



(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)



1-0047659

(51)^{2022.01} C12Q 1/68; A61P 11/00

(13) B

(21) 1-2023-01850

(22) 22/03/2023

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/07/2023 424A

(73) Công ty TNHH LiveSpo Pharma (VN)

Số 22, lô 7,8 khu đô thị Văn Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam

(72) Nguyễn Hòa Anh (VN); Phạm Hồng Thuyết (VN); Trần Thị Mỹ (VN); Nguyễn Văn Hiếu (VN); Nguyễn Thị Vân Anh (VN).

(54) CHẾ PHẨM LỢI KHUẨN ĐƯỜNG HÔ HẤP VÀ CƠ CẤU BỔ SUNG CHẾ
PHẨM LỢI KHUẨN NÀY VÀO KHÔNG KHÍ

(21) 1-2023-01850

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp để bổ sung vào không khí, trong đó chế phẩm này chỉ chứa bào tử của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43. Chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp này an toàn và có lợi cho sức khỏe đường hô hấp của người, cho phép phòng ngừa viêm đường hô hấp đặc biệt là virus cúm. Bằng việc cung cấp trực tiếp bào tử vi khuẩn vào không khí sạch thu được từ máy lọc khí, cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp này cho phép lắp đặt phù hợp với thiết bị lọc khí thông thường và cấp một lượng vi khuẩn hữu ích liên tục cho người sử dụng với nồng độ khoảng từ 10^4 đến 5×10^6 bào tử/m³, giúp cạnh tranh các vi sinh vật có hại và cân bằng hệ vi sinh vật có lợi trong đường hô hấp để chăm sóc nâng cao sức khỏe đường hô hấp và phòng ngừa các bệnh viêm đường hô hấp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh ứng dụng, cụ thể là sáng chế đề cập đến chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp, quy trình sản xuất và cơ cấu để bổ sung chế phẩm lợi khuẩn này vào không khí. Chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế chỉ chứa bào tử vi khuẩn của 03 chủng, *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39, và *Bacillus coagulans* ANA43 theo tỷ lệ thích hợp để bổ sung vào không khí giúp duy trì hệ vi sinh có lợi trong đường hô hấp của người và động vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tình trạng ô nhiễm môi trường không khí đang là vấn đề nan giải của thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng. Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) có đến 92% dân số hiện đang sống trong bầu không khí bị ô nhiễm. Hậu quả của ô nhiễm môi trường không khí đối với con người là rất nghiêm trọng, chúng là tác nhân chính khiến cho tỷ lệ người mắc bệnh về hô hấp, ung thư ngày càng tăng, ô nhiễm môi trường không khí gây ra 7 triệu ca tử vong mỗi năm, trong đó Châu Á - Thái Bình Dương chiếm khoảng 4 triệu ca. Chúng còn khiến tuổi thọ trung bình của mỗi người giảm đi 2 năm, và là nguyên nhân gây tử vong cao thứ 4 trên thế giới sau tăng huyết áp, sử dụng thuốc lá và chế độ ăn uống không lành mạnh. Theo đó ô nhiễm bụi mịn PM 2.5 chính là nguyên nhân gây ra nhiều ca tử vong nhất, bụi mịn (PM 2.5) kết hợp với CO, SO₂, NO₂ có trong không khí gây kích ứng niêm mạc, cản trở hemoglobin kết hợp oxy khiến tế bào thiếu oxy, dẫn đến suy giảm chức năng phổi và làm nặng thêm tình trạng bệnh hen và bệnh tim, đột quỵ não lên tới 25%. Ngoài ra, ô nhiễm môi trường không khí cũng làm gia tăng các tác nhân virus như virus hợp bào hô hấp, virus cúm, cũng như các vi khuẩn như *Streptococcus pneumonia* hoặc *Haemophilus influenza* gây viêm mũi họng, viêm phổi, viêm tiểu phế quản ở người. Đặc biệt, trẻ em dưới 2 tuổi thường là đối tượng chính bị viêm đường hô hấp bởi loại virus này.

Để hạn chế các bụi mịn và các tác nhân gây dị ứng, mùi hôi, nấm mốc, vi khuẩn và virus, việc làm sạch không khí là cần thiết. Hiện nay có 5 loại công nghệ phổ biến được đưa vào các loại máy lọc không khí nhằm loại bỏ ô nhiễm không khí bao gồm:

màng lọc High Efficiency Particulate Air (HEPA), than hoạt tính, tia cực tím, ion âm và ôzôn.

Màng lọc High Efficiency Particulate Air (HEPA): bao gồm một thảm sợi thủy tinh được sắp xếp ngẫu nhiên với đường kính khoảng 0,5 đến 2,0 μm , do đó có thể loại bỏ 99,97% vật chất hạt PM 2.5 và PM 10, phấn hoa, bào tử nấm, hạt bụi, khói thuốc lá và lông thú cưng, an toàn cho người bị dị ứng và hen suyễn. Tuy nhiên, màng lọc HEPA không thể loại bỏ mùi và các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi (VOCs).

Màng lọc than hoạt tính: là than thường hoặc than củi đã được xử lý đặc biệt để đạt hiệu quả cao trong việc hấp thụ phân tử khí. Trước khi than được đưa vào sử dụng trong máy lọc không khí sẽ phải trải qua quá trình nhiệt hóa và chuyển hóa than thành bột than hoạt tính. Cấu trúc lỗ rỗng trong than hoạt tính giúp giữ lại và vô hiệu hóa các phân tử hay các hạt bụi siêu nhỏ. Than hoạt tính có diện tích bề mặt ngoài rất lớn (từ 500 đến 2.500 m^2/g -tương đương với khoảng 260 m^2) nên được coi là một chất lý tưởng để lọc hút nhiều loại hóa chất độc hại cũng như khói hóa học, khí, khói thuốc lá, mùi hôi, loại bỏ formaldehyd có trong đồ gỗ dán, tủ. Tuy vậy, nhược điểm của màng lọc than hoạt tính không thể loại bỏ được bụi phấn hoa, bào tử và vi khuẩn.

Tia cực tím: là sóng điện từ có bước sóng ngắn hơn ánh sáng nhìn thấy nhưng dài hơn tia X, bao gồm: UVA có bước sóng 380-315 nm, hay gọi là sóng dài hay "ánh sáng đen", UVB có bước sóng 315-280 nm- bước sóng trung bình và UVC có bước sóng ngắn hơn 280 nm gọi là sóng ngắn có tính diệt khuẩn nhờ sử dụng năng lượng của các photon cực tím xâm nhập vào màng tế bào của vi sinh vật, tiêu diệt các mầm bệnh, phá hủy các liên kết phân tử axit nucleic, cấu trúc ADN của vi khuẩn, ký sinh trùng, virus và các mầm bệnh khác. Máy lọc khí sử dụng ánh sáng UV diệt khuẩn để bảo trì và yên tĩnh hơn các máy lọc không khí khác. Tuy vậy, một số máy lọc không khí sử dụng ánh sáng tia cực tím có thể phát ra một lượng Ozon gây ô nhiễm không khí và có hại cho sức khỏe, gây ho, khô khè và nghiêm trọng hơn là viêm mô phổi.

Công nghệ ion âm: hiện nay ion âm được tạo ra phổ biến nhờ phương pháp điện ly hay còn gọi là phương pháp ion hóa, dùng điện áp cao để điện ly không khí và tạo ra ion âm, để kết hợp với nhau hạt mang điện tích dương (các chất gây ô nhiễm, khói, bụi, vi khuẩn và chất gây dị ứng lơ lửng) khiến chúng trở nên nặng hơn, rơi xuống đất hoặc dính vào các bề mặt, ngăn chặn sự dịch chuyển lơ lửng đi vào đường hô hấp. Sau đó,

những hạt này được loại bỏ thông qua các hoạt động làm sạch thông thường như hút bụi, quét bụi, lau và rửa. Nếu các hạt được giải phóng trở lại vào không khí, chúng sẽ nhanh chóng bị ion hóa và lắng xuống mặt đất một lần nữa. Từ đó không khí sẽ trở nên sạch sẽ, giảm nhiễm trùng do vi khuẩn gây ra (như *salmonella*). Một nhược điểm của công nghệ ion âm là nó tạo ra một lượng nhỏ Ozon hòa lẫn với không khí, có thể gây ra các vấn đề sức khỏe bao gồm kích ứng mũi, họng và thực quản, tiếp xúc kéo dài với Ozon cũng có thể gây ra bệnh phổi.

Công nghệ Ozon: Ozon có thể gây kích thích đường mũi, kích hoạt hen suyễn, dung tích phổi thấp hơn, cũng có thể gây viêm niêm mạc ngoài phổi. Tuy nhiên, Ozon cũng là một chất làm sạch ô nhiễm không khí hiệu quả cao, nó độc hại hay vô hại tùy thuộc vào cách thức sử dụng, với nồng độ phù hợp và vận hành trong không gian trống, Ozon hoàn toàn có lợi và an toàn. Ozon được sản sinh ra từ các loại máy lọc không khí sẽ nhanh chóng xâm nhập và phá vỡ cấu trúc của các phân tử mùi, loại bỏ mùi và tiêu diệt vi khuẩn- virus nhờ vào khả năng oxy hóa cao. Tuy nhiên, Ozon cũng có cấu trúc không bền, nó nhanh chóng phân rã và tái tạo nên oxy, không sản sinh ra tồn dư hóa chất độc hại. Giới hạn an toàn của nồng độ Ozon đối với các phòng bị chiếm dụng là 0,05 phần triệu, ở mức độ này, Ozon là vô hại. Nhưng khi vượt quá mức này, nó sẽ trở nên nguy hiểm dần dần. Cơ quan quản lý an toàn và sức khỏe nghề nghiệp (OSHA) của Bộ Lao động Hoa Kỳ yêu cầu người lao động không tiếp xúc với hơn 0,10 ppm Ozon trong khoảng thời gian 8 giờ.

Mỗi công nghệ mang trong mình những ưu điểm riêng, nhưng một cơ chế không thể xử lý được toàn bộ những tạp chất ô nhiễm trong không khí. Chính vì lẽ đó, hầu hết các máy lọc không khí hiện đại tích hợp hai công nghệ trở lên, hỗ trợ và bổ sung cho nhau trong cùng một thiết bị, nâng cao hiệu suất và hiệu quả làm sạch, loại bỏ hoàn toàn chất ô nhiễm như chất hạt mịn, aerosol, vi khuẩn, bào tử nấm, virus, lông thú cưng, vảy nến, phấn hoa và các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi (VOCs). Tuy nhiên, khi sử dụng màng lọc để loại bỏ tạp chất, vi khuẩn, virus không đúng cách, môi trường không khí quá ô nhiễm hay màng lọc không được thay định kỳ, màng lọc sẽ chính là nơi cư trú và phát triển của vi khuẩn, virus gây bệnh, điều này vô tình sẽ gây hại cho cơ thể con người khi sử dụng trong thời gian dài. Cộng thêm, tình trạng sử dụng khẩu trang đi đường để tránh bụi bẩn, ô nhiễm và để phòng tránh lây nhiễm các tác nhân gây bệnh tại nơi công cộng

cũng diễn ra khá phổ biến, việc sử dụng khẩu trang tại các địa điểm này diễn ra trong thời gian dài và liên tục và vệ sinh không đúng cách và không thường xuyên thì khẩu trang chính là nguồn ủ và thúc đẩy nguồn lây lan dịch bệnh cho người sử dụng và những người xung quanh (Lee, E.-H.; Chang, Y.; Lee, S.-W. Viability of *Bacillus subtilis* Cells in Airborne Bioaerosols on Face Masks, *Atmosphere*, 12-1496, 2021).

Probiotic là những vi sinh vật có lợi cho vật chủ, đặc biệt là sức khỏe của con người khi được sử dụng với liều lượng thích hợp. Các nghiên cứu gần đây cho thấy bên cạnh vai trò là lợi khuẩn, các probiotic còn giúp bảo vệ và phòng tránh sự viêm nhiễm đường hô hấp bởi chức năng kháng virus và giảm thiểu bội nhiễm vi khuẩn, đặc biệt là probiotic dạng bào tử lợi khuẩn *Bacillus* (Kassaa, New insights on Antiviral Probiotics: From Research to Applications, 1st Ed., Kindle Edition, Springer, 2017). Các giả thuyết về cơ chế kháng virus của probiotic được đưa ra thông qua ba cơ chế phổ biến bao gồm: (1) virus bị bắt giữ thông qua sự tương tác trực tiếp giữa probiotic và virus, (2) probiotic có khả năng sản sinh ra các chất sinh trưởng thứ cấp ức chế sự phát triển của virus, và (3) probiotic kích thích hệ miễn dịch bắt giữ các virus xâm nhập (Lehtoranta et al., Probiotics in respiratory virus infection, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33:1289-1302, 2014).

Một số nghiên cứu chỉ ra rằng probiotic có chứa ba loài *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, và *Lactobacillus fermentum* đã được chứng minh có khả năng giảm thiểu một cách đáng kể các triệu chứng cúm và lượng virus nhiễm trong hệ hô hấp của người. Khi sử dụng theo đường uống với liều ít nhất từ 3×10^6 đến 3×10^7 CFU/ml, probiotic này giúp tăng cường hàm lượng interferon gama (IFN- γ) trong huyết thanh của người bệnh, đồng thời chúng cũng kích thích sự sản sinh globulin A miễn dịch (IgA) trong hệ tiêu hóa (Zhang et al., Prospective study of probiotic supplementation results in immune stimulation and improvement of upper respiratory infection rate. *Synth. Syst. Biotechnol.* 3, 113–120, 2018). Nghiên cứu của Chiba và cộng sự thực hiện trên chuột cho thấy việc sử dụng probiotic có chứa *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 theo đường uống làm giảm nồng độ virus hợp bào hô hấp trong phổi và bảo vệ các tế bào phổi (Chiba et al., Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant mice against respiratory syncytial virus infection. *Int Immunopharmacol* 17:373–382, 2013). Mặc dù các vi khuẩn *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* đã chứng minh nhiều ưu điểm

trong việc phòng ngừa sự xâm nhiễm của virus, các loài vi khuẩn này có nhược điểm là không bền nhiệt trong quá trình bảo quản, vận chuyển dẫn tới độ sống bị suy giảm và tác dụng của sản phẩm bị ảnh hưởng theo thời gian.

Đáng chú ý, một thử nghiệm với cỡ mẫu tương đối lớn ($n = 80$) về hiệu quả của chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* trong việc phòng ngừa sự viêm nhiễm đường hô hấp trẻ em đã được tiến hành. Kết quả thử nghiệm đã cho thấy trẻ em sử dụng *Bacillus clausii* hàng ngày với liều uống 2 ống/ngày, mỗi ống chứa 2×10^9 bào tử thì có thời gian viêm nhiễm đường hô hấp (respiratory infections) giảm còn 11,7 ngày so với 14,37 ngày của nhóm đối chứng (Marseglia et al., Efficacy of *Bacillus clausii* spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study. Therapeutics and Clinical Risk Management 2007;3:13–17, 2007). Trong một nghiên cứu khác trên mô hình động vật, Song và cộng sự (Song, M., et al., Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. Vaccine, 30, 3266-3277, 2012) đã nghiên cứu vai trò của bào tử vi khuẩn *B. subtilis* như một chất mang hấp phụ các hạt virus cúm H5N1 và phức hệ này đóng vai trò như một vacxin kích thích miễn dịch màng nhày ở mũi chuột. Kết quả cho thấy mỗi bào tử *B. subtilis* có thể hấp phụ được tám hạt virus H5N1, và đây rất có thể là nguyên nhân giúp làm giảm khả năng tấn công của virus vào tế bào đích nếu vật chủ nhiễm virus. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu cũng chỉ ra rằng bào tử *B. subtilis* khi sử dụng qua đường nhỏ mũi có khả năng tăng cường hệ miễn dịch tự nhiên thông qua cơ chế: kích hoạt các đại thực bào thông qua con đường tín hiệu Toll-like receptor (TLR) và tập trung các tế bào tiêu diệt tự nhiên đến phổi; kích thích tăng tiết IgA ở màng nhày của mũi, và kích thích sự trưởng thành của tế bào tua thông qua tăng biểu hiện các thụ thể như CD80, CD86, MHC class II.

Gần đây, nhóm tác giả Trần Minh Điền và cộng sự đã chứng minh tác dụng của sản phẩm Livespo Navax dạng xịt mũi chứa 5 tỷ bào tử lợi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 và chủng *Bacillus clausii* ANA39 như là một phương pháp điều trị triệu chứng hiệu quả trong một nghiên cứu lâm sàng đối chứng ngẫu nhiên kéo dài 6 ngày đối với trẻ bị nhiễm RSV ($n = 86$; $n = 40$ /nhóm chứng, và $n = 46$ /nhóm thử nghiệm). Nghiên cứu này đã chứng minh tính an toàn và tác dụng có lợi của hỗn dịch dạng nước chứa bào tử *Bacillus* trong dùng qua đường xịt mũi trong việc làm giảm các triệu chứng điển hình của trẻ nhiễm RSV như chảy nước mũi, khó thở, ral rít ral ẩm, mạch nhanh, do đó rút

ngắn thời gian điều trị 1 ngày và cải thiện hiệu quả điều trị tùy từng triệu chứng trong khoảng 10–50%. Các bào tử *Bacillus* được xịt vào đã ức chế đáng kể sự nhân lên của RSV (630 lần) và vi khuẩn đồng nhiễm *S. pneumoniae* và *H. influenzae* (10^3 – 10^4 lần), do đó làm giảm phản ứng miễn dịch quá mức của tế bào biểu mô để giảm sự tiết quá mức của các cytokine tiền viêm IL-6, IL-8, và TNF- α trong đường mũi khoảng 2,7–12,7 lần (Tran et al., Nasal-spraying *Bacillus* spores as an effective symptomatic treatment for children with acute respiratory syncytial virus infection, Scientific Reports: 12:12402, 2022). Trong một nghiên cứu tương tự, Phùng Thị Bích Thuỷ và cộng sự cũng đã chứng minh tác dụng của sản phẩm Livespo Navax chứa 5 tỷ bào tử lợi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 và chủng *Bacillus clausii* ANA39 trong việc giảm hiệu quả các triệu chứng điển hình ở trẻ nhiễm virus cúm (chảy nước mũi, hạ sốt) giúp rút ngắn thời gian điều trị triệu chứng 1-2 ngày, đồng thời giảm nồng độ virus cúm xuống khoảng 60 lần ($n = 30$; $n = 15$ /nhóm chứng, và $n = 15$ /nhóm thử nghiệm) (Phùng Thị Bích Thuỷ và cộng sự, Bước đầu đánh giá hiệu quả giảm triệu chứng và nồng độ virut cúm ở trẻ em viêm đường hô hấp khi sử dụng sản phẩm LiveSpo Navax dạng xịt chứa bào tử lợi khuẩn *Bacillus*, Tạp chí Y học Dự phòng, T32S.3, 2022).

Việc sử dụng probiotic trực tiếp thông qua đường ăn, uống để phòng ngừa và hỗ trợ điều trị các bệnh về hệ tiêu hóa đã có từ hàng chục năm nay, việc sử dụng probiotic nhằm hỗ trợ và điều trị các bệnh trên đường hô hấp cũng đang được quan tâm rất lớn. Các kết quả nghiên cứu khoa học đã đề cập ở trên và sản phẩm dạng nhỏ mũi và xịt trực tiếp vào mũi bắt đầu được thương mại hoá trên thị trường cho thấy việc bổ sung probiotic trực tiếp vào đường hô hấp là an toàn và có tác dụng hỗ trợ điều trị các bệnh viêm đường hô hấp nhanh và hiệu quả hơn so với sử dụng qua đường uống. Chính vì vậy, chủ động ngăn ngừa các bệnh đường hô hấp bằng cách cung cấp probiotic vào nguồn không khí sạch giúp tăng sức đề kháng tự nhiên của đường hô hấp ở người là một cách tiếp cận có ý nghĩa khoa học và thực tiễn trong công tác chăm sóc sức khỏe hô hấp cho con người, đặc biệt là ở đối tượng người già và trẻ em. Cộng thêm với bối cảnh tình trạng ô nhiễm không khí ngày càng diễn ra nặng nề thì việc sử dụng máy lọc không khí bổ sung các lợi khuẩn để có 2 tác dụng: (1) cạnh tranh với các vi sinh vật có hại bám trên màng lọc khí sử dụng lâu ngày và (2) chủ động bổ sung bào tử lợi khuẩn vào hệ hô hấp là một ý tưởng mới và độc đáo. Việc chế tạo ra cụm cơ cấu bổ sung lợi khuẩn vào máy lọc khí là hướng nghiên cứu hoàn toàn mới trên phạm vi quốc tế và có ý nghĩa ứng dụng thực

tiền trong việc cung cấp nguồn không khí chứa lợi khuẩn để nâng cao sức khỏe đường hô hấp của con người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là sáng chế đề cập đến chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp để bổ sung vào không khí nhằm cân bằng hệ vi sinh trong không khí cho phép xâm nhập vào đường hô hấp của người và động vật để cạnh tranh với vi khuẩn có hại có trong đường hô hấp. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp này và cơ cấu phân tán chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp này vào không khí. Cơ cấu phân tán chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế thích hợp để lắp trong các thiết bị lọc không khí để bổ sung lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế vào không khí.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp để bổ sung vào không khí, trong đó chế phẩm này ở dạng lỏng chỉ chứa bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.1, bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.2, và bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.3 với tổng nồng độ ba loại bào tử này nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml và tỷ lệ tổng lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 so với tổng lượng bào tử *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 gấp từ 10 đến 100 lần, ba chủng vi khuẩn này được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam với số lưu giữ lần lượt là ANA4, ANA39 và ANA43.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến các chủng vi khuẩn lợi khuẩn, trong đó các chủng vi khuẩn này bao gồm vi khuẩn gồm *Bacillus subtilis* ANA4 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.1, vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.2 và vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.3. Các chủng vi khuẩn này được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam với số lưu giữ ANA4, ANA39, ANA43.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, trong đó chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 có số lưu giữ ANA4 tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam được hoạt hóa và nuôi cấy trong môi trường bao gồm pepton đậu nành từ 16 đến 18 g/l, cao nấm men từ 2 đến 4 g/l, đường dextroza từ 1 đến 3 g/l, NaCl từ 4 đến 6 g/l, K_2HPO_4 từ 2 đến 3 g/l, nhiệt độ từ 30°C đến 37°C, tốc độ khuấy từ 100 đến 300 vòng/phút, lượng khí oxi cấp với từ 0,5 đến 5 mM/phút, pH duy trì trong khoảng từ 7,0 đến 8,0, thời gian nuôi cấy từ 1 đến 2 ngày, sau khi thu hồi sinh khối, phá vỡ tế bào bằng dung dịch lysozym và ly tâm thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4;

b) thu bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39, trong đó chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 có số lưu giữ ANA39 tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D/, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam được hoạt hóa và nuôi cấy trong môi trường bao gồm pepton đậu nành từ 16 đến 20 g/l, cao nấm men từ 2 đến 6 g/l, đường dextroza từ 1 đến 3 g/l, NaCl từ 4 đến 8 g/l, KCl từ 0,5 đến 2 g/l, $MgSO_4$ từ 0,5 đến 2 g/l, $Ca(NO_3)_2$ từ 0,5 đến 3 mM, $MnCl_2$ từ 5 đến 15 mM và $FeSO_4$ từ 0,5 đến 2mM, nhiệt độ từ 30°C đến 37°C, tốc độ khuấy từ 200 đến 300 vòng/phút, lượng khí oxi cấp với từ 0,5 đến 3 mM/phút, pH duy trì trong khoảng từ 7,5 đến 8,5, thời gian nuôi cấy từ 2 đến 3 ngày, sau khi thu hồi sinh khối, phá vỡ tế bào bằng dung dịch lysozym và ly tâm thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39;

c) thu bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43, trong đó chủng vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 có số lưu giữ ANA43 tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam được hoạt hóa và nuôi cấy trong môi trường bao gồm cao nấm men từ 2 đến 3 g/l, pepton đậu nành từ 15 đến 17 g/l, NaCl từ 4 đến 5 g/l, đường dextroza từ 1 đến 2 g/l, K_2HPO_4 từ 2 g đến 4 g/l, bổ sung $Ca(NO_3)_2$ từ 0,5 mM đến 5 mM, $MnCl_2$ từ 5 mM đến 20 mM, $FeSO_4$ từ 0,5 mM đến 2 mM, nhiệt độ nuôi cấy từ 30°C đến 50°C, tốc độ khuấy từ 100 đến 200 vòng/phút, tốc độ sục khí

oxy từ 0,5 mM/phút đến 3 mM/phút, pH duy trì trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 trong khoảng từ 2 đến 3 ngày, sau khi thu hồi sinh khối, phá vỡ tế bào bằng dung dịch lysozym và ly tâm thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43; và

d) thu chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp bằng cách phối trộn bào tử vi khuẩn của ba chủng *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 với tỷ lệ tổng lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 so với tổng lượng bào tử *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 gấp từ 10 đến 100 lần, sau khi chuẩn độ bằng nước RO thu được chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp dạng lỏng chỉ chứa ba loại bào tử này nằm với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến cơ cấu phân tán chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo điểm 1 vào không khí, trong đó cơ cấu này bao gồm cụm cấp chế phẩm và cụm phân tán để phân tán chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp vào không khí, trong đó:

cụm cấp chế phẩm bao gồm bơm vi lượng được nối với bình chứa có chứa chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế và bộ điều khiển để bơm chế phẩm lợi khuẩn từ bình chứa này qua màng bông xốp của cụm phân tán nhằm phân tán bào tử lợi khuẩn vào luồng không khí với lượng từ 1×10^4 đến 5×10^6 bào tử/m³;

cụm phân tán bao gồm ống phân tán hình trụ gồm cửa nạp và cửa xả, bên trong được lắp lần lượt màng lọc bụi, màng lọc khử mùi, màng lọc HEPA, màng bông xốp và quạt gió để hút không khí vào một đầu và phân tán chế phẩm lợi khuẩn được bơm vào màng bông xốp để phân tán vào không gian cần cung cấp bào tử lợi khuẩn với lượng cấp từ 1×10^4 - 5×10^6 bào tử/m³;

theo đó, khi vận hành, bộ điều khiển sẽ điều khiển bơm vi lượng bơm chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp chứa trong bình chứa phân tán đều lên màng bông xốp theo lưu lượng của quạt gió, đồng thời không khí được hút qua cửa nạp, lần lượt đi qua màng lọc bụi, màng lọc khử mùi, màng lọc HEPA và qua màng bông xốp để phân tán bào tử vi khuẩn có trên màng bông xốp này qua cửa xả vào không khí;

khác biệt ở chỗ bình chứa chứa chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp chỉ chứa bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và bào tử

sống của vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 với tỷ lệ tổng lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 so với tổng lượng bào tử *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 gấp từ 10 đến 100 lần, tổng lượng bào tử có trong chế phẩm này là khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml và lượng bào tử được phân tán qua cửa xả vào không khí là từ 1×10^4 - 5×10^6 bào tử/m³.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó cụm phân tán còn có dàn trao đổi nhiệt bố trí trước màng bông xốp để duy trì nhiệt độ không khí cấp nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C trước khi đi qua màng bông xốp để phân tán bào tử lợi khuẩn vào không khí.

Theo một phương án thay thế, trong đó màng bông xốp được thay thế bằng vòi phun sương để cấp chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp vào không khí ở dạng sương mù.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bình chứa có thể tháo lắp thông qua các ren nối hoặc khớp nối để có thể dễ dàng thay thế, bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp.

Sáng chế còn đề cập đến thiết bị lọc không khí, trong đó thiết bị này có bổ sung cơ cấu phân tán chế phẩm lợi khuẩn vào không khí theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình vẽ sơ đồ nguyên tắc của cụm cấp chế phẩm của cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp vào không khí theo sáng chế.

Hình 2 là hình vẽ sơ đồ nguyên tắc một phương án thực hiện của thiết bị lọc không khí có lắp cơ cấu phân tán chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế. Trong đó thiết bị này có bố trí dàn trao đổi nhiệt để điều hòa không khí.

Hình 3 là hình vẽ sơ đồ nguyên tắc cơ cấu phân tán chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp vào không khí sử dụng màng bông xốp để phân tán bào tử chế phẩm lợi khuẩn vào không khí.

Hình 4 là ảnh chụp bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 (A), *Bacillus clausii* ANA39 (B), và *Bacillus coagulans* ANA43 (C) thu được sau khi ly tâm dịch ly giải tế bào nuôi cấy tương ứng.

Hình 5 là ảnh chụp khuẩn lạc của kết quả nuôi cấy vi khuẩn trong không khí, trong đó: (A) kết quả nuôi cấy xác định vi khuẩn có trong không khí sau khi lọc qua màng lọc

HEPA, (B) kết quả nuôi cấy xác định vi khuẩn lơ lửng trong không khí được phân tán bởi cơ cấu phân tán chế phẩm lợi khuẩn trong không khí; và (C) kết quả nuôi cấy xác định vi khuẩn phân tán trong không khí ở cửa xả sau của cơ cấu phân tán chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế.

Hình 6 là ảnh chụp các cơ quan nội tạng của mẫu thử nghiệm, trong đó cho thấy không có biểu hiện khác thường về hình dạng bên ngoài, màu sắc của các tổ chức tim, phổi, gan, lách, thận, dạ dày, ruột của các thử nghiệm: (A) nhóm đối chứng; (B) nhóm thử nghiệm liều $1,68 \times 10^9$ bào tử lợi khuẩn/ngày; (C) nhóm thử nghiệm liều $8,4 \times 10^9$ bào tử lợi khuẩn/ngày được cho uống liên tục trong 28 ngày.

Hình 7 là hình ảnh giải phẫu mô bệnh học quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400 lần của (1) gan và (2) thận của thử nghiệm thuộc: (A) nhóm đối chứng; (B) nhóm thử nghiệm liều $1,68 \times 10^9$ bào tử lợi khuẩn/ngày; (C) nhóm thử nghiệm liều $8,4 \times 10^9$ bào tử lợi khuẩn/ngày và được cho uống liên tục trong 28 ngày: Tiêu bản gan và thận được cố định bằng formalin 10 %, nhuộm bằng dung dịch nhuộm Hematoxylin Eosin (HE).

Hình 8 là ảnh chụp mắt của thử nghiệm, kết quả cho thấy không có hiện tượng bất thường về giác mạc, móng mắt, kết mạc và tiết dịch của thử nghiệm: (A) nhóm đối chứng, và (B) nhóm thử nghiệm với liều nhỏ 1×10^8 bào tử lợi khuẩn (trương đương 0,1 ml hỗn dịch) vào túi kết mạc, sau đó theo dõi ở các thời điểm: (1) trước khi nhỏ, (2) ngay sau khi nhỏ, (3) sau khi nhỏ 1 giờ, (4) sau khi nhỏ 24 giờ, (5) sau khi nhỏ 48 giờ, (6) sau khi nhỏ 72 giờ và (7) sau khi nhỏ 7 ngày.

Hình 9 là ảnh chụp niêm mạc mũi tất cả thử nghiệm cho thấy không có hiện tượng khác thường ở tiêu bản mô bệnh học niêm mạc mũi của thử nghiệm: (A) nhóm đối chứng, (B) nhóm thử nghiệm liều $2,4 \times 10^9$ bào tử lợi khuẩn/ngày tại 4 vị trí cắt niêm mạc (1); (2); (3) và (4) được xịt liên tục trong vòng 21 ngày.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể có viện dẫn đến các hình vẽ, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết sáng chế và các ví dụ minh họa cụ thể chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp để bổ sung vào không khí, trong đó chế phẩm này ở dạng lỏng chỉ chứa bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.1, bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.2, và bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.3. Chế phẩm này chứa tổng nồng độ ba loại bào tử vi khuẩn nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml. Tỷ lệ tổng lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 so với tổng lượng bào tử *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 gấp từ 10 đến 100 lần. Ba chủng vi khuẩn sinh bào tử này được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam với số lưu giữ lần lượt là ANA4, ANA39, và ANA43.

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 được phân lập và lưu giữ dưới dạng chủng giống gốc. Trong đó chủng vi khuẩn này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam với số lưu giữ ANA4.

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 là chủng vi khuẩn thuộc họ *Bacillus* được phân lập từ ruột tôm. Chủng này có khuẩn lạc mọc trên môi trường Luria Bertani (môi trường LB), pH 7,4, có hình thái xù xì, mép răng cưa, khuẩn lạc có màu trắng kích thước khoảng 3-5 mm. Vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 là vi khuẩn Gram dương, hình que, kích thước chiều ngang khoảng 1 μm . Vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 có bào tử rất bền nhiệt, độ sống giữ được 50% khi xử lý ở 80°C trong 20 phút. Bào tử của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 nảy mầm nhanh khi được cấy vào môi trường có chất dinh dưỡng, phát triển tốt trong các môi trường nuôi cấy thông thường, cụ thể là môi trường LB, Difco Sporulation Medium (DSM), Trypton Soy Broth (TSB) pH từ 7,0 đến 8,0. Hình ảnh bào tử *Bacillus subtilis* ANA4 tinh khiết sau khi thu được bằng cách ly giải tế bào sau khi nuôi ở môi trường DSM được thể hiện trên Hình 4A.

Các thử nghiệm đánh giá về điều kiện nuôi cấy cho thấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 có khả năng sinh trưởng rất nhanh ở nhiệt độ 37°C trong môi trường hiếu khí và chậm ở môi trường kỵ khí, mọc được ở môi trường có muối NaCl nồng độ cao lên tới

6,5%. Vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 này có khả năng tạo màng sinh học nhanh giúp liên kết các tế bào với nhau hiệu quả, và có tính chất đối kháng khá mạnh hai loài vi khuẩn gây bệnh đường hô hấp trên là *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenza*. Ngoài ra, chủng này có khả năng sản sinh tốt một số enzym như amylaza, caseinaza, gelatinaza; tiếp theo là catalaza và lipaza.

Các thử nghiệm *in vitro* cho thấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 phân lập được theo sáng chế là an toàn, không sinh độc tố và vi khuẩn này có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.1. Hiện chủng vi khuẩn này đang được lưu giữ với mã số ANA4 tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam.

Chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 theo sáng chế là chủng vi khuẩn thuộc họ *Bacillus* được phân lập từ ruột gà. Chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 này có khuẩn lạc màu vàng nhạt mọc trên môi trường LB (Luria-Bertani), pH tối ưu từ 7,5 đến 8,5, đường kính khuẩn lạc khoảng từ 1 đến 3 mm viền nhẵn, bề mặt bóng. Vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 là vi khuẩn Gram dương hình que, kích thước chiều ngang khoảng 1 μ m, sống trong môi trường kỵ khí hiếu khí tùy nghi. Môi trường thích hợp để phát triển là môi trường LB, DSM, TSB ở pH 7,5 đến 8,5. Hình ảnh bào tử lợi khuẩn tinh sạch của chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 này được thể hiện trên Hình 4B. Chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 này có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.2 được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam với số lưu giữ ANA39.

Các thử nghiệm đánh giá về điều kiện phát triển của vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 cho thấy chúng sinh trưởng tốt ở nồng độ muối cao NaCl 8% ở nhiệt độ thông thường 37°C. Tuy nhiên, chúng bị ức chế khi ở nồng độ muối cao NaCl 6,5% và nhiệt độ cao lên tới 50°C. Chủng vi khuẩn này có khả năng phát triển tốt trong cả điều kiện kỵ khí và hiếu khí, pH hơi kiềm, tạo màng sinh học ở mức độ trung bình. Ngoài ra, chủng này có khả năng sản sinh amylaza tốt, tiếp đến là caseinaza, lipaza và cũng có khả năng sản sinh catalaza và gelatinaza với lượng thấp.

Các thử nghiệm *in vitro* cho thấy chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 theo sáng chế, không sinh độc tố, không gây tan huyết và mặc dù kháng lại hai loại kháng

sinh clindamycin và erythromycin trong số 13 loại kháng sinh khảo sát, nhưng không chứa plasmit mang gen kháng chất kháng sinh, chứng tỏ chủng có tính chất kháng kháng sinh tự nhiên hay nội sinh mà không phải do nhận vận chất di truyền từ bên ngoài. Kết quả phân tích trình tự 16S rARN trên ngân hàng gen với trình tự 16S rARN của chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 nêu trong SEQ ID NO.2 cho thấy đây là một chủng mới, có độ tương đồng trình tự 16S rARN so với chủng gần nhất trong cây phân loại là *Bacillus clausii* UBBC07 với mức độ tương đồng là 99,8%. Chủng *Bacillus clausii* UBBC07 là một chủng đã được đánh giá về độ an toàn và đã chứng tỏ an toàn với người và động vật (Sudha và cộng sự: Sudha MR, Bhonagiri S, Kumar MA. (2013), Efficacy of *Bacillus clausii* strain UBBC-07 in the treatment of patients suffering from acute diarrhoea. *Beneficial Microbes*, 4(2):211-6). Ngoài ra, kết quả phân tích hệ gen cho thấy chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 không chứa gen mã hóa độc tố nên không có khả năng gây độc hoặc kích thích niêm mạc của người và động vật khi sử dụng.

Chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 có khả năng tạo bào tử với độ bền nhiệt cao, bào tử này có khả năng chịu được nhiệt độ lên tới 65°C trong 20 phút, và có độ sống ổn định ít nhất 24 tháng trong điều kiện nhiệt độ môi trường. Chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 có số lưu giữ ANA39 và được bảo quản ở dạng bào tử đông khô đựng trong tủ âm sâu -30°C tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7,8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam.

Chủng vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 là chủng vi khuẩn thuộc họ *Bacillus*, chủng này có khuẩn lạc mọc trên môi trường DeMan, Rogosa and Sharpe (MRS), pH từ 5,0 đến 6,5, có màu trắng, mép tròn, kích thước khoảng 1-3 mm, bề mặt bóng. Vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 là vi khuẩn Gram dương, hình que, kích thước chiều ngang khoảng 1 µm. Vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 có bào tử bền nhiệt, độ sống giữ được 80% khi xử lý ở 70°C trong 20 phút. Bào tử của vi khuẩn này nảy mầm nhanh thành vi khuẩn khi được cấy vào môi trường có chất dinh dưỡng, phát triển tốt trong các môi trường nuôi cấy thông thường như MRS. Vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 thể hiện khả năng kháng *Streptococcus pneumoniae* gây viêm đường hô hấp. Hình ảnh bào tử của chủng vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 này được thể hiện trên Hình 4C.

Các thử nghiệm đánh giá về điều kiện nuôi cấy cho thấy vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 này sinh trưởng tốt ở nhiệt độ từ 30°C đến 50°C và là vi khuẩn tùy nghi, có khả năng phát triển được cả trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí, ở pH acid nhẹ và trung tính, hỗ trợ cho các vi sinh vật có lợi ở niêm mạc đường hô hấp phát triển.

Các thử nghiệm đánh giá *in vitro* cho thấy, vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 phân lập được an toàn, không sinh độc tố và không chứa plasmit mang gen kháng kháng sinh. Kiểm tra kết quả trên cây phân loại và so sánh trình tự 16S trên ngân hàng gen cho thấy chủng vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 là một chủng mới, có độ tương đồng trình tự 16S rARN so với chủng gần nhất trong cây phân loại là *Bacillus coagulans* ATCC 7050 là 99,8%. Chủng vi khuẩn này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO3. Hiện chủng vi khuẩn này đang được lưu giữ với mã ANA43 tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7,8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam.

Bào tử của các vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 này thu được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 riêng rẽ để sinh khối tích tụ bào tử, sau đó ly giải phá vỡ tế bào sinh dưỡng, thu bào tử tinh sạch.

Các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39, *Bacillus coagulans* ANA43 trải qua quá trình phân lập, sàng lọc và tuyển chọn dựa trên các tiêu chí: (i) có khả năng tạo màng sinh học cao, (ii) phát triển nhanh và tạo bào tử với hiệu suất cao, (iii) tiết ra các chất kháng khuẩn có tác dụng ức chế vi khuẩn gây bệnh đường hô hấp, (iv) kích thích miễn dịch tự nhiên ở đường hô hấp. Sau quá trình phân lập, tuyển chọn các tác giả đã thu được ba chủng vi khuẩn thuộc loài *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, và *Bacillus coagulans* có hoạt tính vượt trội. Các chủng này được kiểm tra bằng các giải trình tự 16S rARN và so sánh với ngân hàng gen. Trình tự 16S rARN của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 nêu trong SEQ ID NO.1 và *Bacillus clausii* ANA39 nêu trong SEQ ID NO.2, và *Bacillus coagulans* ANA43 nêu trong SEQ ID NO.3. Các chủng vi khuẩn này được lưu giữ với mã ANA4, ANA39, và ANA43, tương ứng.

Các tác giả đã thử nghiệm và thấy rằng, để phát triển cạnh tranh và tạo hệ vi sinh vật tốt trong đường hô hấp nhằm ức chế các vi sinh vật kích ứng gây bệnh hệ đường hô hấp, ví dụ vi khuẩn gây ra bệnh phế cầu thì để cạnh tranh cần bổ sung một lượng vi

khuẩn lợi khuẩn đường hô hấp theo tỷ lệ và lượng nhất định để chúng có thể phát triển, cạnh tranh và lập được một hệ vi sinh khỏe mạnh trong đường hô hấp. Lượng bào tử vi khuẩn được sử dụng tính theo lượng bào tử hữu ích, nghĩa là lượng bào tử sống, có khả năng phát triển thành vi khuẩn hoàn chỉnh và có thể sống sót và tạo màng sinh học cạnh tranh dinh dưỡng với các vi khuẩn này. Lượng bào tử sống được xác định trên cơ sở pha loãng theo loạt và cấy lên môi trường thạch, dựa trên lượng khuẩn lạc thu được để tính ra lượng bào tử sống.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4; b) thu bào tử thu bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39; c) thu bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43; và d) thu chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp.

Trong bước thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 là bào tử thu được từ chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4. Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 giống gốc được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam với số lưu giữ ANA4.

Chủng giống gốc *Bacillus subtilis* ANA4 này được hoạt hóa bằng cách cấy vào môi trường LB trong điều kiện lắc. Nhiệt độ nuôi cấy trong khoảng từ 30°C đến 37°C trong khoảng từ 16 giờ đến 24 giờ để hoạt hóa chủng giống *Bacillus subtilis* ANA4. Vi khuẩn giống gốc có thể là chủng được nuôi cấy, lưu giữ trong điều kiện lưu thông thường hoặc có thể ở dạng đông sâu trong nitơ lỏng. Trường hợp bảo quản đông sâu, trước khi hoạt hóa, chủng giống gốc này cần được tan đông và cấy lên môi trường phục hồi để thu khuẩn lạc trước khi cấy hoạt hóa chủng giống gốc *Bacillus subtilis* ANA4. Lượng vi khuẩn có trong môi trường hoạt hóa sau khi nuôi cấy đạt khoảng 2×10^9 tế bào/ml.

Sau khi hoạt hóa, chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 được nuôi cấy trong môi trường thích hợp để tăng sinh khối và tích tụ bào tử. Các thành phần môi trường này được hòa với nước RO đến nồng độ xác định, cụ thể cao nấm men từ 2 đến 4 g/l, pepton đậu nành từ 16 đến 18 g/l, NaCl từ 4 đến 6 g/l, đường dextroza từ 1 đến 3g/l, K_2HPO_4 từ 2 đến 3 g/l. Sau khi hòa tan thành phần môi trường nuôi cấy, tiến hành chỉnh pH về khoảng từ 7,0 đến 8,0 rồi khử trùng môi trường ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 120°C

đến 130°C trong khoảng từ 10 phút đến 15 phút, môi trường sau khi khử trùng được để nguội thu được môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy này được sử dụng để nuôi cấy sinh khối vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4.

Để nuôi cấy thu sinh khối vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 sau khi hoạt hóa được chuyển vào môi trường nuôi cấy và lên men nuôi cấy ở nhiệt độ từ 30°C đến 37°C, tốc độ khuấy từ 100 đến 300 vòng/phút, lượng khí oxy cấp với từ 0,5 đến 5 mM/phút, pH duy trì trong khoảng từ 7,0 đến 8,0, thời gian nuôi cấy từ 1 đến 2 ngày, sau khi thu hồi sinh khối, phá vỡ tế bào bằng dung dịch lysozym và ly tâm thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4.

Quá trình nuôi cấy thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 được thực hiện bằng cách bổ sung dịch nuôi cấy chủng giống *Bacillus subtilis* ANA4 đã được hoạt hóa vào môi trường nuôi cấy đã được khử trùng ở trên. Tỷ lệ dịch nuôi cấy chủng giống *Bacillus subtilis* ANA4 đã được hoạt hóa với môi trường nuôi cấy là từ 0,5 đến 10% (thể tích/thể tích). Sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ từ 30°C đến 37°C, tốc độ khuấy từ 100 đến 300 vòng/phút, tốc độ sục khí oxy từ 0,5 mM/phút đến 5 mM/phút, pH duy trì trong khoảng từ 7,0 đến 8,0. Thời gian nuôi cấy được duy trì trong khoảng từ 1 đến 2 ngày để vi khuẩn sinh trưởng, phát triển nhằm thu sinh khối. Bằng thực nghiệm, các tác giả đã nhận thấy rằng, với điều kiện nuôi cấy nêu trên, thời gian nuôi cấy từ 1 đến 2 ngày, vi khuẩn sẽ chuyển sang giai đoạn tích lũy, tạo bào tử, do đó lượng bào tử thu được sẽ là tốt nhất.

Để thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, cần loại bỏ tế bào sinh dưỡng, cụ thể là sau khi lên men, dịch nuôi cấy được ly tâm để thu sinh khối chứa bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4. Quá trình này có thể được thực hiện bằng cách ly tâm hoặc lọc để thu sinh khối. Theo một phương án ưu tiên, quá trình thu sinh khối được thực hiện bằng cách ly tâm. Sinh khối được thu hồi và rửa bằng dung dịch đệm Tris HCl. Dung dịch đệm Tris HCl sử dụng để rửa sinh khối vi khuẩn có pH từ 7,5 đến 8,5, nồng độ 10 mM đến 100 mM để rửa sạch và gây kích ứng tạo bào tử. Tiếp đó sinh khối được ủ với lysozym nồng độ từ 5 µg/ml đến 50 µg/ml để phá vỡ lớp màng tế bào sinh dưỡng. Bằng cách ủ sinh khối trong môi trường chứa lysozym trong khoảng từ 10 phút đến 60 phút ở nhiệt độ từ 25°C đến 30°C, màng tế bào được phá vỡ, giải phóng bào tử. Tiếp đó rửa loại màng tế bào bằng nước muối KCl hoặc NaCl nồng độ từ 500 mM đến 1M với tỷ lệ

từ 1:2 đến 1:20 (thể tích/thể tích). Sau mỗi quá trình rửa, lọc thu bào tử và rửa lại bằng nước muối từ 2 đến 3 lần. Cuối cùng rửa lại bằng nước tinh sạch từ 1 đến 2 lần thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 đậm đặc có nồng độ khoảng $1 \times 10^9 - 5 \times 10^{11}$ bào tử/ml. Bào tử này có thể được bảo quản ở dạng lỏng trong tủ lạnh âm sâu -20°C đến -80°C trong vòng 6 tháng, hoặc đông khô nếu bảo quản lâu dài trước khi sử dụng phối trộn để tạo chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế.

Trong bước thu bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39, bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 là bào tử thu được từ chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39. Chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 giống gốc được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam với số lưu giữ ANA39.

Chủng giống gốc vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 này được hoạt hóa bằng cách cấy vào môi trường LB bổ sung 5% KCl trong điều kiện lắc. Nhiệt độ nuôi cấy trong khoảng từ 30 đến 37°C trong từ 1 đến 2 ngày để hoạt hóa chủng giống *Bacillus clausii* ANA39. Vi khuẩn giống gốc có thể là chủng được nuôi cấy, lưu giữ trong điều kiện lưu thông thường hoặc có thể ở dạng đông sâu trong Nitơ lỏng. Trường hợp bảo quản đông sâu, trước khi hoạt hóa, chủng giống gốc này cần được tan đông và cấy lên môi trường phục hồi để thu khuẩn lạc trước khi cấy hoạt hóa chủng giống vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39. Lượng vi khuẩn có trong môi trường hoạt hóa sau khi nuôi cấy đạt khoảng 4×10^8 tế bào/ml.

Sau khi hoạt hóa, chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 được nuôi cấy trong môi trường thích hợp để tăng sinh khối và tích tụ bào tử. Môi trường nuôi cấy bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 thích hợp được sử dụng theo sáng chế bao gồm cao nấm men từ 2 đến 6 g/l, pepton đậu nành từ 16 đến 20 g/l, NaCl từ 4 đến 8 g/l, dextroza từ 1 đến 3 g/l KCl từ 0,5 đến 2 g/l, MgSO_4 từ 0,5 đến 2 g/l. Sau khi hòa tan các thành phần môi trường nuôi cấy, chỉnh pH trong khoảng từ 7,5 đến 8,5 rồi tiến hành khử trùng môi trường ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 120°C đến 130°C trong khoảng từ 10 phút đến 15 phút. Môi trường sau khi khử trùng được để nguội. Tiếp đó, bổ sung $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ từ 0,5 mM đến 3 mM, MnCl_2 từ 5 mM đến 15 mM, FeSO_4 từ 0,5 mM đến 2 mM ở dạng vô trùng vào môi trường này thu được môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy này được sử dụng để nuôi cấy sinh khối vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39.

Để nuôi cấy thu sinh khối vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39, vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 sau khi hoạt hóa được chuyển vào môi trường nuôi cấy và lên men nuôi cấy ở nhiệt độ từ 30°C đến 37°C, tốc độ khuấy từ 200 đến 300 vòng/phút, lượng khí oxy cấp với từ 0,5 đến 3 mM/phút. Trong quá trình lên men, duy trì pH trong khoảng từ 7,5 đến 8,5. Thời gian nuôi cấy từ 2 đến 3 ngày ly tâm thu sinh khối. Sau khi thu hồi sinh khối, để thu bào tử, tiến hành phá vỡ tế bào bằng dung dịch lysozym và ly tâm thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39.

Bằng thực nghiệm, các tác giả đã nhận thấy rằng, với điều kiện nuôi cấy nêu trên, thời gian nuôi cấy từ 2 đến 3 ngày, vi khuẩn sẽ chuyển sang giai đoạn tích lũy, tạo bào tử, do đó lượng bào tử thu được sẽ là tốt nhất.

Để thu bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39, cần loại bỏ tế bào sinh dưỡng, cụ thể là sau khi lên men, dịch nuôi cấy được ly tâm để thu sinh khối chứa bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39. Quá trình này có thể được thực hiện bằng cách ly tâm hoặc lọc để thu sinh khối. Theo một phương án ưu tiên, quá trình thu sinh khối được thực hiện bằng cách ly tâm. Sinh khối được thu hồi và rửa bằng dung dịch đệm Tris HCl. Dung dịch đệm Tris HCl được sử dụng để rửa sinh khối vi khuẩn có pH từ 7,5 đến 8,5, nồng độ 10 mM đến 100 mM để rửa sạch và gây kích ứng tạo bào tử. Tiếp đó, sinh khối được ủ với lysozym nồng độ từ 5 µg/ml đến 50 µg/ml để phá vỡ lớp màng tế bào sinh dưỡng. Bằng cách ủ sinh khối trong môi trường chứa lysozym trong khoảng từ 10 phút đến 60 phút ở nhiệt độ từ 25°C đến 30°C, màng tế bào được phá vỡ, giải phóng bào tử. Tiếp đó, rửa loại màng tế bào bằng nước muối KCl hoặc NaCl nồng độ từ 500 mM đến 1 M với tỷ lệ từ 1:2 đến 1:20 (thể tích/thể tích). Sau mỗi quá trình rửa, lọc thu bào tử và rửa lại bằng nước muối từ 2 đến 3 lần. Cuối cùng rửa lại bằng nước tinh sạch từ 1 đến 2 lần thu được dung dịch bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 đậm đặc có nồng độ khoảng $1 \times 10^8 - 1 \times 10^{11}$ bào tử/ml. Bào tử này có thể được bảo quản ở dạng lỏng trong tủ lạnh âm sâu -20°C đến -80°C trong vòng 6 tháng, hoặc có thể đông khô nếu bảo quản lâu dài trước khi sử dụng phối trộn để tạo chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế.

Trong bước thu bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43, bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 là bào tử thu được từ chủng vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43. Chủng vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 giống gốc được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D/, số 22, lô 7, 8 khu

đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam với số lưu giữ ANA43.

Chủng giống gốc vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 này được hoạt hóa bằng cách cấy chủng giống gốc vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 vào môi trường MRS trong điều kiện lắc, nhiệt độ khoảng từ 30°C đến 50°C trong từ 1 đến 2 ngày để thu được chủng giống *Bacillus coagulans* ANA43 được hoạt hóa. Vi khuẩn giống gốc có thể là chủng được nuôi cấy, lưu giữ trong điều kiện lưu thông thường hoặc có thể ở dạng đông sâu trong nitơ lỏng. Trường hợp bảo quản đông sâu, trước khi hoạt hóa, chủng giống gốc này cần được tan đông và cấy lên môi trường phục hồi để thu khuẩn lạc trước khi cấy hoạt hóa chủng giống vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43. Lượng vi khuẩn có trong môi trường hoạt hóa sau khi nuôi cấy đạt khoảng 5×10^8 tế bào/ml.

Sau khi hoạt hóa, chủng vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 được nuôi cấy trong môi trường thích hợp để tăng sinh khối và tích tụ bào tử. Môi trường nuôi cấy *Bacillus coagulans* ANA43 được chuẩn bị bằng cách hòa với nước RO các thành phần bao gồm cao nấm men từ 2 đến 3 g/l, pepton đậu nành từ 15 đến 17 g/l, NaCl từ 4 đến 5 g/l, đường dextroza từ 1 đến 2 g/l, K_2HPO_4 từ 2 g đến 4 g/l, sau khi khử trùng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 120°C đến 130°C trong khoảng từ 10 phút đến 15 phút, để nguội đến khoảng 50°C, bổ sung $Ca(NO_3)_2$ từ 0,5 mM đến 5 mM, $MnCl_2$ từ 5 mM đến 20 mM, $FeSO_4$ từ 0,5 mM đến 2 mM thu được môi trường nuôi cấy *Bacillus coagulans* ANA43.

Quá trình nuôi cấy thu bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 được thực hiện bằng cách bổ sung dịch nuôi cấy chủng giống *Bacillus coagulans* ANA43 đã được hoạt hóa vào môi trường nuôi cấy theo tỷ lệ từ 2 đến 10% (thể tích/thể tích), sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ từ 30°C đến 50°C, tốc độ khuấy từ 100 đến 200 vòng/phút, tốc độ sục khí oxy từ 0,5 mM/phút đến 3 mM/phút, pH duy trì trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 trong khoảng từ 2 đến 3 ngày để vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 phát triển sinh khối và tích tụ bào tử.

Để thu bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43, tiến hành ly tâm hoặc lọc để thu sinh khối, tiếp đó rửa sinh khối bằng dung dịch đệm Tris HCl, pH từ 7,5 đến 8,5, nồng độ 10 mM đến 100 mM rồi ủ với lysozym nồng độ từ 5 µg/ml đến 50 µg/ml trong khoảng từ 10 phút đến 60 phút ở nhiệt độ từ 25°C đến 30°C, sau đó rửa bằng nước muối KCl hoặc NaCl nồng độ từ 500 mM đến 1M với tỷ lệ từ 1:2 đến 1:20 (trọng lượng/thể

tích) để phá vỡ tế bào, sau khi rửa lại bằng nước RO để loại tạp chất, thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43. Bào tử này có thể được bảo quản ở dạng lỏng trong tủ lạnh âm sâu -20 °C đến -80°C trong vòng 6 tháng, hoặc có thể đông khô nếu bảo quản lâu dài trước khi sử dụng phối trộn để tạo chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế.

Trong bước thu chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp bằng cách phối trộn bào tử vi khuẩn bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39, và *Bacillus coagulans* ANA43 với tỷ lệ tổng lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 so với tổng lượng bào tử *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 gấp từ 10 đến 100 lần. Tiếp đó, chuẩn độ bằng cách pha loãng bằng nước RO thu được chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp dạng lỏng chỉ chứa ba loại bào tử này nằm với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml.

Các tác giả đã nghiên cứu và nhận thấy rằng, để có hiệu quả tốt đến hệ vi sinh đường hô hấp, thì ngoài việc các vi sinh vật bổ sung phải tạo màng sinh học nhanh để bám được trên các niêm mạc mũi, các vi sinh vật này cần phải tác dụng hiệp đồng để bất hoạt và ức chế cạnh tranh với các virus, vi khuẩn gây hại, đồng thời điều hoà được việc tiết quá mức của các cytokine tiền viêm gây hiện tượng viêm ngạt mũi. Do đó, ngoài việc sử dụng các bào tử của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39, và *Bacillus coagulans* ANA43 thì cần có tỷ lệ phối trộn thích hợp để có được tác dụng hiệp đồng này. Cụ thể là các bào tử vi khuẩn thu được ở trên có nồng độ khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml được phối chế với nhau sao cho tỷ lệ lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 so với tổng lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 là gấp từ 10 đến 100 lần.

Theo các phương án ưu tiên cụ thể, trong đó chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế có lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 đạt ít nhất 5×10^9 bào tử/ml và lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 đạt ít nhất 5×10^7 bào tử/ml. Chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp thu được ở dạng lỏng, màu trắng ngà.

Sáng chế còn đề cập đến cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế vào không khí. Cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn này nhằm cấp một lượng vi khuẩn có trong chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp vào không khí để xâm nhập vào hệ hô hấp của người và động vật nhằm hỗ trợ duy trì hệ vi sinh đường hô hấp khỏe mạnh, giúp

tránh được những tác hại do vi khuẩn gây hại phát triển quá mức trong đường hô hấp gây ra, ví dụ như viêm mũi, họng, cúm.

Cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế vào không khí theo sáng chế bao gồm cụm cấp chế phẩm và cụm phân tán để phân tán chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp vào không khí. Sơ đồ nguyên lý của cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế được thể hiện trên Hình 3. Trong đó, cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế bao gồm cụm cấp chế phẩm 10 và cụm phân tán 20 để phân tán chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế vào không khí.

Cụm cấp chế phẩm 10 của cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế như được thể hiện trên Hình 1 bao gồm bơm vi lượng 11 được nối với bình chứa 12 chứa chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế. Bộ điều khiển 13 điều khiển bơm vi lượng 11 bơm chế phẩm lợi khuẩn từ bình chứa 12 vào màng bông xốp 25 của cụm phân tán 20 dựa trên lưu lượng không khí được hút bởi quạt gió 20 nhằm phân tán bào tử lợi khuẩn vào luồng không khí. Tốt hơn là lượng bào tử lợi khuẩn được phân tán vào luồng không khí được hút bởi quạt gió 20 là từ 1×10^4 đến 5×10^6 bào tử/ m^3 .

Bình chứa 12 chứa chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp, trong đó chế phẩm này chỉ chứa bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 với tỷ lệ tổng lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 so với tổng lượng bào tử *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 gấp từ 10 đến 100 lần. Tổng lượng bào tử có trong chế phẩm này là khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml. Bình chứa 12 này có thể tháo lắp thông qua các ren nối hoặc khớp nối để có thể dễ dàng thay thế, bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp.

Bơm vi lượng 11 có thể là loại bơm vi lượng bất kỳ cho phép bơm, ví dụ nhưng không chỉ giới hạn ở bơm vi lượng cho phép bơm một lượng chất lỏng từ 0,1 đến 100 ml/phút để cấp một lượng chất lỏng từ bình chứa vào màng bông xốp 25 hoặc thông qua vòi phun để phân tán ra không khí. Bơm vi lượng 11 này được gắn giữa bình chứa 12 và màng bông xốp 25 để bơm chính xác một lượng chế phẩm có trong bình chứa 12 vào màng bông xốp 25 để phân tán ra ngoài không khí. Căn cứ vào lưu lượng của lượng khí đầu ra, bơm vi lượng sẽ bơm một lượng được tính trước sao cho có thể thu được không khí chứa bào tử lợi khuẩn đường hô hấp với lượng từ 1×10^4 đến 5×10^6 bào tử/ m^3 .

Dựa trên các thay đổi về lưu lượng khí đẩy ra cũng như nồng độ của bào tử vi khuẩn có trong bình chứa 12 mà bơm vi lượng 11 có thể được điều chỉnh thông qua bộ điều khiển 13. Theo một phương án cụ thể, bộ điều khiển 13 này bao gồm mạch điều khiển được gắn vi xử lý để nhận tín hiệu từ cảm biến lưu lượng khí ra và tín hiệu cảm biến đo nồng độ bào tử vi khuẩn trong bình chứa để điều khiển bơm vi lượng bơm chính xác một lượng chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp có trong bình chứa vào màng bông xốp 25 để thu được khí chứa $1 \times 10^4 - 5 \times 10^6$ bào tử/ m^3 định trước. Các tín hiệu từ cảm biến lưu lượng cũng như từ cảm biến đo nồng độ bào tử được truyền về vi xử lý của bộ điều khiển để điều chỉnh bơm vi lượng tăng hoặc giảm lưu lượng bơm chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp cấp vào đường bông thấm bào tử sẽ được đẩy ra ngoài nhờ không khí sau khi lọc qua màng lọc.

Cụm phân tán 20 như được thể hiện trên Hình 3 bao gồm ống phân tán hình trụ 21 bao gồm cửa nạp và cửa xả ở hai đầu. Bên trong ống phân tán hình trụ 21 này, theo hướng từ cửa nạp đến cửa xả, được lắp lần lượt màng lọc bụi 22, màng lọc khử mùi 23, màng lọc HEPA 24, màng bông xốp 25 và quạt gió 26.

Màng lọc bụi 22 có tác dụng lọc các hạt bụi lơ lửng trong không khí và được bố trí ở phía cửa nạp của cụm phân tán 20. Màng lọc bụi 22 này cho phép giữ lại các hạt bụi có kích thước cỡ micro, các màng lọc bụi có thể sử dụng trong cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn là đã biết và hoàn toàn có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này chọn lựa để đạt được mục đích loại bỏ các hạt bụi lơ lửng có trong không khí.

Màng lọc khử mùi 23 nhằm mục đích hấp phụ các thành phần hóa học dễ bay hơi gây mùi có trong không khí, các màng lọc này thường là các màng lọc than hoạt tính hoặc màng lọc hấp phụ tương tự và không bị giới hạn bởi các màng lọc cụ thể.

Màng lọc HEPA 24 còn được gọi là bộ lọc HEPA (high efficiency particulate air filter) là một loại màng lọc cho phép lọc 99,95% các hạt có kích thước 0,3mm theo tiêu chuẩn châu Âu. Các màng lọc này thường được sử dụng trong các thiết bị lọc không khí cho phép giữ lại hoàn toàn các hạt, bụi mịn và các tác nhân gây hại. Màng lọc HEPA thường bao gồm 4 lớp gồm màng lọc thô, màng lọc hỗn hợp màng lọc khử mùi và màng lọc khử bụi. Các màng lọc HEPA được ưu tiên sử dụng, ví dụ các màng lọc E10, E11,

E12, tốt hơn là có thể sử dụng loại màng lọc loại H13, H14 cho phép lọc các hạt có kích thước 0,3 micromet lên tới 99,975% với tỷ lệ lọc đạt 99,99%.

Màng bông xốp 25 đóng vai trò như màng trung gian để cấp và phân tán chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế. Theo một phương án ưu tiên, để phân tán chế phẩm lợi khuẩn vào không khí thông qua luồng không khí, màng bông xốp 25 có thể được thay thế bằng vòi phun sương để phân tán chế phẩm vào luồng không khí được hút qua cụm phân tán 20 ở dạng sương mù.

Quạt gió 26 được bố trí ở cửa xả để hút không khí vào một đầu và phân tán chế phẩm lợi khuẩn được bơm vào màng bông xốp 25 để phân tán vào không gian cần cung cấp bào tử lợi khuẩn với lượng cấp từ $1 \times 10^4 - 5 \times 10^6$ bào tử/ m^3 . Trường hợp sử dụng các vòi phun sương để cấp chế phẩm thì các vòi phun này được điều chỉnh để kích thước các hạt phân tán được tạo ra ở dạng sương, có kích thước nano. Lưu lượng chế phẩm được cấp để phân tán bởi quạt gió 26 được thực hiện bởi bơm vi lượng 11 và được điều khiển bởi bộ điều khiển 13 theo lưu lượng không khí được thổi qua cửa xả bởi quạt gió 26 sao cho lượng bào tử lợi khuẩn được phân tán từ $1 \times 10^4 - 5 \times 10^6$ bào tử/ m^3 không khí.

Khi vận hành, bộ điều khiển 13 sẽ điều khiển bơm vi lượng 11 bơm chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp chứa trong bình chứa 12 phân tán đều lên màng bông xốp 25, hoặc được phun qua đầu phun để phân tán bào tử vào dòng không khí được hút bởi quạt gió 26. Bào tử vi khuẩn được cấp để phân tán đều theo lưu lượng không khí hút bởi quạt gió 26. Khi đó, không khí được hút qua cửa nạp, lần lượt đi qua màng lọc bụi 22, màng lọc khử mùi 23, màng lọc HEPA 24 và qua màng bông xốp 25 để phân tán bào tử vi khuẩn có trên màng bông xốp 25 này qua cửa xả vào không khí. Bào tử vi khuẩn được phát tán vào không khí cho phép xâm nhập vào đường hô hấp của động vật, từ đó phát triển và cạnh tranh với vi khuẩn gây hại có trên đường hô hấp. Tốt nhất là lượng bào tử được phân tán vào không khí đạt từ $1 \times 10^4 - 5 \times 10^6$ bào tử/ m^3 .

Theo một phương án ưu tiên được thể hiện trên Hình 2, trong đó cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế còn bao gồm dàn trao đổi nhiệt 27. Trong đó dàn trao đổi nhiệt 27 này tốt hơn là được bố trí trước màng bông xốp 25 để duy trì nhiệt độ không khí cấp nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C trước khi đi qua màng bông xốp để phân tán bào tử lợi khuẩn vào không khí.

Như vậy, trong quá trình sử dụng, bằng việc bơm cấp lượng chế phẩm lợi khuẩn có trong bình chứa vào đường khí bởi bơm vi lượng, lượng chế phẩm lợi khuẩn sẽ được sử dụng, do đó khi cần, có thể thay thế hoặc bổ sung chế phẩm lợi khuẩn này vào bình chứa. Do đó, cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế có thể còn có bộ cảnh báo cho phép cảnh báo người sử dụng cũng như cho phép theo dõi về lượng chế phẩm để có thể bổ sung hoặc thay thế bình chứa nhằm đảm bảo bơm vi lượng có thể vận hành để cung cấp một lượng chế phẩm lợi khuẩn vào không khí như được thiết lập trước.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thiết bị lọc khí bổ sung lợi khuẩn đường hô hấp, trong đó thiết bị này được lắp cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế.

Theo một phương án cụ thể, thiết bị lọc khí được lắp cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế cho phép cung cấp bào tử vi khuẩn vào không khí sau khi lọc vào không gian sống của người hoặc động vật. Bơm vi lượng được sử dụng khi này có thể là bơm nhu động kết nối chung với nguồn của quạt gió (hoặc được kích hoạt khi quạt hoạt động) của máy lọc không khí. Cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế được lắp với bơm và cấp vào miệng cấp gió thông màng bông xốp. Khi máy lọc khí hoạt động, quạt gió sẽ quay và qua đó máy bơm nhu động cũng được kích hoạt, bơm dung dịch chứa bào tử lợi khuẩn thấm vào màng bông xốp, dưới tác động của luồng gió đi qua, bào tử lợi khuẩn sẽ được khuếch tán ra cùng với luồng không khí đã được lọc để tạo ra không khí có bổ sung chế phẩm vi khuẩn lợi khuẩn theo sáng chế. Lượng vi khuẩn bổ sung khi đó được căn cứ theo lượng vi khuẩn có trong chế phẩm và lưu lượng khí đầu ra sao cho nồng độ bào tử lợi khuẩn trong không khí lọc đầu ra đạt khoảng $1 \times 10^4 - 5 \times 10^6$ bào tử/m³. Khi đó, bào tử được khuếch tán ra ngoài không khí, đảm bảo cho lượng lợi khuẩn xâm nhập qua đường hô hấp cho mỗi người là khoảng 10 m³ không khí lọc hàng ngày sẽ hấp thụ được khoảng từ 100 nghìn đến 50 triệu bào tử lợi khuẩn. Lượng bào tử lợi khuẩn này chỉ thấp hơn khoảng 10 lần so với lượng bào tử lợi khuẩn *Bacillus* được xịt vào mũi hàng ngày mà đem lại tác dụng hỗ trợ giảm các triệu chứng viêm đường hô hấp ở trẻ em đã nhiễm RSV và cúm (Trần Minh Điển và cộng sự, 2022; Phùng Thị Bích Thủy và cộng sự, 2022). Điều này phù hợp với khuyến cáo của tổ chức Y tế thế giới, liều dùng probiotic cho mục đích dự phòng thường thấp hơn khoảng 10 lần so với liều dùng cho mục đích hỗ trợ điều trị.

Như vậy, cần thấy rằng, việc gắn cơ cấu bổ sung lợi khuẩn theo sáng chế vào thiết bị lọc khí gia dụng hoặc thiết bị lọc khí công nghiệp hoàn toàn có thể thực hiện được tùy vào các thiết bị lọc khí đã biết. Các thiết bị lọc khí gia dụng có thể được gắn cơ cấu bổ sung lợi khuẩn theo sáng chế này khác biệt ở chỗ không chỉ cấp khí sạch mà còn cung cấp bào tử vi khuẩn hữu ích đường hô hấp, giúp hỗ trợ ổn định hệ vi sinh đường hô hấp của người và động vật. Các bào tử này khi vào hệ hô hấp sẽ phát triển cạnh tranh với vi khuẩn gây bệnh nhằm ức chế và giảm bớt tác động bất lợi của vi khuẩn gây bệnh lên động vật lên đường hô hấp.

Một ví dụ minh họa cụ thể đối với thiết bị lọc khí gia dụng, lưu lượng bơm dịch bào tử lợi khuẩn được thiết lập theo lưu lượng dòng khí của thiết bị lọc đạt trung bình $180\text{m}^3/\text{giờ}$. Khi đó cơ cấu bổ sung lợi khuẩn sẽ bơm cấp vào với lưu lượng khoảng từ $0,25\text{-}10\text{ ml/giờ}$ cho phép cấp lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39, và bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 nồng độ khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml vào màng bông xốp trước quạt gió với tỉ lệ khuếch tán ra ngoài không khí là 1% sẽ thu được không khí có nồng độ bào tử nằm trong khoảng từ 1×10^4 đến 5×10^6 bào tử / m^3 . Khi đó với lượng không khí sử dụng trung bình, người hít khí này sẽ được cung cấp một lượng vi khuẩn đủ để duy trì hệ vi sinh vật đường hô hấp khỏe mạnh, giúp loại bỏ các vi khuẩn gây hại.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp

Thu nhận chủng giống gốc vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 có số lưu giữ lần lượt là ANA4, ANA39, và ANA43 tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của Công ty TNHH ANABIO R&D số 22, lô 7, 8, khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội. Các mẫu chủng giống gốc này được nuôi trên môi trường bảo quản trong ống nghiệm trên môi trường thạch nghiêng.

Thiết bị nuôi cấy, máy ly tâm, dụng cụ thí nghiệm, các nguyên liệu, hóa chất như cao nấm men, pepton đậu nành, đường dextroza, các loại muối NaCl, KCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, FeSO₄, MgSO₄, Ca(NO₃)₂, MnCl₂, enzym lysozym được mua từ nhà cung cấp, môi trường vi sinh LB, MRS được mua từ nhà cung cấp (Merck).

+ Thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4

Cấy mẫu chủng giống gốc *Bacillus subtilis* ANA4 trong ống thạch nghiêng vào trong 1 lít môi trường LB tiệt trùng, nuôi lắc hoạt hóa ở nhiệt độ khoảng 37°C trong 1 ngày để hoạt hóa chủng giống *Bacillus subtilis* ANA4.

Cân 300g cao nấm men, 1700 g pepton đậu nành, 500 g NaCl, 200 g đường dextroza, 250 g K₂HPO₄, và pha với 100 lít nước RO. Chính pH đến 7,4. Sau khi khử trùng ở nhiệt độ 120°C trong 15 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, thu được môi trường nuôi cấy.

Bổ sung 1 lít môi trường nhân giống LB vào 100 lít môi trường được chuẩn bị ở trên, sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ từ 37°C, tốc độ khuấy 150 vòng/phút, tốc độ sục khí oxy 1 mM/phút, pH 7,4, thời gian nuôi 1 ngày.

Chuyển toàn bộ môi trường nuôi cấy vào thiết bị ly tâm để thu sinh khối. Rửa sinh khối bằng dung dịch đệm Tris HCl, pH 8,0, nồng độ 30 mM. Tiếp đó ủ với lysozym nồng độ từ 10 µg/ml trong 30 phút ở nhiệt độ 25°C. Sau đó rửa với nước muối KCl 1M với tỷ lệ từ 1:5 để loại tế bào sinh dưỡng. Lặp lại quá trình rửa 3 lần. Cuối cùng rửa lại bằng nước tinh sạch thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4. Bào tử này được định lượng trong nước đến 3,5 x 10¹¹ bào tử/mL, thu được 500 mL bào tử *Bacillus subtilis* ANA4.

Mẫu bào tử này được kiểm tra trên kính hiển vi, kết quả cho thấy bào tử thu được dạng hình bầu dục đều như trên Hình 4A.

+ Thu bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39

Cấy mẫu chủng giống gốc *Bacillus clausii* ANA39 trong ống thạch nghiêng vào trong 5 lít môi trường LB bổ sung 5% KCl diệt trùng, nuôi lắc hoạt hóa ở nhiệt độ khoảng 35°C trong 1 ngày để hoạt hóa chủng giống *Bacillus clausii* ANA39.

Cân 400 g cao nấm men, 1700 g pepton đậu nành, 600 g NaCl, 200 g đường dextroza, 150g KCl, 150 g MgSO₄ và pha với 100 lít nước RO. Sau khi khử trùng ở nhiệt độ 120°C trong 15 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, tiếp đó bổ sung Ca(NO₃)₂ đến nồng độ cuối 2 mM, MnCl₂ đến nồng độ cuối 10 mM và FeSO₄ đến nồng độ cuối 1 mM thu được môi trường nuôi cấy.

Bổ sung 5 lít môi trường nhân giống LB vào 100 lít môi trường được chuẩn bị ở trên, sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ từ 37°C, tốc độ khuấy 250 vòng/phút, tốc độ sục khí oxy 0,5 mM/phút trong 18 giờ đầu, 2 mM/phút trong thời gian còn lại, pH 8,0, thời gian nuôi 2 ngày.

Chuyển toàn bộ môi trường nuôi cấy vào thiết bị ly tâm để thu sinh khối. Rửa sinh khối bằng dung dịch đệm Tris HCl, pH 8,0, nồng độ 30 mM. Tiếp đó ủ với lysozym nồng độ từ 10 µg/ml trong 30 phút ở nhiệt độ 25°C. Sau đó rửa với nước muối KCl 1M với tỷ lệ từ 1:5 để loại tế bào sinh dưỡng. Lặp lại quá trình rửa 3 lần. Cuối cùng rửa lại bằng nước tinh sạch thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39. Bào tử này được định lượng trong nước đến 3,8 x 10¹⁰ CFU/mL, thu được 500 mL bào tử *Bacillus clausii* ANA39.

Mẫu bào tử này được kiểm tra trên kính hiển vi, kết quả cho thấy bào tử thu được dạng hình bầu dục đều như trên Hình 4B.

+ Thu bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43

Cấy mẫu chủng giống gốc *Bacillus coagulans* ANA43 trong ống thạch nghiêng vào trong 5 lít môi trường MRS diệt trùng, nuôi lắc hoạt hóa ở nhiệt độ khoảng 40°C trong 1 ngày để hoạt hóa chủng giống *Bacillus coagulans* ANA43.

Cân 250 g cao nấm men, 1600 g pepton đậu nành, 460 g NaCl, 150 g đường dextroza, 350 g K₂HPO₄ và pha với 100 lít nước RO. Sau khi khử trùng ở nhiệt độ 120°C

trong 15 phút, để nguội đến khoảng 50°C, bổ sung $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ đến nồng độ cuối 2,5 mM, MnCl_2 đến nồng độ cuối 15 mM, FeSO_4 đến nồng độ cuối 1 mM thu được môi trường nuôi cấy.

Bổ sung 5 lít môi trường nhân giống MRS vào 100 lít môi trường được chuẩn bị ở trên, sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 45°C, tốc độ khuấy 120 vòng/phút, tốc độ sục khí oxy 0,5 mM/phút trong 18 giờ đầu, 1,0 mM/phút trong thời gian còn lại, pH 6,2, thời gian nuôi 2 ngày.

Chuyển toàn bộ môi trường nuôi cấy vào thiết bị ly tâm để thu sinh khối. Rửa sinh khối bằng dung dịch đệm Tris HCl, pH 8,0, nồng độ 30 mM. Tiếp đó ủ với lysozym nồng độ từ 10 µg/ml trong 30 phút ở nhiệt độ 25°C. Sau đó rửa với nước muối KCl 1M với tỷ lệ từ 1:5 để loại tế bào sinh dưỡng. Lặp lại quá trình rửa 3 lần. Cuối cùng rửa lại bằng nước RO thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43. Bào tử này được định lượng trong nước đến $4,5 \times 10^9$ CFU/mL, thu được 500 mL bào tử *Bacillus coagulans* ANA43.

Mẫu bào tử này được kiểm tra trên kính hiển vi, kết quả cho thấy bào tử thu được dạng hình bầu dục đều như trên Hình 4C.

+ Thu dung dịch probiotic

Bổ sung 100 ml dịch chứa bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 ở nồng độ $3,5 \times 10^{11}$ bào tử/ml, 100 ml dịch chứa *Bacillus clausii* ANA39 ở nồng độ $3,8 \times 10^{10}$ bào tử/ml, 100 ml dịch chứa *Bacillus coagulans* ANA43 ở nồng độ $4,5 \times 10^9$ bào tử/ml, bổ sung nước RO đủ 20 lít. Sau khi khuấy trộn đều thu được sản phẩm probiotic dạng dịch lỏng, màu trắng ngà. Dung dịch này được đóng vào các túi nhựa với dung tích 150 ml/túi bởi máy tự động. Sau khi đánh giá cảm quan thì từ 20 lít dung dịch hỗn hợp bào tử thu được 130 túi chế phẩm probiotic dạng hỗn hợp bào tử *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 với nồng độ tổng cộng $1,5 \times 10^9$ bào tử/ml.

Ví dụ 2: Thử nghiệm thiết bị lọc khí lắp cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp

Cơ cấu bổ sung lợi khuẩn đường hô hấp theo sơ đồ Hình 1 được lắp trực tiếp vào thiết bị lọc khí HEPA gia dụng như sơ đồ nêu trong Hình 3. Cơ cấu này bao gồm bơm

vi lượng nhu động với sử dụng đầu bơm YZ15 và ống silicon 16#, lưu lượng được thiết lập theo lưu lượng dòng khí của thiết bị lọc đạt trung bình 180 m³/giờ. Túi nhựa dung tích 150 ml chứa lợi khuẩn đường hô hấp thu được từ Ví dụ 1 được gắn vào đầu hút của bơm vi lượng cho phép cấp bào tử lợi khuẩn có mật độ $1,5 \times 10^9$ bào tử/ml. Bơm vi lượng nhu động được thiết lập dựa trên lưu lượng khí đi qua miệng cấp gió của thiết bị lọc khí và hoạt động đồng thời với quạt gió của máy lọc sẽ cho ra lưu lượng khoảng 1 ml/vòng quay thông qua bảng điều khiển.

Bơm vi lượng nhu động này được kết nối chung với nguồn của quạt gió và được kích hoạt khi quạt gió của thiết bị lọc không khí hoạt động. Thiết bị sử dụng ống silicon 16# được lắp vào đầu quay của máy bơm, 1 đầu ống được kết nối với túi chứa dung dịch bào tử lợi khuẩn, đầu còn lại được kết nối với màng bông xốp được đặt tại vị trí cửa cấp gió của máy lọc khí.

Khi thiết bị lọc không khí hoạt động, quạt gió vận hành đồng thời sẽ kích hoạt bơm nhu động hoạt động, bơm dung dịch chứa BTLK từ túi đựng chảy sang, thấm vào màng bông xốp, luồng gió đã đi qua màng lọc thô, HEPA được quạt gió đẩy qua tấm bông xốp giúp khuếch tán bào tử lợi khuẩn ra ngoài không khí chứa bào tử sống có mật độ bào tử nằm trong khoảng dự kiến là 1×10^4 đến 5×10^6 bào tử/m³.

Ví dụ 3. Đánh giá mật độ vi khuẩn trong không khí đầu ra của máy lọc khí bổ sung bào tử lợi khuẩn

Để xác định mật độ vi khuẩn có trong không khí sau khi qua máy lọc, đặt 3 đĩa môi trường thạch chuẩn tại đầu ra của máy lọc khí trong vòng 15 phút, sau đó nuôi cấy trong 1 ngày ở tủ ấm để xác định khả năng hoạt động của vi khuẩn khi cấp vào không khí. Kết quả trung bình của tổng số vi khuẩn của 03 lần nuôi cấy của mỗi mẫu được nêu trong Bảng 1 và trên Hình 5.

Hình 5 là ảnh chụp khuẩn lạc của kết quả nuôi cấy vi khuẩn trong không khí, trong đó: (A) kết quả nuôi cấy xác định vi khuẩn có trong không khí sau khi lọc qua màng lọc HEPA, (B) kết quả nuôi cấy xác định vi khuẩn lơ lửng trong không khí được phân tán bởi cơ cấu phân tán chế phẩm lợi khuẩn trong không khí; và (C) kết quả nuôi cấy vi khuẩn phân tán trong không khí ở cửa xả sau của cơ cấu phân tán chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế.

Bảng 1. Kết quả đánh giá khả năng sống của lợi khuẩn được cung cấp bởi thiết bị cấp lợi khuẩn

STT	Tên mẫu	Tổng số vi khuẩn (CFU/dm ³)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
1	Không khí lọc sau màng lọc HEPA	0	0	0	0
2	Không khí từ không gian bổ sung bào tử lợi khuẩn	$5,8 \times 10^1$	$5,4 \times 10^1$	$4,6 \times 10^1$	$5,3 \times 10^1$
3	Không khí từ cửa xả sau cơ cấu phân tán của máy lọc khí bổ sung chế phẩm lợi khuẩn	$7,4 \times 10^1$	$6,8 \times 10^1$	$7,2 \times 10^1$	$7,1 \times 10^1$

Theo Bảng trên cho thấy, trước khi bổ sung, không khí qua màng lọc HEPA đảm bảo không có chứa vi khuẩn, sau khi bổ sung bào tử lợi khuẩn không khí cửa xả sẽ có chứa bào tử lợi khuẩn với nồng độ nằm trong khoảng cho phép là từ 10^1 đến 5×10^3 bào tử/dm³, tương đương với 1×10^4 đến 5×10^6 bào tử/m³. Như vậy với một người sử dụng trung bình 10 m³/ngày sẽ được cung cấp khoảng từ 10^5 đến 5×10^7 bào tử lợi khuẩn, một lượng vi khuẩn phù hợp cho người sử dụng lâu dài một hệ vi sinh vật đường hô hấp khỏe mạnh.

Ví dụ 4. Đánh giá độ an toàn của chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp

Độ an toàn của chế phẩm được đánh giá thông qua thử nghiệm độc tính cấp trên mô hình chuột, độc tính bán trường diễn trên mô hình thỏ. Địa điểm thử nghiệm được tiến hành tại Khoa Dược lý - Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương.

Chế phẩm thử nghiệm ở dạng lỏng được đóng gói vào túi 150 ml/túi chứa bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39, và *Bacillus coagulans* ANA43 với tổng lượng $1,5 \times 10^9$ bào tử/ml được sản xuất theo Ví dụ 1.

Thử nghiệm độc tính cấp được thực hiện trên 40 con chuột nhắt trắng giống Swiss, với liều dùng gấp 60 lần liều khuyến cáo sử dụng hàng ngày ở người (tương đương $2,4 \times 10^{10}$ bào tử/kg chuột) trong vòng 7 ngày, theo dõi: số chuột chết, mức độ tiêu thụ thức ăn- nước uống, khối lượng chuột và các biểu hiện bất thường (về thể trạng, hành vi, vận động, nước tiểu...) trong các nhóm chứng và nhóm thử. Sau 7 ngày cho chuột uống mẫu thử với mức liều từ 20,0 ml mẫu thử/kg chuột đến 60,0 ml mẫu thử/ kg chuột,

không nhận thấy có bất cứ biểu hiện bất thường so với nhóm chứng. Trong thời gian 7 ngày thử nghiệm, chuột ăn uống, hoạt động bình thường, không có chuột chết, quan sát đại thể cho thấy không có sự khác biệt ở các cơ quan nội tạng (tim, phổi, gan, lách, thận, ruột) so với nhóm chứng. Như vậy, thử nghiệm độc tính cấp với mẫu chế phẩm thử nghiệm nêu trong Ví dụ 1 không tìm thấy liều gây độc cấp tính ở chuột.

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn được thực hiện trên đối tượng thỏ Newzealand trưởng thành khoẻ mạnh, không mang thai hoặc cho con bú, chưa trải qua thử nghiệm nào trước đó. Phương pháp đánh giá là phương pháp mù đơn, nhóm đối chứng song song, phân ngẫu nhiên vào 3 nhóm. Thỏ được nuôi mỗi con một lồng trong phòng nuôi có kiểm soát nhiệt độ và độ ẩm thích hợp với thức ăn và nước uống theo nhu cầu. Tất cả các thao tác trên động vật thí nghiệm đều được tuân theo các quy trình về chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của Khoa Dược lý – Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương. Với liều dùng tương đương 6×10^9 bào tử/ người/ ngày và liều gấp 5 lần tương đương 30×10^9 bào tử/ người/ ngày, thỏ được sử dụng chế phẩm liên tục trong 28 ngày, sau đó theo dõi tiếp 14 ngày sau khi ngừng sử dụng chế phẩm, mẫu thử không ảnh hưởng đến cân nặng, thể trạng, vận động của thỏ thử nghiệm.

Kết quả thử nghiệm cho thấy thỏ khoẻ mạnh, tăng cân đều. Về các chỉ số sinh hóa đánh giá chức năng gan, thận (hoạt độ các enzym AST, ALT, protein toàn phần, bilirubin toàn phần, cholesterol, glucoza, urea, creatinin) và các chỉ số huyết học (hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, bạch cầu, tiểu cầu) không có sự khác biệt có ý nghĩa ở thời điểm trước thử nghiệm, sau 14 ngày uống mẫu thử, sau 28 ngày uống mẫu thử, và sau 14 ngày ngừng uống mẫu thử giữa hai nhóm thử nghiệm so với nhóm chứng.

Hình 6 là ảnh chụp cơ quan nội tạng của thỏ thử nghiệm, kết quả cho thấy không có biểu hiện khác thường về hình dạng bên ngoài, màu sắc của các tổ chức tim, phổi, gan, lách, thận, dạ dày, ruột của các thỏ nhóm thử nghiệm. Trong đó (A) nhóm đối chứng, (B) nhóm thử nghiệm liều 6×10^9 bào tử lợi khuẩn/ngày, (C) nhóm thử nghiệm liều 30×10^9 bào tử lợi khuẩn/ngày được cho uống liên tục trong 28 ngày.

Hình 7 thể hiện hình ảnh quan sát vi thể: tiêu bản gan, thận được cố định bằng Formalin 10 %, nhuộm bằng dung dịch nhuộm Hematoxylin Eosin (HE) và quan sát dưới kính hiển vi quang học. Kết quả quan sát vi thể do Bộ môn Giải phẫu sinh lý bệnh

- Trường Đại học Y Hà Nội thực hiện cho thấy các con thỏ thử nghiệm đều có gan, thận, bình thường không phát hiện tổn thương, hình ảnh cấu trúc trong giới hạn bình thường. Không có các triệu chứng bất thường liên quan đến mẫu thử với 2 mức liều thử nghiệm là 0,93 ml mẫu thử/kg thỏ đến 4,65 ml mẫu thử/ kg thỏ (tương đương 6×10^9 bào tử/người/ngày và 30×10^9 bào tử/người/ngày) so với nhóm chứng. Trong đó (A) nhóm đối chứng, (B) nhóm thử nghiệm liều 6×10^9 bào tử lợi khuẩn/ngày, (C) nhóm thử nghiệm liều 30×10^9 bào tử lợi khuẩn/ngày được cho uống liên tục trong 28 ngày: Các hình ảnh bao gồm (1) gan, (2) thận được cố định bằng Formalin 10 %, nhuộm bằng dung dịch nhuộm Hematoxylin Eosin (HE) và chụp qua kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400 lần.

Các kết quả thử nghiệm độc tính cấp và bán trường diễn trên mô hình động vật đã cho thấy chế phẩm rất an toàn, không có khả năng gây độc cấp tính ngay cả khi dùng với liều rất cao và không gây độc bán trường diễn khi sử dụng lâu dài trong 1 tháng với nồng độ gấp 5 lần lượng khuyến cáo.

Ví dụ 5. Đánh giá độ an toàn của chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp trên mắt và mũi

Độ an toàn của chế phẩm trên mắt và mũi được đánh giá thông qua thử nghiệm kích ứng niêm mạc mắt, niêm mạc mũi và niêm mạc họng trên mô hình thỏ được thực hiện theo tiêu chuẩn ISO 10993-10:2010. Địa điểm thử nghiệm được tiến hành tại Khoa Dược lý - Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương.

Chế phẩm thử nghiệm ở dạng lỏng được đóng gói vào túi 150 ml/túi chứa bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39, và *Bacillus coagulans* ANA43 với tổng lượng $1,5 \times 10^9$ bào tử/ml được sản xuất theo Ví dụ 1.

Thử nghiệm đánh giá mức độ kích ứng mắt của chế phẩm được thực hiện trên 03 thỏ New Zealand trưởng thành cả hai giống đực và cái, khỏe mạnh, thỏ cái không mang thai hoặc cho con bú, cân nặng từ 2 - 3 kg, thỏ được nuôi mỗi con một lồng trong phòng nuôi có kiểm soát nhiệt độ và độ ẩm thích hợp với thức ăn và nước uống theo nhu cầu. Thỏ được nhỏ vào túi kết mạc mắt với lượng 0,1 ml hỗn dịch, mẫu thử được nhỏ vào một mắt, mắt còn lại sử dụng làm đối chứng. Theo dõi và ghi lại các dấu hiệu của giác mạc, mống mắt, kết mạc tại thời điểm các thời điểm ngay sau khi nhỏ thuốc, 1 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ và 7 ngày sau khi nhỏ thuốc cho thấy sản phẩm không gây kích ứng mắt.

Thử nghiệm kích niêm mạc mũi được thực hiện trên 10 thỏ Newzealand trưởng thành cả hai giống đực và cái, khỏe mạnh, thỏ cái không mang thai hoặc cho con bú, cân nặng $\geq 2,0$ kg. Thử nghiệm được tiến hành trong vòng 21 ngày liên tục và theo dõi thêm 14 ngày sau khi dừng sử dụng chế phẩm. Thỏ được chia làm 2 nhóm: 6 thỏ thử nghiệm xịt chế phẩm với tần suất 4 lần/ ngày, mỗi lần 3 lần xịt/ lỗ mũi và 4 thỏ đối chứng cũng được xịt với số lượng và tần suất như vậy bằng nước muối sinh lý. Theo dõi tình trạng sức khoẻ của thỏ, cân nặng, mức độ tiêu thụ thức ăn, nước uống, theo dõi các chỉ số kích ứng và tiêu bản quan sát vi thể niêm mạc mũi của thỏ, kết quả thực nghiệm *in-vivo* cả ở cấp độ đại thể cũng như vi thể cho thấy chế phẩm ở thử nghiệm Ví dụ 1 không gây kích ứng trên mũi thỏ.

Hình 8 là ảnh chụp mắt của tất các thỏ tham gia thử nghiệm cho thấy không có hiện tượng khác thường về giác mạc, mống mắt, kết mạc và tiết dịch của thỏ thuộc: nhóm đối chứng (A), nhóm thử nghiệm (B) với liều nhỏ 1×10^8 bào tử lợi khuẩn (tương đương 0,1 ml hỗn dịch) vào túi kết mạc, sau đó theo dõi ở các thời điểm: (1) trước khi nhỏ, (2) ngay sau khi nhỏ, (3) sau khi nhỏ 1 giờ, (4) sau khi nhỏ 24 giờ, (5) sau khi nhỏ 48 giờ, (6) sau khi nhỏ 72 giờ và (7) sau khi nhỏ 7 ngày.

Hình 9 là ảnh tiêu bản mô bệnh học mũi được cố định bằng Formalin 10%, nhuộm bằng dung dịch nhuộm Hematoxylin Eosin (HE) của 3 mặt cắt (1); (2); (3) và (4), sau đó quan sát dưới kính hiển vi quang học. Kết quả quan sát vi thể do Bộ môn Giải phẫu sinh lý bệnh - Trường Đại học Y Hà Nội thực hiện cho thấy: mặt cắt của các niêm mạc mũi không có dấu hiệu tổn thương ở niêm mạc mũi của thỏ ở nhóm thử với tần suất xịt 4 lần/ ngày, mỗi lần 3 nhát xịt/ lỗ mũi (tương đương lượng hít vào $2,4 \times 10^9$ bào tử/ ngày) (B) và nhóm đối chứng (A) trong vòng 21 ngày.

Thử nghiệm mức độ kích ứng niêm mạc mũi và kích ứng mắt của chế phẩm thử nghiệm được thực hiện theo tiêu chuẩn ISO 10993-10:2010 cho thấy chế phẩm an toàn với mũi và mắt, không gây kích ứng niêm mạc mũi và kích ứng mắt.

Ví dụ 5. Thử nghiệm lâm sàng khả năng hỗ trợ điều trị cúm ở trẻ em bởi sản phẩm thử nghiệm

Thử nghiệm được tiến hành với chế phẩm thu được từ Ví dụ 1 với mục đích dự phòng, được thử nghiệm trực tiếp bằng cách xịt vào mũi trẻ em tình nguyện tham gia nghiên cứu tại cơ sở điều trị lâm sàng và được thực hiện theo nguyên tắc đạo đức phù

hợp với tuyên bố Helsinki và hướng dẫn ICH GCP, phù hợp với các quy định và chuẩn mực đạo đức hiện hành của Bộ Y Tế về nghiên cứu trên đối tượng con người. Nghiên cứu được phê duyệt bởi hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y học tại bệnh viện Nhi Trung Ương theo số quyết định 1266/BVNTW-VNCSKTE. Thời gian thử nghiệm được tiến hành từ 2/10/2021 đến 26/3/2022.

Phương pháp đánh giá bao gồm liệu trình sử dụng probiotic ở dạng xịt kết hợp với thuốc điều trị (Goldcefd, Tamiflu, hoặc Carbothrol), so sánh với nhóm đối chứng chỉ sử dụng nước muối sinh lý NaCl 0,9% kết hợp với thuốc điều trị.

Các tình nguyện viên được chia thành hai nhóm: nhóm đối chứng gồm 30 trẻ và nhóm thử nghiệm gồm 30 trẻ. Tất cả bệnh nhân trong hai nhóm có độ tuổi từ 1-5 tuổi và đều dương tính với virus cúm.

Nhóm đối chứng chỉ được điều trị theo phác đồ của bệnh viện kết hợp với xịt rửa mũi bằng nước muối sinh lý và nhóm thử nghiệm được điều trị theo phác đồ của bệnh viện kết hợp với xịt rửa mũi bằng chế phẩm probiotic. Các bệnh nhân trong nhóm thử nghiệm được sử dụng chế phẩm probiotic dưới dạng dung dịch xịt mũi với tần suất 3 lần/ngày. Các bệnh nhân trong nhóm đối chứng được rửa mũi bằng nước muối sinh lý cũng với tần suất 3 lần/ngày, và sử dụng liên tục trong vòng 7 ngày.

Các chỉ số lâm sàng bao gồm xuất tiết mũi họng, khó thở, rút lõm lồng ngực (RLLN), ran rít, ran ẩm, sốt, mạch, và nhịp thở được theo dõi và đánh giá trong suốt quá trình thử nghiệm.

Các chỉ số xét nghiệm cận lâm sàng bao gồm test nhanh virus cúm bằng que thử được tiến hành ở ngày 0 trước điều trị, các chỉ số nồng độ virus cúm, nồng độ *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii* và *Bacillus coagulans* trong dịch rửa mũi bằng kỹ thuật real-time PCR được tiến hành ở ngày 0 trước điều trị và ngày 3 điều trị.

Kết quả thử nghiệm bước đầu được mô tả dưới đây:

+ *Đánh giá sự an toàn của chế phẩm probiotic*

Các tiêu chí đánh giá bao gồm: các chỉ số sinh học như nhịp thở, mạch, nhiệt độ, và SpO₂ trước và sau khi xịt chế phẩm probiotic và nước muối sinh lý trong quá trình 3 ngày sử dụng với tổng cộng 9 lần xịt (3 lần xịt/ngày).

Kết quả thử nghiệm cho thấy, tổng số 30 bệnh nhân đều không ghi nhận bất kỳ biểu hiện liên quan đến các bất thường về nhịp thở, mạch, nhiệt độ, và SpO₂. Hơn thế nữa, chế phẩm probiotic còn góp phần bình ổn chỉ số nhịp thở và mạch ở 100% bệnh nhân sử dụng sản phẩm. Như vậy, với liều dùng dự định khuyến cáo cho bệnh nhân xịt mũi 3 lần/ngày thì chế phẩm probiotic theo Ví dụ 1 hoàn toàn an toàn với trẻ em.

+ *Đánh giá tác dụng cải thiện các triệu chứng lâm sàng của chế phẩm probiotic*

Các kết quả đánh giá lâm sàng trên hai nhóm đối tượng thử nghiệm và đối chứng cho thấy việc sử dụng chế phẩm probiotic trong quá trình điều trị làm giảm đáng kể triệu chứng xuất tiết mũi, thể hiện ở số ngày khỏi trung bình của nhóm thử nghiệm là 3 ngày, so với 4,5 ngày của nhóm đối chứng. Tương tự, chế phẩm probiotic cũng có tác dụng đáng kể trong việc làm giảm triệu chứng ran rít so với nhóm đối chứng, thời gian triệu chứng biến mất khi sử dụng chế phẩm probiotic là 3 ngày, so với 5 ngày của nhóm đối chứng. Bên cạnh đó, các triệu chứng đặc trưng khác của bệnh nhân như sốt, nhịp thở, và mạch đập cũng cũng được cải thiện ở nhóm thử nghiệm.

+ *Đánh giá tác dụng giảm nồng độ virus cúm trong dịch rửa mũi*

Nồng độ virus cúm, bao gồm cúm A, cúm B, virus cúm kiểu phụ A/H1, A/H3, và A/H5 trong dịch rửa mũi của các bệnh nhân được đánh giá thông qua phản ứng PCR thời gian thực (real-time PCR) sử dụng mỗi TaqMan đặc hiệu. Kết quả cho thấy mức độ giảm nồng độ virus cúm của nhóm thử nghiệm trung bình đạt 800 lần trước và sau điều trị. Ngược lại, nhóm đối chứng có sự giảm nồng độ virus thấp hơn, đạt 40 lần. Như vậy, chế phẩm probiotic có hiệu quả rõ rệt trong tác dụng làm giảm nồng độ virus cúm trên các bệnh nhân, hiệu quả gấp 20 lần việc sử dụng nước muối sinh lý.

+ *Đánh giá sự bám dính của các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 lên niêm mạc mũi ở trẻ nhiễm virus cúm.*

Sự bám dính của các chủng vi khuẩn lên niêm mạc mũi được xác định bằng việc phát hiện các chủng *Bacillus* trong dịch rửa mũi sau khoảng 6-8 tiếng từ khi xịt chế phẩm, và được phát hiện kỹ thuật real-time PCR sử dụng SYBR và mỗi đặc hiệu cho ba loài *B. subtilis*, *B. clausii*, và *B. coagulans*. Kết quả cho thấy đã phát hiện sự có mặt của *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39, và *Bacillus coagulans* ANA43 với nồng độ lần lượt là $\geq 10^5$ CFU/ml, $\geq 10^4$ CFU/ml và $\geq 10^3$ CFU/ml. Kết quả này cho

thấy các bệnh nhân tham gia nghiên cứu ở hai nhóm thử nghiệm và đối chứng được cung cấp đúng sản phẩm thử nghiệm, được hướng dẫn đúng và tuân thủ quy trình xịt mũi. Ngoài ra tỷ lệ bào tử *B. subtilis*, *B. clausii*, và *B. coagulans* phát hiện trong dịch rửa mũi tương ứng với tỷ lệ được pha chế trong dung dịch, chứng tỏ cả 3 loại bào tử cùng có khả năng bám dính lên niêm mạc mũi.

Các kết quả thử nghiệm lâm sàng cho thấy chế phẩm rất an toàn, có tác dụng làm giảm các triệu chứng và thời gian điều trị bệnh khi nhiễm virus hợp bào, cúm. Vì vậy, khi đưa chế phẩm này vào các hệ thống máy lọc khí sẽ có tác dụng phòng ngừa bệnh viêm đường hô hấp, đặc biệt là virus cúm mùa.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo sáng chế được phối chế cho phép bổ sung một lượng vi khuẩn thuộc nhóm lợi khuẩn vào đường hô hấp có khả năng phân tán vào không khí sạch được thổi ra từ các máy điều hoà và lọc khí, giúp đơn giản hóa quá trình sử dụng chế phẩm. Việc cấp lợi khuẩn trực tiếp vào nguồn không khí cho phép sử dụng thường xuyên lợi khuẩn, từ đó luôn duy trì và ổn định cũng như liên tục cấp vi khuẩn lợi khuẩn, giảm các tác động bất lợi từ vi sinh vật có hại gây viêm đường hô hấp.

Cụm cơ cấu bổ sung bào tử lợi khuẩn vào máy lọc khí được chế tạo đơn giản, phù hợp để lắp đặt với mọi loại máy lọc khí (máy điều hoà không khí với màng lọc thông thường, máy lọc với màng lọc HEPA) hiện có trên thị trường mà không bị phụ thuộc vào nhà cung cấp thiết bị lọc khí cụ thể.

Việc sản xuất bào tử lợi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39, và *Bacillus coagulans* ANA43 theo sáng chế trên cơ sở nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng nên đơn giản, dễ phát triển, không cần những thiết bị phức tạp nên có thể phát triển trên quy mô lớn. Bằng công nghệ lên men vi sinh tạo bào tử lợi khuẩn *Bacillus*, sử dụng enzym phân giải hoàn toàn tế bào sinh dưỡng, quy trình cho phép thu nhận bào tử lợi khuẩn *Bacillus* một cách dễ dàng và bào tử có độ tinh khiết cao (gần như 100% không lẫn tế bào sinh dưỡng) và bền nhiệt, nên túi đựng dung dịch bào tử lợi khuẩn có thể bảo quản lâu dài lên tới 3 năm ở nhiệt độ phòng hay ngoài trời mà không bị hỏng hoặc nhiễm các vi sinh vật gây bệnh khác.

Máy lọc khí điều hoà thông thường và máy lọc khí HEPA bổ sung cụm cơ cấu bổ sung bào tử lợi khuẩn đã tạo ra không khí sạch có lượng lợi khuẩn phù hợp cho liều dùng lợi khuẩn cần thiết trong một ngày, sẽ đem lại các tác dụng có lợi cho sức khoẻ đường hô hấp của người sử dụng như giảm cạnh tranh các vi sinh vật có hại, tăng cường miễn dịch đường hô hấp, và đặc biệt là giảm được các nguy cơ cúm (sổ mũi, ho...).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp để bổ sung vào không khí, trong đó chế phẩm này ở dạng lỏng chỉ chứa bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.1, bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.2, và bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.3 với tổng nồng độ ba loại bào tử này nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml và tỷ lệ tổng lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 so với tổng lượng bào tử *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 gấp từ 10 đến 100 lần, ba chủng vi khuẩn này được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam với số lưu giữ lần lượt là ANA4, ANA39 và ANA43.

2. Phương pháp sản xuất chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, trong đó chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 có số lưu giữ ANA4 tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam được hoạt hóa và nuôi cấy trong môi trường bao gồm pepton đậu nành từ 16 đến 18 g/l, cao nấm men từ 2 đến 4 g/l, đường dextroza từ 1 đến 3 g/l, NaCl từ 4 đến 6 g/l, K_2HPO_4 từ 2 đến 3 g/l, nhiệt độ từ 30°C đến 37°C, tốc độ khuấy từ 100 đến 300 vòng/phút, lượng khí oxi cấp với từ 0,5 đến 5 mM/phút, pH duy trì trong khoảng từ 7,0 đến 8,0, thời gian nuôi cấy từ 1 đến 2 ngày, sau khi thu hồi sinh khối, phá vỡ tế bào bằng dung dịch lysozym và ly tâm thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4;

b) thu bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39, trong đó chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 có số lưu giữ ANA39 tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam được hoạt hóa và nuôi cấy trong môi trường bao gồm pepton đậu nành từ 16 đến 20 g/l, cao nấm men từ 2 đến 6 g/l, đường dextroza từ 1 đến 3 g/l, NaCl từ 4 đến 8 g/l, KCl từ 0,5 đến 2 g/l, $MgSO_4$ từ 0,5 đến 2 g/l, $Ca(NO_3)_2$ từ 0,5 đến 3 mM, $MnCl_2$ từ 5 đến 15 mM và $FeSO_4$ từ 0,5 đến 2mM, nhiệt độ từ 30°C

đến 37°C, tốc độ khuấy từ 200 đến 300 vòng/phút, lượng khí oxy cấp với từ 0,5 đến 3 mM/phút, pH duy trì trong khoảng từ 7,5 đến 8,5, thời gian nuôi cấy từ 2 đến 3 ngày, sau khi thu hồi sinh khối, phá vỡ tế bào bằng dung dịch lysozym và ly tâm thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39;

c) thu bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43, trong đó chủng vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 có số lưu giữ ANA43 tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 22, lô 7, 8 khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội, Việt Nam được hoạt hóa và nuôi cấy trong môi trường bao gồm cao nấm men từ 2 đến 3 g/l, pepton đậu nành từ 15 đến 17 g/l, NaCl từ 4 đến 5 g/l, đường dextroza từ 1 đến 2 g/l, K₂HPO₄ từ 2 g đến 4 g/l, bổ sung Ca(NO₃)₂ từ 0,5 mM đến 5 mM, MnCl₂ từ 5 mM đến 20 mM, FeSO₄ từ 0,5 mM đến 2 mM, nhiệt độ nuôi cấy từ 30°C đến 50°C, tốc độ khuấy từ 100 đến 200 vòng/phút, tốc độ sục khí oxy từ 0,5 mM/phút đến 3 mM/phút, pH duy trì trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 trong khoảng từ 2 đến 3 ngày, sau khi thu hồi sinh khối, phá vỡ tế bào bằng dung dịch lysozym và ly tâm thu được bào tử vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43; và

d) thu chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp bằng cách phối trộn bào tử vi khuẩn của ba chủng *Bacillus subtilis* ANA4, *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 với tỷ lệ tổng lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 so với tổng lượng bào tử *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 gấp từ 10 đến 100 lần, sau khi chuẩn độ bằng nước RO thu được chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp dạng lỏng chỉ chứa ba loại bào tử này nằm với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml.

3. Cơ cấu cấp chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo điểm 1 vào không khí, trong đó cơ cấu này bao gồm cụm cấp chế phẩm (10) và cụm phân tán (20) để phân tán chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp vào không khí, trong đó:

cụm cấp chế phẩm (10) bao gồm bơm vi lượng (11) được nối với bình chứa (12) chứa chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp theo điểm 1 và bộ điều khiển (13) để bơm chế phẩm lợi khuẩn từ bình chứa (12) này qua màng bông xốp (25) của cụm phân tán (20) nhằm phân tán bào tử lợi khuẩn vào luồng không khí với lượng từ 1×10^4 đến 5×10^6 bào tử/m³;

cụm phân tán (20) bao gồm ống phân tán hình trụ (21) gồm cửa nạp và cửa xả, bên trong được lắp lần lượt màng lọc bụi (22), màng lọc khử mùi (23), màng lọc HEPA (24),

màng bông xốp (25) và quạt gió (26) để hút không khí vào một đầu và phân tán chế phẩm lợi khuẩn được bơm vào màng bông xốp (25) để phân tán vào không gian cần cung cấp bào tử lợi khuẩn với lượng cấp từ 1×10^4 - 5×10^6 bào tử/ m^3 ;

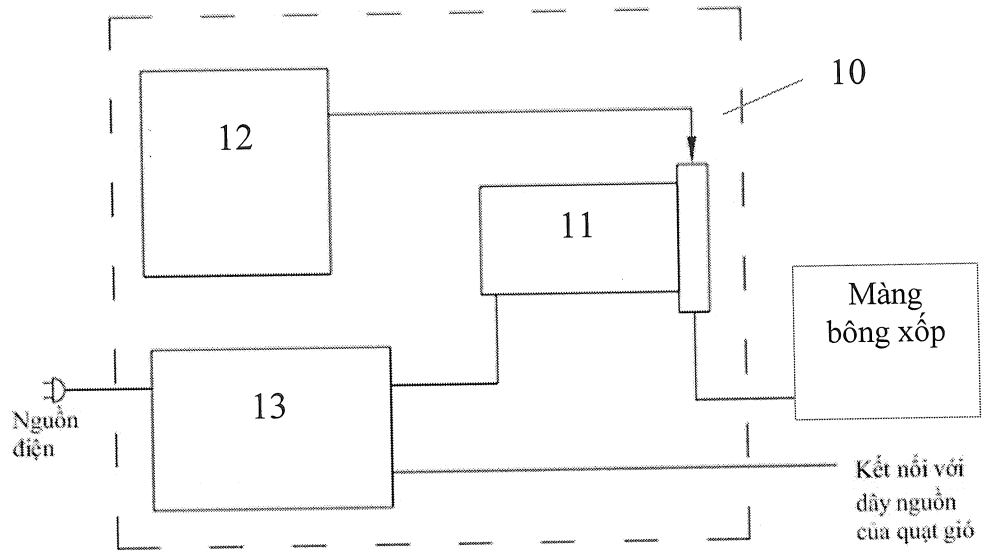
theo đó, khi vận hành, bộ điều khiển (13) sẽ điều khiển bơm vi lượng (11) bơm chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp chứa trong bình chứa (12) phân tán đều lên màng bông xốp (25) theo lưu lượng của quạt gió (26), đồng thời không khí được hút qua cửa nạp, lần lượt đi qua màng lọc bụi (22), màng lọc khử mùi (23), màng lọc HEPA (24) và qua màng bông xốp (25) để phân tán bào tử vi khuẩn có trên màng bông xốp (25) này qua cửa xả vào không khí;

trong đó khác biệt ở chỗ bình chứa (12) chứa chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp chỉ chứa bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4, vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus coagulans* ANA43 với tỷ lệ tổng lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA4 so với tổng lượng bào tử *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus coagulans* ANA43 gấp từ 10 đến 100 lần, tổng lượng bào tử có trong chế phẩm này là khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml và lượng bào tử được phân tán qua cửa xả vào không khí là từ 1×10^4 - 5×10^6 bào tử/ m^3 .

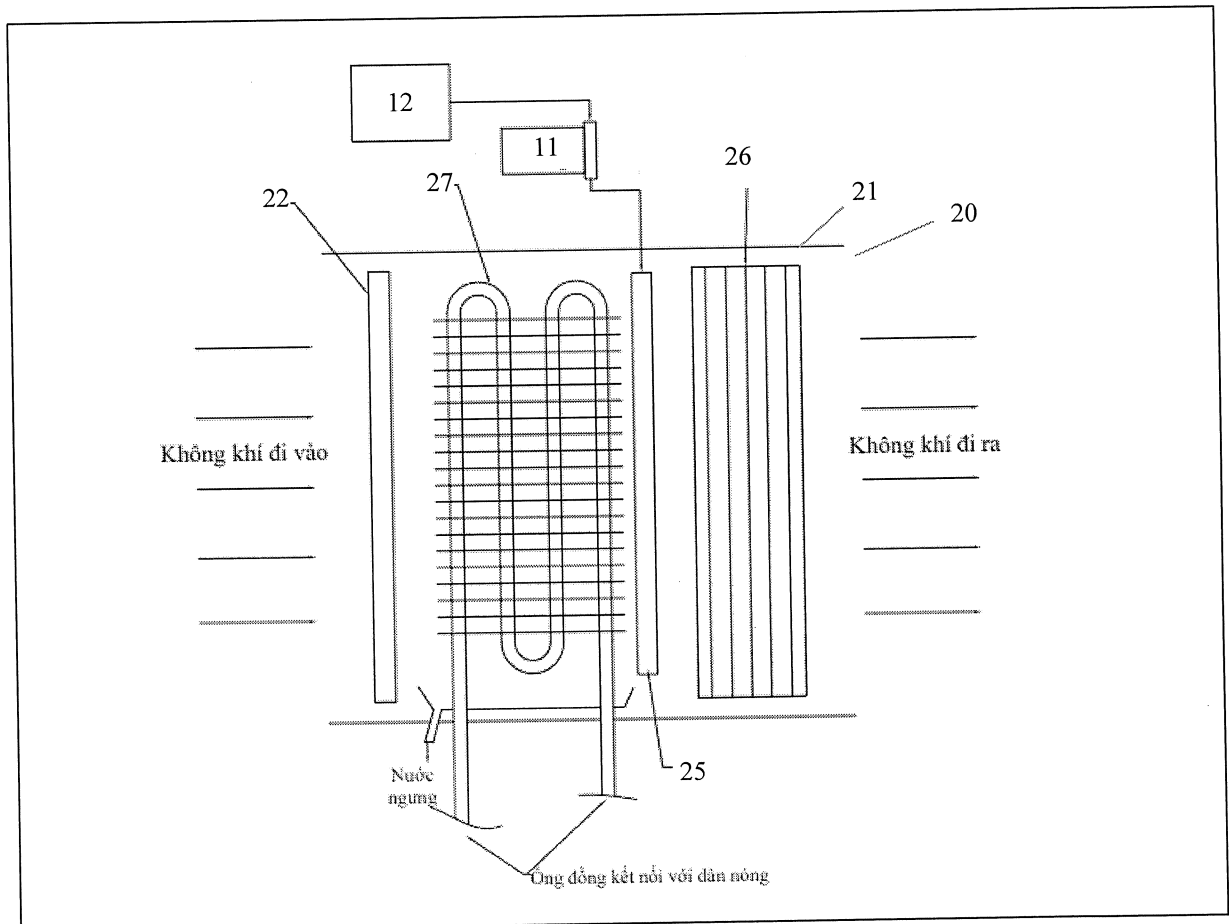
4. Cơ cấu theo điểm 3, trong đó cụm phân tán (20) còn có dàn trao đổi nhiệt (27) bố trí trước màng bông xốp (25) để duy trì nhiệt độ không khí cấp nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C trước khi đi qua màng bông xốp để phân tán bào tử lợi khuẩn vào không khí.

5. Cơ cấu theo điểm 3 hoặc 4, trong đó màng bông xốp (25) được thay thế bằng vòi phun sương để phân tán bào tử lợi khuẩn vào không khí ở dạng sương mù.

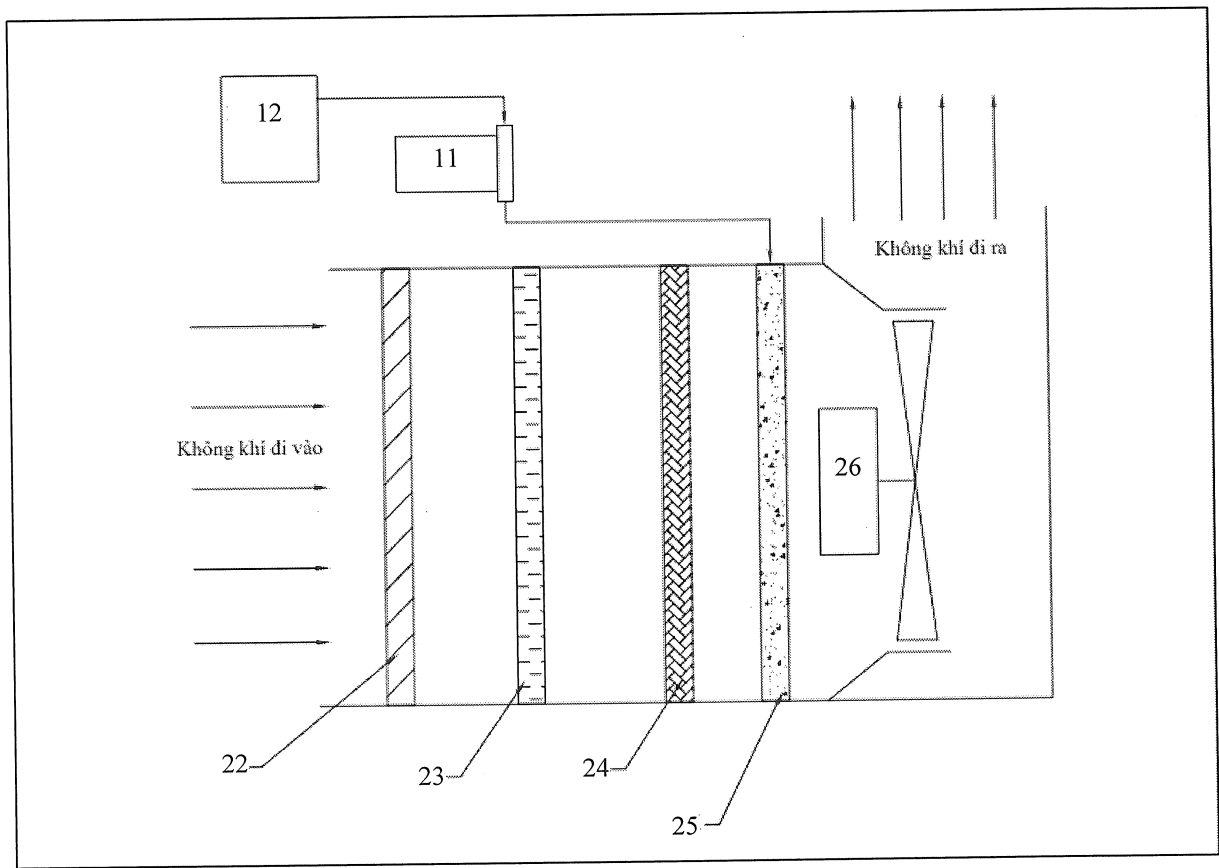
HÌNH 1



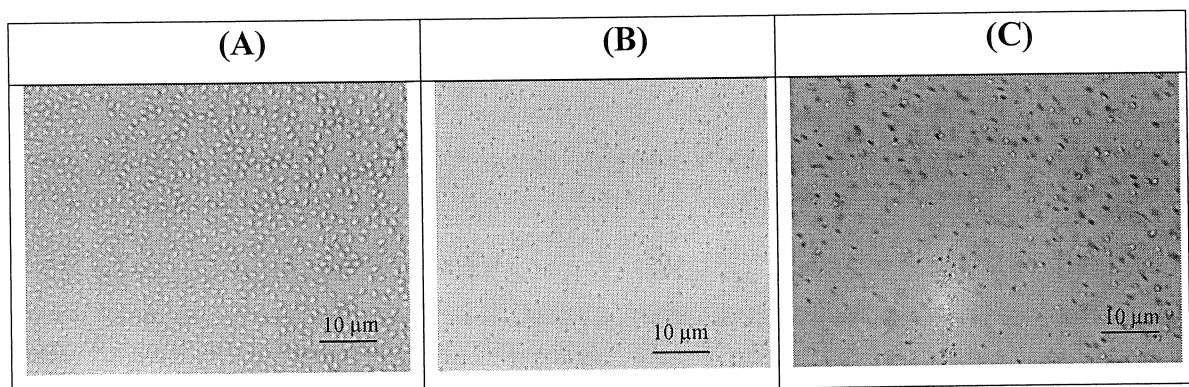
HÌNH 2



HÌNH 3

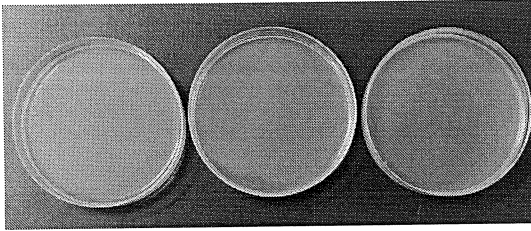


HÌNH 4

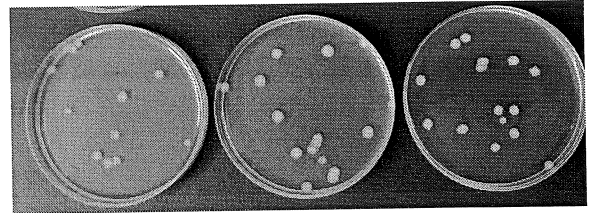


HÌNH 5

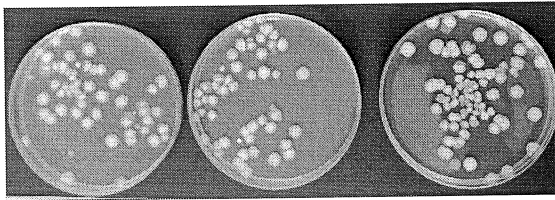
(A)



(B)

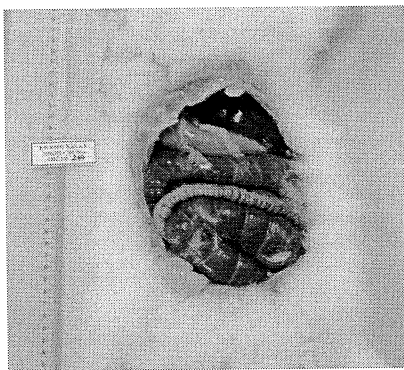


(C)

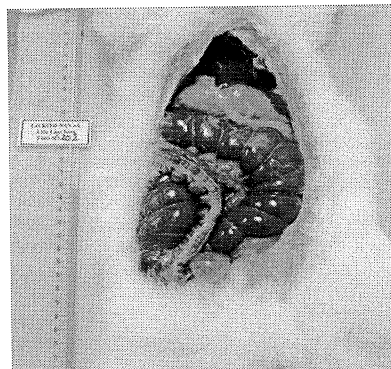


HÌNH 6

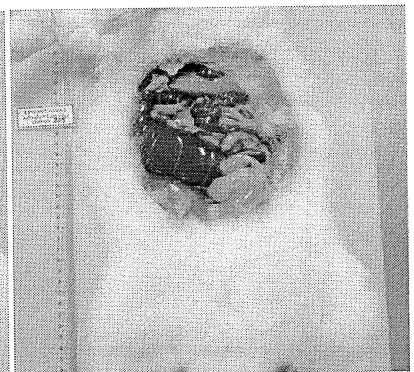
(A)



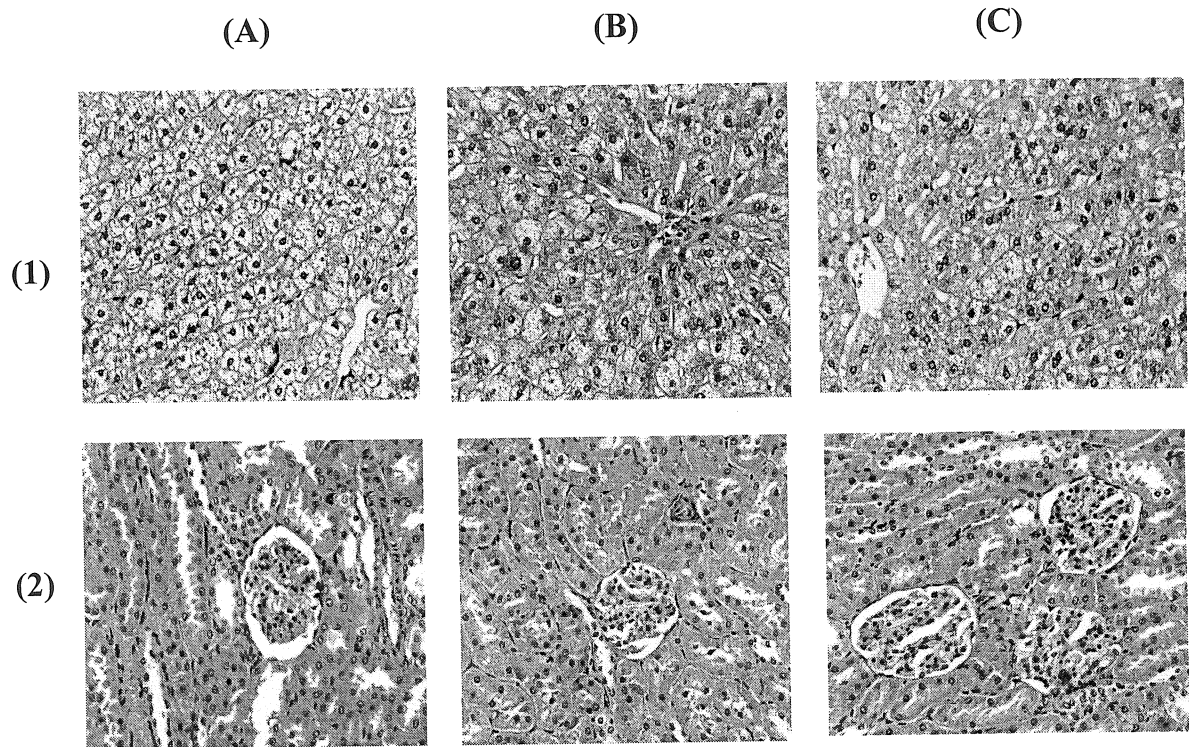
(B)



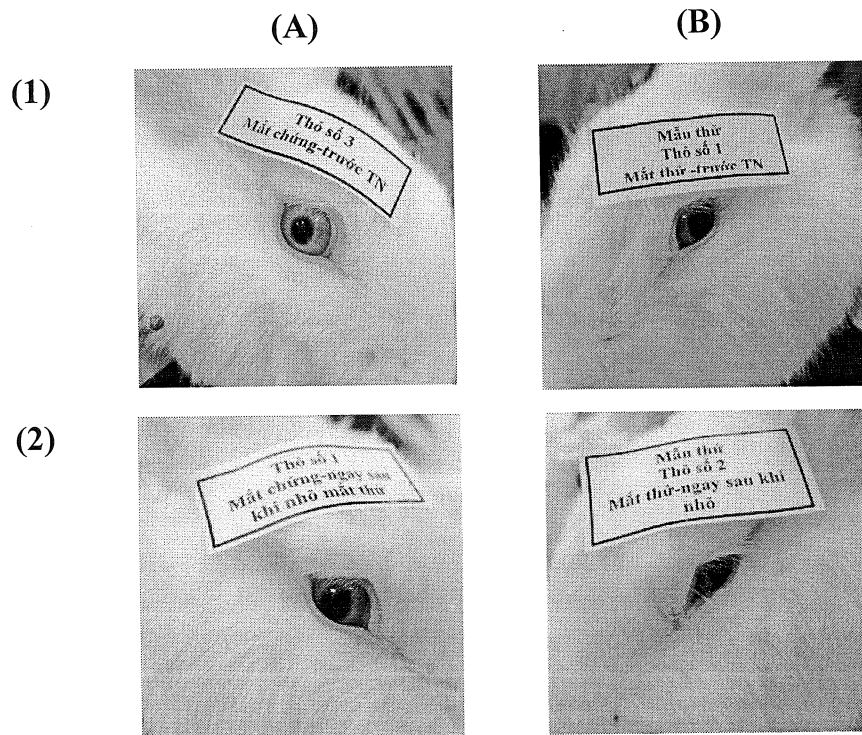
(C)



HÌNH 7

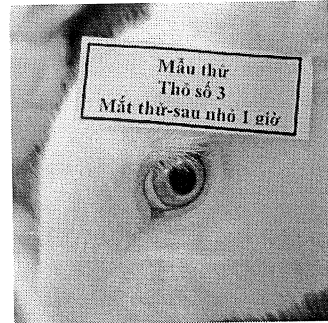
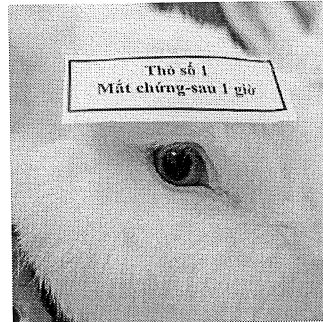


HÌNH 8

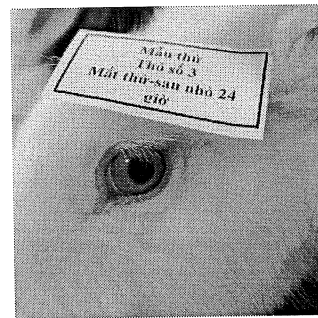
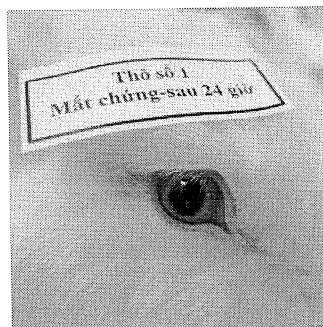


HÌNH 8 (tiếp)

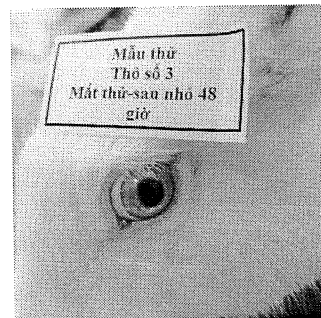
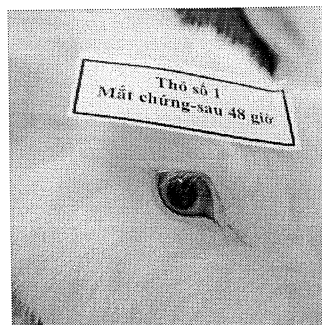
(3)



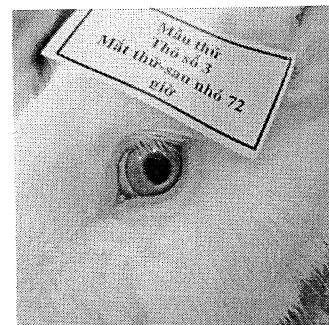
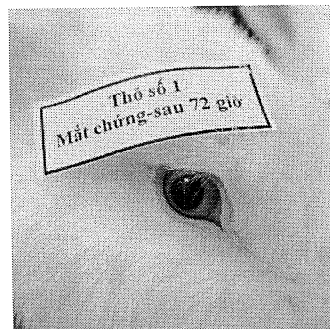
(4)



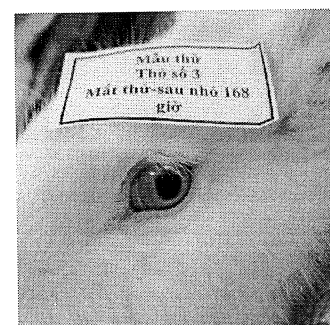
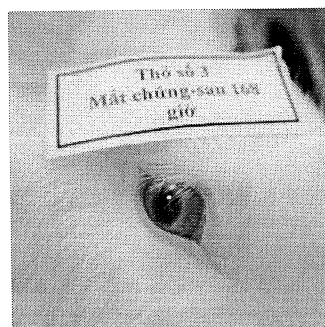
(5)



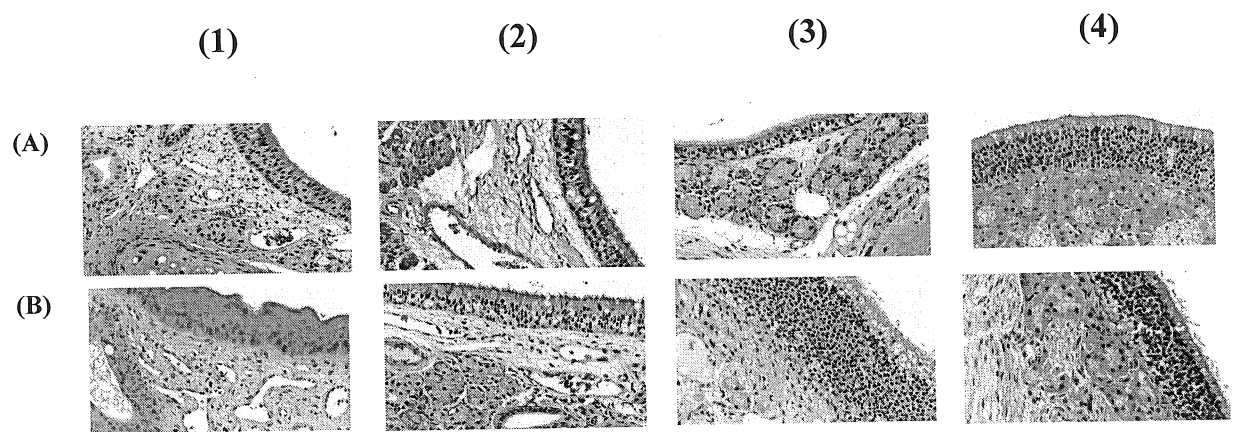
(6)



(7)



HÌNH 9



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Công ty TNHH Livespo Pharma

<120> Chế phẩm lợi khuẩn đường hô hấp và cơ cấu để bổ sung chế phẩm lợi khuẩn này vào không khí

<130>

<160> 3

<170>

<210> 1

<211> 1442

<212> ARN

<213> *Bacillus subtilis* ANA4

<220>

<223> 16S

<220>

<400> 1

GGGGAAGGGG GGGGGGCTAT ACATGCAGTC GAGCGGACAG ATGGGAGCTT GCTCCCTGAT	60
GTTAGCGGCG GACGGGTGAG TAACACGTGG GTAACCTGCC TGTAAGACTG GGATAACTCC	120
GGGAAACCGG GGCTAATACC GGATGGTTGT TTGAACCGCA TGGTTCAAAC ATAAAAGGTG	180
GCTTCGGCTA CCACTTACAG ATGGACCCGC GGCGCATTAG CTAGTTGGTG AGGTAACGGC	240
TCACCAAGGC AACGATGCGT AGCCGACCTG AGAGGGTGAT CGGCCACACT GGGACTGAGA	300
CACGGCCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TAGGGAATCT TCCGCAATGG ACGAAAGTCT	360
GACGGAGCAA CGCCGCGTGA GTGATGAAGG TTTTCGGATC GTAAAGCTCT GTTGTTAGGG	420
AAGAACAAGT ACCGTTCGAA TAGGGCGGTA CCTTGACGGT ACCTAACCAG AAAGCCACGG	480
CTAACTACGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GTAGGTGGCA AGCGTTGTCC GGAATTATTG	540
GGCGTAAAGG GCTCGCAGGC GGTTTCTTAA GTCTGATGTG AAAGCCCCCG GCTCAACCGG	600
GGAGGGTCAT TGGAACTGG GGAAC TTGAG TGCAGAAGAG GAGAGTGGAA TTCCACGTGT	660
AGCGGTGAAA TGC GTAGAGA TGTGGAGGAA CACCAGTGGC GAAGGCGACT CTCTGGTCTG	720
TAAGTGACGC TGAGGAGCGA AAGCGTGGGG AGCGAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC	780
ACGCCGTAAA CGATGAGTGC TAAGTGTTAG GGGGTTTCCG CCCCTTAGTG CTGCAGCTAA	840
CGCATTAAGC ACTCCGCCTG GGGAGTACGG TCGCAAGACT GAAACTCAA GGAATTGACG	900
GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTGCGA GCAACGCGAA GAACCTTACC	960
AGGTCTTGAC ATCCTCTGAC AATCCTAGAG ATAGGACGTC CCCTTCGGGG GCAGAGTGAC	1020
AGGTGGTGCA TGGTTGTCTG CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTAAAGT CCCGCAACGA	1080
GCGCAACCTT TGATCTTAGT TGCCAGCATT CAGTTGGGCA CTCTAAGGTG ACTGCCGGTG	1140
ACAAACCGGA AGAAGGTGGG GATGACGTCA AATCATCATG CCCCTTATGA CCTGGGCTAC	1200
CCACGTGCTA CAATGGACAG AACAAAGGGC AGCGAAACCC GCGAGGTAA GCCAATCCCC	1260
AAAATCTGTT CCCAGTTCGG ATCCAAGGTT GGAACCTCCAC TGCGGGAAAC TGGAATCCCT	1320
AAGAAATCCG GGATAACCAT GCCCCGGGGA AAAC TTTTCC GGGGCCTGGA ACCCCCGCCC	1380
GGTCCCCCCC AAGAGGTTTG AAAACCCGAA CGGGGGAGGG ACCTTTT TAG GGACCGCCCC	1440
CA	1442

<210> 2

<211> 1397

<212> ARN

<213> *Bacillus clausii* ANA39

<220>

<223> 16S

<220>

<400> 2

CTTGCTCCCG	TACGTTAGCG	GCGGACGGGT	GAGTAACACG	TGGGCACCTG	CCCCTTAGAC	60
TGGGATAACT	CCGGGAAACC	GGAGCTAATA	CCGGATAATC	CCTTTTTCCA	CCTGGAGAGA	120
GGGTGAAAGA	TGGCTTCGGG	TATCACTAGG	GGATGGGCCC	GCGGCGCATT	AGCTAGTTGG	180
TAAGGTAACG	GCTTACCAAG	GCGACGATGC	GTAGCCGACC	TGAGAGGGTG	ATCGGCCACA	240
CTGGGACTGA	GACACGGCCC	AGACTCATAC	GGGAGGCAGC	AGTAGGGAAT	CTTCCGCAAT	300
GGACGAAAGT	CTGACGGAGC	AACGCCGCGT	GAGTGAGGAA	GGCCTTCGGG	TCGTAAAGCT	360
CTGTTGTGAG	GGAAGAAGCG	GTACCGTTTCG	AATAGGGCGG	TACCTTGACG	GTACCTCACC	420
AGAAAGCCAC	GGCTAACTAC	GTGCCAGCAG	CCGCGGTAAT	ACGTAGGTGG	CAAGCGTTGT	480
CCGGAATTAT	TGGGCGTAAA	GCGCGCGCAG	GCGGCTTCTT	AAGTCTGATG	TGAAATCTCG	540
GGGCTCAACC	CCGAGCGGCC	ATTGGAAACT	GGGGAGCTTG	AGTGCAGAAG	AGGAGAGTGG	600
AATTCACGCT	GTAGCGGTGA	AATGCGTAGA	GATGTGGAGG	AACACCAGTG	GCGAAGGCGA	660
CTCTCTGGTC	TGTAAGTGAC	GCTGAGGCGC	GAAAGCGTGG	GGAGCAAACA	GGATTAGATA	720
CCCTGGTAGT	CCACGCCGTA	AACGATGAGT	GCTAGGTGTT	AGGGGTTTCG	ATGCCCCGTAG	780
TGCCGAAGTT	AACACATTAA	GCACTCCGCC	TGGGGAGTAC	GGCCGCAAGG	CTGAAACTCA	840
AAGGAATTGA	CGGGGACCCG	CACAAGCAGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTTCG	AAGCAACGCG	900
AAGAACCTTA	CCAGGTCTTG	ACATCCTTTG	ACCACCCAAG	AGATTGGGCT	TCCCCTTCGG	960
GGGCAAAGTG	ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT	GTCGTGAGAT	GTTGGGTAA	1020
GTCCCGCAAC	GAGCGCAACC	CTTGATCTTA	GTTGCCAGCA	TTAAGTTGGG	CACTCTAAGG	1080
TGACTGCCGG	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAATCATCA	TGCCCCCTTAT	1140
GACCTGGGCT	ACACACGTGC	TACAATGGAT	GGTACAAAGG	GCAGCGAAAC	CGCGAGGTGA	1200
AGCCAATCCC	ATAAAGCCAT	TCTCAGTTCG	GATTGCAGGC	TGCTACTCGC	CTGCATGAAG	1260
CCGGAATTGC	TAGTAATCGC	GGATCAGCAT	GCCGCGGTGA	ATACGTTCCC	GGGTCTTGTA	1320
CACACCGCCC	GTCACACCAC	GAGAGTTTGT	AACACCCGAA	GTCGGTGAGG	CAACCTTTTG	1380
GAGCCAGCCG	CCTAAGG					1397

<210> 3

<211> 1401

<212> ARN

<213> *Bacillus coagulans* ANA43

<220>

<223> 16S

<220>

<400> 3

TTAAAAGGTT AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA CACGTGGGCA ACCTGCCTGT AAGATCGGGA	60
TAACGCCGGG AAACCGGGGC TAATACCGGA TAGTTTTTTC CTCCGCATGG AGGAAAAAGG	120
AAAGACGGCT TCGGCTGTCA CTTACAGATG GGCCCGCGGC GCATTAGCTA GTTGGTGGGG	180
TAACGGCTCA CCAAGGCAAC GATGCGTAGC CGACCTGAGA GGGTGATCGG CCACATTGGG	240
ACTGAGACAC GGCCCAAACCT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCCG CAATGGACG	300
AAAGTCTGAC GGAGCAACGC CGCGTGAGTG AAGAAGGCCT TCGGGTCGTA AAATCTGTGT	360
GCCGGGGAAG AACAAGTGCC GTTCGAACAG GCGGCGCCT TGACGGTACC CGGCCAGAAA	420
GCCACGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTGTCCGGA	480
ATTATTGGGC GTAAAGCGCG CGCAGGCGGC TTCTTAAGTC TGATGTGAAA TCTTGCGGCT	540
CAACCGCAAG CGGTCATTGG AAATGGGAG GCTTGAGTGC AGAAGAGGAG AGTGGAAATC	600
CACGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGAGATGT GGAGGAACAC CAGTGGCGAA GGCGGCTCTC	660
TGGTCTGTAA CTGACGCTGA GGCGCGAAAG CGTGGGGAGC AAACAGGATT AGATACCCTG	720
GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGAGTGCTAA GTGTTAGAGG GTTCCGCCC TTTAGTGCTG	780
CAGCTAACGC ATTAAGCACT CCGCCTGGGG AGTACGGCCG CAAGGCTGAA ACTCAAAGGA	840
ATTGACGGGG GCCCGCACAA GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTCGAAGCA ACGCGAAGAA	900
CCTTACCAGG TCTTGACATC CTCTGACCTC CCTGGAGACA GGGCCTTCCC CTTCGGGGGA	960
CAGAGTGACA GGTGGTGAT GGTGTGTCGTC AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC	1020
CCGCAACGAG CGCAACCCTT GACCTTAGTT GCCAGCATTC AGTTGGGCAC TCTAAGGTGA	1080
CTGCCGGTGA CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTATGAC	1140
CTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGATGGT ACAAAGGGCT GCGAGACCGC GAGGTTAAGC	1200
CAATCCCAGA AAACCATTC CAGTTCGGAT TGCAGGCTGC AACCCGCCTG CATGAAGCCG	1260
GAATCGCTAG TAATCGCGGA TCAGCATGCC GCGGTGAATA CGTTCCCGGG CCTTGTACAC	1320
ACCGCCCGTC ACACCACGAG AGTTTGTAAC ACCCGAAGTC GGTGAGGTAA CCTTTACGGA	1380
GCCAGCCGCC GAAGGTGGGAC	1401