



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0004165

(51) **C12Q 1/68**
2024.01

(13) **Y**

(21) 2-2025-00200

(22) 05/07/2022

(67) 1-2022-04205

(45) 25/07/2025 448

(43) 26/09/2022 414A

(73) CÔNG TY TNHH LIVESPO PHARMA (VN)

số 22, lô 7,8, khu đô thị Văn Khê, phường La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

(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 RUỘT VÀ CƠ CẤU BỔ SUNG CHẾ PHẨM
LỢI KHUẨN NÀY VÀO NƯỚC UỐNG**

(21) 2-2025-00200

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm lợi khuẩn đường ruột để bổ sung vào nước uống chỉ chứa bào tử của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 và *Bacillus clausii* ANA39, chế phẩm lợi khuẩn đường ruột này an toàn và có lợi cho sức khoẻ đường ruột của người, cho phép cân bằng hệ vi sinh. Bằng việc cung cấp trực tiếp bào tử vi khuẩn vào nước tinh khiết thu được từ máy lọc nước, cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột này cho phép lắp đặt phù hợp với thiết bị lọc nước thông thường và cho phép cung cấp một lượng vi khuẩn hữu ích liên tục cho người sử dụng với nồng độ khoảng từ 1×10^5 đến 5×10^7 bào tử/ml, giúp cạnh tranh các vi sinh vật có hại và cân bằng hệ vi sinh vật có lợi trong đường ruột để chăm sóc nâng cao sức khoẻ đường ruột và phòng ngừa các bệnh rối loạn đường tiêu hoá.

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 ruột, quy trình sản xuất và cơ cấu để bổ sung chế phẩm lợi khuẩn này vào nước uống. Chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo sáng chế chỉ chứa bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 và *Bacillus clausii* ANA39 theo tỷ lệ thích hợp để bổ sung vào nước uống giúp duy trì hệ vi sinh có lợi trong đường ruột của người và động vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo Unicef, tình trạng ô nhiễm nguồn nước hiện nay đang diễn ra ở khắp nơi trên thế giới, đặc biệt tại các nước đang phát triển như ở miền Nam sa mạc Sahara, Đông Nam Á và Mỹ Latinh. Ở Việt Nam có tới 17 triệu người tại Việt Nam chưa được tiếp cận với nước sạch (báo cáo của viện Y học lao động và Vệ sinh môi trường). Mỗi năm có khoảng 9.000 người tử vong, khoảng 20.000 người mắc bệnh ung thư mới phát hiện mà một trong những nguyên nhân chính là do ô nhiễm nguồn nước (theo thống kê của Bộ Y tế và Bộ Tài nguyên & Môi trường), 44% trẻ em bị nhiễm giun và 27% trẻ em dưới 5 tuổi bị suy dinh dưỡng tại Việt Nam do thiếu nước sạch và vệ sinh kém (theo WHO).

Các nguyên nhân chính dẫn đến việc ô nhiễm nguồn nước sinh hoạt có thể kể đến như: thứ nhất, nguồn nước nhiễm các hợp chất hữu cơ độc và có độ bền sinh học cao như: phenol, chất bảo vệ thực vật như thuốc trừ sâu, linden, sevin, endrin; thứ hai, nguồn nước nhiễm kim loại nặng có độc tính cao như thủy ngân, chì, asen. Ngoài ra, nguyên nhân nữa gây ra ô nhiễm nguồn nước là do nhiễm các vi khuẩn có hại từ chất thải sinh hoạt của con người, động vật, các vi sinh vật này có thể gây ra các bệnh tả, bại liệt và thương hàn như: Adenovirus, Norovirus GI, Rotavirus, Sapovirus, *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium difficile*, *Shigella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *Plesiomonas shigelloides*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*. Trong một vài nghiên cứu cho thấy, khi sử dụng nước nhiễm asen để ăn uống, con người có thể mắc bệnh ung

thư da, người nhiễm chì lâu ngày có thể mắc bệnh thận, thần kinh, nhiễm amoni, nitrat, nitrit gây bệnh da xanh, thiếu máu, nhiễm lưu huỳnh lâu ngày, con người có thể bị bệnh về đường tiêu hoá. Nhiễm natri gây bệnh tim mạch và cao huyết áp.

Công nghệ lọc nước ở quy mô gia đình nhằm chủ động loại bỏ các hóa chất, kim loại, vi khuẩn, vi trùng cùng các tạp chất gây ô nhiễm để làm nước sinh hoạt. Hiện nay, có 3 loại công nghệ lọc nước ưu việt có thể kể đến là:

Công nghệ lọc nước UF (Ultra Filtration- Màng siêu lọc): sử dụng màng lọc được cấu tạo từ những sợi hydrophilic PVC (poly vinyl clorit) hình ống, màu trắng với kích thước lỗ rỗng khoảng từ 0,01 đến 0,1 μm sẽ loại bỏ phần lớn các loại virus, vi khuẩn, các phân tử có đường kính lớn hơn 0,1 μm bằng áp suất của màng lọc. Quá trình lọc diễn ra ở nhiệt độ thường và áp suất thấp từ nên tiêu thụ ít điện năng, đồng thời không thải nước.

Công nghệ lọc nước nano: sử dụng màng có kích thước lỗ siêu nhỏ, trung bình chỉ khoảng 0,001 μm , thông qua 4 bước cụ thể như sau: lọc bằng cơ học để bỏ những thành phần có kích thước lớn lỗ lọc sẽ ngăn lại; lọc bằng cơ chế hấp thụ để loại bỏ các kim loại nặng sẽ bị giữ lại nhờ cơ chế hấp thụ của lõi lọc nano; lọc bằng cơ chế trao đổi ion là xử lý nước cứng; lọc diệt khuẩn bằng công nghệ phủ bạc (Ag) để loại bỏ vi khuẩn, virus.

Công nghệ lọc nước RO (Reverse Osmosis- màng lọc thẩm thấu ngược): đây là một công nghệ lọc nước tiên tiến và hiệu quả được sử dụng phổ biến hiện nay, sử dụng màng lọc có kích thước 0,0001 μm . Màng lọc RO hoạt động trên cơ chế chuyển động của các phân tử nước nhờ áp lực nén của máy bơm cao áp đẩy các thành phần hóa học, các kim loại, tạp chất, các vi khuẩn, virus có trong nước chuyển động mạnh, văng ra vùng có áp lực thấp hay trôi theo dòng nước ra ngoài theo đường thải. Trong khi ấy các phân tử nước thì lọt qua các mắt lọc cỡ kích cỡ 0,0001 μm nhờ áp lực dư. Như vậy, sau quá trình lọc sẽ thu được nguồn nước đầu ra tinh khiết.

Các máy lọc nước được bán trên thị trường đều cho ra chất lượng nước tinh khiết, đảm bảo chất lượng nước đầu ra đạt chỉ tiêu theo tiêu chuẩn của Bộ Y tế Việt Nam. Tuy nhiên, cả 3 loại công nghệ lọc đều sử dụng màng lọc để loại bỏ hóa chất, vi khuẩn, virus, khi sử dụng không đúng cách, nguồn nước 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, bản thân trong thực phẩm cũng có nhiều vi sinh vật gây bệnh (Thomas Bintsis, Foodborne pathogens, AIMS Microbiol, 3: 529–563, 2017), khi rửa vẫn có nguy cơ đọng lại trên bề mặt dụng cụ rửa và chế biến, khi chế biến không kỹ, cũng như lưu lại thức ăn dư trong tủ lạnh sẽ vô tình là nguồn thực phẩm tiềm ẩn chứa các vi sinh vật gây bệnh (M E Macías-Rodríguez và cộng sự, Microbiological safety of domestic refrigerators and the dishcloths used to clean them in Guadalajara, Jalisco, Mexico, J Food Prot, 76: 984-90, 2013).

Việc sử dụng lợi khuẩn (probiotic) để giảm tải mầm bệnh trong ruột được gọi là chiến lược lợi khuẩn (Callaway, Anderson, et al., 2003). Các kỹ thuật probiotic liên quan đến việc đưa một quần thể vi sinh vật có lợi vào ruột để ức chế sự phát triển của vi sinh vật có hại và thiết lập hay phục hồi cân bằng lại hệ vi sinh đường ruột, mục tiêu của phương pháp này là để loại trừ sự hình thành của các vi khuẩn gây bệnh (Doyle và Erickson, 2006, Gaggia và cộng sự, 2010, Patterson và Burkholder, 2003). Điều này có thể thực hiện được do probiotic có khả năng ức chế bám dính và phát triển của các loại vi sinh vật gây hại trong đường ruột, tiêu biểu như các vi khuẩn như *Salmonella*, *Campylobacter*, và *Shigella*. Ngoài ra, probiotic còn kích thích hệ thống miễn dịch của vật chủ, cải thiện thành phần và chức năng của quần thể vi sinh vật đường ruột (O'Toole & Cooney, 2008).

Một ví dụ về chủng lợi khuẩn cạnh tranh vi khuẩn gây bệnh hỗ trợ cho liệu pháp bù nước trong điều trị tiêu chảy cấp đó là chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* DSM 17938-được sử dụng như một thuốc khi làm giảm tần suất đi ngoài và lượng phân trong mỗi lần đi kể từ ngày thứ 2-3 sử dụng thuốc (Francavilla R et al A (2012) Randomised clinical trial: *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 vs. placebo in children with acute diarrhoea-a double-blind study. *Aliment Pharmacol Ther.* 36 (4): 363-9); hỗn hợp probiotic gồm: *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Lactobacillus acidophilus* LB, *Saccharomyces boulardii*; hỗn hợp của *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* và *Lactobacillus bulgaricus* làm giảm thời gian tiêu chảy trong khoảng 24 giờ và tần suất đi phân giảm vào ngày thứ hai 2 sử dụng sản phẩm (Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF (2010) Probiotics for treating

acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev.* (11): CD003048). Ngoài ra, probiotic còn hỗ trợ chống viêm và hội chứng kích thích đường ruột. Các chứng bệnh viêm ruột như Pouchitis, bệnh Crohn, cũng như hội chứng viêm ruột kích thích (Iritable bowel syndrome-IBS) là do sự thay đổi của hệ vi sinh đường ruột hoặc nhiễm trùng Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EM (2010) The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 59: 325-32.

So với các lợi khuẩn đã đề cập trên, bào tử lợi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có ưu điểm là bền với các tác nhân vật lý (nhiệt độ, tia UV), hoá học (các dung môi hữu cơ, nồng độ muối cao, pH acid, kiềm...) nên độ sống của vi sinh vật được duy trì tốt trong suốt quá trình bảo quản và sử dụng. Đã có một số nghiên cứu về ứng dụng vi khuẩn của hai loài *Bacillus subtilis* và *Bacillus clausii* cho thấy chúng là những loài vi khuẩn hữu ích, thích hợp để phát triển chế phẩm vi sinh hữu ích để hỗ trợ tiêu hóa, đặc biệt ở trẻ em (de Castro JA, Guno MJV, Perez MO (2019) *Bacillus clausii* as adjunctive treatment for acute community-acquired diarrhea among Filipino children: a large-scale, multicenter, open-label study (Coddle). *Trop Dis Travel Med Vaccines* 5: 14; Ianiro G, Rizzatti G, Plomer M, Lopetuso L, Scaldaferri F, Franceschi F, Cammarota G, Gasbarrini A (2018) *Bacillus clausii* for the Treatment of Acute Diarrhea in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients* 10). Thử nghiệm chứng minh *Bacillus clausii* có hoạt tính ức chế khả năng sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh và tăng cường khả năng miễn dịch (Urdaci và cộng sự; Urdaci MC, Bressollier P, Pinchuk I (2004) *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *J Clin Gastroenterol* 38: S86-90). Thông qua cơ chất được tiết ra môi trường trong quá trình sinh trưởng thứ cấp, *Bacillus clausii* ức chế sự phát triển của các vi khuẩn Gram dương gây rối loạn tiêu hóa đường ruột, tiêu biểu như *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, và *Clostridium difficile* (Urdaci và cộng sự; Urdaci MC, Bressollier P, Pinchuk I (2004) *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *J Clin Gastroenterol* 38: S86-90). Bên cạnh đó, *Bacillus clausii* được tìm thấy có tác dụng làm giảm các hiệu ứng gây độc tế bào của vi khuẩn *Clostridium difficile* và *Bacillus cereus* thông qua quá trình bài tiết M-protease, một enzym phân giải protein (Ripert và cộng sự; Ripert G, Racedo SM, Elie AM, Jacquot C, Bressollier P, Urdaci MC (2016) Secreted Compounds of the Probiotic

Bacillus clausii Strain O/C Inhibit the Cytotoxic Effects Induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* Toxins. *Antimicrob Agents Chemother* 60: 3445-54).

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, tuy nhiên các bệnh đường tiêu hóa do loạn khuẩn vẫn còn là một vấn đề khá phổ biến, gây ảnh hưởng tới chất lượng cuộc sống. Lý do chủ yếu là do nguồn nước, thực phẩm bị ô nhiễm và không phải lúc nào mọi người cũng có ý thức chủ động sử dụng lợi khuẩn để phòng bệnh. Vì vậy, việc chủ động cung cấp lượng bào tử lợi khuẩn vừa đủ bằng cách bổ sung lợi khuẩn vào nguồn nước sinh hoạt hàng ngày có ý nghĩa quan trọng trong phòng ngừa các bệnh đường tiêu hóa. Trên thị trường có rất nhiều hãng ứng dụng sản xuất nhiều máy lọc nước an toàn, với chất lượng nước đầu ra đạt tiêu chuẩn nước uống của bộ Y tế. Tuy nhiên, chưa có hãng máy lọc nước nào cho ra loại nước bổ sung lợi khuẩn, nên việc chế tạo ra cụm cơ cấu bổ sung lợi khuẩn vào máy lọc nước có ý nghĩa ứng dụng thực tiễn trong việc cung cấp nước chứa lợi khuẩn để chăm sóc sức khỏe đường ruột 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 ruột để bổ sung vào nước uống nhằm cân bằng hệ vi sinh trong đường ruột của động vật sử dụng, phương pháp sản xuất chế phẩm này, cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột vào nước uống. Sáng chế cũng đề cập đến thiết bị lọc nước bổ sung lợi khuẩn đường ruột có lắp cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chế phẩm lợi khuẩn đường ruột để bổ sung vào nước uống, trong đó chế phẩm này ở dạng lỏng chỉ chứa bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 và bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.2 với tổng nồng độ hai loại bào tử này nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml, tỷ lệ lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39/*Bacillus subtilis* ANA46 là từ 1% đến 100%, và hai 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 ANA39 và ANA46.

Sáng chế cũng đề cập đến chủng vi khuẩn vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39, 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 ANA39.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) 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, MgSO₄ từ 0,5 đến 2 g/l, Ca(NO₃)₂ từ 0,5 đến 3 mM, MnCl₂ từ 5 đến 15 mM và FeSO₄ 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;

b) thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46, trong đó chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 có số lưu giữ ANA46 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, K₂HPO₄ từ 2 đến 4 g/l, nhiệt độ từ 30°C đến 37°C, tốc độ khuấy từ 150 đến 300 vòng/phút, lượng khí oxi cấp với từ 0,5 đến 3 mM/phút, pH duy trì trong khoảng từ 6,0 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 subtilis* ANA46; và

c) thu chế phẩm lợi khuẩn đường ruột bằng cách phối trộn bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 theo tỷ lệ lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39/*Bacillus subtilis* ANA46 là từ 1% đến 1%, sau đó pha

loãng hỗn hợp bào tử này với nước cất đến nồng độ tổng hai loại bào tử này nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml thu được chế phẩm lợi khuẩn đường ruột ở dạng lỏng.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột vào nước uống, trong đó cơ cấu này bao gồm bơm vi lượng được điều khiển bởi bộ điều khiển để bơm một lượng chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo điểm 1 được đựng trong bình chứa vào đường nước uống, trong đó:

bơm vi lượng được nối giữa bình chứa và đường nước uống để bơm chính xác một lượng chế phẩm có trong bình chứa vào đường nước uống để thu được nước uống chứa lợi khuẩn đường ruột với lượng từ 1×10^5 đến 5×10^7 bào tử/ml;

bộ điều khiển gồm mạch điều khiển được gắn vi xử lý để nhận tín hiệu từ cảm biến lưu lượng nước chảy trong đường nước uống 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 ruột có trong bình chứa vào đường nước uống để thu được nước uống chứa $1 \times 10^5 - 5 \times 10^7$ bào tử/ml; và

bình chứa để chứa chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo điểm 1, trong đó khác biệt ở chỗ bình chứa này chứa bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 được pha với nước với tổng hai loại bào tử này nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml và tỷ lệ lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39/*Bacillus subtilis* ANA46 là từ 1% đến 1%, hai 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.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bình chứa chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế được lắp với bơm vi lượng qua van một chiều cho phép bơm và cấp chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo sáng chế vào đường nước uống một chiều.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bình chứa mà chứa chế phẩm lợi khuẩn này có thể tháo lắp để thay thế hoặc bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo sáng chế.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến thiết bị lọc nước bổ sung lợi khuẩn đường ruột được lắp cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo sáng chế, trong

đó cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn này được lắp đặt để bổ sung vào đầu ra của đường nước uống nhằm thu được nước uống chứa lợi khuẩn đường ruột với lượng từ 1×10^5 đến 5×10^7 bào tử/ml.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình vẽ sơ đồ cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột vào nước uống theo sáng chế.

Hình 2 là hình vẽ sơ đồ thiết bị lọc nước bổ sung lợi khuẩn theo một phương án cụ thể theo sáng chế. Trong đó thiết bị lọc nước này là thiết bị lọc nước màng nano và nước được lọc qua các cốc lọc màng nano để loại bỏ tạp chất và được gắn cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế để thu được nước uống chứa lợi khuẩn đường ruột.

Hình 3 là hình vẽ sơ đồ thiết bị lọc nước bổ sung lợi khuẩn theo sáng chế theo một phương án cụ thể. Trong đó thiết bị này là thiết bị lọc nước qua màng RO với nước được lọc qua các cốc lọc để loại bỏ tạp chất và được bơm tăng áp bơm qua màng lọc RO. Cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn được lắp để bổ sung lợi khuẩn đường ruột vào nước sau khi qua màng RO để vào bình tích áp để cung cấp nước uống chứa lợi khuẩn đường ruột.

Hình 4 là ảnh chụp bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 (A) và *Bacillus clausii* ANA39 (B) thu được sau khi ly tâm dịch tế bào nuôi cấy.

Hình 5 là hình ảnh đĩa đếm khuẩn lạc sau khi cấy 100 μ l của các mẫu nước từ các loại máy lọc nước được pha loãng 1000 lần: (A) nước lọc từ thiết bị lọc nước nano, (B) nước lọc từ thiết bị lọc nước nano bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột gồm bào tử lợi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 và *Bacillus clausii* ANA39, (C) nước lọc từ thiết bị lọc nước RO, (D) nước lọc từ thiết bị lọc nước RO được bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột gồm bào tử lợi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 và *Bacillus clausii* ANA39.

Hình 6 là ảnh chụp các cơ quan nội tạng của tất cả các thử nghiệm 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: nhóm đối chứng (A), nhóm thử nghiệm liều 6×10^{10} bào tử lợi khuẩn/ngày (B), nhóm thử nghiệm liều $1,8 \times 10^{11}$ bào tử lợi khuẩn/ngày (C) được cho uống liên tục trong 28 ngày.

Hình 7 là hình ảnh giải phẫu mô bệnh học gan, thận, ruột non, đại tràng của các thử thuộc: nhóm đối chứng (A), nhóm thử nghiệm liều 6×10^{10} bào tử lợi khuẩn/ngày (B), nhóm thử nghiệm liều $1,8 \times 10^{11}$ bào tử lợi khuẩn/ngày (C) được cho uống liên tục trong 28 ngày: Tiêu bản bao gồm (1) gan, (2) thận, (3) ruột non và (4) đại tràng được cố định bằng Formalin 10 %, nhuộm bằng dung dịch nhuộm Hematoxylin Eosin (HE) và quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400 lần.

Hình 8 là biểu đồ biểu diễn tỉ lệ các loài vi khuẩn chiếm đa số ở đường ruột của thử thuộc: nhóm đối chứng ở ngày 0 (A) và sau 28 ngày (B); nhóm thử nghiệm liều $1,8 \times 10^{11}$ bào tử lợi khuẩn/ngày ở ngày 0 (C) và sau 28 ngày (D).

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 ruột để bổ sung vào nước uống, trong đó chế phẩm này ở dạng lỏng bao gồm bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 và bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.2. Chế phẩm này chứa tổng nồng độ hai loại bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39/*Bacillus subtilis* ANA46 nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml. Tỷ lệ lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39/*Bacillus subtilis* ANA46 là từ 1% đến 1%. Hai 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 ANA39 và ANA46.

Chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 là chủng vi khuẩn thuộc họ *Bacillus* sp. 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 8,0. Hình ảnh bào tử lợi khuẩn tinh khiết 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 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 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 plasmid 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.1 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.

Sáng chế cũng đề cập đến chủng vi khuẩn vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46, trong đó chủng vi khuẩn này có trình tự 16S 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 ANA46.

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 là chủng vi khuẩn thuộc họ *Bacillus* sp. được phân lập từ phân người. Chủng này có khuẩn lạc mọc trên môi trường Luria Bertani (môi trường LB), pH 7,4, có hình thái phẳng, mép đều, khuẩn lạc có màu trắng kích thước khoảng 2-4 mm. Vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 là vi khuẩn Gram dương, hình que, kích thước chiều ngang khoảng 1 μ m. Vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 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* ANA46 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 6,0 đến 8,0 Hình ảnh bào tử *Bacillus subtilis* ANA46 tinh khiết 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* ANA46 có khả năng sinh trưởng 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%. Ngoài ra, chủng này có khả năng sản sinh tốt một số enzym như amylaza, caseinaza, gelatinaza cũng như là catalaza và lipaza.

Các thử nghiệm *in vitro* cho thấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 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.2. Hiện chủng vi khuẩn này đang được lưu giữ với mã số ANA46 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 clausii* ANA39 và *Bacillus subtilis* ANA46 này thu được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus subtilis* ANA46 riêng rẽ để sinh khối tích tụ bào tử, sau đó phá vỡ tế bào sinh dưỡng, thu bào tử tinh sạch.

Các chủng vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus subtilis* ANA46 trải qua quá trình phân lập, sàng lọc và tuyển chọn dựa trên các tiêu chí: (i) sinh tổng hợp mạnh các enzym có lợi cho đường tiêu hoá (amylaza, proteaza, lipaza), (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 ruột, (iv) kích thích miễn dịch tự nhiên ở đường ruột. Sau quá trình phân lập, tuyển chọn các tác giả đã thu được hai chủng vi khuẩn thuộc loài *Bacillus clausii* và *Bacillus subtilis* có hoạt tính vượt trội. Các chủng này được kiểm tra bằng các giải trình tự rARN 16S và so sánh với ngân hàng gen. Trình tự rARN 16S của vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 nêu trong SEQ ID NO.1 và *Bacillus subtilis* ANA46 nêu trong SEQ ID NO.2. Các chủng vi khuẩn này được lưu giữ với mã ANA39 và ANA46, 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 ruột nhằm ức chế các vi sinh vật kích ứng gây bệnh hệ đường ruột, ví dụ vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy cấp thì bổ sung một lượng vi khuẩn lợi khuẩn đường ruột 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 ruột. 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 qua môi trường axit ở dạ dày. 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 ruột theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) thu bào tử thu bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39; b) thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46; và c) thu chế phẩm lợi khuẩn đường ruột.

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, đường dextroza từ 1 đến 3 g/l, NaCl từ 4 đến 8 g/l, KCl từ 0,5 đến 2 g/l, MgSO₄ 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 Ca(NO₃)₂ từ 0,5 mM đến 3 mM, MnCl₂ từ 5 mM đến 15 mM, FeSO₄ 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 oxi 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.

Quá trình nuôi cấy thu bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 được thực hiện bằng cách bổ sung dịch nuôi cấy chủng giống *Bacillus clausii* ANA39 đã được hoạt hóa

vào môi trường nuôi cấy đã được khử trùng. Tỷ lệ dịch nuôi cấy chủng *Bacillus clausii* ANA39 đã được hoạt hóa với môi trường nuôi cấy là từ 2 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 7,5 đến 8,5. Thời gian nuôi cấy được duy trì trong khoảng từ 2 đến 3 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 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 ruột theo sáng chế.

Trong bước thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46, bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 là bào tử thu được từ chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46. Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 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 ANA46.

Chủng giống gốc *Bacillus subtilis* ANA46 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* ANA46. 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* ANA46. 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* ANA46 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 subtilis* ANA46 thích hợp được sử dụng theo sáng chế 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, K_2HPO_4 từ 2 đến 4 g/l. Các thành phần môi trường này được hòa với nước cất 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 3 g/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 6,0 đến 8,5 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* ANA46.

Để nuôi cấy thu sinh khối vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46, vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 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 150 đến 300 vòng/phút, lượng khí oxy cấp với từ 0,5 đến 3 mM/phút, pH duy trì trong khoảng từ 6 đến 8, 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 subtilis* ANA46.

Quá trình nuôi cấy thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 được thực hiện bằng cách bổ sung dịch nuôi cấy chủng giống *Bacillus subtilis* ANA46 đã được hoạt hóa vào môi trường nuôi cấy đã được khử trùng ở trên. Tỷ lệ dịch nuôi cấy chủng giống *Bacillus subtilis* ANA46 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 6,0 đến 8,5. 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* ANA46, 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* ANA46. 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 7,0 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* ANA46 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 ruột theo sáng chế.

Trong bước thu chế phẩm lợi khuẩn đường ruột bằng cách phối trộn bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 theo tỷ lệ lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39/*Bacillus subtilis* ANA46 là từ 1% đến 1%. Tiếp đó pha loãng hỗn hợp bào tử này với nước cất đến nồng độ sao cho tổng hai loại bào tử này nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml thu được chế phẩm lợi khuẩn đường ruột ở dạng lỏng.

Các tác giả đã nghiên cứu và nhận thấy rằng, để có hiệu quả tốt đến hệ vi sinh đường ruột, thì ngoài việc các vi sinh vật bổ sung phải vượt qua được môi trường axit trong dạ dày, mà các vi sinh vật này cần phải tạo được hiệu quả tạo hệ vi sinh trong đường ruột với mật độ đủ để cạnh tranh được với các vi khuẩn gây hại. Do đó, ngoài việc sử dụng các bào tử của vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus subtilis* ANA46 thì cần có tỷ lệ phối trộn thích hợp. Cụ thể là các bào tử vi khuẩn thu được ở trên có nồng độ khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{11} bào tử/ml được phối chế với nhau sao cho lượng bào tử *Bacillus subtilis* ANA46 gấp khoảng từ 100 đến 1000 lần lượng bào tử *Bacillus clausii* ANA39, hay nói cách khác tỷ lệ lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39/*Bacillus subtilis* ANA46 là từ 1% đến 1%. Theo cách khác, trong chế phẩm cuối thu được, lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 đạt ít nhất 1×10^9 bào tử/ml và lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 đạt ít nhất 1×10^6 bào tử/ml. Chế phẩm lợi khuẩn đường ruột thu được ở dạng lỏng, màu trắng ngà.

Sáng chế còn đề cập đến cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột vào nước uống. Cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột vào nước uống theo sáng chế nhằm cấp một lượng vi khuẩn có trong chế phẩm lợi khuẩn đường ruột nhằm hỗ trợ duy trì hệ vi sinh đường ruột khỏe mạnh, giúp tránh được những tác hại do vi khuẩn gây hại phát triển quá mức trong đường ruột gây ra, ví dụ đau bụng hoặc tiêu chảy.

Như thể hiện trên Hình 1, là một phương án thể hiện sơ đồ cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột vào nước uống. Cơ cấu này bao gồm bơm vi lượng được điều khiển bởi bộ điều khiển để bơm một lượng chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo sáng chế được đựng trong bình chứa vào đường nước uống.

Bơm vi lượng 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 đường nước uống. Bơm vi lượng này được gắn giữa bình chứa và đường nước uống để bơm chính xác một lượng chế phẩm có trong bình chứa vào đường nước uống. Căn cứ vào lưu lượng trên đường nước uống, bơm vi lượng sẽ bơm một lượng được tính trước sao cho có thể thu được nước uống chứa bào tử lợi khuẩn đường ruột với lượng từ 1×10^5 đến 5×10^7 bào tử/ml. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn có thể tính được lượng chế phẩm được cấp vào đường nước uống theo lưu lượng dòng chảy. Đường nước uống theo sáng chế

tốt nhất là đường nước ra của máy lọc nước, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, máy lọc nước dạng lọc màng nano hoặc màng lọc RO để cung cấp nước uống cho người và động vật sử dụng.

Dựa trên các thay đổi về lưu lượng dòng chảy của đường nước uống cũng như nồng độ của bào tử vi khuẩn có trong bình chứa mà bơm vi lượng có thể được điều chỉnh thông qua bộ điều khiển. Theo một phương án cụ thể, bộ điều khiển này bao gồm mạch điều khiển được gắn vi xử lý để nhận tín hiệu từ cảm biến lưu lượng nước chảy trong đường nước uống 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 ruột có trong bình chứa vào đường nước uống để thu được nước uống chứa $1 \times 10^5 - 5 \times 10^7$ bào tử/ml 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 ruột cấp vào đường nước uống phối trộn với dòng chảy trên đường nước uống này để thu được nước uống chứa lượng bào tử thích hợp.

Một phương án ưu tiên cụ thể đối với các trường hợp lưu lượng dòng chảy trên đường nước uống không đổi, hàm lượng bào tử của chế phẩm lợi khuẩn đường ruột trong bình chứa không đổi thì lưu lượng của bơm vi lượng có thể được cố định ở một giá trị định trước, khi đó tín hiệu để bơm vi lượng bơm chế phẩm lợi khuẩn sẽ được thiết lập theo tín hiệu cấp nước trên đường nước uống.

Bình chứa để chứa chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo sáng chế. Bình chứa này không bị giới hạn cụ thể, nhưng tốt nhất ở dạng túi, bình hoặc dạng ống với thể tích từ 50 đến 500 ml và có các ren nối cho phép tháo lắp dễ dàng với đường cấp của bơm vi lượng. Bình chứa này chứa chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế, cụ thể là bình chứa này chứa bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 được pha với nước với tổng hai loại bào tử này nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml. Tỷ lệ lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39/*Bacillus subtilis* ANA46 là từ 1% đến 1% và hai chủng vi khuẩn tạo 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.

Như vậy, trong quá trình sử dụng, bằng việc bơm cấp lượng chế phẩm lợi khuẩn có trong bình chứa vào đường nước uống 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 đường nước uống như được thiết lập trước.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thiết bị lọc nước bổ sung lợi khuẩn đường ruột, trong đó thiết bị này được lắp cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo sáng chế. Các hình 2 và hình 3 thể hiện sơ đồ về thiết bị lọc nước cụ thể được được lắp cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột.

Hình 2 mô tả một phương án ưu tiên về thiết bị lọc nước bổ sung lợi khuẩn đường ruột sử dụng màng siêu lọc hoặc màng lọc nano. Thiết bị lọc nước này bao gồm các cột lọc (lõi lọc) được ghép nối tiếp nhau. Cột lọc 1 thường là cột lọc polypropylen cho phép lọc thô, trong đó loại bỏ các thành phần như rỉ sắt, rong rêu, cát. Cột lọc 2 (UDF) có bản chất là carbon, cho phép hấp phụ các ion kim loại nặng khử hóa chất độc tố. Cột lọc carbon (CTO) 3 cho phép khử màu, khử mùi, làm trong nước và cân bằng pH. Các cột lọc này được lắp nối tiếp nhau để cho phép lọc nước từ nguồn nước vào để thu được nước lọc có thể uống được trực tiếp. Các phương án khác về quá trình lọc có thể thực hiện hoặc đưa ra bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và không thuộc phạm vi của sáng chế, miễn là nước thu được có khả năng uống trực tiếp. Để bổ sung bào tử lợi khuẩn, cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn được lắp sau các lõi lọc, trước vòi nước để thông qua bơm vi lượng, bào tử lợi khuẩn được bổ sung trực tiếp vào đường nước trước khi chảy qua vòi cho người hoặc động có thể sử dụng.

Hình 3 mô tả sơ đồ thiết bị lọc nước RO, trong đó thiết bị này được gắn cơ cấu bổ sung lợi khuẩn đường ruột theo sáng chế. Trong đó nước sau khi đi qua các cột lọc (lõi lọc) cho phép loại bỏ các thành phần khoáng, vi lượng, đa lượng và vi khuẩn sẽ được qua bơm tăng áp để bơm lọc qua màng lọc RO. Cơ cấu bổ sung lợi khuẩn đường ruột theo sáng chế được gắn phía sau màng lọc RO để bổ sung lợi khuẩn vào nước sạch vào

đường nước thành phẩm. Nước này có thể được bơm vào bình tích áp trước khi chảy qua vòi để cung cấp cho người sử dụng.

Theo một phương án cụ thể, nước sau khi lọc có thể được cung cấp cho người sử dụng thông qua vòi nước của thiết bị lọc nước RO. Bơm vi lượng được sử dụng khi này có thể là bơm nhu động kết nối chung với nguồn của bơm tăng áp (hoặc được kích hoạt khi máy bơm áp hoạt động) của máy lọc nước. Cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn theo sáng chế được lắp với bơm và cấp vào đường nước thông qua van một chiều qua khớp nối chữ T. Khi áp suất trong bình tích áp của hệ thống lọc giảm xuống đến mức nhất định, role áp suất sẽ đóng điện cấp cho máy tăng bơm để bơm nước lọc qua màng RO với một lượng xác định, khi đó đồng hồ bơm nhu động cũng hoạt động để cung cấp một lượng dung dịch chứa bào tử lợi khuẩn trong bình chứa hòa với nước sau khi lọc để vào bình tích áp. Khi áp suất trong bình đủ lớn, bơm áp và bơm nhu động sẽ ngắt để tạo ra nước 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 nước qua màng lọc RO sao cho nồng độ bào tử lợi khuẩn trong nước lọc đầu ra đạt khoảng $1 \times 10^5 - 5 \times 10^7$ bào tử/ml, đảm bảo cho lượng lợi khuẩn cho mỗi người sử dụng khoảng từ 100 ml đến 2 lít nước lọc này để ăn và uống hàng ngày sẽ hấp thụ được khoảng 100 triệu - 10 tỷ bào tử lợi khuẩn. Lượng bào tử lợi khuẩn này nằm trong khuyến cáo bởi tổ chức khoa học Probiotic và Prebiotic quốc tế cho liều dùng lợi khuẩn hàng ngày tùy theo mục đích phòng ngừa hay hỗ trợ điều trị các bệnh đường tiêu hoá.

Như vậy, cần thấy rằng, việc gắn cơ cấu bổ sung lợi khuẩn theo sáng chế vào thiết bị lọc nước gia dụng hoặc thiết bị lọc nước công nghiệp hoàn toàn có thể thực hiện được tùy vào các thiết bị lọc nước đã biết. Các thiết bị lọc nước gia dụng có thể được gắn cơ cấu bổ sung lợi khuẩn theo sáng chế này khác biệt ở chỗ không cấp nước tinh khiết mà cung cấp nước chứa bào tử vi khuẩn hữu ích đường ruột, giúp hỗ trợ ổn định hệ vi sinh đường ruột của người và động vật.

Các thiết bị lọc nước được lắp cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn cho phép thu được nước uống chứa lợi khuẩn đường ruột với lượng từ 1×10^5 đến 5×10^7 bào tử/ml.

Một ví dụ minh họa cụ thể đối với thiết bị lọc nước gia dụng, nước đầu vào được bơm qua máy lọc nước thông thường hoặc máy lọc nước RO gia dụng với công suất khoảng 5-20 L/giờ. Khi đó cơ cấu bổ sung lợi khuẩn sẽ bơm cấp vào với lưu lượng

khoảng từ 0,25-10 ml/giờ cho phép cấp lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 nồng độ khoảng từ 1×10^9 đến 1×10^{10} bào tử/ml để thu được nước có nồng độ bào tử nằm trong khoảng từ 1×10^5 đến 1×10^7 bào tử/ml. Khi đó với lượng nước sử dụng theo khuyến cáo, người uống nước này sẽ được cung cấp một lượng vi khuẩn đủ để duy trì hệ vi sinh vật đường ruột khỏe mạnh, giúp loại bỏ các vi khuẩn gây hại.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất dung dịch lợi khuẩn đường ruột

Thu nhận chủng giống gốc vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và *Bacillus subtilis* ANA46 có số lưu giữ lần lượt là ANA39 và ANA46 tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của Công ty TNHH ANABIO R&D, Lô 7,8 Liền kề 22, KĐT Văn Khê, La Khê, Hà Đông, 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, soy pepton, đường dextroza, các loại muối NaCl, KCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $FeSO_4$, $MgSO_4$, $Ca(NO_3)_2$, $MnCl_2$, 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 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 tiệt 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, 1800 g pepton đậu nành, 600g NaCl, 150g KCl, 200g đường dextroza, 150 g muối $MgSO_4$ 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 $Ca(NO_3)_2$ đến nồng độ cuối 2 mM, $MnCl_2$ đến nồng độ cuối 10 mM và $FeSO_4$ 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 100 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 $3,4 \times 10^9$ 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 hạt đều như trên Hình 4B.

+ Thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46

Cấy mẫu chủng giống gốc *Bacillus subtilis* ANA46 trong ống thạch nghiêng vào trong 1 lít môi trường LB tiết trùng, nuôi lắc hoạt hóa ở nhiệt độ khoảng 35°C trong 2 ngày để hoạt hóa chủng giống *Bacillus subtilis* ANA46.

Cân 300 g cao nấm men, 1,7 kg pepton đậu nành, 500 g NaCl, 200 g đường dextroza, 250 g K₂HPO₄, 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, 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* ANA46. Bào tử này được định lượng trong nước đến $3,2 \times 10^{11}$ CFU/mL, thu được 500 mL bào tử *Bacillus subtilis* ANA46.

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 dung dịch probiotic

Bổ sung 100 ml dịch chứa bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 ở nồng độ $3,2 \times 10^{11}$ bào tử/ml, 1 ml dịch chứa *Bacillus clausii* ANA39 ở nồng độ $3,4 \times 10^{10}$ bào tử/ml, bổ sung nước cất 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 300 ml/túi bởi máy tự động. Sau khi đánh giá cảm quan thì từ 20 lít dung dịch hỗn hợp bào tử thu được 65 túi chế phẩm probiotic dạng hỗn hợp bào tử *Bacillus subtilis* ANA46 và *Bacillus clausii* ANA39 với nồng độ tổng cộng $1,5 \times 10^9$ bào tử/ml.

Ví dụ 2: Thiết bị lọc nước bổ sung lợi khuẩn đường ruột

Cơ cấu bổ sung lợi khuẩn đường ruột được lắp trực tiếp và thiết bị lọc nước RO gia dụng, cơ cấu này bao gồm bơm vi lượng với sử dụng đầu bơm YZ15 và ống silicon 16#, lưu lượng được thiết lập theo lưu lượng dòng chảy của thiết bị cấp nước đạt 20 ml/giờ. Túi nhựa dung tích 300 ml chứa lợi khuẩn đường ruột theo Ví dụ 1 được gắn vào đầu hút của bơm vi lượng cho phép cấp bào tử lợi khuẩn thu được từ ví dụ 1 có mật độ $1,5 \times 10^9$ bào tử/ml. Bơm vi lượng là bơm nhu động được thiết lập dựa trên lưu lượng nước chảy qua ống nước thành phẩm của thiết bị lọc nước và hoạt động đồng thời với bơm tăng áp 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 máy bơm áp và được kích hoạt khi máy bơm áp của thiết bị lọc nước 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 qua van 1 chiều và kết nối với đường nước sau màng lọc RO qua khớp nối chữ T, trước bình tích áp.

Khi áp suất trong bình tích áp của hệ thống lọc giảm xuống đến mức nhất định, role áp suất sẽ đóng điện cấp cho máy bơm áp, đồng thời bơm nhu động cũng hoạt động bơm bào tử lợi khuẩn trộn cùng với nước RO với tỉ lệ bổ sung 1 ml bào tử lợi khuẩn/1 L nước để đi vào bình tích áp. Khi áp suất trong bình đủ lớn, bơm áp và bơm nhu động sẽ ngắt để tạo ra nước bổ sung hỗn dịch tinh khiết chứa bào tử sống có mật độ bào tử nằm trong khoảng dự kiến là 1×10^5 đến 1×10^7 bào tử/ml.

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

Để xác định mật độ vi khuẩn có trong nước sau khi qua máy lọc, lấy 10 ml nước tại vòi ra của máy lọc nước bổ sung lợi khuẩn ở 3 thời điểm khác nhau, sau đó, tiến hành

kiểm tra, đánh giá khả năng sống của vi khuẩn. Phương pháp thử nghiệm được tiến hành bằng phương pháp nuôi cấy, pha loãng theo loạt và nuôi cấy trong 1 ngày trên môi trường chuẩn để xác định khả năng hoạt động của vi khuẩn khi cấp vào nước lọc. Kết quả trung bình của tổng số vi khuẩn của 03 lần nuôi cấy của mỗi mẫu được nêu trong Bảng 2 và trên Hình 5.

Hình 5 là hình ảnh đĩa đếm khuẩn lạc sau khi cấy 100 μ l của các mẫu nước từ các loại máy lọc nước được pha loãng 1000 lần: (A) nước lọc từ thiết bị lọc nước nano, (B) nước lọc từ thiết bị lọc nước nano bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột gồm bào tử lợi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 và *Bacillus clausii* ANA39, (C) nước lọc từ thiết bị lọc nước RO, (D) nước lọc từ thiết bị lọc nước RO được bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột gồm bào tử lợi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 và *Bacillus clausii* ANA39.

Bảng 2. Kết quả đánh giá khả năng sống của vi sinh vật trong chế phẩm probiotic

STT	Tên mẫu	Tổng số vi khuẩn (CFU/ml)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
1	Máy lọc thường	0	0	0	0
2	Máy lọc thường bổ sung bào tử lợi khuẩn	$3,7 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$
3	Máy lọc RO	0	0	0	0
4	Máy lọc RO bổ sung bào tử lợi khuẩn	$4,2 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$

Theo bảng trên cho thấy, trước khi bổ sung bào tử lợi khuẩn máy lọc nước không có chứa vi khuẩn, sau khi bổ sung bào tử lợi khuẩn vào máy lọc, nước đầu ra sẽ có chứa bào lợi khuẩn với nồng độ nằm trong khoảng cho phép là từ 10^5 đến 10^7 CFU/ml. Như vậy với một người sử dụng trung bình 1 đến 2 lít nước/ngày sẽ được cung cấp khoảng từ 10^8 đến 10^{10} bào tử lợi khuẩn, một lượng vi khuẩn phù hợp cho người sử dụng lâu dài một hệ vi sinh vật đường ruột khỏe mạnh.

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

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 trong thời gian từ ngày 17/06/2021 đến 29/07/2021.

Chế phẩm thử nghiệm ở dạng lỏng được đóng gói 5 ml/ống chứa bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 và bào tử của vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 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 50 con chuột nhắt trắng giống Swiss, với liều dùng gấp 60 lần liều khuyến cáo sử dụng hàng ngày ở người (tương đương $1,8 \times 10^{11}$ bào tử/ngày) 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^{10} bào tử/ người/ ngày và liều gấp 3 lần tương đương $1,8 \times 10^{11}$ 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 khỏe 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 hình ảnh quan sát đại thể các cơ quan nội tạng của thỏ thử nghiệm 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^{10} bào tử lợi khuẩn/ngày, (C) nhóm thử nghiệm liều $1,8 \times 10^{11}$ 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, ruột non, đại tràng 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, ruột non, đại tràng 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 20,0 ml mẫu thử/kg chuột đến 60,0 ml mẫu thử/kg chuột (tương đương 6×10^{10} bào tử/người/ngày và $1,8 \times 10^{11}$ bào tử/người/ngày) so với nhóm chứng. Trong đó (A) nhóm đối chứng, (B) nhóm thử nghiệm liều 6×10^{10} bào tử lợi khuẩn/ngày, (C) nhóm thử nghiệm liều $1,8 \times 10^{11}$ bào tử lợi khuẩn/ngày được cho uống liên tục trong 28 ngày: Các hình ảnh bao gồm (1) gan, (2) thận, (3) ruột non và (4) đại tràng 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 (gấp 60 lần lượng khuyến cáo) và không gây độc bán trường diễn khi sử dụng lâu dài trong 1 tháng với nồng cao gấp 3 lần lượng khuyến cáo.

Ví dụ 5. Đánh giá hiệu quả làm tăng mật độ lợi khuẩn trong hệ vi sinh đường ruột của chế phẩm lợi khuẩn đường ruột

Thỏ được sử dụng làm mô hình để đánh giá tác dụng cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột khi sử dụng chế phẩm. Mẫu phân thỏ của 2 nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm được lấy tại 2 thời điểm ngày 0 (trước khi cho thỏ ăn chế phẩm) và ngày 28 sau khi cho thỏ ăn chế phẩm để phân tích toàn bộ hệ vi sinh vật (microbiome) có trong mẫu phân bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới và phân tích 16s ARN metagenome.

Cụ thể, lấy 0,2 g phân thỏ, hoà tan trong 0,5 ml nước cất, ly tâm 8000 vòng trong 3 phút, hút 200 µl dịch nổi đi tách tổng hệ gen của các vi khuẩn có trong phân bằng ADN mini kit của hãng Quiagen- Đức. Hệ gen của vi khuẩn trong mẫu phân đã được tinh sạch được chuyển để phân tích bởi hãng Macrogen, Hàn Quốc để phân tích microbiome đường tiêu hoá. Kết quả phân tích cho thấy trong 1 ml phân thỏ có khoảng 161.946 loài vi sinh vật khác nhau, tuy nhiên có 04 loài chiếm đa số trong quần thể vi sinh đường ruột thỏ là 3 loài lợi khuẩn *Intestinimonas butyriciproducens*, *Neglecta timonensis*, *Bifidobacterium magnum*, và 1 loài hại khuẩn *Murimonas intestini*.

Kết quả thể hiện ở Hình 8 cho thấy ở ngày 0 cả nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm đều có mật độ vi sinh vật gây hại lên tới 33 - 44%. Sau 28 ngày sử dụng chế phẩm lợi khuẩn đường ruột, mật độ hại khuẩn *Murimonas intestini* của nhóm đối chứng có giảm nhưng vẫn ở mức là 29%, trong khi mật độ hại khuẩn *Murimonas intestini* của nhóm sử dụng chế phẩm giảm xuống đáng kể, chỉ còn 2% và mật độ của 3 loài lợi khuẩn tăng lên đáng kể đặc biệt là loài *Neglecta timonensis*. Kết quả còn cho thấy tuy sử dụng bào tử lợi khuẩn ở nồng độ cao, nhưng bào tử lợi khuẩn không làm thay đổi các thành phần loài của hệ vi sinh vật bản địa của đường ruột thỏ, cụ thể là không thay đổi đáng kể về chủng loại và số lượng các loài vi sinh vật, và đặc biệt là không có sự thay đổi chủng loại của 4 loài vi sinh vật có mật độ chính trong hệ đường ruột.

Kết quả này cho thấy chế phẩm bào tử lợi khuẩn được tạo thành theo sáng chế có tác dụng làm giảm bất ngờ mật độ của hại khuẩn, nhưng vẫn giữ và tăng mật độ của lợi khuẩn và đặc biệt không làm thay đổi bản chất của các loài vi khuẩn bản địa có sẵn trong đường ruột.

Ví dụ 6. Đánh giá an toàn và tác dụng hỗ trợ điều trị của chế phẩm probiotic trên trẻ em bị tiêu chảy kéo dài

Thử nghiệm tác dụng của sản phẩm probiotic thu được từ Ví dụ 1 được thực hiện sau khi có kết quả đánh giá thử nghiệm độc tính cấp và bán trường diễn trên chuột và trên thỏ, có kết luận an toàn và có khả năng thử nghiệm trên người.

Sản phẩm thử nghiệm là sản phẩm thu được từ Ví dụ 1, đối tượng thử nghiệm là các tình nguyện viên tham gia nghiên cứu tại khoa tiêu hoá bệnh viện Nhi Trung Ương, 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 1077/BVNTW-HĐĐĐ. Thời gian nghiên cứu từ 2/5/2022 đến 2/5/2023, trong đó thời gian thu thập số liệu của thử nghiệm giai đoạn 1 được tiến hành từ 2/5/2022 đến 20/6/2022.

Cả hai nhóm bệnh nhân đều được điều trị theo phác đồ thường quy tại bệnh viện. Thời gian theo dõi cho đến khi bệnh nhân khỏi triệu chứng hoặc tối đa là 7 ngày điều trị. Phương pháp đánh giá bao gồm liệu trình sử dụng bổ sung thêm chế phẩm dạng uống với liều từ 2 đến 6 ống/ngày chia đều từ 2 đến 3 lần/ngày, trong vòng 5 ngày liên tục, tùy theo mức độ nặng nhẹ của bệnh; so sánh với nhóm đối chứng sử dụng bổ sung thêm giả được là nước lọc RO với liều 2 đến 6 ống/ngày chia đều từ 2 đến 3 lần/ngày, trong vòng 5 ngày liên tục.

Nghiên cứu ở giai đoạn 1 được thực hiện bước đầu trên 30 bệnh nhân mà cha mẹ của bệnh nhân đã đồng ý tham gia nghiên cứu. Các bệnh nhân được chia thành hai nhóm: nhóm đối chứng gồm 15 trẻ và nhóm thử nghiệm gồm 15 trẻ. Tất cả bệnh nhân trong hai nhóm có độ tuổi từ 3 tháng tuổi đến 6 tuổi và đều có triệu chứng tiêu chảy kéo dài (đi đại tiện 3 lần/ngày, triệu chứng kéo dài trong khoảng thời gian ≥ 14 ngày và < 30 ngày). Các triệu chứng lâm sàng theo dõi và so sánh giữa 2 nhóm bao gồm: (i) số lần đi trong một ngày, (ii) tính chất của phân (nhiều nước, có nhày, lẫn máu); (iii) đau bụng; (iv) buồn nôn/nôn; (v) mệt mỏi, (vi) chán ăn.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện như dưới đây:

+ Đánh giá sự có mặt của các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 và *Bacillus clausii* ANA39 trong phân

Sự có mặt của các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 và *Bacillus clausii* ANA39 trong phân trẻ em sau 1 ngày sử dụng được phát hiện kỹ thuật real-time PCR đa mồi (Multiplex real-time PCR) sử dụng SYBR và mồi đặc hiệu cho hai loài *B. subtilis* và *B. clausii* trong 1 ống phản ứng (phản ứng đa mồi đặc hiệu cho *Bacillus* sp.). Kết quả cho thấy cả 15 bệnh nhân sử dụng sản phẩm probiotic đều có mặt lại chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 và *Bacillus clausii* ANA39 trong khi 15 bệnh nhân nhóm đối chứng không có mặt 2 chủng vi khuẩn này. Như vậy, tất cả các bệnh nhân tham gia nghiên cứu ở hai nhóm thử nghiệm và đối chứng được các y tá và điều dưỡng cho uống đúng chế phẩm thử nghiệm và giả dược.

+ Đánh giá sự an toàn của chế phẩm probiotic

Trong thời gian sử dụng sản phẩm, không ghi nhận bất cứ biến cố bất lợi hay tác dụng phụ nào trên cả 15 bệnh nhân sử dụng sản phẩm. Các tiêu chí đánh giá bao gồm các triệu chứng lâm sàng như táo bón, kích ứng niêm mạc họng và niêm mạc ruột, và các chỉ số sinh học như mạch, nhiệt độ, công thức máu, và chỉ số sinh hoá phản ánh chức năng gan thận trước và sau khi dùng sản phẩm probiotic.

+ Đánh giá hiệu quả rút ngắn thời gian điều trị các triệu chứng tiêu chảy của chế phẩm probiotic

Các kết quả đánh giá các chỉ số 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 thời gian điều trị một số triệu chứng chính của bệnh tiêu chảy mãn từ 1 đến 2 ngày, bao gồm: đi đại tiện 3 lần/ngày, phân nhiều nước/có nhầy/lẫn máu, buồn nôn, đau bụng, mệt mỏi, chán ăn, và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo sáng chế được phối chế cho phép bổ sung một lượng vi khuẩn thuộc nhóm lợi khuẩn vào đường ruột thông qua việc lắp đặt bổ sung trực tiếp vào nguồn nước tinh sạch, giúp đơn giản hóa quá trình sử dụng chế phẩm. Việc cấp lợi khuẩn trực tiếp vào nguồn nước 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 từ vi khuẩn có hại gây rối loạn đường tiêu hóa.

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

Việc sản xuất bào tử lợi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 và *Bacillus clausii* ANA39 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 lên men thối và nhiễm các vi sinh vật gây bệnh khác.

Máy lọc nước thông thường và máy lọc nước RO bổ sung cụm cơ cấu bổ sung bào tử lợi khuẩn đã tạo ra nước lọc tinh khiết có lượng lợi khuẩn phù hợp cho liều dùng lợi khuẩn cần thiết trong một ngày. Nước tinh khiết được lấy ra từ nguồn máy lọc này có thể uống trực tiếp hoặc sử dụng để nấu nướng sẽ đem lại các tác dụng có lợi cho sức khỏe đường ruột của người sử dụng như giảm đầy hơi, khó tiêu, biếng ăn, mệt mỏi, tăng cường miễn dịch đường ruột, và đặc biệt là tránh được các nguy cơ bị rối loạn tiêu hóa (tiêu chảy, táo bón, phân sống...) do mất cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột khi ăn phải các thức ăn và đồ uống nhiễm các vi sinh vật gây bệnh đường ruột.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm lợi khuẩn đường ruột để bổ sung vào nước uống, trong đó chế phẩm này ở dạng lỏng chỉ chứa bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 và bào tử sống của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.2 với tổng nồng độ hai loại bào tử này nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml, tỷ lệ lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39/*Bacillus subtilis* ANA46 là từ 1% đến 1%, và hai chủng vi khuẩn này được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 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 ANA39 và ANA46.

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

a) 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 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;

b) thu bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46, trong đó chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 có số lưu giữ ANA46 tại Trung tâm nghiên cứu bào tử lợi khuẩn của công ty TNHH ANABIO R&D, số 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, K_2HPO_4 từ 2 đến 4 g/l, nhiệt độ từ 30°C đến 37°C, tốc độ khuấy từ 150 đến 300 vòng/phút, lượng khí oxi cấp với từ 0,5 đến 3 mM/phút, pH duy trì trong khoảng từ 6,0 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 subtilis* ANA46; và

c) thu chế phẩm lợi khuẩn đường ruột bằng cách phối trộn bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 theo tỷ lệ lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39/*Bacillus subtilis* ANA46 là từ 1% đến 1%, sau đó pha loãng hỗn hợp bào tử này với nước cất đến nồng độ tổng hai loại bào tử này nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml thu được chế phẩm lợi khuẩn đường ruột ở dạng lỏng.

3. Cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột vào nước uống, trong đó cơ cấu này bao gồm bơm vi lượng được điều khiển bởi bộ điều khiển để bơm một lượng chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo điểm 1 được đựng trong bình chứa vào đường nước uống, trong đó:

bơm vi lượng được nối giữa bình chứa và đường nước uống để bơm chính xác một lượng chế phẩm có trong bình chứa vào đường nước uống để thu được nước uống chứa lợi khuẩn đường ruột với lượng từ 1×10^5 đến 5×10^7 bào tử/ml;

bộ điều khiển gồm mạch điều khiển được gắn vi xử lý để nhận tín hiệu từ cảm biến lưu lượng nước chảy trong đường nước uống 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 ruột có trong bình chứa vào đường nước uống để thu được nước uống chứa $1 \times 10^5 - 5 \times 10^7$ bào tử/ml; và

bình chứa để chứa chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo điểm 1, trong đó khác biệt ở chỗ bình chứa này chỉ chứa bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 được pha với nước với tổng hai loại bào tử này nằm trong khoảng từ 1×10^9 đến 5×10^{10} bào tử/ml và tỷ lệ lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39/*Bacillus subtilis* ANA46 là từ 1% đến 1%, hai 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.

4. Thiết bị lọc nước bổ sung lợi khuẩn đường ruột, trong đó thiết bị này được lắp cơ cấu bổ sung chế phẩm lợi khuẩn đường ruột theo điểm 3 để bổ sung vào đầu ra của đường

nước uống của thiết bị lọc nước nhằm thu được nước uống chỉ chứa bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39 và bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* ANA46 với tổng hai loại bào tử này nằm trong khoảng từ 1×10^5 đến 5×10^7 bào tử/ml và tỷ lệ lượng bào tử vi khuẩn *Bacillus clausii* ANA39/*Bacillus subtilis* ANA46 là từ 1% đến 1%.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Công ty TNHH ANABIO R&D

<120> Chế phẩm lợi khuẩn đường ruột và cơ cấu để bổ sung chế phẩm lợi khuẩn này vào nước uống

<130>

<160> 2

<170>

<210> 1

<211> 1397

<212> ARN

<213> *Bacillus clausii* ANA39

<220>

<223> 16S

<220>

<400> 1

CTTGCTCCCG	TACGTTAGCG	GCGGACGGGT	GAGTAACACG	TGGGCACCTG	CCCCTTAGAC	60
TGGGATAACT	CCGGGAAACC	GGAGCTAATA	CCGGATAATC	CCTTTTCCA	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	GTACCGTTCG	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
AATTCCACGT	GTAGCGGTGA	AATGCGTAGA	GATGTGGAGG	AACACCAGTG	GCGAAGGCGA	660
CTCTCTGGTC	TGTAACGTAC	GCTGAGGCGC	GAAAGCGTGG	GGAGCAAACA	GGATTAGATA	720
CCCTGGTAGT	CCACGCCGTA	AACGATGAGT	GCTAGGTGTT	AGGGGTTTCG	ATGCCCCGTAG	780
TGCCGAAGTT	AACACATTAA	GCACTCCGCC	TGGGGAGTAC	GGCCGCAAGG	CTGAAACTCA	840
AAGGAATTGA	CGGGGACCCG	CACAAGCAGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTCG	AAGCAACGCG	900
AAGAACCTTA	CCAGGTCTTG	ACATCCTTTG	ACCACCCAAG	AGATTGGGCT	TCCCCTTCGG	960
GGGCAAAGTG	ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT	GTCGTGAGAT	GTTGGGTTAA	1020
GTCCCCGAAC	GAGCGCAACC	CTTGATCTTA	GTTGCCAGCA	TTAAGTTGGG	CACTCTAAGG	1080
TGACTGCCGG	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAATCATCA	TGCCCCTTAT	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> 2

<211> 1350

<212> ARN

<213> *Bacillus subtilis* ANA46

<220>

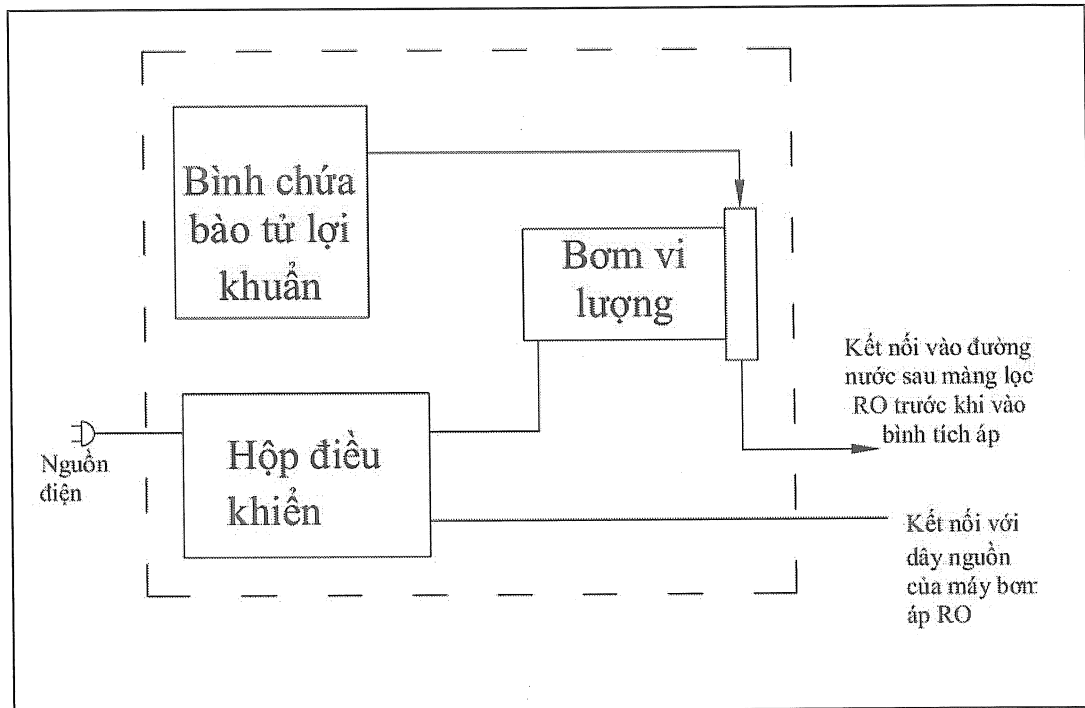
<223> 16S

<220>

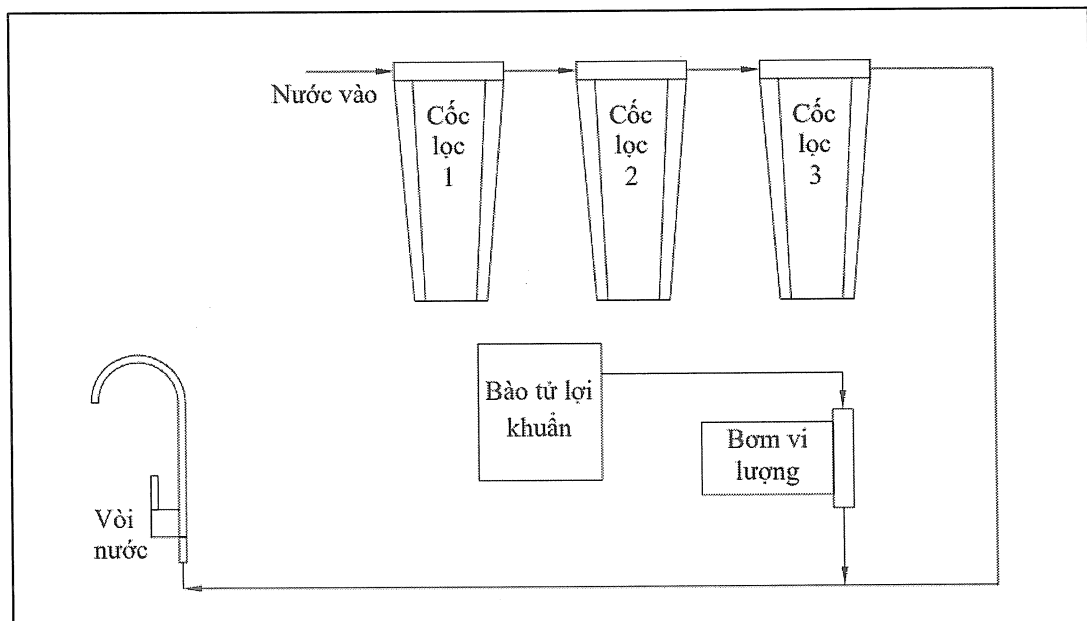
<400> 2

CTCCCTGATG TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT AACACGTGGG TAACCTGCCT GTAAGACTGG 60
 GATAACTCCG GGAAACCGGG GCTAATACCG GATGGTTGTT TGAACCGCAT GGTTCAAACA 120
 TAAAAGGTGG CTTCGGCTAC CACTTACAGA TGGACCCGCG GCGCATTAGC TAGTTGGTGA 180
 GGTAACGGCT CACCAAGGCA ACGATGCGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG 240
 GGACTGAGAC ACGGCCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGA 300
 CGAAAGTCTG ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGT TTTTCGGATCG TAAAGCTCTG 360
 TTGTTAGGGA AGAACAAGTA CCGTTCGAAT AGGGCGGTAC CTTGACGGTA CCTAACCAGA 420
 AAGCCACGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGTGGCAA GCGTTGTCCG 480
 GAATTATTGG GCGTAAAGGG CTCGCAGGCG GTTTCTTAAG TCTGATGTGA AAGCCCCCGG 540
 CTCAACCGGG GAGGGTCATT GGAACTGGG GAACTTGAGT GCAGAAGAGG AGAGTGGAAT 600
 TCCACGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT GTGGAGGAAC ACCAGTGGCG AAGGCGACTC 660
 TCTGGTCTGT AACTGACGCT GAGGAGCGAA AGCGTGGGGA GCGAACAGGA TTAGATACCC 720
 TGGTAGTCCA CGCCGTAAAC GATGAGTGCT AAGTGTTAGG GGGTTTCCGC CCCTTAGTGC 780
 TGCAGCTAAC GCATTAAGCA CTCCGCCTGG GGAGTACGGT CGCAAGACTG AAACCTCAAAG 840
 GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT TAATTCGAAG CAACGCGAAG 900
 AACCTTACCA GGTCTTGACA TCCTCTGACA ATCCTAGAGA TAGGACGTCC CCTTCGGGGG 960
 CAGAGTGACA GGTGGTGCAT GGTGTGCGTC AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC 1020
 CCGCAACGAG CGCAACCCTT GATCTTAGTT GCCAGCATTC AGTTGGGCAC TCTAAGGTGA 1080
 CTGCCGGTGA CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTATGAC 1140
 CTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGACAGA ACAAAGGGCA GCGAAACCGC GAGGTAAAGC 1200
 CAATCCCACA AATCTGTTCT CAGTTCGGAT CGCAGTCTGC AACTCGACTG CGTGAAGCTG 1260
 GAATCGCTAG TAATCGCGGA TCAGCATGCC GCGGTGAATA CGTTCCTGGG CCTTGTACAC 1320
 ACCGCCCCGTC ACACCACGAG AGTTTGTAAC 1350

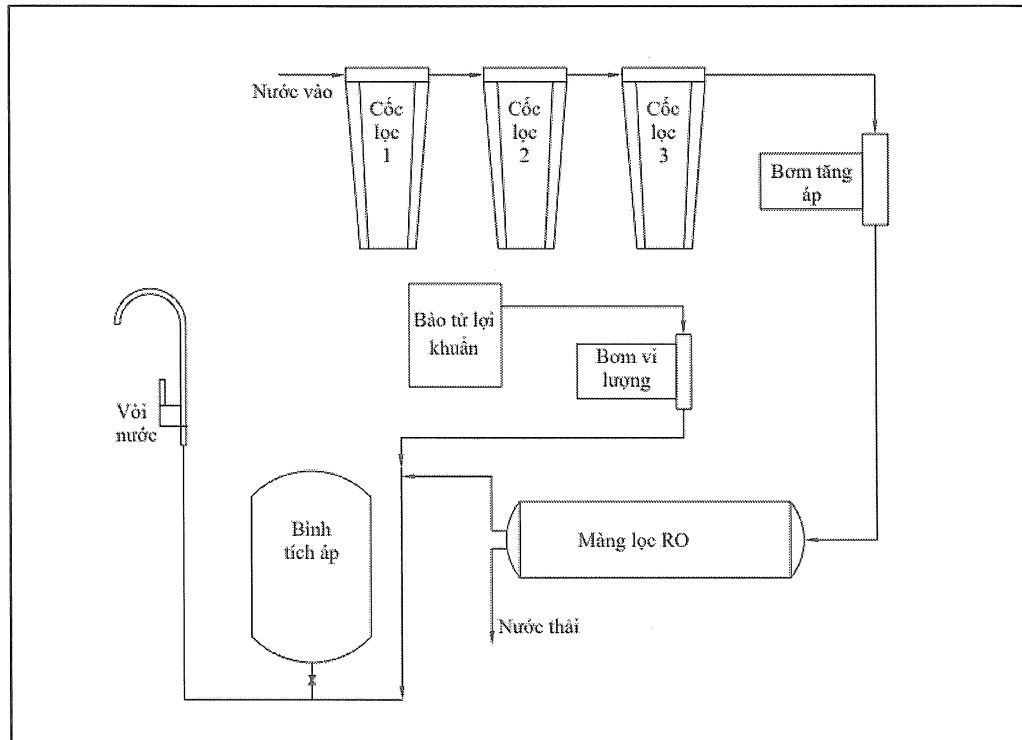
HÌNH 1



HÌNH 2

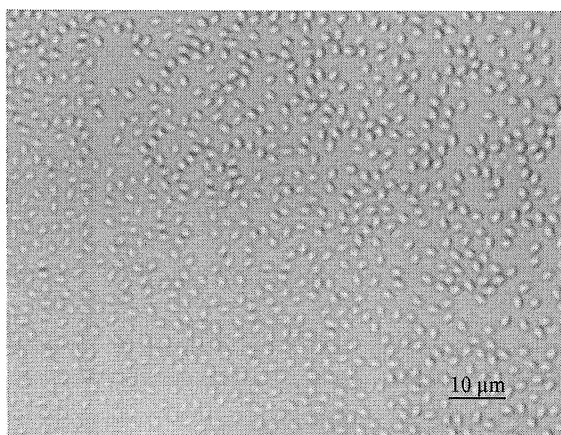


HÌNH 3

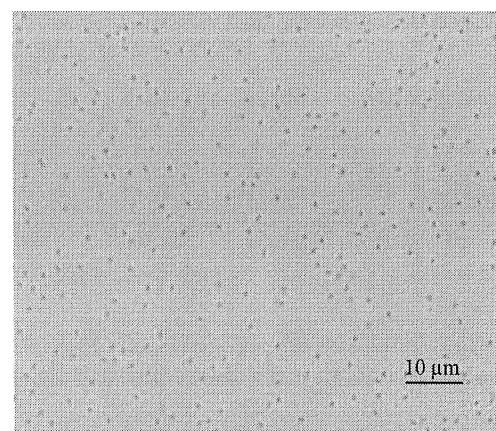


HÌNH 4

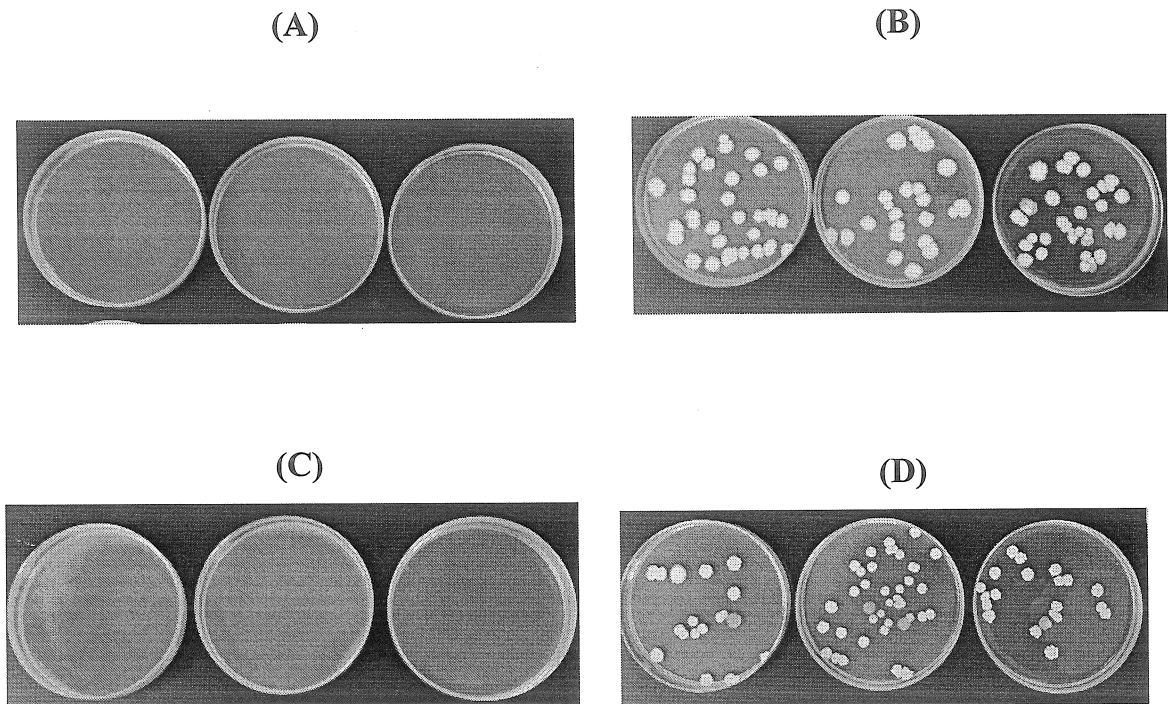
(A)



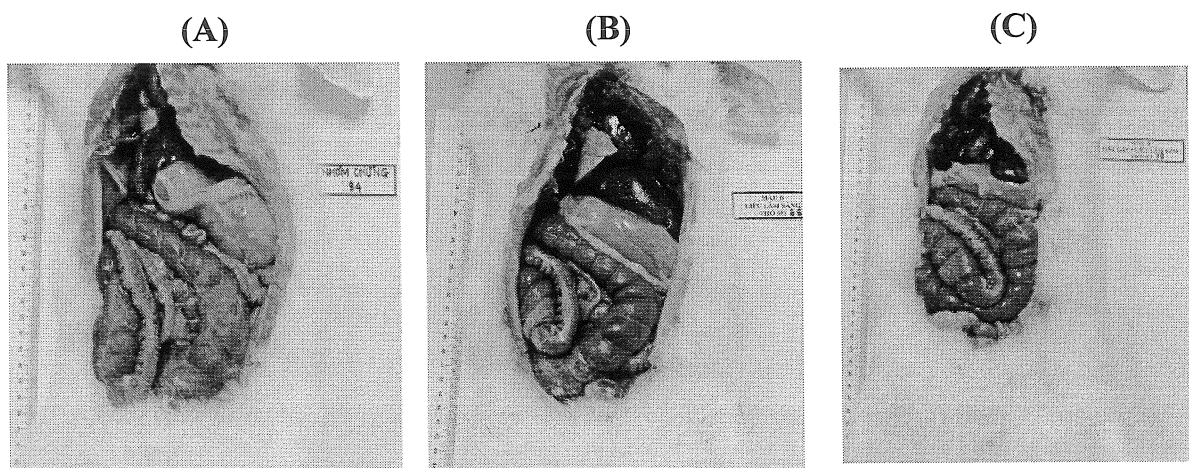
(B)



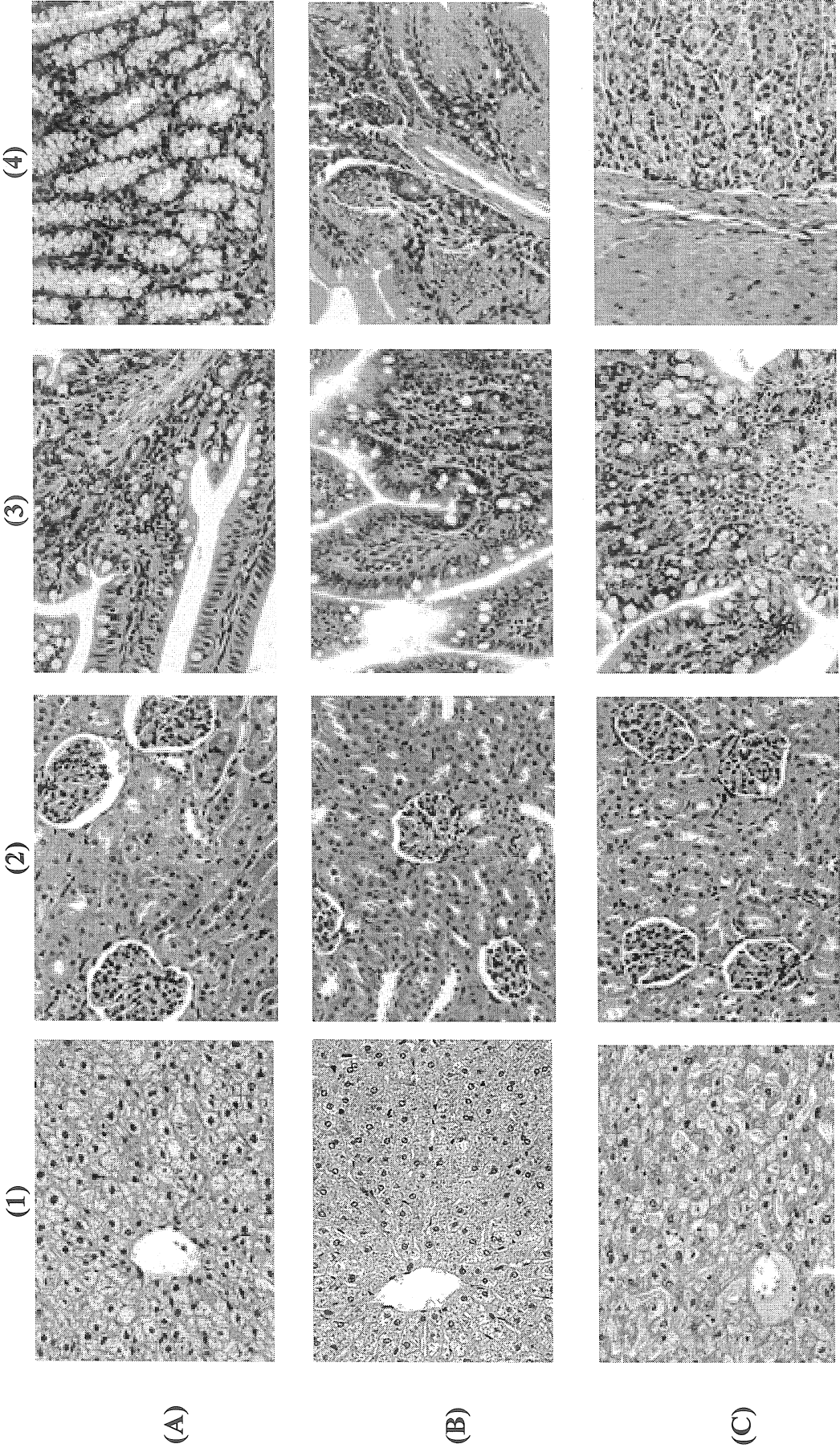
HÌNH 5



HÌNH 6



HÌNH 7



HÌNH 8

