO, N-metylxetamit (MA), polyvinylpyrrolidon, propandi-ol (1,2-propandi-ol hoặc 1,3-propandi-ol hay hỗn hợp của cả hai chất này), propylen glycol, albumin huyết thanh, hỗn hợp của albumin huyết thanh với metanol, carbohydrat và alginat. Ví dụ về các chất alginat có thể được sử dụng làm chất bảo quản đông lạnh là alginat Satialgine® hay alginat Algogel® đều là các chất do Cargill cung cấp (xem tài liệu P. Capelaa et al, “Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt” Food Research International Volume 39, Issue 2, March 2006, Pages 203–211)

Ví dụ về carbohydrat có thể được sử dụng làm chất bảo quản đông lạnh là, nhưng không chỉ giới hạn ở, sucroza, glucoza trộn với metanol, lactoza, trehaloza, raffinosa, dextran, pectin (Ví dụ, Unipectine™ cũng do Cargill cung cấp và được tài liệu đề cập là chất bảo quản đông lạnh theo P. Capelaa et al, Food Research International Volume 39, nêu trên), tinh bột hydroxyetyl (HES), và xenluloza sulphat.

Cũng có thể sử dụng hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất bảo quản đông lạnh trong dung dịch ủ, ví dụ (nhưng không nhằm mục đích giới hạn) là hỗn hợp của sữa đã tách chất béo với glyxerol hoặc hỗn hợp của sữa đã tách chất béo với carbohydrat (xem phần Ví dụ thực hiện sáng chế). Theo phương án này, có thể gia tăng nồng độ của chỉ một trong số các chất bảo quản đông lạnh ở các bước ủ liên tiếp trong khi nồng độ của chất bảo quản đông lạnh còn lại (hoặc các chất tiếp theo) được giữ không đổi trong quá trình ủ (xem phần Ví dụ thực hiện). Theo một phương án, chất bảo quản đông lạnh có nồng độ được giữ không đổi có thể là chất được chọn từ sucroza, hỗn hợp glucoza với metanol, lactoza, trehaloza, raffinosa, hoặc dextran. Theo một phương án cụ thể, nồng độ của sữa đã tách chất béo được gia tăng ở mỗi bước trong ít nhất hai bước ủ liên tiếp trong khi nồng độ carbohydrat (như sucroza, hỗn hợp glucoza với

metanol, lactoza, trehaloza, raffinosa, hoặc dextran) được giữ không đổi trong ít nhất hai bước ủ liên tiếp này.

Có thể sử dụng tế bào phù hợp bất kỳ (được nang hóa) trong sáng chế này. Tế bào được nang hóa này có thể là tế bào nhân chuẩn hoặc tế bào nhân sơ hoặc hỗn hợp của một số tế bào nhân chuẩn hoặc một số tế bào nhân sơ. Những tế bào này cũng có thể là hỗn hợp tế bào nhân sơ với tế bào nhân chuẩn. Ví dụ về tế bào nhân chuẩn là, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào động vật có vú, tế bào nấm hoặc tế bào nấm men. Một ví dụ tế bào động vật có vú với mục đích minh họa thuần túy là tế bào biểu mô sắc tố võng mạc người (RPE) được đề cập trong tài liệu: Wikström et al. "Viability of freeze dried microencapsulated human retinal pigment epithelial cells" Eur. J. Pharm. Sci. Volume 47, Issue 2, 29 September 2012, Pages 520-526 hoặc tế bào gốc trung mô được đề cập trong tài liệu: Gordon et al, 2001, "Recovery of human mesenchymal stem cells following dehydration and rehydration" Cryobiology 43, 182. Một vài ví dụ minh họa về tế bào nấm men phù hợp là *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* và *Torulopsis*. Ví dụ về tế bào nấm là, và không nhằm mục đích giới hạn, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* hoặc *Penicillium*. Tế bào nhân sơ được sử dụng theo sáng chế có thể là tế bào vi khuẩn. Tế bào vi khuẩn này có thể là tế bào vi khuẩn ưa khí hoặc yếm khí. Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, những tế bào vi khuẩn này có thể được chọn từ nhóm gồm *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus* và hỗn hợp các tế bào này.

Theo một phương án của phương pháp này, tế bào được đem ủ theo mô tả ở đây là tế bào probiotic. Ví dụ về tế bào probiotic phù hợp là, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus*

alimentarius, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei*Shirota, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lacti*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus* GG), *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus thermotolerans*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactococcuslactis*, *Micrococcus varians*, *Pediococcusacidilactici*, *Pediococcuspentosaceus*, *Pediococcusacidilactici*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* và hỗn hợp bất kỳ của các tế bào này.

Theo một phương án, cụ thể là khi tế bào vi khuẩn hoặc tế bào nhân chuẩn như nấm men được sử dụng, những tế bào này đang ở pha sinh trưởng theo hàm mũ khi được nang hóa. Tuy nhiên, cũng có thể bao nang và tiếp theo là đông khô những tế bào đang ở pha sinh trưởng bất kỳ, chẳng hạn tế bào động vật có vú đã sinh trưởng đến pha nhập dòng (xem tài liệu: Wikström et al, Eur. J. Pharm. Sci. (2012), nêu trên).

Theo phương án điển hình, tế bào được nang hóa trong vi nang có thành nang xóp. Thành nang xóp (vỏ) có thể chứa chất liệu được chọn từ nhóm gồm polyme alginat, collagen, gelatin, chitosan, agaroza, polyme poly-lysine, polyme xenluloza sulphat và tổ hợp các chất này.

Lưu ý là thuật ngữ “được nang hóa” được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa thông thường trong lĩnh vực này. Nang hóa là để chỉ quá trình hình thành vỏ bọc liên tục bao quanh chất nền tro hoặc bao quanh tế bào nằm trọn trong thành nang với nhân chất liệu bao nang chính là tế bào hay chất nền này. Nang hóa cũng khác với “gắn cố định” là quá trình bẫy bắt chất liệu như tế bào nằm trong hay xuyên suốt chất nền. Ngược với nang hóa, gắn cố định là quá trình ngẫu nhiên tạo ra kích thước phân tử không xác định nơi có tỷ lệ phần trăm các yếu tố đã cố định sẽ được phơi nhiễm trên bề mặt. Nang hóa hay vi nang hóa (cả hai thuật ngữ này có thể thay thế được cho nhau) giúp phân cách chất liệu nhân khỏi môi trường của nó, nhờ vậy nâng cao tính ổn định của nhân và kéo dài độ vững bền bảo quản của chất liệu nhân. Cấu trúc được

hình thành bởi chất tạo vi nang hóa xung quanh chất liệu nhân được gọi là thành hay vỏ nang. Hệ thành nang thường được thiết kế có tính chất bảo vệ được chất liệu nhân và để giải phóng nhân sau này trong điều kiện cụ thể đồng thời cho phép những phân tử nhỏ đi vào và đi ra khỏi thành nang xốp (có chức năng như màng). Viên nang bất kỳ và vật liệu bao nang có thể được cho đông khô theo như mô tả ở đây. Ví dụ, viên nang có thể có kích thước nằm trong khoảng từ dưới micron đến vài milimet và có thể có hình dạng khác nhau.

Theo đề cập ở trên, một số polyme sinh học loại dùng cho thực phẩm như alginat, tinh bột, gồm xanthan, gồm guar, gồm carob và gồm carrageenan cũng như protein nước sữa đã được kiểm nghiệm làm chất vi nang hóa để bảo vệ, chẳng hạn bảo vệ tế bào vi sinh nhạy cảm với axit ở các mức độ thành công khác nhau. Gần đây có thể xem tài liệu: Islam *et al.* “Microencapsulation of Live Probiotic Bacteria” J. Microbiol. Biotechnol. (2010), 20(10), 1367–1377. Có thể sử dụng tất cả các chất liệu nang hóa này và tất cả các vi khuẩn probiotic trong tài liệu này cho phương pháp của sáng chế. Ví dụ, có thể xem khái quát về tất cả các vật liệu nang hóa và những tế bào vi sinh có thể được sử dụng cho sáng chế trong đơn yêu cầu cấp patent với công bố quốc tế số WO 2012/101167 “Protection Of Microbial Cells From Acidic Degradation”.

Polyme alginat, nếu được sử dụng làm vật liệu nang hóa mong muốn cho tế bào, có thể là polyme alginate tinh khiết, polyme alginat-tinh bột biến tính, alginat-inulin-gồm xanthan, alginat và polyme poly L-lysin, polyme chitosan/alginat và polyme chitosan/xanthan. Ví dụ về các vật liệu nang hóa alginate đã được đề cập trong tài liệu: Wikström *et al.*, nêu trên hoặc trong đơn yêu cầu cấp patent công bố quốc tế số WO 2012/101167 và các tài liệu viện dẫn trong công bố này.

Theo phương án khác của sáng chế, vật liệu nang hóa có thể là polyme xenluloza sulphat. Polyme này có thể là polyme xenluloza sulphat đã biết bất kỳ, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, polyme xenluloza sulphat có chứa phức hợp được hình thành từ natri xenluloza sulphat (NaCS)/poly[điallyl(đimetyl)amoniumclorua] (pDADMAC). Ví dụ về vật liệu alginat nang hóa được đề cập trong đơn yêu cầu cấp patent có số công bố quốc tế WO 2012/101167 và tài liệu viện dẫn trong công bố này.

Theo một phương án của phương pháp đông khô tế bào được nang hóa (hoặc phương án của phương pháp điều chế tế bào được nang hóa để đông khô), sau ít nhất hai bước ủ liên tiếp tế bào được nang hóa này được chuyển đến môi trường đông khô phù hợp mà không có bước rửa trung gian. Thuật ngữ “bước rửa” có nghĩa cụ thể là bước xử lý trong đó tế bào ủ được tiếp xúc với đệm rửa/môi trường không có chất bảo quản đông lạnh.

Theo phương án khác, tế bào được nang hóa như tế bào vi khuẩn được đông khô trong môi trường đông khô phù hợp sau bước ủ cuối. Theo phương án này, môi trường đông khô cũng có thể chứa chất bảo quản đông lạnh. Theo đó, môi trường đông khô này chứa chất bảo quản đông lạnh giống như trong dung dịch ủ.

Ví dụ về chất bảo quản đông lạnh phù hợp có thể được sử dụng trong bước làm lạnh (bước này có thể được thực hiện sau phương pháp của sáng chế) là, nhưng không chỉ giới hạn ở, sữa đã tách chất béo, glyxerol, đimetylsulfoxit (DMSO), formamit, hỗn hợp của formamit và DMSO, N-metylaxetamit (MA), albumin huyết thanh, hỗn hợp của albumin huyết thanh với metanol, polyvinylpyrrolidon, propandi-ol, propylen glycol, carbohydrat và alginat, và chỉ là ví dụ minh họa.

Ví dụ về chất bảo quản đông lạnh gốc carbohydrat phù hợp là, nhưng không chỉ giới hạn ở, sucroza, hỗn hợp glucoza và metanol, lactoza, trehaloza, raffinosa, dextrans, pectin, tinh bột hydroxyetyl (HES) và xenluloza sulphat.

Theo phương án điển hình của bước làm lạnh này, môi trường đông khô là dung dịch nước có chứa một hay nhiều chất bảo quản đông lạnh vốn được chọn cho bước làm lạnh này.

Theo mô tả ở trên, sáng chế cũng đề cập đến tế bào được nang hóa đã đông khô đã nhận được từ phương pháp đã đề cập. Sáng chế cũng đề cập đến hợp phần chứa tế bào được nang hóa như đề cập cùng với chất mang phù hợp. Ví dụ, chất mang này có thể là chất mang thông thường được sử dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm hay thực phẩm. Hợp phần được đề cập này có thể là thực phẩm chức năng, mỹ phẩm hoặc dược phẩm.

Ví dụ về mỹ phẩm trong đó có tế bào đã bao nang của sáng chế là các hợp phần dùng khu trú như xà phòng (cả dạng lỏng hay rắn), nước rửa, mỹ phẩm trang điểm, kem bôi, gel tắm, muối tắm, hay nước gội đầu. Ví dụ minh họa về các hợp phần này chứa tế bào vi khuẩn probiotic như *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* hoặc *Bacillus coagulans* (ví dụ chủng GanedenBC³⁰® (*Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 của GanedenBiotec, Cleveland, Ohio, USA). Các mỹ phẩm này có thể được sử dụng để nâng cao khả năng làm ẩm da, tính đàn hồi, cải thiện nếp nhăn dưới mắt hay giảm các nếp nhăn nhăn ở người.

Nếu sử dụng tế bào được nang hóa thu được theo sáng chế hay hợp phần chứa tế bào này làm phụ gia cho thực phẩm, thì thực phẩm này, chẳng hạn, có thể là ngũ cốc hay sản phẩm làm từ sữa như yoghurt, sữa đông, bánh pudding, pho mát nông trại, hay bơ. Nếu được sử dụng làm phụ gia cho thực phẩm như yoghurt hay pudding, tế bào được nang hóa của sáng chế hay hợp phần chứa tế bào được nang hóa này có thể được bảo quản trong ngăn riêng của túi đựng thực phẩm. Ví dụ, ngăn riêng này có thể cuộn lại được để đẩy hết lượng chứa trong đó ra, có nghĩa là tế bào được nang hóa của sáng chế hoặc hợp phần tương ứng được đẩy vào ngăn còn lại của túi đựng thực phẩm, vốn đã được đổ đầy, chẳng hạn, bằng yoghurt hay pudding. Sử dụng ngăn đựng riêng như vậy cho phép bổ sung thêm, chẳng hạn, tế bào probiotic được nang hóa vào thực phẩm ngay trước khi ăn.

Liên quan đến khía cạnh này, sáng chế cũng đề cập đến các ứng dụng dược phẩm và thực phẩm thuộc bổ dưỡng khác nhau. Các ứng dụng này là, nhưng không chỉ giới hạn ở, điều trị hay phòng ngừa bệnh tiêu chảy, bệnh tiêu chảy do kháng sinh gây ra, viêm khớp, chứng béo phì, hội chứng ruột bị kích thích, chứng ợ chua, hội chứng mệt mỏi mạn tính và các dạng bệnh lý khác do mất cân bằng quần thể vi khuẩn trong ruột. Để dùng cho các ứng dụng này, tế bào được nang hóa của sáng chế hoặc hợp phần chứa tế bào được nang hóa này được đưa vào cá thể, thường là động vật có vú như người hay động vật nuôi ở nhà hay trang trại như mèo, chó, cừu, bò, lợn, gia cầm hoặc cá, chẳng hạn.

Sáng chế còn đề xuất hợp phần phù hợp để làm lạnh tế bào, trong đó những tế bào này có thể được nang hóa hoặc không bị nang hóa (tự do). Hợp phần này chứa sữa

đã tách chất béo, glyxerol và carbohydrat. Vì vậy, hợp phần này có thể là dung dịch làm lạnh (hoặc dung dịch bảo quản đông lạnh) được sử dụng cho phương pháp đông khô bất kỳ được đề cập và đã biết trong lĩnh vực này. Vì vậy hợp phần này chứa chất mang cho chất bảo quản đông lạnh (nghĩa là sữa đã tách chất béo, glyxerol và carbohydrat). Chất mang này thường là (dạng tinh khiết) nước hoặc dung dịch có nước chứa muối, chẳng hạn.

Theo một phương án của hợp phần này thì carbohydrat có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, sucroza, hỗn hợp glucoza và metanol, lactoza, trehaloza, raffinosa, dextran, pectin, hydroxyetyl tinh bột (HES), xenluloza sulphat và hỗn hợp của các chất carbohydrat này. Theo một phương án carbohydrat này là sucroza, lactoza, raffinosa hoặc trehaloza.

Sữa đã tách chất béo có thể có mặt ở nồng độ phù hợp bất kỳ để tạo ra tác dụng bảo vệ hữu hiệu cho tế bào hoặc tế bào được nang hóa trong quá trình làm lạnh. Theo một phương án, sữa đã tách chất béo có thể có trong hợp phần (dung dịch làm lạnh) của sáng chế ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1% (khối lượng/thể tích) đến 10% (khối lượng/thể tích). Theo đó, lưu ý là sữa đã tách chất béo (còn được biết là sữa gầy) được sử dụng theo nghĩa thông thường để chỉ loại sữa nhận được sau khi toàn bộ phần kem (còn gọi là chất béo của sữa) được tách ra khỏi sữa nguyên. Có thể sử dụng sữa đã tách chất béo/sữa gầy bất kỳ có trên thị trường trong dung dịch làm lạnh/hợp phần theo sáng chế. Thông thường, bột sữa đã tách chất béo được sử dụng để điều chế hợp phần làm lạnh của sáng chế. Vì vậy, nồng độ của sữa đã tách chất béo được đề cập ở đây dưới dạng trọng lượng-% sữa đã tách chất béo trên thể tích dung dịch làm lạnh.

Glyxerol cũng có thể có trong hợp phần của sáng chế với nồng độ phù hợp bất kỳ có tác dụng bảo vệ hữu hiệu cho tế bào được nang hóa trong quá trình làm lạnh. Theo một phương án, glyxerol có thể có trong dung dịch làm lạnh của sáng chế với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,2% (khối lượng/thể tích) đến 5% (khối lượng/thể tích).

Carbohydrat cũng có thể có trong hợp phần của sáng chế với nồng độ phù hợp bất kỳ tạo ra tác dụng bảo vệ hữu hiệu cho tế bào hoặc tế bào được nang hóa trong quá trình làm lạnh. Theo phương án tiêu biểu, carbohydrat có thể có trong dung dịch làm

lạnh của sáng chế ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1% (khối lượng/thể tích) đến 15% (khối lượng/thể tích).

Theo một phương án cho hợp phần này, sữa đã tách chất béo có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 3% (khối lượng/thể tích) đến 8% (khối lượng/thể tích), glyxerol có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5% (khối lượng/thể tích) đến 2% (khối lượng/thể tích) và carbohydrat có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 5% (khối lượng/thể tích) đến 13% (khối lượng/thể tích). Theo phương án nữa, hợp phần làm lạnh của sáng chế chứa sữa tách chất béo có nồng độ khoảng 5% (khối lượng/thể tích), glyxerol có nồng độ khoảng 1% (khối lượng/thể tích) và carbohydrat có nồng độ khoảng 10% (khối lượng/thể tích). Nhằm mục đích minh họa, cần lưu ý là dung dịch như vậy có thể được điều chế bằng cách lấy 1g glyxerol, 5g bột sữa đã tách chất béo và 10g trehaloza cho vào dụng cụ đo loại 100ml. Sau đó, thể tích dung dịch được điều chỉnh đến 100ml bằng nước vô trùng được cất hai lần.

Liên quan đến phần mô tả ở trên, hợp phần của sáng chế chứa sữa đã tách chất béo, glyxerol và carbohydrat có thể được sử dụng để làm lạnh tế bào được nang hóa như đã đề cập. Tuy nhiên, hợp phần chứa sữa đã tách chất béo, glyxerol và carbohydrat này cũng có thể được sử dụng để điều chế tế bào được nang hóa cho đông khô, nghĩa là ở các bước ủ liên tiếp tế bào được nang hóa với nồng độ gia tăng của chất bảo quản đông lạnh như đã đề cập. Theo đó, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế tế bào được nang hóa để đông khô, trong đó phương pháp này có bước ủ tế bào được nang hóa trong hợp phần của sáng chế vốn có chứa sữa đã tách chất béo, glyxerol và carbohydrat.

Sáng chế sẽ được minh họa cụ thể hơn bằng Ví dụ thực hiện dưới đây, tuy nhiên các ví dụ này không nhằm mục đích giới hạn phạm vi bảo hộ sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Đông khô với chất bảo quản đông lạnh được thêm dần từng bước vào dung dịch ủ

Dữ liệu thực hiện:

Vi khuẩn probiotic *Lactobacillus acidophilus* được nang hóa, đông khô, đã tái hydrat hóa và được kiểm nghiệm hoạt tính chuyển hóa là thước đo sức sống. Phân tích các nang theo tính nguyên vẹn cấu trúc sau đông khô và tái hydrat hóa.

Nang hóa vi khuẩn:

Thu hoạch giống cấy vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* có mật độ quang OD là 1 ở bước sóng 600nm và thực hiện nang hóa trong natri xenluloza sulphat và polydiallyl dimetyl amoni clorua (pDADMAC—còn gọi là Gel8 theo phân loại danh pháp quốc tế thành phần mỹ phẩm International Nomenclature Cosmetic Ingredient (INCI)). Vi khuẩn được nang hóa được nuôi cấy trong môi trường de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) ở 37°C có lắc với tốc độ 50 vòng/phút.

Đông khô (làm lạnh nhanh)

Vi khuẩn được nang hóa và vi khuẩn tự do được đóng băng trong bể etanol/đá khô bằng cách sử dụng thêm dần từng bước sữa đã tách chất béo 5%, glyxerol 1% hoặc DMSO trong nước vô trùng được cất hai lần làm chất bảo quản đông lạnh và sau đó bảo quản ở -80°C. Môi trường làm lạnh cho vi khuẩn tự do là giống như cho vi khuẩn được nang hóa chỉ khác là không được bổ sung dần từng bước.

Đối với tế bào vi khuẩn được nang hóa, các chất bảo quản đông lạnh được bổ sung dần theo từng bước như sau:

Quy cách chung (cho “pha loãng nhiều bậc” môi trường nuôi cấy):

Sử dụng tối đa 1.000 nang trên một ml hoặc bội số bất kỳ của nó, đặt các nang (có chứa vi khuẩn) vào ống nghiệm Falcon loại 50ml chứa môi trường MRS mới. Hỗn dịch tế bào này (dung dịch ủ) được nhận thêm 0,5ml/ml môi trường làm lạnh là chất bảo quản đông lạnh để tạo ra môi trường làm lạnh có nồng độ chất bảo quản đông lạnh 50% (thể tích/thể tích). Một cách khái quát, nếu tổng thể tích hỗn dịch tế bào là 1ml, thì sau đó lấy ra 0,5ml môi trường và cho vào 0,5ml môi trường làm lạnh để nhận được dịch pha loãng 50% của cả hai). Ủ tế bào được nang hóa trong 25 phút và sau đó đổi tiếp 50 % (thể tích/thể tích) dung dịch ủ sang môi trường bảo quản đông lạnh (nghĩa là trường hợp tổng thể tích là 1ml, thì lấy ra 0,5ml và cho vào 0,5ml môi trường làm lạnh để tạo ra môi trường làm lạnh nồng độ 75% (thể tích/thể tích). Ủ lại

lần nữa trong 25 phút trước khi lại thay 50% môi trường ủ bằng môi trường làm lạnh trong các bước tiếp theo. Ở bước ủ cuối cùng, môi trường quanh viên nang là môi trường làm lạnh 100%.

(A) Thêm dần từng bước chất bảo quản đông lạnh DMSO

Đặt 16 nang trong ống nghiệm Falcon loại 50ml có chứa 9ml môi trường MRS mới. Hỗn dịch tế bào này (dung dịch ủ) được nhận thêm 200 μ l DMSO làm chất bảo quản đông lạnh để thu được nồng độ DMSO ban đầu là khoảng 2% (thể tích/thể tích). Ủ tế bào được nang hóa trong 25 phút và sau đó cho thêm 200 μ l DMSO để thu được nồng độ DMSO là khoảng 4,2% (thể tích/thể tích). Lại ủ tiếp 25 phút trước khi 200 μ l DMSO được thêm trong 3 bước tiếp theo để có được nồng độ DMSO cuối cùng là 10% (1ml DMSO trong 10ml dung dịch ủ).

(B) Thêm dần từng bước hỗn hợp sữa đã tách chất béo/glyxerol làm chất bảo quản đông lạnh (sữa đã tách chất béo 5% và glyxerol 1% trong nước)

Theo đó, 100 nang lớn được làm bằng tay được cho vào ống nghiệm Falcon loại 50ml có chứa 9ml môi trường MRS mới. Lấy ra 5ml môi trường MRS từ ống Falcon và bổ sung thêm 5ml dung dịch ủ có chứa sữa đã tách chất béo làm chất bảo quản đông lạnh (sữa đã tách chất béo 5 % (khối lượng/thể tích) và glyxerol 1% (khối lượng/thể tích) trong nước) ở các bước ủ tiếp theo. Trong thử nghiệm này, sáu bước ủ được thực hiện, trong đó nồng độ chất bảo quản đông lạnh được gia tăng theo thứ tự là 50%, 75%, 87,5%, 93,75%, 97%, và 100%, có nghĩa là ở bước ủ cuối cùng các tế bào được nang hóa có trong môi trường làm lạnh. Thời gian ủ ở mỗi bước sau khi thêm sữa đã tách chất béo làm chất bảo quản đông lạnh là khoảng 25 phút. Tại thời điểm cuối mỗi bước ủ, các nang bị rơi xuống theo trọng lực, nhờ vậy môi trường ủ được hút ra bằng ống hút pipet. Sau bước ủ cuối cùng với sữa đã tách chất béo 5% (khối lượng/thể tích) và glyxerol 1% (khối lượng/thể tích) trong nước, cả vi khuẩn được nang hóa đóng băng và vi khuẩn tự do sau đó được đưa trực tiếp vào dung dịch làm lạnh này (nghĩa là không có bước rửa bất kỳ) để đông khô nhanh qua đêm. Để đông khô, trước tiên các nang cộng môi trường làm lạnh 100% bị làm sốc lạnh bằng cách dùng bể etanol 96%/đá khô. Các viên nang sốc lạnh này sau đó được bảo quản ở -80°C hoặc đem đông khô ngay lập tức. Có thể sử dụng bất kỳ máy đông khô cho quá

trình đông khô nhanh theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trong thử nghiệm này, máy Thermo Scientific ModulyoD-230 đã được sử dụng. Kết quả thử nghiệm có trong Fig. 1 đến Fig. 9. Có thể thấy từ ảnh chụp kính hiển vi các nang trên Fig. 1, các bước ủ nang liên tiếp theo phương pháp của sáng chế tạo ra bao nang nguyên vẹn sau tái hydrat hóa và vì vậy tăng tính nguyên vẹn cấu trúc của quá trình nang hóa. Liên quan đến khía cạnh này có thể xem cả ảnh chụp trên Fig. 4 và Fig. 5 cho thấy các nang xenluloza sulphat đã được xử lý theo phương pháp của sáng chế (sử dụng nồng độ gia tăng của sữa đã tách chất béo trong các bước ủ) và sau đó đông khô trong nitơ lỏng hoặc etanol/đá khô vẫn duy trì được dạng hình cầu ban đầu của mình với bề mặt trơn mượt sau tái hydrat hóa trong khi, như thấy rõ trên Fig. 6 đến 9, các nang đã đông khô trong các dung dịch đệm khác nhau không có chất bảo quản đông lạnh bị hư hỏng hoặc bị phá hủy mạnh.

Ngoài việc duy trì được tính nguyên vẹn cấu trúc cho nang chứa tế bào, phương pháp đông khô theo sáng chế cũng tạo ra tỷ lệ sống cao hơn đáng kể cho tế bào được nang hóa. Fig. 2 cho thấy tác dụng bảo vệ các nang (giữ nguyên vẹn) cho vi khuẩn thử nghiệm trong quá trình đông khô khi sử dụng dung dịch ủ chứa lượng gia tăng sữa đã tách chất béo và glyxerol làm chất bảo quản đông lạnh trong quá trình làm lạnh. Tác dụng bảo vệ được kiểm nghiệm bằng thử nghiệm sức sống tiến hành một ngày sau khi đã đông khô và sau đó là tái hydrat hóa vi khuẩn đã đông khô. Sức sống này được đem so sánh với tế bào vi khuẩn mới nang hóa làm tham chiếu và được biểu diễn dưới dạng % sống. Như minh họa trên Fig. 2, sau khi được đông khô theo phương pháp của sáng chế, các nang bảo vệ được vi khuẩn trong quá trình đông khô (tế bào vi khuẩn đã bao nang có tỷ lệ sống 98% so với tỷ lệ sống 25% ở tế bào vi khuẩn tự do), nghĩa là sức sống của vi khuẩn được nang hóa là cao hơn đáng kể so với vi khuẩn tự do.

Fig. 3 so sánh hai dung dịch ủ khác nhau đã được sử dụng trong Ví dụ này (dung dịch ủ 1: môi trường MRS chứa lượng DMSO gia tăng là chất bảo quản đông lạnh, dung dịch ủ 2 chứa lượng sữa đã tách chất béo gia tăng) theo tỷ lệ sống của vi khuẩn trong quá trình đông khô. Theo Fig. 3, ủ với nồng độ gia tăng của sữa đã tách chất béo (còn có thêm glyxerol là chất bảo quản đông lạnh bổ sung) tạo ra tỷ lệ sống không đổi

khi so sánh với tế bào vi khuẩn mới bao nang chưa qua đông khô, trong khi xử lý bằng DMSO thì ít hiệu quả hơn với tỷ lệ sống chỉ là 9%.

Ví dụ 2: Tác dụng của trehaloza và sữa đã tách chất béo làm chất bảo quản đông lạnh lên tỷ lệ sống của vi khuẩn *Lactobacillus* đã bao nang bằng natri xenluloza sulphat

Trong Ví dụ này, tỷ lệ sống của *Lactobacillus acidophilus* đã bao nang, đông khô được kiểm nghiệm với có hoặc không có trehaloza 10% là chất bảo quản đông lạnh được bổ sung vào khi bảo quản trong điều kiện môi trường xung quanh. Dung dịch đông khô cũng được sử dụng cho các bước tiếp theo là dung dịch nước chứa sữa tách chất béo 5% (khối lượng/thể tích), glyxerol 1% (khối lượng/thể tích), và trehaloza 10% (khối lượng/thể tích).

Chi tiết thử nghiệm:

Lọ đựng vi khuẩn probiotic đã đóng băng trước đó, *Lactobacillus acidophilus* được làm tan băng từ -80°C và cho 20μl vi khuẩn này vào 50ml môi trường MRS. Sau đó vi khuẩn này được nuôi cấy qua đêm ở 37°C có lắc ở tốc độ 50 vòng/phút. Ngày hôm sau, xác định mật độ quang của giống cấy vi khuẩn này ở 600nm (OD600) trên thiết bị Tecan Infinite M200. Thông thường số đo OD600 bằng 1 là tương ứng với khi vi khuẩn đang ở pha sinh trưởng theo hàm mũ. Vi khuẩn nên ở pha sinh trưởng theo hàm mũ khi được nang hóa.

Để nang hóa vi khuẩn, 100ul giống cấy vi khuẩn có OD600 bằng 1 được trộn với 2ml natri xenluloza sulphat 1,8% có chứa natri clorua 0,9%. Dùng xylanh loại 5ml và kim loại 23G cho quá trình nang hóa. Trộn giống cấy vi khuẩn với natri xenluloza sulphat và nhỏ vào bể gelatin hóa chứa 150ml pDADMAC 1,3% (24kDa), natri clorua 0,9%. Để các nang gelatin hóa trong pDADMAC trong 4 phút. Sau đó, cho vào 300ml nước muối được đệm phosphat 1x (PBS) và rửa nang trong 8 phút. Lấy ra 300ml dung dịch rửa và thêm tiếp 400ml PBS vào và rửa nang thêm 4 phút nữa. Sau đó hút cạn dung dịch rửa ra và rửa tiếp 3 lần bằng PBS mỗi lần 100ml, sau đó là rửa 3 lần mỗi lần bằng 30ml MRS mới. Chuyển các nang sang lọ hình nón loại 250ml có chứa 100ml môi trường MRS mới. Nuôi cấy các nang này qua đêm ở 37°C với lắc ở tốc độ 50 vòng/phút.

Đối với vi khuẩn tự do, chuyển 5ml giống cấy qua đêm *Lactobacillus* có OD₆₀₀=1 vào ống nghiệm Falcon loại 15ml và ly tâm ở 3000g trong 5 phút. Tái tạo huyền phù các thể viên vi khuẩn này trong 5ml môi trường bảo quản lạnh (sữa đã tách chất béo 5% (khối lượng/thể tích), glyxerol 1% (khối lượng/thể tích) trong nước) có hoặc không có trehaloza 10% (khối lượng/thể tích). Huyền phù vi khuẩn tái tạo này sau đó được phân mẫu thành các phần 10 x 0,5ml trong các ống nghiệm Falcon loại 15ml. 5ul huyền phù tế bào tái tạo này được cho vào mỗi lỗ trong 4 lỗ giếng của đĩa loại 96 giếng và thực hiện thử nghiệm Alamar Blue để xác định hoạt tính chuyển hóa của tế bào vi khuẩn. Alamar Blue® là phân tích đo sức sống tế bào đã được chứng minh, phân tích đo này sử dụng tác dụng khử tự nhiên chuyển hóa resazurin thành phân tử phát huỳnh quang, resorufin, ở tế bào sống. Resazurin, là chất màu chỉ thị không phát huỳnh quang, được chuyển hóa thành resorufin phát quang màu đỏ tươi qua các phản ứng khử của tế bào có hoạt tính chuyển hóa. Cường độ phát huỳnh quang là tỷ lệ với số tế bào sống. Cho 100ul môi trường MRS mới và 10ul chất thử Alamar Blue vào mẫu vi khuẩn 5ul và ủ các mẫu này ở 37°C có lắc ở tốc độ 50 vòng/phút trong 1 giờ. Đọc đĩa Alamar Blue trên máy Tecan Infinite M200. Phần còn lại của tế bào vi khuẩn tự do trong môi trường bảo quản đông lạnh được đóng băng trong bể etanol/đá khô và bảo quản sau đó ở -80°C.

Sau nuôi cấy qua đêm, rửa các nang chứa vi khuẩn ba lần mỗi lần bằng 50ml môi trường MRS mới trong bình loại 250ml trước tiên và sau đó cho vào ống Falcon loại 15ml rửa bằng 10ml môi trường MRS mới. Lấy ra 5ml môi trường MRS và cho vào 5ml môi trường bảo quản lạnh (cũng làm như vậy cho vi khuẩn dạng tự do) có hoặc không có trehaloza 10% (khối lượng/thể tích). Ủ các nang trong hỗn dịch này trong 25 phút sau đó lấy ra 5ml môi trường này và thay bằng 5ml môi trường bảo quản lạnh mới (có hoặc không có trehaloza 10%, khi cần). Lặp lại công đoạn này 4 lần nữa, nhờ vậy tăng tỷ lệ môi trường bảo quản lạnh từ 50% sau lần thứ nhất thêm môi trường bảo quản lạnh lên đến 98,5% ở lần cuối cùng. Tiếp theo, đặt 1 nang từ môi trường vào mỗi lỗ giếng trong số 4 lỗ của đĩa loại 96 giếng và thực hiện phân tích Alamar Blue để xác định mức độ hoạt tính chuyển hóa của tế bào vi khuẩn trong nang. Cho 10ul chất thử Alamar Blue và 100ul môi trường MRS mới vào mỗi lỗ có chứa các nang và ủ mẫu ở 37°C có lắc ở tốc độ 50 vòng/phút trong 1 giờ. Đọc đĩa phân tích

Alamar Blue trên máy Tecan Infinite M200. Đặt 4 nang lấy từ môi trường bảo quản lạnh vào các ống Falcon loại 15ml có chứa 500ul dung dịch nước đông khô chứa sữa đã tách chất béo 5%, 1% có hoặc không có trehaloza 10% (nếu cần). Sau đó đóng băng các nang này trong bể etanol/đá khô và bảo quản ở -80°C.

Đông khô qua đêm các ống nghiệm Falcon chứa vi khuẩn tự do hoặc nang với sữa đã tách chất béo là chất bảo quản đông lạnh có hoặc không có trehaloza 10% bằng máy sấy ThermoScientificModulyo D-230. Để kiểm nghiệm tỷ lệ sống của vi khuẩn đã đông khô, thực hiện tái hydrat hóa hai mẫu giống nhau đã đông khô của *Lactobacillus* tự do và *Lactobacillus* được nang hóa tại mỗi thời điểm bằng cách sử dụng lần lượt 500ul nước Millipore, hoặc 5-10ml môi trường MRS, trong 5 phút. Sau đó thực hiện phân tích Alamar Blue trên cả *Lactobacillus* tự do và nang *Lactobacillus*. Phân tích này được lặp lại bốn lần với mỗi chế độ dưới đây được áp dụng cho hai mẫu giống nhau:

1. Các mẫu trắng (100ul môi trường MRS + 10ul xanh alamar)
2. Các mẫu *Lactobacillus* tự do đã đông khô có trehaloza (5ul giống cấy đã tái hydrat hóa + 100ul môi trường MRS +10ul xanh Alamar)
3. Các mẫu *Lactobacillus* tự do đã đông khô không có trehaloza (5ul giống cấy đã tái hydrat hóa + 100ul môi trường MRS +10ul xanh Alamar)
4. Các mẫu vi khuẩn được nang hóa đông khô có trehaloza (1 nang trên một giếng +100ul môi trường MRS + 10ul xanh alamar)
5. Các mẫu vi khuẩn được nang hóa đông khô không có trehaloza (1 nang trên một lỗ giếng +100ul môi trường MRS + 10ul xanh alamar)

Ủ các mẫu này ở 37°C với lắc ở tốc độ 50 vòng/phút trong 1 giờ. Đọc đĩa phân tích Alamar Blue trên máy Tecan Infinite M200. Trong vòng hai tháng sau đông khô, thời điểm tái hydrat hóa các mẫu là các tuần 1, 2, 3, 4, 6, 7 và 8 sau đông khô để đánh giá sức sống của vi khuẩn sau quá trình bảo quản ở nhiệt độ thấp bằng sữa đã tách chất béo 5%, glyxerol 1% và có hoặc không có trehaloza 10% ở nhiệt độ trong phòng.

Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trên Fig. 10. Mỗi điểm số liệu trên Fig. 10 là giá trị trung bình của hai mẫu giống nhau đông khô (mỗi mẫu được kiểm tra

bốn lần) với hai ngoại lệ: vi khuẩn tự do với trehaloza 10% ở tuần 6 và vi khuẩn được nang hóa với trehaloza 10% ở tuần 8 trong đó ở cả hai trường hợp, một mẫu trong số hai mẫu giống nhau đã bị thoái biến hoàn toàn (chưa rõ nguyên nhân) và không được đưa vào thống kê. Xác định tỷ lệ sống theo đơn vị phát huỳnh quang tương đối (RFU). Có thể thấy trên Fig. 10, phương pháp đông khô theo sáng chế trong đó tế bào vi khuẩn đã bao nang được ủ nhiều bước liên tiếp trong dung dịch chứa nồng độ gia tăng của môi trường làm lạnh (chứa sữa tách chất béo 5%, glyxerol 1%, trehaloza 10%) là chất bảo quản đông lạnh, phương pháp này tạo ra tỷ lệ sống hơn 60% tế bào và vì vậy là sự cải thiện đáng kể tỷ lệ sống của tế bào tự do. Trong khi đạt được tỷ lệ sống trên 60 % trong thời gian bảo quản hai tuần bằng cách xử lý riêng với sữa đã tách chất béo có nồng độ gia tăng, thì việc thêm trehaloza nồng độ 10 % (khối lượng/thể tích) được thực hiện để duy trì tỷ lệ sống đáng kể này trong toàn bộ thời gian thử nghiệm là 8 tuần, có nghĩa là kéo dài độ vững bền bảo quản nang/tế bào được nang hóa. Kết quả này cũng cho thấy phương pháp của sáng chế và tế bào được nang hóa đông khô thu được bằng phương pháp này là có triển vọng thương mại với những tế bào như tế bào probiotic (và cả các tế bào khác nữa) được bảo quản trong một thời gian cho đến khi sử dụng.

Ví dụ 3: Đông khô *Lactobacillus casei* được nang hóa bằng cách sử dụng hợp phần chứa sữa đã tách chất béo, trehaloza và glyxerol làm chất bảo quản đông lạnh

Lọ đựng vi khuẩn probiotic đã làm đóng băng trước đó, *Lactobacillus casei*, được làm tan băng từ -80°C và cho 20µl vi khuẩn này vào 50ml môi trường MRS. Vi khuẩn được nuôi cấy tiếp qua đêm ở 37°C với lắc ở tốc độ 50 vòng/phút. Ngày hôm sau, mật độ quang của giống cấy vi khuẩn được xác định ở 600nm (OD600) trên máy Tecan Infinite M200. Thông thường số đo OD600 bằng 1 là tương ứng với lúc vi khuẩn đang ở pha sinh trưởng theo hàm mũ. Vi khuẩn nên ở pha sinh trưởng theo hàm mũ khi được nang hóa.

Để nang hóa vi khuẩn, 100ul giống cấy vi khuẩn có OD600 bằng 1 được trộn với 2ml natri xenluloza sulphat 1,8% có chứa natri clorua 0,9%. Dùng xylanh loại 5ml và kim tiêm cỡ 23G cho quá trình nang hóa. Trộn giống cấy vi khuẩn này với natri xenluloza sulphat và nhỏ giọt vào bể gelatin hóa có chứa 150ml pDADMAC 1,3%

(24kDa), natri clorua 0,9%. Để các nang gelatin hóa trong pDADMAC trong 4 phút. Tiếp theo, 300ml nước muối được đệm phosphat (PBS) 1x được cho vào và rửa các nang trong 8 phút. Sau đó lấy ra 300ml dung dịch rửa và cho tiếp 400ml PBS vào và rửa các nang thêm 4 phút nữa. Sau đó hút cạn dung dịch rửa ra và rửa tiếp 3 lần bằng PBS mỗi lần 100ml, sau đó là rửa 3 lần mỗi lần 30ml MRS mới. Chuyển các nang sang lọ hình nón loại 250ml có 100ml môi trường MRS mới. Nuôi cấy các nang này qua đêm ở 37°C với lắc ở tốc độ 50 vòng/phút.

Sau nuôi cấy qua đêm, trước tiên rửa các nang chứa vi khuẩn bằng môi trường MRS mới ba lần mỗi lần 50ml trong bình loại 250ml và sau đó đặt vào ống Falcon loại 15ml có 10ml môi trường MRS mới. Lấy ra 5ml môi trường MRS và cho vào 5ml môi trường bảo quản lạnh có (sữa đã tách chất béo 5% (khối lượng/thể tích), glyxerol 1% (khối lượng/thể tích), trehaloza 10% (khối lượng/thể tích) trong nước). Ủ các nang trong hỗn dịch này 25 phút, sau đó lấy ra 5ml môi trường và thay bằng 5ml môi trường bảo quản lạnh mới. Lặp lại công đoạn này thêm 4 lần, nhờ vậy làm tăng tỷ lệ môi trường bảo quản lạnh từ 50% sau lần thứ nhất bổ sung bảo quản lạnh lên đến 98,5% cho lần cuối cùng.

Cuối cùng, lấy nang từ môi trường bảo quản lạnh cho vào ống Falcon loại 15ml có 500ul dung dịch đông khô có nước chứa sữa đã tách chất béo 5%, glyxerol 1% và trehaloza 10%. Sau đó đóng băng các nang này trong bể etanol/đá khô và sau đó bảo quản ở -80°C.

Có thể thấy từ Fig. 11A đến 11C là ảnh tế bào được bao nang trước và sau quá trình nang hóa (Fig. 11A là các nang *Lactobacillus casei* ngay sau khi nang hóa, Fig. 11B là các nang *Lactobacillus casei* một ngày sau nang hóa và trước đông khô, và Fig. 11C là các nang *Lactobacillus casei* đã đông khô và tái hydrat hóa), các nang *Lactobacillus casei* này vẫn nguyên vẹn sau đông khô, nghĩa là không bị ảnh hưởng bởi đông khô.

Ngoài kiểm tra bằng thị giác, sức sống của vi khuẩn *Lactobacillus casei* được nang hóa được kiểm tra trước khi đông khô và kiểm tra sau khi đã đông khô theo như giải thích trong Ví dụ 2. Từ Fig. 12, kết quả kiểm tra cho thấy sức sống vi khuẩn *Lactobacillus casei* bị ảnh hưởng bởi đông khô, nghĩa là toàn bộ sức sống bị lấy đi sau

đông khô. Vì vậy, Ví dụ 3 xác nhận hiệu quả và sự phù hợp của phương pháp đông khô và theo đó là hợp phần của sáng chế.

Ví dụ 4: Đông khô *Bifidobacterium infantislongum* được nang hóa bằng cách sử dụng hợp phần chứa sữa đã tách chất béo, trehaloza và glyxerol là chất bảo quản đông lạnh

Bifidobacterium infantislongum là ví dụ về vi khuẩn yếm khí chặt chẽ. Vì vậy, tế bào vi khuẩn này được nuôi cấy trong điều kiện yếm khí trong môi trường MRS, ở 37°C và 50 vòng/phút qua đêm. Sử dụng Gaspak (BD) để tạo môi trường yếm khí chặt chẽ trong quá trình nuôi cấy.

Sau nuôi cấy, vi khuẩn *Bifidobacteria* được bao nang bằng cách sử dụng natri xenluloza sulphat như đề cập trong Ví dụ 2 và 3, nhưng trong điều kiện yếm khí. Sau nuôi cấy qua đêm, trước tiên rửa các nang chứa vi khuẩn ba lần mỗi lần bằng 50ml môi trường MRS mới trong bình loại 250ml và sau đó đặt vào ống Falcon loại 15ml có 10ml môi trường MRS mới. Lấy ra 5ml môi trường MRS và cho vào 5ml môi trường bảo quản lạnh có (sữa đã tách chất béo 5% (khối lượng/thể tích), glyxerol 1% (khối lượng/thể tích), trehaloza 10% (khối lượng/thể tích) trong nước). Ủ nang trong huyền phù này 25 phút sau đó lấy ra 5ml môi trường và thay bằng 5ml môi trường bảo quản lạnh mới. Lặp lại công đoạn này thêm 4 lần nữa, nhờ vậy tăng tỷ lệ môi trường bảo quản lạnh từ 50% sau lần thứ nhất thêm môi trường bảo quản lạnh lên đến 98,5% ở lần cuối cùng.

Cuối cùng, các nang từ môi trường bảo quản lạnh được cho vào ống Falcon loại 15ml có 500ul dung dịch đông khô có nước chứa sữa đã tách chất béo 5%, glyxerol 1% và trehaloza 10%. Tiếp theo, đóng băng các nang này trong bể etanol/đá khô và sau đó bảo quản ở -80°C.

Fig. 13 là ảnh tế bào được nang hóa ở thời điểm trước và sau khi nang hóa (Fig. 13A là ảnh các nang một ngày sau khi nang hóa và trước khi đông khô, và Fig. 13B là ảnh các nang *Bifidobacterium infantislongum* đông khô đã tái hydrat hóa), tính nguyên vẹn của các nang *Bifidobacterium infantislongum* này bị ảnh hưởng một chút sau đông khô.

Ngoài kiểm tra bằng thị giác, kiểm tra sức sống của vi khuẩn *Bifidobacterium infantis* được nang hóa trước khi đông khô và sau khi đông khô như theo Ví dụ 2. Có thể thấy trên Fig. 14, sức sống của *Bifidobacterium infantislongum* bị ảnh hưởng một chút bởi đông khô, như Fig. 14 cho thấy có khoảng 50% vi khuẩn còn sống sau đông khô. Tuy nhiên, chắc chắn là sức sống của vi khuẩn *Bifidobacterium infantis* tự do (không nang hóa) sẽ thấp hơn nhiều. Ngoài ra, có thể chờ đợi sức sống cao hơn ở các nang đã sấy toàn diện trong quá trình đông khô. Vì vậy, Ví dụ 4 cũng xác nhận hiệu quả và tính phù hợp của phương pháp đông khô và hợp phần tương ứng của sáng chế.

Có thể thực hiện sáng chế này khi không có một hay một số dấu hiệu, khi không có giới hạn, vốn không được đề cập trong bản mô tả này. Vì vậy, ví dụ, thuật ngữ “chứa”, “có”, “bao gồm”, v.v., cần được hiểu theo nghĩa rộng và không bị giới hạn. Ngoài ra, những thuật ngữ và các cụm từ được sử dụng trong sáng chế này là để mô tả và không bị giới hạn phạm vi, và tác giả không có ý định sử dụng các thuật ngữ và cụm từ này để loại trừ các dấu hiệu tương đương hay một phần của chúng, nhưng cần thừa nhận là có thể có nhiều cải biến vẫn thuộc phạm vi sáng chế này. Vì vậy, cần hiểu là mặc dù sáng chế được mô tả kỹ lưỡng bởi các phương án và các dấu hiệu tùy chọn, vẫn có thể có các cải biến và biến thể khác nhau mà chuyên gia trong lĩnh vực này có thể thực hiện, và các cải biến và biến thể này được coi là thuộc phạm vi của sáng chế.

Sáng chế đã được mô tả theo nghĩa khái quát. Mỗi nhóm dấu hiệu hẹp hơn hay phân nhóm dấu hiệu thuộc phạm vi bộc lộ chung cũng là một phần của sáng chế. Điều này bao gồm các mô tả chung của sáng chế với điều kiện hoặc dấu hiệu loại trừ loại bỏ một số đối tượng, bất kể có hay không các chất liệu được liệt kê cụ thể ở đây. Các phương án khác là thuộc phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, khi các dấu hiệu này được mô tả dưới dạng nhóm Markush, chuyên gia trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng mỗi thành viên riêng lẻ hay nhóm con gồm các thành viên của nhóm Markush này cũng được mô tả.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo tế bào được nang hóa để đông khô, phương pháp này có ít nhất hai bước ủ liên tiếp, trong đó tế bào được nang hóa này được ủ một thời gian phù hợp ở mỗi bước ủ trong dung dịch ủ có chứa chất bảo quản đông lạnh, trong đó nồng độ chất bảo quản đông lạnh trong dung dịch ủ được gia tăng ở mỗi bước ủ kế tiếp, trong đó tế bào được nang hóa này là tế bào vi khuẩn hoặc tế bào nấm men, và trong đó chất bảo quản đông lạnh này là hợp chất chứa sữa đã tách chất béo, glyxerol và trehaloza, trong đó sữa đã tách chất béo có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 3% (khối lượng/thể tích) đến 8% (khối lượng/thể tích), glyxerol có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5% (khối lượng/thể tích) đến 2% (khối lượng/thể tích) và trehaloza có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 5% (khối lượng/thể tích) đến 13% (khối lượng/thể tích) trong hợp chất này.
2. Phương pháp theo điểm 1, bao gồm 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 bước ủ trong đó nồng độ chất bảo quản đông lạnh được gia tăng theo mỗi bước ủ.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tế bào này là tế bào probiotic.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó tế bào probiotic này được chọn từ nhóm gồm *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lacti*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus* GG), *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus thermotolerans*, *Lactobacillus mucosae*, *Micrococcus varians*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*,

Pediococcus acidilactici, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus* và *Staphylococcus xylosus*.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn thêm bước đông khô tế bào được nang hóa.
6. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này còn thêm bước đông khô tế bào được nang hóa.
7. Phương pháp theo điểm 3, trong đó phương pháp này còn thêm bước đông khô tế bào được nang hóa.
8. Phương pháp theo điểm 4, trong đó phương pháp này còn thêm bước đông khô tế bào được nang hóa.

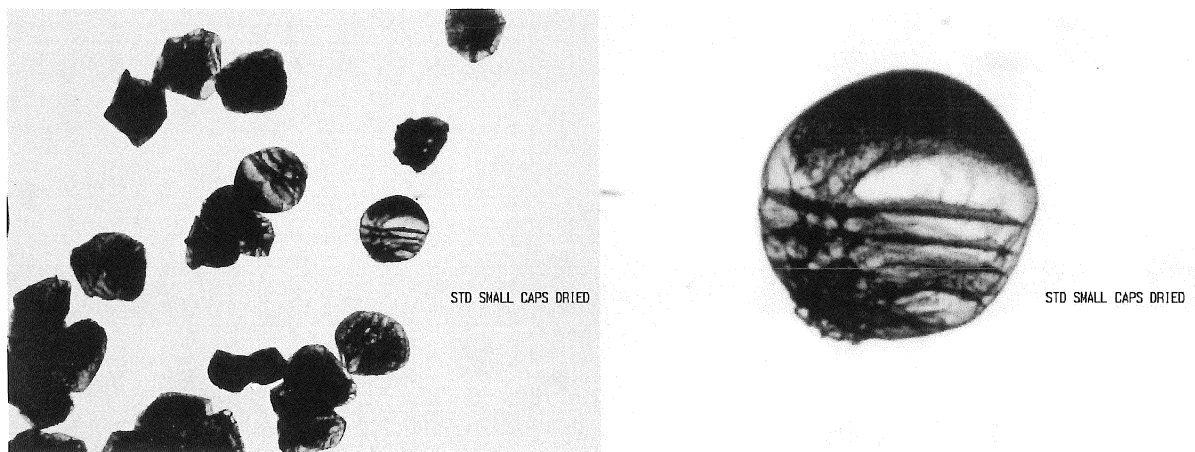


Fig. 1

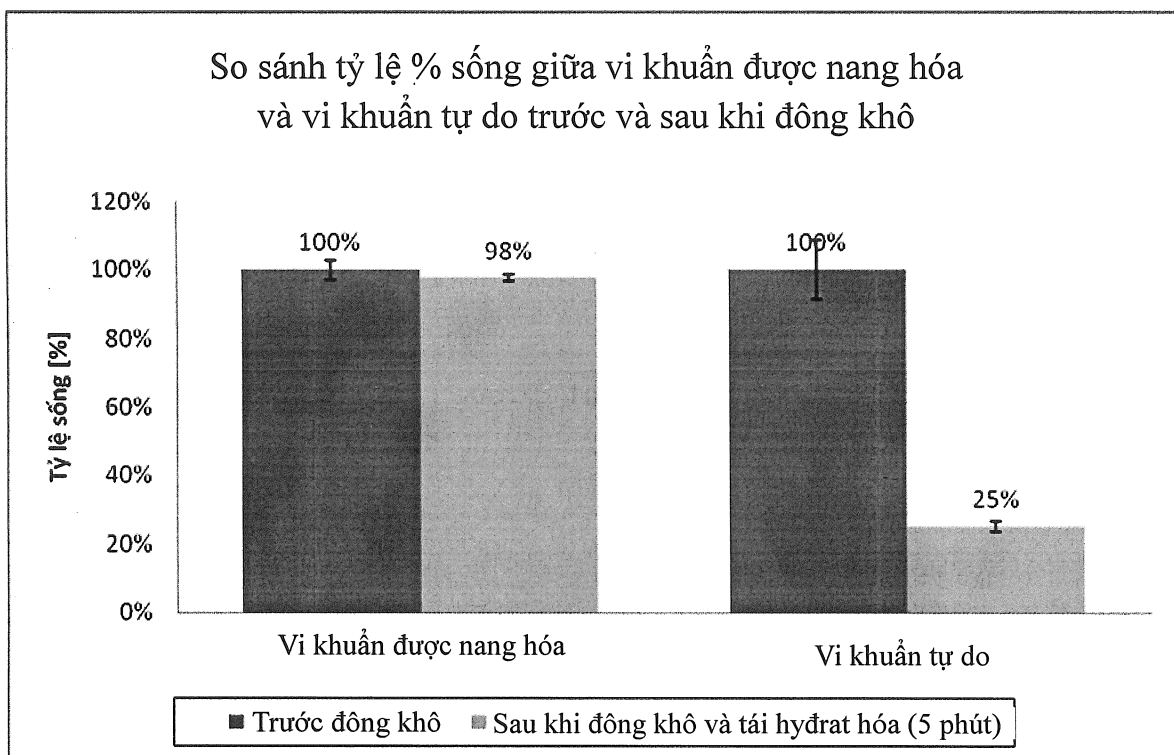


Fig. 2

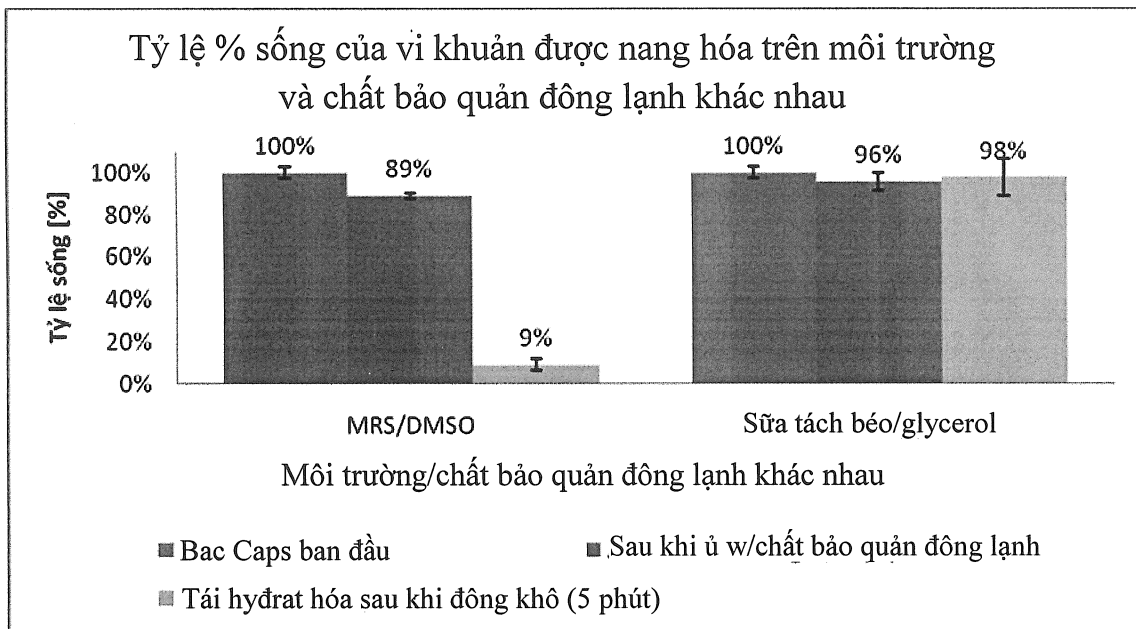


Fig. 3

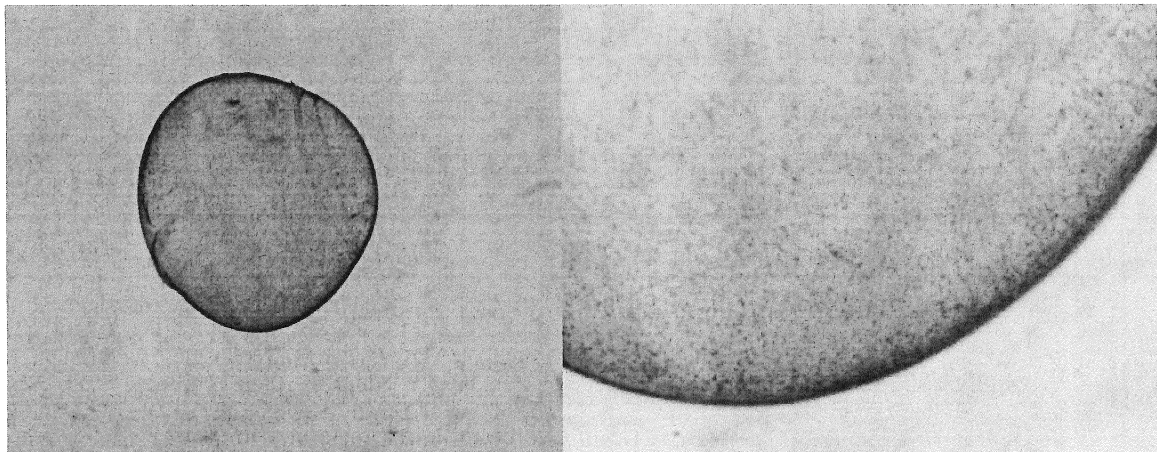


Fig. 4

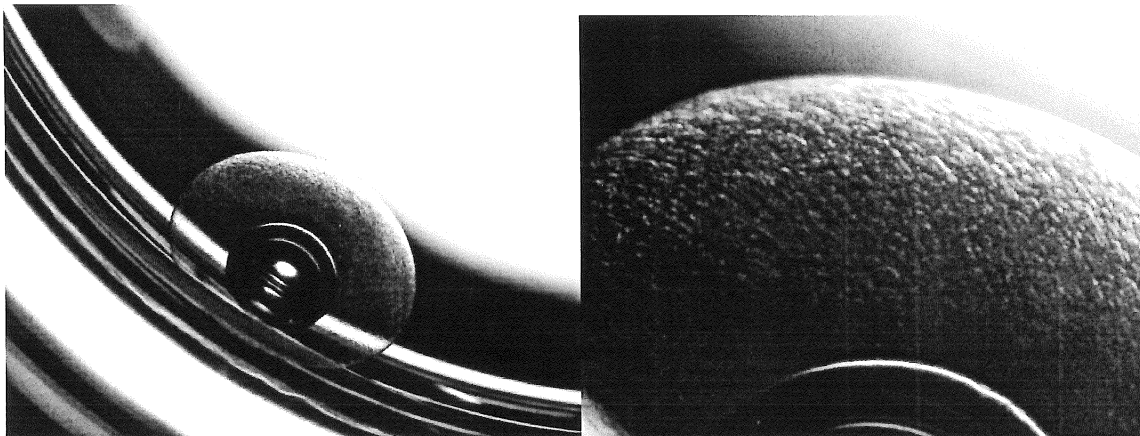


Fig. 5

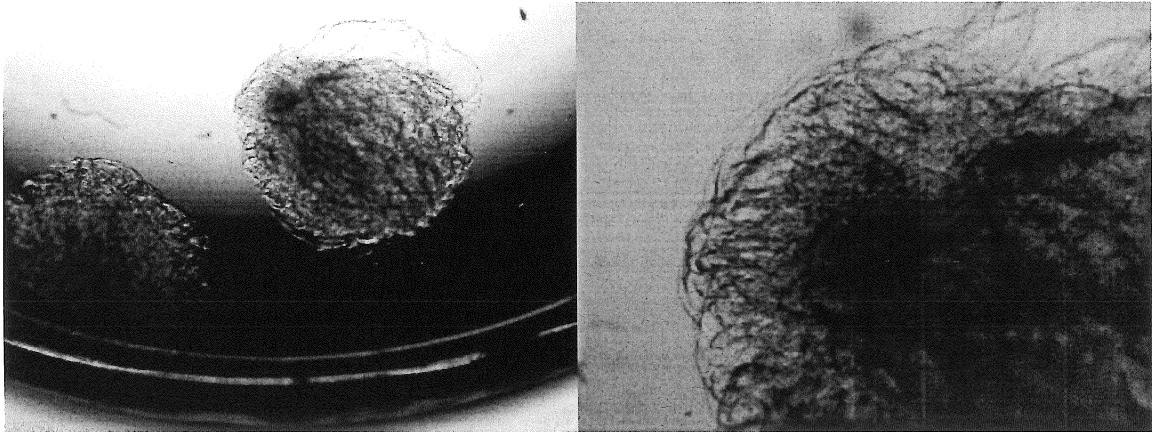


Fig. 6

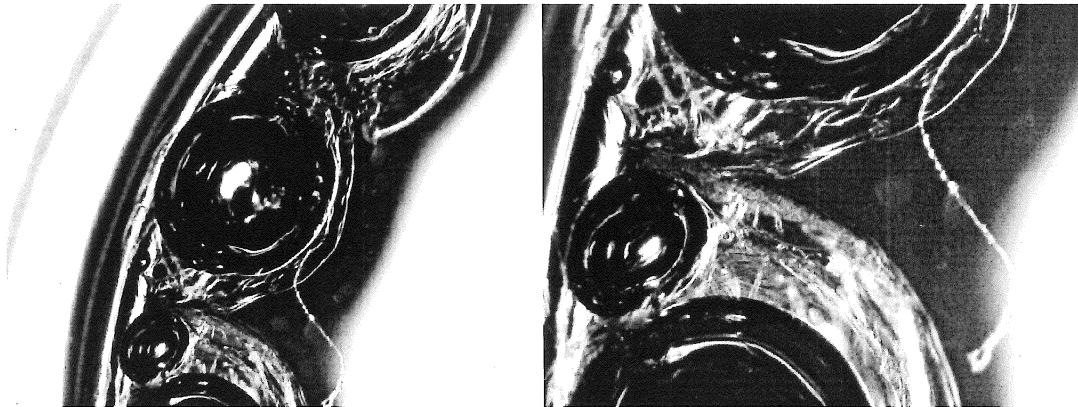


Fig. 7

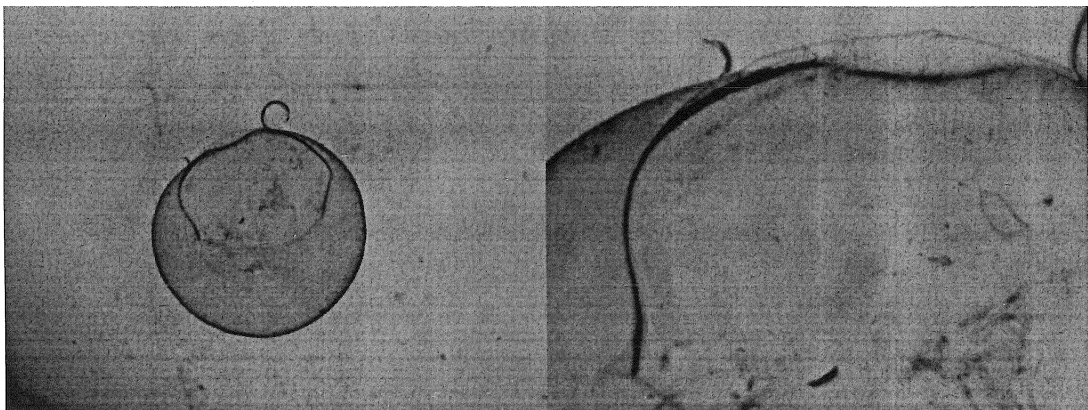


Fig. 8

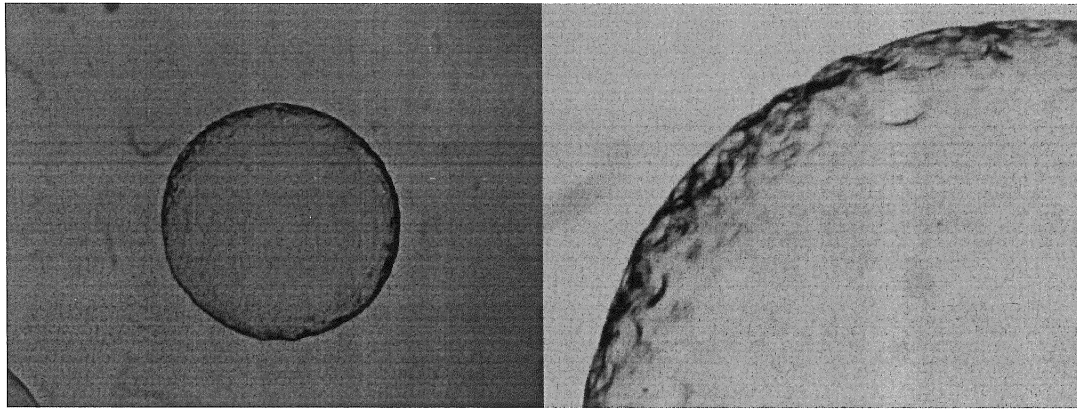


Fig. 9

**Biểu đồ kết quả so sánh tỷ lệ sống giữa
L.acidophilus tự do và đông khô có hoặc không có
trehaloza**

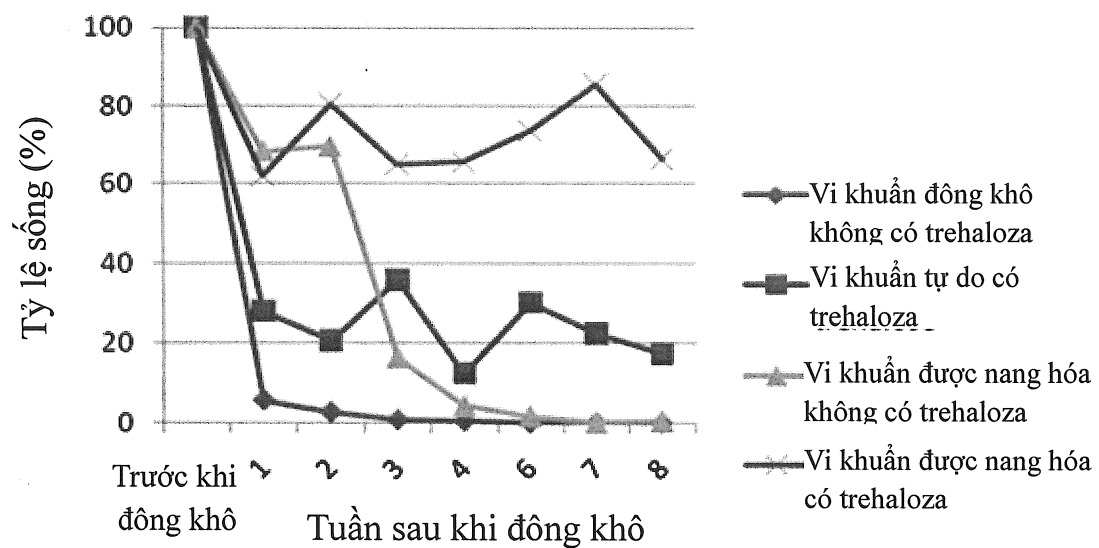


Fig. 10

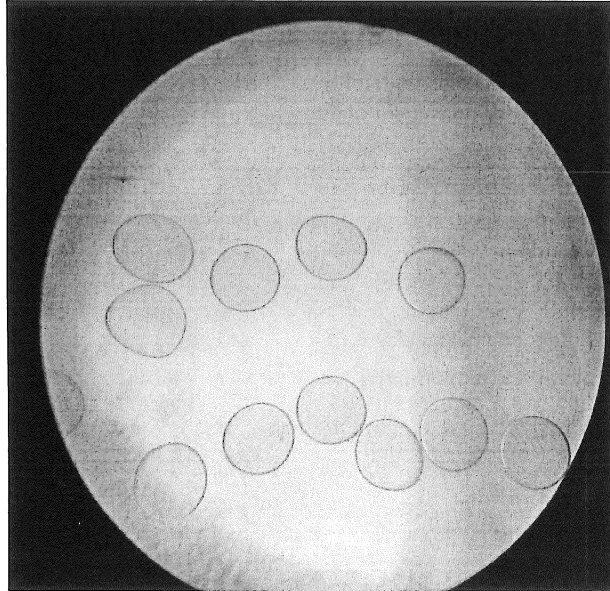


Fig. 11A

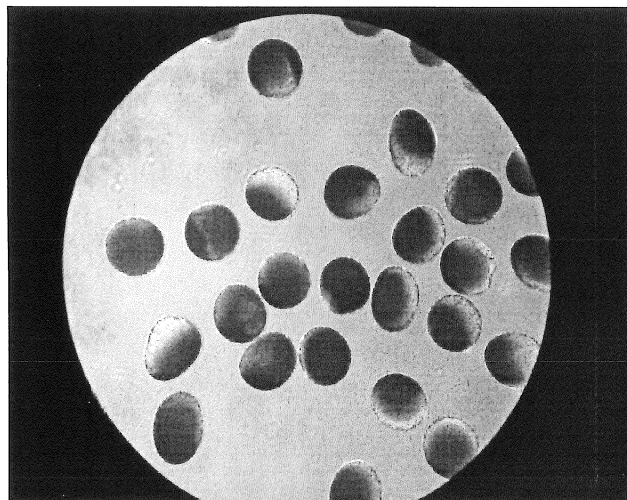


Fig. 11B

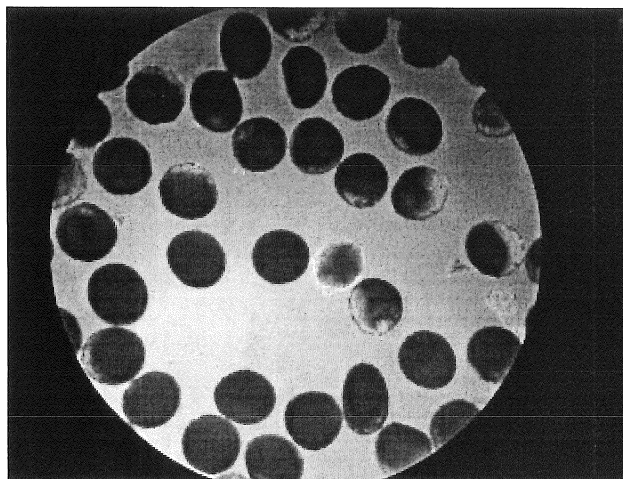


Fig. 11C

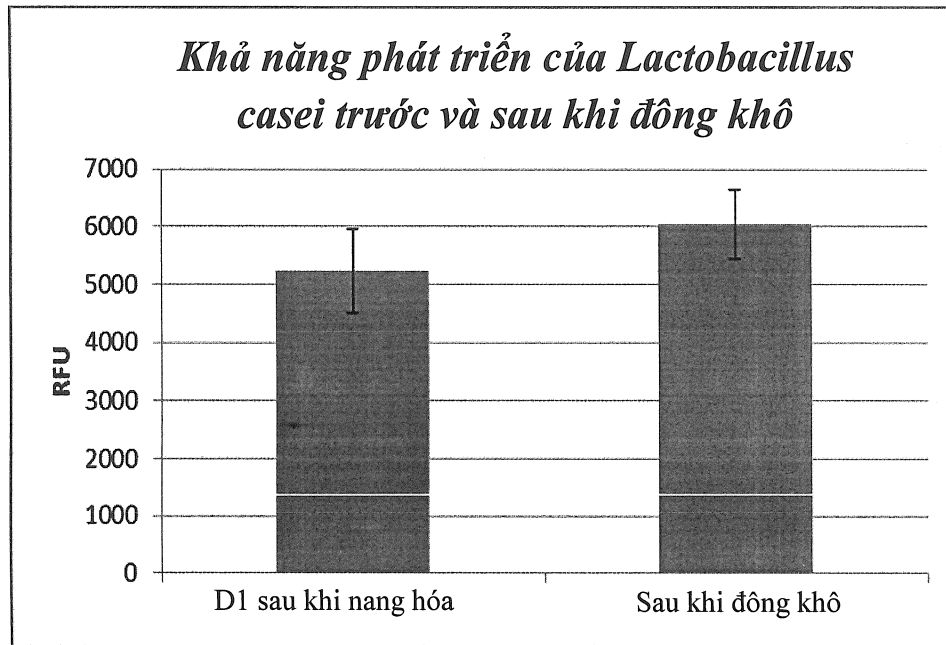


Fig. 12

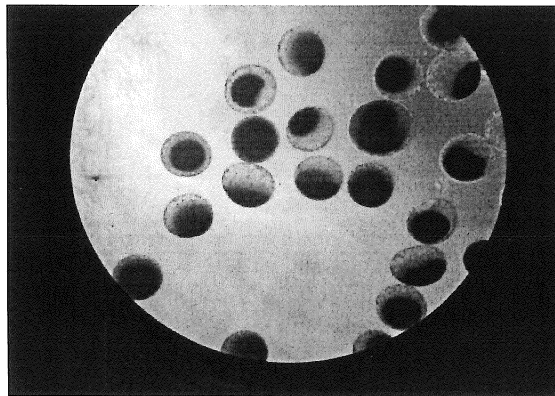


Fig. 13A

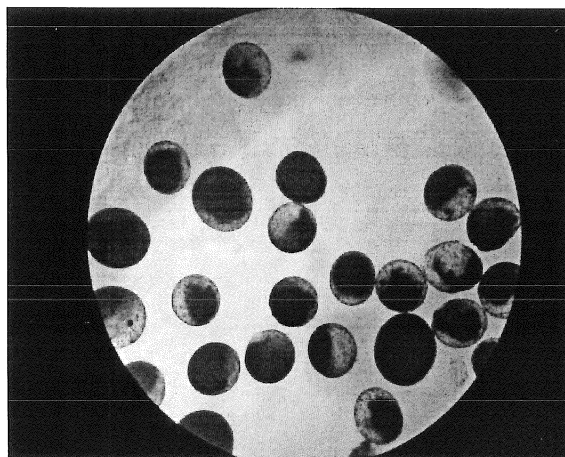
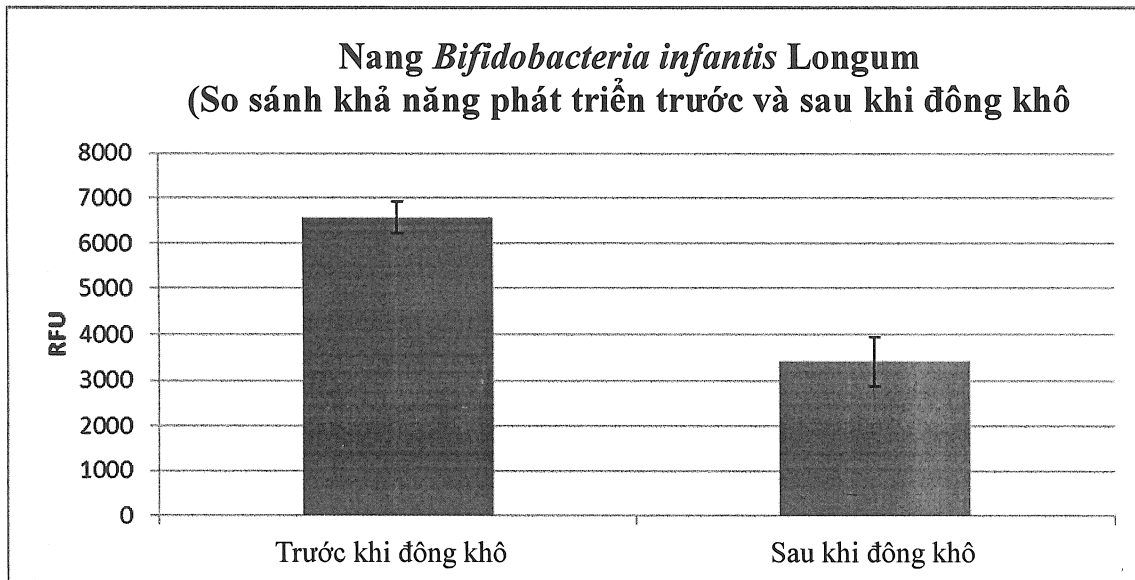


Fig. 13B

**Fig. 14**