



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

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**

(11)



CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

1-0023128

(51)⁷ **A23L 3/40, 3/3463, C12N 1/00, 7/01**

(13) **B**

(21) 1-2013-00467

(22) 12.08.2011

(86) PCT/US2011/047547 12.08.2011

(87) WO2012/021783 16.02.2012

(30) 61/373,711 13.08.2010 US

(45) 25.02.2020 383

(43) 25.10.2013 307

(73) Advanced Bionutrition Corporation (US)

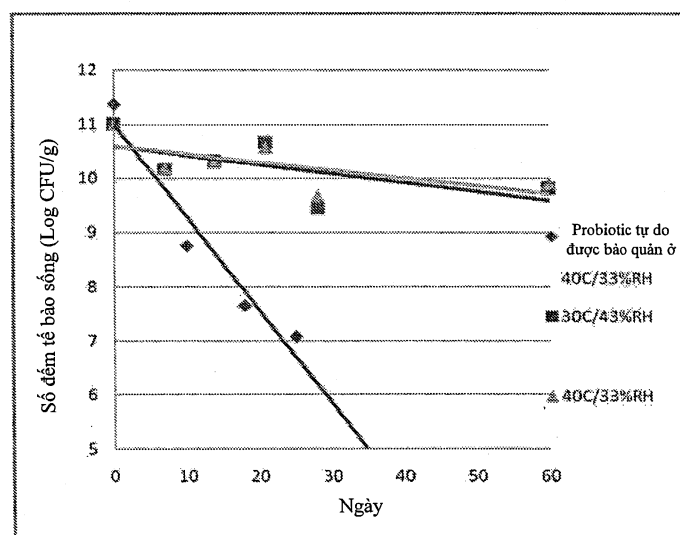
7155 Columbia Gateway Drive, Columbia, MD 21046-2545, United States of America

(72) HAREL, Moti (US), TANG, Qiong (US)

(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) **HỢP PHẦN LÀM ỔN ĐỊNH KHÔ CHỨA VẬT LIỆU CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ HỢP PHẦN NÀY**

(57) Sáng chế đề xuất hợp phần và phương pháp sấy để bảo quản vật liệu có hoạt tính sinh học để bị tác động, như peptit, protein, hormon, axit nucleic, kháng thể, thuốc vaccin, nấm men, vi khuẩn (probiotic hoặc loại khác), virus và/hoặc huyền phù tế bào, trong quá trình bảo quản. Hợp phần này bao gồm thành phần hydrat cacbon và thành phần chất tăng cường thủy tinh, trong đó thành phần hydrat cacbon bao gồm hỗn hợp di-, oligo- và polysacarit và chất tăng cường thủy tinh bao gồm ion của axit hữu cơ và sản phẩm thủy phân protein. Hợp phần này được bảo chế bằng cách phân tán tất cả các thành phần rắn trong dung dịch và sau đó được làm đông lạnh tức thì để tạo thành hạt nhỏ, dây hoặc giọt. Phương pháp sấy ưu tiên của các hạt, dây hoặc giọt đông lạnh được bắt đầu bằng bước thanh lọc nhanh và làm ổn định cấu trúc của các hạt đông lạnh dưới áp suất chân không thấp hơn 2000 mTorr (266,64 Pa) sau đó là bước sấy sơ cấp dưới áp suất chân không cao hơn 2000 mTorr và ở nhiệt độ mong muốn. Trong bước sấy thứ cấp và cuối cùng của vật liệu, áp suất chân không hoàn toàn và nhiệt độ tăng dần được sử dụng, để thu được hoạt tính nước mong muốn cuối cùng của vật liệu khô.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực làm ổn định vật liệu sinh học trong cấu trúc thủy tinh khô.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc bảo quản cấu trúc và chức năng của các vật liệu sinh học trong quá trình bảo quản dài hạn ở nhiệt độ và độ ẩm cao là rất quan trọng đối với các ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm dinh dưỡng và ngành dược. Các vật liệu sinh học dễ bị tác động, như protein, enzym, tế bào, vi khuẩn và virus cần phải thường xuyên được bảo quản dài hạn cho đến khi sử dụng. Quá trình làm đông lạnh đơn thuần thường được thực hiện khi phương pháp sấy là có hại hoặc không thích hợp cho thành phẩm. Để bảo quản ở trạng thái khô - sấy thăng hoa đang là phương pháp phổ biến nhất. Các phương pháp khác, như sấy bằng không khí môi trường, sấy trong chân không ở nhiệt độ môi trường (sấy chân không), hoặc sấy bằng cách cho các giọt sương mù mịn tiếp xúc với không khí ẩm (sấy phun) và sấy bằng cách hút ẩm thường là không thích hợp đối với các chất có hoạt tính sinh học dễ bị tác động, như vi khuẩn và virus còn sống hoặc đã bị làm yếu đi. Nhiệt độ sấy cao được sử dụng trong các phương pháp này gây ra sự hư hỏng đáng kể cho chính các chất có hoạt tính sinh học này.

Thông thường, quy trình sấy thăng hoa có thể làm mất đáng kể hoạt tính và làm hư hại chất có hoạt tính sinh học do sự tạo thành tinh thể băng trong quá trình sấy chậm. Sấy thăng hoa kết hợp các sức ép do cả quá trình làm đông lạnh và sấy. Bước làm đông lạnh của quy trình này có thể có các tác dụng không mong muốn, như làm biến tính protein và enzym, và phá vỡ tế bào. Các hư hỏng gây ra do bước làm đông lạnh có thể được tránh, ở một mức độ nhất định, bằng cách bổ sung hợp chất hoặc chất bảo vệ cryo vào dung dịch. Các chất bảo vệ này thường là các hóa chất có độ tan cao mà được thêm vào chế phẩm để bảo vệ màng tế bào và protein trong quá trình làm đông lạnh và để tăng cường tính ổn định trong quá trình bảo quản. Các chất làm ổn định phổ biến bao gồm đường như sucroza, trehaloza, glyxerol, hoặc sorbitol, ở nồng độ cao (Morgan et al., 2006; Capela et al., 2006). Các disacarit, như sucroza và trehaloza, là các chất bảo

vệ cryo tự nhiên có tính chất bảo vệ tốt. Trehaloza là chất bảo vệ cryo đáng quan tâm do nó thực sự được phân lập từ thực vật và các sinh vật sống mà vẫn ở trạng thái tạm ngưng hoạt động trong điều kiện khô hạn. Trehaloza được chỉ ra là chất bảo vệ hữu hiệu cho nhiều vật liệu sinh học, (xem Crowe, J. H., 1983). Một số sáng chế bộc lộ việc sử dụng trehaloza hoặc trehaloza kết hợp với các chất bảo vệ cryo khác để bảo vệ protein và các đại phân tử sinh học khác, như enzym, huyết thanh, bổ thể huyết thanh, kháng thể, kháng nguyên, protein phát huỳnh quang và thành phần vacxin trong quá trình làm đông lạnh, sấy và tái hydrat hóa (Patent Mỹ số 5,556,771).

Tuy nhiên, có một số hạn chế liên quan đến việc sử dụng trehaloza hoặc các disacarit hoặc monosacarit khác khi làm chất bảo vệ cryo duy nhất. Trehaloza không thể thấm vào tế bào đủ để bảo vệ các thành phần hoạt tính nằm trong thể tích nội bào, điều này có thể dẫn đến tính không ổn định khi bảo quản của các chất được sấy thăng hoa này. Ngoài ra, nồng độ trehaloza lớn hơn 60% khối lượng của môi trường bảo quản nhất định đôi khi là cần thiết. Một vấn đề thậm chí là nghiêm trọng hơn liên quan đến việc sử dụng trehaloza là ở chỗ các vật liệu sinh học được bảo quản bằng cách sử dụng một mình trehaloza không có tính ổn định bảo quản trong khoảng thời gian kéo dài, đặc biệt là khi được bảo quản trong môi trường nhiệt độ và/hoặc độ ẩm cao. Do đó, vẫn tồn tại nhu cầu phát triển chế phẩm và quy trình sấy tối ưu làm giảm thiểu các thất thoát do sấy trong khi vẫn đạt được độ ổn định bảo quản thích hợp của vật liệu được sấy này.

Một số vấn đề liên quan đến trehaloza và quy trình sấy thăng hoa đã được giải quyết bằng cách sử dụng hỗn hợp các chế phẩm cụ thể và sấy chân không ở trạng thái thủy tinh, cụ thể là các loại thủy tinh đường (Patent Mỹ số 6,190,701). Trong các chế phẩm này, chất có hoạt tính sinh học được bảo vệ bên trong chất nền thủy tinh chống lại các môi trường không thân thiện như nhiệt độ và độ ẩm cao. Tuy nhiên, trong các chế phẩm này, sự có mặt của nước dưới dạng hơi ẩm trong môi trường có tác dụng như là chất làm dẻo và có tác dụng làm giảm nhiệt độ chuyển thủy tinh (T_g) của chất nền thủy tinh. Ở hàm lượng nước cao hơn, T_g này được làm giảm đáng kể đến mức độ chế phẩm khô này ở trạng thái cao su hoặc dẻo không mong muốn ở nhiệt độ phòng.

Ưu điểm của việc duy trì dạng thủy tinh của chế phẩm này bao gồm làm tăng tính ổn định vật lý của chất và làm giảm các phản ứng liên phân tử có hại. Thảo luận chi tiết về mặt hóa lý của các tương tác polyme thực phẩm-nước như liên quan đến trạng thái thủy tinh và nhiệt độ chuyển của chúng có thể tìm thấy trong ấn phẩm M. Le Meste et

al. 2002. Tuy nhiên, các hạn chế của hệ vô định hình như tính không ổn định vật lý và tính phản ứng hóa học cao hơn, là rào cản trong quá trình thương mại hóa rộng rãi của chúng.

Do đó, tồn tại nhu cầu về hợp phần làm ổn định hữu dụng cho phạm vi rộng các vật liệu sinh học. Nhu cầu khác nữa đang tồn tại là hợp phần làm ổn định mà có thể được sử dụng hiệu quả trong cả quy trình sấy thăng hoa và quy trình sấy bao gồm bước sấy bằng nhiệt độ môi trường. Cũng có nhu cầu về hỗn hợp hợp phần ít tốn kém hơn hợp phần hiện đang được sử dụng. Cuối cùng, và quan trọng là, có nhu cầu về hỗn hợp hợp phần cung cấp môi trường ổn định để bảo quản vật liệu sinh học trong khoảng thời gian kéo dài ở nhiệt độ tăng và độ ẩm thay đổi mà có thể gặp phải trong quá trình vận chuyển và bảo quản vật liệu, mà vẫn giữ được lượng hoạt tính đáng kể nhờ vào việc tái hydrat hóa.

Tất cả các nhu cầu này được đáp ứng bởi hỗn hợp hợp phần, phương pháp sấy và các hợp phần vật liệu sinh học được bảo quản thu được theo sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp phần và phương pháp sấy để bảo quản vật liệu có hoạt tính sinh học dễ bị tác động, như peptit, protein, hormon, axit nucleic, kháng thể, dược chất, vaccin, nấm men, vi khuẩn (probiotic hoặc dạng khác), virus và/hoặc huyền phù tế bào, trong quá trình bảo quản.

Hợp phần theo sáng chế bao gồm hỗn hợp hydrat cacbon của di-, oligo- và polysaccharit và các ion của axit hữu cơ, tốt hơn là axit citric và hoặc axit ascorbic. Chế phẩm này được bào chế bằng cách phân tán tất cả các thành phần rắn trong dung dịch. Dung dịch này được làm đông lạnh tức thì bằng các cách đã biết trong lĩnh vực như nitơ lỏng hoặc đá khô để tạo thành các hạt nhỏ, dây hoặc giọt. Các hạt đông lạnh có thể được bảo quản trong tủ làm lạnh sâu (khoảng từ -30°C đến -80°C) để sử dụng sau ở trạng thái đông lạnh hoặc được đặt lên các khay ở trạng thái đông lạnh để sấy trong tủ sấy thăng hoa truyền thống. Phương pháp sấy ưu tiên tùy ý được bắt đầu bằng bước thanh lọc nhanh và làm ổn định cấu trúc của các hạt đông lạnh dưới áp suất chân không thấp hơn <2000 mTorr (266,64 Pa), sau đó là bước sấy sơ cấp dưới áp suất chân không lớn hơn >2000 mTorr và ở nhiệt độ mong muốn. Trong bước sấy thứ cấp và cuối cùng của vật

liệu, áp suất chân không đầy đủ và nhiệt độ tăng được sử dụng, để thu được hoạt tính nước mong muốn cuối cùng của vật liệu khô.

Theo một phương án cụ thể, vật liệu sinh học bao gồm vi khuẩn sống (ví dụ, vi khuẩn probiotic). Ví dụ về các vi sinh vật thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nấm men như *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* và *Torulopsis*, nấm mốc như *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* và *Torulopsis* và vi khuẩn như các chi *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Kocuriaw*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weiss ella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* và *Lactobacillus*. Ví dụ cụ thể về các vi sinh vật probiotic thích hợp sẽ được đại diện bởi các loài sau và bao gồm tất cả các kiểu sinh học nuôi cấy nằm trong các loài này: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus coagulans*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. mesentericus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. natto*, *Bacteroides amylophilus*, *Bac. capillosus*, *Bac. ruminicola*, *Bac. suis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *Candida pintolepesii*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus cremoris*, *E. diacety lactis*, *E. faecium*, *E. intermedius*, *E. lactis*, *E. muntidi*, *E. thermophilus*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces fragilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. brevis*, *L. case 4* *L. curvatus*, *L. cellobiosus*, *L. delbrueckii ss. bulgaricus*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *P. cereviseae (damnosus)*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Prop. shermanii*, *Saccharomyces cereviseae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staph. xylosus*, *Streptococcus infantarius*, *Strep. salivarius ss. thermophilus*, *Strep. Thermophilus* và *Strep. lactis*.

Theo một phương án, chế phẩm chứa hỗn hợp hydrat cacbon của di-, oligo- và poly-sacarit, mà các vật liệu có hoạt tính sinh học được gắn vào đó. Ví dụ về polysacarit thích hợp, bao gồm nhưng không giới hạn ở, xenluloza axetat phtalat (CAP), carboxy-metyl-xenluloza, pectin, natri alginat, muối của axit alginic, hydroxyl propyl metyl xenluloza (HPMC), metyl xenluloza, carrageenan, gồm gellan, gồm guar, gồm acacia, gồm xanthan, gồm đậu locust, chitosan và dẫn xuất của chitosan, collagen, axit polyglycolic, tinh bột và tinh bột biến tính. Ví dụ về oligosacarit thích hợp, bao gồm

nhưng không giới hạn ở, xyclodextrin, inulin, FOS, maltodextrin, dextran, v.v.; và các hỗn hợp của chúng. Ví dụ về disacarit thích hợp, bao gồm nhưng không giới hạn ở, lactoza, trehaloza, sucroza, v.v.. Theo một phương án cụ thể, polysacarit được ưu tiên là natri alginat hoặc gôm gellan. Tốt hơn là, hỗn hợp hydrat cacbon chứa, theo phần trăm khối lượng của chất khô toàn phần, từ 0,1 đến 10% polysacarit, từ 1 đến 10% oligosacarit và từ 10 đến 90% disacarit. Theo phương án bổ sung, hỗn hợp hydrat cacbon chứa di-, oligo- và polysacarit theo tỷ lệ khối lượng là 10:0,1-4:0,1-2, và tốt hơn là, trong đó tỷ lệ khối lượng của disacarit/oligosacarit/polysacarit là từ khoảng 10:0,2:0,1 đến 10:2:1.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, polysacarit trong hỗn hợp hydrat cacbon được liên kết chéo với ion kim loại hóa trị hai để tạo thành hydrogel rắn chắc.

Theo phương án khác, hợp phần chứa lượng đáng kể hợp chất tăng cường thủy tinh bao gồm muối axit hữu cơ như axit lactic, axit ascorbic, axit maleic, axit oxalic, axit malonic, axit malic, axit suxinic, axit xitric, axit gluconic, axit glutamic, và các muối tương tự. Muối có thể bao gồm các cation như natri, kali, canxi, magiê, và các cation tương tự. Ví dụ bao gồm natri xitrat, natri lactat, natri maleat, magiê gluconat, natri ascorbat, và muối tương tự. Muối có nhiệt độ chuyển thủy tinh cao (T_g) và độ tan cao được ưu tiên. Axit hữu cơ được ưu tiên nhất là axit xitric và muối của nó (ví dụ, natri hoặc kali xitrat, trinatri xitrat dehydrat) và axit ascorbic và muối của nó (ví dụ, natri ascorbat, kali ascorbat, magiê ascorbat). Tổng lượng các ion xitrat hoặc ascorbat được ưu tiên trong hợp phần khô là sao cho tỷ lệ mol của các ion đối với số mol của hợp chất hydrat cacbon nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,3 và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,2.

Các chất tăng cường thủy tinh hữu dụng khác bao gồm protein, sản phẩm thủy phân protein, polypeptit và axit amin. Các chất này bao gồm gelatin, albumin, protein nước sữa, protein đậu tương, casein, caseinat, globulin miễn dịch, protein đậu tương, protein đậu Hà Lan, protein hạt bông hoặc thực phẩm khác và protein bơ sữa hoặc protein thực vật và/hoặc các sản phẩm thủy phân của chúng. Ví dụ về axit polyamin bao gồm polyalanin, polyarginin, polyglyxin, axit polyglutamic và chất tương tự. Axit amin hữu dụng bao gồm lysin, glyxin, alanin, arginin hoặc histidin, cũng như axit amin kỵ nước (tryptophan, tyrosin, leuxin, phenylalanin, v.v.) và metylamin như betain. Tổng lượng được ưu tiên của protein, sản phẩm thủy phân của protein và axit amin trong hợp

phần khô là khoảng từ 1% đến 30% tổng khối lượng của hỗn hợp hydrat cacbon và tốt nhất là từ 5% đến 20% khối lượng hydrat cacbon. Lý tưởng là, các hợp chất mà là hợp chất được coi là an toàn (Generally Recognized As Safe - GRAS) được ưu tiên hơn so với các hợp chất không phải là GRAS.

Cần lưu ý rằng lượng thích hợp của chất tăng cường thủy tinh trong hợp phần có thể phụ thuộc vào các tính chất mong muốn của hợp phần khô. Việc xác định lượng thích hợp của chất tăng cường thủy tinh cần được thực hiện theo điều kiện bảo quản mong muốn. Ví dụ, hợp phần chứa hỗn hợp hydrat cacbon và protein hoặc sản phẩm thủy phân protein có thể được sử dụng để tăng cường tính ổn định hóa học của vật liệu sinh học trong khi đang được bảo quản ở nhiệt độ và độ ẩm tương đối vừa phải, như 25°C và 25% RH. Các ion xitrat có thể được ưu tiên tạo thành chất tăng cường thủy tinh để thu được lợi ích bổ sung là làm ổn định ở nhiệt độ và độ ẩm cao hơn. Hoặc, có thể có trường hợp là hỗn hợp của ion xitrat và/hoặc ascorbat với chất tăng cường thủy tinh khác, như protein hoặc sản phẩm thủy phân protein, được ưu tiên hơn để tạo thành hợp phần này.

Tốt hơn, nếu quy trình trộn vật liệu sinh học và hợp phần này là bằng cách bổ sung hỗn hợp hợp phần khô toàn phần vào môi trường nuôi cấy cô đặc hoặc dung dịch môi trường chứa vật liệu sinh học. Khối lượng của vật liệu sinh học trong môi trường nuôi cấy thường nằm trong khoảng từ 5% đến 30% khối lượng/thể tích, và tốt hơn là khoảng từ 10% đến 20% khối lượng/thể tích. Khối lượng bổ sung của hỗn hợp hợp phần trong môi trường nuôi cấy thường nằm trong khoảng từ 10% đến 60%, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20% đến 40%. Hàm lượng chất rắn cuối cùng trong huyền phù đặc đã trộn nằm trong khoảng từ 20% đến 60% và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 30% đến 50%. Tốt hơn là, dung dịch được trộn ở nhiệt độ phòng hoặc được làm nóng nhẹ để giúp hòa tan vật liệu trong dung dịch nhót (ví dụ, từ 20°C đến 40°C). Theo một biến thể của sáng chế, tổng lượng hỗn hợp hydrat cacbon trong chế phẩm được điều chỉnh để thu được độ nhót và tỷ trọng chế phẩm mong muốn mà cho phép sấy hiệu quả trong khi vẫn tránh được sự tạo thành cao su hoặc tạo bọt quá mức có thể xảy ra trong bước sấy. Độ nhót của bột nhào được ưu tiên nằm trong khoảng từ 1.000 cP đến 500.000 cP, và khoảng được ưu tiên nhất là từ 10.000 cP đến 300.000 cP. Độ nhót và tỷ trọng mong muốn của bột nhào cuối cùng có thể thu được bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này,

ví dụ, điều chỉnh nhẹ lượng polysacarit trong hỗn hợp hydrat cacbon hoặc bằng cách khử khí hoặc phun khí như không khí, nitơ, cacbon dioxit, argon v.v..

Bột nhão vật liệu sinh học theo sáng chế thường được làm đông lạnh tức thì đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -30°C đến -180°C , tốt hơn là, chế phẩm này được làm đông lạnh tức thì trong nitơ lỏng bằng cách phun sương, chảy nhỏ giọt hoặc phun vào bể nitơ lỏng. Gôm các hạt nhỏ, hạt, dây hoặc giọt từ bể nitơ lỏng và sấy trong tủ sấy thăng hoa hoặc tủ sấy chân không, hoặc bảo quản chúng trong tủ lạnh sâu (khoảng từ -30°C đến -80°C) để sử dụng sau ở dạng đông lạnh hoặc cho đến khi sấy.

Nói chung, các kỹ thuật sấy hữu dụng bao gồm sấy phun; làm đông khô sau đó nghiền để micron hóa bột; phun sương lên bề mặt lạnh, sau đó làm thăng hoa và thu gom bột đã micron hóa; sấy bay hơi dung dịch không đông lạnh trong lò chân không hoặc thiết bị bay hơi ly tâm ở nhiệt độ lớn hơn nhiệt độ làm đông lạnh bột nhão (khoảng từ -20 đến 50°C), sau đó nghiền đến kích thước hạt mong muốn. Các hạt bột thu được là giống thủy tinh hoặc kết tinh bên trong với phần lớn các nguyên liệu thủy tinh phủ trên bề mặt. Ưu điểm của việc phủ nguyên liệu thủy tinh lên vật liệu sinh học là làm tăng tính ổn định vật lý của sản phẩm và làm giảm các phản ứng liên phân tử có hại bên trong hạt. Theo phương án được ưu tiên, các hạt đông lạnh được chuyển lên các khay và được đưa ngay đến buồng sấy chân không mà ở đó quy trình sấy diễn ra theo ba bước chính bao gồm: (1) bước thanh lọc nhanh và làm ổn định cấu trúc tùy ý của các hạt đông lạnh dưới áp suất chân không thấp hơn <2000 mTorr, (2) bước sấy sơ cấp dưới áp suất chân không lớn hơn >2000 mTorr và ở nhiệt độ lớn hơn điểm đông lạnh của bột nhão, và (3) bước sấy thứ cấp và cuối cùng của nguyên liệu thủy tinh vô định hình dưới áp suất chân không đầy đủ và nhiệt độ tăng dần trong thời gian đủ để làm giảm hoạt tính nước của chế phẩm sấy khô đến 0,3 Aw hoặc nhỏ hơn.

Hợp phần sinh học khô và ổn định có thể được sử dụng trực tiếp dưới dạng bông, hoặc được nghiền thành bột và sàng đến kích thước hạt trung bình nằm trong khoảng từ $10\text{ }\mu\text{m}$ đến $1000\text{ }\mu\text{m}$. Chế phẩm này có thể được sử dụng trực tiếp cho động vật, bao gồm người, dưới dạng bột cô đặc, dưới dạng chất lỏng hoàn nguyên, (ví dụ, đồ uống), hoặc nó có thể được kết hợp ở dạng bông hoặc bột vào thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi sẵn có.

Các ưu điểm này và ưu điểm khác và các dấu hiệu của sáng chế sẽ được mô tả đầy đủ hơn trong phần mô tả chi tiết về các phương án được ưu tiên dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện độ ổn định cấp tốc của vi khuẩn probiotic có bán sẵn và vi khuẩn probiotic trong hợp phần khô theo sáng chế.

Fig. 2 thể hiện ảnh hưởng của các tỷ lệ mol khác nhau giữa chất tăng cường thủy tinh và hỗn hợp hydrat cacbon trong hợp phần đối với độ ổn định của probiotic (*L. paracasei*) trong điều kiện bảo quản cấp tốc (37°C và 33%RH).

Fig. 3 thể hiện ảnh hưởng của hợp phần theo sáng chế đối với độ ổn định bảo quản của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus*. Độ ổn định của vi khuẩn probiotic khô được kiểm tra ở điều kiện bảo quản cấp tốc là 24°C và 33%RH trong 537 ngày.

Fig. 4 thể hiện ảnh hưởng của nhiều chất tăng cường thủy tinh khác nhau đối với độ ổn định bảo quản của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus*. Độ ổn định của vi khuẩn probiotic khô được kiểm tra ở điều kiện bảo quản cấp tốc là 24°C và 43%RH trong 180 ngày.

Fig. 5 thể hiện ảnh hưởng của các tỷ lệ sản phẩm thủy phân protein/đường khác nhau đến độ ổn định bảo quản (35°C và 43%RH) của vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium lactis*.

Fig. 6 thể hiện sự tối ưu độ pH đối với độ ổn định tối đa của vi khuẩn probiotic *L. rhamnosus* (điều kiện bảo quản cấp tốc ở 40°C và 33%RH trong 8 tuần).

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Được hiểu là thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không nhằm giới hạn sáng chế. Như được sử dụng trong bản mô tả và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, dạng số ít "một" bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi nội dung chỉ rõ theo cách khác. Do đó, ví dụ, khi nói "một protein" sẽ bao gồm một protein hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều protein; khi nói "enzym", "vi khuẩn", v.v., sẽ bao gồm một loại hoặc hỗn hợp nhiều loại, và tương tự.

Để mô tả và yêu cầu bảo hộ sáng chế, thuật ngữ sau sẽ được sử dụng theo các định nghĩa được đưa ra dưới đây.

"Vật liệu sinh học", "hợp phần sinh học", hoặc "chế phẩm có hoạt tính sinh học" chỉ các chế phẩm, mà ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của các thành phần hoặc chất có hoạt tính sinh học có hiệu quả một cách rõ ràng.

"Chất tăng cường thủy tinh" là hợp chất hóa học có khả năng tạo thành cấu trúc vô định hình hoặc thủy tinh ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ tới hạn, nhiệt độ chuyển thủy tinh (T_g). Nếu chất tăng cường thủy tinh được sấy khô ở dưới T_g của nó, thủy tinh sẽ được tạo thành. Tuy nhiên, nếu chất tăng cường thủy tinh được sấy khô ở trên T_g của nó, thì thủy tinh sẽ không được tạo thành. Trong quá trình hình thành cấu trúc thủy tinh, hợp chất sinh học có thể được gắn trong cấu trúc thủy tinh. Chất tăng cường thủy tinh thích hợp để sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối của axit hữu cơ như axit lactic, axit ascorbic, axit maleic, axit oxalic, axit malonic, axit malic, axit suxinic, axit xitric, axit gluconic, axit glutamic, và axit tương tự. Muối có thể bao gồm các cation như natri, kali, canxi, magiê, phosphat và các cation tương tự. Các chất tăng cường thủy tinh hữu dụng khác bao gồm protein, sản phẩm thủy phân protein, polypeptit và axit amin. Hỗn hợp của các chất tạo thủy tinh cũng được đề xuất trong một hợp phần duy nhất. Quy trình được sử dụng để thu được cấu trúc thủy tinh cho mục đích của sáng chế thường là làm thăng hoa và/hoặc làm bay hơi dung môi. Lý tưởng là, hợp chất mà là hợp chất GRAS được ưu tiên hơn so với các hợp chất không phải là GRAS.

"Hydrat cacbon" hoặc "hợp chất polyhydroxy" chỉ các sacarit chứa chủ yếu là cacbon, hydro, và oxy. Sacarit thường chứa mạch chính là đường gồm các đơn vị cấu trúc lặp lại liên kết ở dạng mạch thẳng hoặc không thẳng, một số chúng chứa các nhóm hóa học mang điện dương hoặc điện âm. Các đơn vị lặp này có thể nằm trong khoảng từ hai đến vài triệu. Các sacarit hữu dụng bao gồm đường khử và đường không khử và rượu đường, disacarit, oligosacarit, polysacarit tan trong nước và các dẫn xuất của chúng. Hai monosacarit được liên kết với nhau tạo thành disacarit. Hai monosacarit được sử dụng để tạo thành disacarit có thể giống hoặc khác nhau. Ví dụ về các disacarit mà có thể được sử dụng trong hỗn hợp hydrat cacbon theo sáng chế bao gồm, sucroza, trehaloza, lactoza, maltoza, isomaltoza. Disacarit sulfat hóa cũng có thể được sử dụng. Số lượng nhỏ các monosacarit được liên kết với nhau (cụ thể là từ ba đến mười) tạo thành oligosacarit. Monosacarit được sử dụng để tạo thành oligosacarit có thể là các thành phần đường giống hoặc khác nhau. Ví dụ về oligosacarit thích hợp để sử dụng bao gồm, inulin, maltodextrin, dextran, fructo-oligosacarit (FOS), galacto-oligosacarit

(GOS), mannan-oligosacarit (MOS) và hỗn hợp của chúng. Số lượng lớn các monosacarit được liên kết với nhau (cụ thể là lớn hơn mười) tạo thành polysacarit. Monosacarit được sử dụng để tạo thành polysacarit có thể là các thành phần đường giống hoặc khác nhau. Ví dụ về polysacarit thích hợp để sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, metylxenluloza, hydroxypropylxenluloza, hydroxyetylxenluloza, và hypromelozơ; tinh bột hoặc các phân đoạn tinh bột hòa tan, gồm xanthan, gồm guar, pectin, carrageen, galactomannan, gồm gellan, bao gồm dẫn xuất bất kỳ của các hợp chất này, xenluloza axetat phtalat (CAP), carboxy-metyl-xenluloza, natri alginat, muối của axit alginic, hydroxyl propyl metyl xenluloza (HPMC), gồm acacia, gồm đậu locust, chitosan và dẫn xuất của chitosan, collagen, axit polyglycolic, tinh bột và tinh bột biến tính và xyclodextrin.

Chế phẩm hoặc hợp phần "ổn định" là chế phẩm trong đó vật liệu có hoạt tính sinh học gần như vẫn giữ được độ ổn định vật lý, độ ổn định hóa học, và/hoặc hoạt tính sinh học của nó khi bảo quản. Độ ổn định có thể được xác định ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm được chọn trong khoảng thời gian được chọn. Phương pháp phân tích xu thế có thể được sử dụng để ước lượng hạn sử dụng dự kiến trước khi vật liệu thực sự được bảo quản trong khoảng thời gian đó. Ví dụ, đối với vi khuẩn sống, độ ổn định được xác định là thời gian cần để mất 1 log CFU/g chế phẩm khô trong điều kiện xác định trước về nhiệt độ, độ ẩm và khoảng thời gian.

"Khả năng sống sót" đối với vi khuẩn, chỉ khả năng tạo thành khuẩn lạc (CFU hoặc Đơn vị tạo khuẩn lạc) trên môi trường dinh dưỡng thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn. Khả năng sống sót, đối với virus, chỉ khả năng gây nhiễm và sao chép trong tế bào chủ thích hợp, dẫn đến sự tạo thành mảng trên thảm tế bào chủ.

Nhiệt độ phòng hoặc điều kiện "xung quanh" là điều kiện ở một thời điểm nhất định trong môi trường nhất định. Cụ thể là, nhiệt độ phòng xung quanh là 22-25°C, áp suất xung quanh, và độ ẩm xung quanh được xác định dễ dàng và sẽ thay đổi phụ thuộc vào thời gian trong năm, thời tiết và điều kiện khí hậu, độ cao, v.v.

"Hoạt tính nước" hoặc "Aw" trong trường hợp hợp phần chế phẩm sấy, để chỉ tính khả dụng của nước và là trạng thái năng lượng của nước trong hệ thống. Nó được xác định là áp suất hơi của nước phía trên mẫu chia cho áp suất hơi của nước tinh khiết ở cùng nhiệt độ. Nước cất tinh khiết có hoạt tính nước đúng bằng một hoặc $A_w=1,0$.

"Độ ẩm tương đối" hoặc "RH" trong trường hợp độ ổn định bảo quản để chỉ lượng hơi nước trong không khí ở nhiệt độ nhất định. Độ ẩm tương đối thường thấp hơn độ ẩm cần thiết để làm bão hòa không khí và được thể hiện theo tỉ lệ phần trăm độ ẩm bão hòa.

"Khô" và các biến thể của nó để chỉ trạng thái vật lý được khử nước hoặc khan, tức là, gần như không có chất lỏng. Sấy bao gồm ví dụ, sấy phun, sấy tầng sôi, sấy đông khô, và sấy chân không.

"Làm đông khô" hoặc sấy thăng hoa chỉ quy trình bào chế hợp phần ở dạng khô bằng cách làm đông lạnh nhanh và khử nước ở trạng thái đông lạnh (đôi khi được gọi là sự thăng hoa). Quá trình làm đông khô diễn ra ở nhiệt độ mà dẫn đến sự kết tinh các polyme. Quy trình này có thể diễn ra trong chân không ở áp suất đủ để duy trì sản phẩm đông lạnh, tốt hơn là thấp hơn khoảng <2000 mTOR .

"Sấy sơ cấp" hoặc "sấy lỏng", liên quan đến các quy trình được mô tả trong bản mô tả, chỉ sự sấy khử nước diễn ra từ thời gian tan chảy các hạt đông lạnh đến điểm bắt đầu sấy thứ cấp. Cụ thể là, phần lớn bước sấy sơ cấp diễn ra bằng cách làm bay hơi kéo dài, trong khi nhiệt độ sản phẩm vẫn thấp hơn đáng kể so với nhiệt độ của nguồn nhiệt. Quy trình này có thể diễn ra trong chân không ở áp suất đủ để duy trì sản phẩm tan chảy, tốt hơn là lớn hơn khoảng >2000 mTorr.

"Sấy thứ cấp", liên quan đến quy trình được mô tả trong bản mô tả, chỉ bước sấy diễn ra ở nhiệt độ lớn hơn nhiệt độ đông lạnh của chế phẩm và gần với nhiệt độ của nguồn nhiệt. Quy trình này có thể diễn ra trong chân không ở áp suất đủ để làm giảm hoạt tính nước của chế phẩm, tốt hơn là thấp hơn khoảng <1000 mTorr (133,32 Pa). Trong quy trình sấy chế phẩm cụ thể, bước sấy thứ cấp làm giảm hoạt tính nước của chế phẩm đến A_w bằng 0,3 hoặc nhỏ hơn.

Hợp phần và phương pháp sấy theo sáng chế giải quyết vấn đề ở chỗ cung cấp các chế phẩm khô hoặc đông lạnh ở quy mô công nghiệp và hiệu quả về chi phí chứa vật liệu có hoạt tính sinh học dễ bị tác động, như peptit, protein, hormon, axit nucleic, kháng thể, thuốc, vacxin, nấm men, vi khuẩn, virus và/hoặc huyền phù tế bào, có hạn sử dụng được kéo dài đáng kể ở trạng thái khô. Sáng chế đề xuất hợp phần bảo quản và phương pháp sấy bao gồm vật liệu sinh học được bao quanh bởi cấu trúc thủy tinh vô định hình của hợp chất hòa tan cao. Quy trình làm đông lạnh và sấy bao gồm bước: trộn vật liệu sinh học và hợp phần trong bột nhão lỏng, làm đông lạnh tức thì bột nhão chứa hợp phần này trong nitơ lỏng để tạo thành giọt, dây hoặc hạt, thanh lọc các hạt đông

lạnh này trong chân không cao, sau đó sấy vật liệu có hoạt tính sinh học trong sự tạo thành đường thủy tinh bằng cách làm bay hơi hơi ẩm trong điều kiện áp suất giảm trong khi vẫn cấp nhiệt cho hợp phần này.

Sáng chế dựa trên sự phát hiện nổi bật rằng vật liệu sinh học có thể được bảo vệ trong cấu trúc thủy tinh mà về vẫn còn hoạt tính đáng kể. Khi vật liệu sinh học này được kết hợp với hỗn hợp hợp phần và được sấy chân không theo sáng chế, độ ổn định cao hơn thu được trong khoảng thời gian kéo dài tiếp xúc với điều kiện nhiệt độ và độ ẩm khắc nghiệt. Sáng chế bao gồm các hợp phần chứa vật liệu sinh học, hỗn hợp của hydrat cacbon hòa tan và muối axit carboxylic tăng cường thủy tinh. Hợp phần theo sáng chế vốn khác biệt về cấu trúc vật lý và chức năng của chúng so với hợp phần đường không nhớt hoặc cô đặc mà được sấy đơn giản trong quy trình sấy điển hình. Ví dụ, Patent Mỹ số 6,919,172 bộc lộ hợp phần bột được tạo sol khí để sử dụng trong phổi, mà có chứa hỗn hợp các hydrat cacbon khác nhau và natri xitrat. Tuy nhiên, hợp phần được mô tả theo patent này không có hợp chất dạng protein bổ sung cần thiết cho độ ổn định bổ sung và để tạo thành cấu trúc vật lý mong muốn trong quá trình sấy dung dịch có nồng độ đường cao. Hợp phần được mô tả theo patent này cũng không có độ nhớt hoặc cấu trúc hydrogel, mà cho phép sấy hiệu quả dung dịch tan chảy hoặc không đông lạnh để tạo thành thủy tinh được tăng cường. Ngược lại, hợp phần và quy trình sấy theo sáng chế khắc phục được tất cả các vấn đề này mà vẫn thu được vật liệu sinh học có độ ổn định cao.

Cấu trúc thủy tinh được tăng cường thường thu được trong giải pháp kỹ thuật đã biết bằng cách tạo bột hoặc đun sôi dung dịch trong chân không để tạo thuận lợi cho việc sấy hiệu quả. Bước tạo bột thường dẫn đến việc sôi quá mức và phun trào dung dịch – điều không tránh khỏi khi sấy dung dịch không được làm đông lạnh, và do đó, chỉ có thể thu được lượng rất nhỏ dung dịch trong lọ hoặc bình (xem ví dụ Patent Mỹ số 6,534,087, trong đó độ dày của sản phẩm được tạo bột cuối cùng là nhỏ hơn 2 mm). Hợp phần và phương pháp sấy theo sáng chế tránh được sự sôi và tạo bọt chế phẩm nhờ đó có thể nạp được nhiều nguyên liệu hơn nhiều trên mỗi diện tích sấy và, do đó, có thể dễ dàng mở rộng quy mô để sản xuất số lượng lớn nguyên liệu mà không cần sử dụng các bình và khay hoặc thiết bị được thiết kế chuyên dụng.

Phạm vi rộng các vật liệu sinh học có thể được sử dụng với hợp phần theo sáng chế để tạo thành môi trường bảo quản chứa nước theo sáng chế. Môi trường bảo quản

này sau đó có thể được đưa qua quy trình sấy theo sáng chế để tạo ra bột khô ổn định chứa vật liệu sinh học. Các vật liệu sinh học này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở: enzym, như enzym tụy, lipaza, amylaza, proteaza, phitaza, lactat dehydrogenaza; protein, như insulin; vaccin; virus, như adenovirus; tế bào, bao gồm tế bào chưa có nhân điển hình (bao gồm vi khuẩn) và tế bào nhân chuẩn, các vật liệu sinh học khác, bao gồm thuốc, axit nucleic, và túi lipid.

Vi khuẩn probiotic được cho thấy là đặc biệt có lợi nhờ hợp phần và phương pháp sấy theo sáng chế. Bột probiotic khô ổn định được bào chế theo hợp phần và phương pháp theo sáng chế bao gồm bước trộn môi trường nuôi cấy mới, đông lạnh hoặc khô của vi khuẩn probiotic với hỗn hợp hydrat cacbon và hợp chất tăng cường thủy tinh, làm đông lạnh tức thì chế phẩm nhót trong nitơ lỏng để tạo thành giọt, dây hoặc hạt rắn đông lạnh, và sấy chân không bằng cách bắt đầu sử dụng áp suất chân không đủ để thanh lọc và làm ổn định cấu trúc của các hạt đông lạnh, làm tăng nhiệt độ chế phẩm cao hơn nhiệt độ làm đông lạnh và cung cấp nguồn nhiệt 20°C và cao hơn để tạo thuận lợi cho việc loại bỏ nước sơ cấp. Việc duy trì nhiệt độ của chế phẩm cao hơn điểm đông lạnh có thể được thực hiện bằng cách điều chỉnh áp suất chân không và bằng sự dẫn nhiệt đến chế phẩm. Để hoàn thành quy trình sấy và làm giảm thêm hoạt tính nước của chế phẩm xuống dưới A_w 0,3 hoặc thấp hơn, bước sấy thứ cấp được áp dụng ở áp suất chân không tối đa và ở nhiệt độ tăng đến 70°C. Hợp phần này có thể vẫn ổn định trong điều kiện bảo quản khắc nghiệt như 40°C và 33%RH trong 60 ngày hoặc lâu hơn.

Bào chế hợp phần

Hợp phần để bào chế bột ổn định, đông lạnh hoặc khô của vật liệu sinh học theo sáng chế, chứa hỗn hợp hydrat cacbon và chất tăng cường thủy tinh. Các nguyên liệu này, khi được trộn với vật liệu có hoạt tính sinh học được ưu tiên tạo thành hạt, dây hoặc giọt trong nitơ lỏng và có thể được sấy hiệu quả trong cấu trúc thủy tinh vô định hình theo phương pháp của sáng chế và cung cấp lượng lớn các hợp phần ổn định khô để bảo quản và sử dụng vật liệu có hoạt tính sinh học này (xem Fig. 1 – đối với các quan sát vật lý và hoạt tính nước (A_w) của các chế phẩm khác nhau sau khi sấy). Hỗn hợp hydrat cacbon tạo ra tính ổn định cấu trúc cho chế phẩm và/hoặc lợi ích bảo vệ về mặt vật lý và hóa học cho vật liệu có hoạt tính sinh học và ngăn chặn hoặc làm giảm các tác dụng bất lợi dựa trên việc hoàn nguyên hoặc tái hydrat hóa.

Phân đoạn polysacarit trong hỗn hợp hydrat cacbon có thể tạo ra độ nhớt đặc cho chế phẩm và kiểm soát tốt hơn các đặc tính về tỷ trọng của chế phẩm dưới áp suất chân không và độ bền cấu trúc được gia tăng cho hợp phần chế phẩm sấy khô theo sáng chế. Polysacarit được ưu tiên, cụ thể là với các sinh vật sống, là gồm tan trong nước, do tính chất khác biệt của chúng là tạo thành gel nhớt ở nhiệt độ vừa phải. Gôm ở nồng độ nhất định còn được phát hiện ra là làm ổn định hiệu quả cấu trúc chế phẩm trong chân không, bằng cách tạo ra độ nhớt và tỷ trọng thích hợp cho chế phẩm và cho phép sấy hiệu quả chế phẩm trong bước sấy lỏng sơ cấp ở độ nhớt cụ thể. Một số gôm còn có thể tạo thành hydrogel bằng cách liên kết chéo với các cation hóa trị hai hoặc đa hóa trị (ví dụ, alginat, pectin, chitosan) hoặc nhờ các thay đổi nhiệt độ hoặc pH (ví dụ, gelatin, CMC, CAP, gôm gellan). Dung dịch được tạo hydrogel sẽ ngăn ngừa các vấn đề liên quan đến sấy chân không dung dịch không được đông lạnh.

Phân đoạn disacarit trong hỗn hợp hydrat cacbon bao gồm các đường và rượu đường khác nhau. Disacarit được ưu tiên là disacarit không gây kết tinh và/hoặc làm hỏng hoặc làm mất ổn định vật liệu có hoạt tính sinh học trong chế phẩm ở nhiệt độ đông lạnh (ví dụ, thấp hơn -20°C) và trong quá trình loại nước. Ví dụ, vật liệu có hoạt tính sinh học có thể được gắn vật lý trong các đường tạo thủy tinh như sucroza, lactoza hoặc trehaloza để tăng cường sự duy trì cấu trúc phân tử trong suốt quá trình sấy và tạo ra độ cứng cấu trúc cho chất nền vô định hình ở trạng thái khô. Disacarit thích hợp sẽ thay thế hiệu quả nước từ quá trình hydrat hóa bị mất khi sấy, để ngăn ngừa sự hư hại cho màng tế bào và sự biến tính enzym (xem tổng quan trong ấn phẩm Crowe et al., 1998). Các chức năng khác của disacarit trong hợp phần có thể bao gồm việc bảo vệ vật liệu có hoạt tính sinh học khỏi sự tiếp xúc với ánh sáng có hại, oxy, chất oxy hóa và hơi ẩm. Disacarit thích hợp phải dễ dàng hòa tan trong dung dịch. Trehaloza là chất bảo vệ đặc biệt thu hút bởi nó là disacarit không khử được tìm thấy ở thực vật và sinh vật sống (ví dụ, vi khuẩn, nấm và động vật không xương sống như côn trùng và giun tròn) mà duy trì ở trạng thái ngủ trong giai đoạn khô hạn. Trehaloza được chỉ ra là chất bảo vệ có hiệu quả cho nhiều vật liệu sinh học khác nhau bao gồm protein và các đại phân tử sinh học khác, như enzym, huyết thanh, kháng thể, kháng nguyên và thành phần vaccin (Sanchez et al., 1999, Intl. J. Pharm. 185, 255-266; Esquisabel et al, 1997, J. Microencapsulation, 14, 627-638). Trong một số trường hợp, có thể có lợi khi bao gồm hai hoặc nhiều hơn hai disacarit khác nhau như hỗn hợp trehaloza và sucroza để ức chế

sự tạo thành tinh thể, tăng cường tính ổn định của chế phẩm vật liệu có hoạt tính sinh học sấy khô trong điều kiện bảo quản trong khoảng thời gian kéo dài và giảm chi phí.

Phân đoạn oligosacarit trong hỗn hợp hydrat cacbon bao gồm inulin, maltodextrin, dextran, fructo-oligosacarit (FOS), galacto-oligosacarit (GOS), mannan-oligosacarit (MOS) và hỗn hợp của chúng. Các oligosacarit này làm giảm một số vấn đề liên quan đến việc sử dụng một mình trehalose làm chất bảo vệ cho nhiều vật liệu sinh học được bảo quản. Mặc dù rất hữu hiệu trong việc bảo vệ vật liệu sinh học trong quá trình khử nước và tái hydrat hóa, nhưng một mình trehalose đóng vai trò làm chất làm ổn định không tạo ra tính ổn định bảo quản mong muốn trong khoảng thời gian kéo dài, đặc biệt là trong môi trường nhiệt độ và/hoặc độ ẩm cao. Vấn đề này được giải quyết theo sáng chế bằng cách bổ sung oligosacarit, tốt hơn là inulin, vào hỗn hợp hydrat cacbon.

Tỷ lệ khối lượng được ưu tiên của các sacrit trong hỗn hợp hydrat cacbon là 10:0,1-4:0,1-2 disacrit/oligosacrit/polysacrit và tốt hơn là, tỷ lệ khối lượng của disacrit/oligosacrit/polysacrit nằm trong khoảng từ 10:0,2:0,1 đến 10:2:1. Tốt hơn là, hỗn hợp hydrat cacbon chứa, theo phần trăm khối lượng chất khô toàn phần là, từ 10 đến 90% disacrit, từ 1 đến 10% oligosacrit và từ 0,1 đến 10% polysacrit.

Chất tăng cường cấu trúc thủy tinh theo sáng chế bao gồm muối của axit hữu cơ như axit lactic, axit ascorbic, axit maleic, axit oxalic, axit malonic, axit malic, axit suxinic, axit xitric, axit gluconic, axit glutamic, và các axit tương tự. Muối có thể bao gồm các cation như natri, kali, canxi, magiê, muối đệm, đệm phosphat và các cation tương tự. Ví dụ bao gồm natri xitrat, natri lactat, natri maleat, magiê gluconat, natri ascorbat, kali ascorbat, muối đệm phosphat và muối tương tự. Nói chung, các anion đa hóa trị tạo thành thủy tinh dễ dàng hơn với Tg cao hơn so với các anion hóa trị một. Anion được ưu tiên sẽ có Tg cao và độ tan đủ để ức chế sự kết tinh và nhờ đó tạo thành cấu trúc thủy tinh bền. Trong một số trường hợp, các hỗn hợp muối hữu cơ có thể là hữu dụng (ví dụ natri xitrat và natri ascorbat). Natri xitrat được thấy là tương tác với các nhóm hydroxyl của phân tử đường và tạo thành liên kết qua nhóm carboxyl của nó, mà dẫn đến sự tăng mạnh nhiệt độ chuyển thủy tinh của sucroza được thủy tinh hóa (Kets et al, 2004. Citrate increases glass transition temperature of vitrified sucrose preparations Cryobiology, 48:46-54). Natri xitrat là chất phụ gia thực phẩm phổ biến được xác nhận là GRAS (21 CFR 184.1751 - Natri xitrat). Các chức năng khác của natri

xitrat trong hợp phần này có liên quan đến khả năng đệm của nó và ngăn ngừa các thay đổi mạnh về độ pH của môi trường lỏng trong quá trình làm đông lạnh, mà có thể dẫn đến sự biến tính của protein được sấy thăng hoa.

Các chất tăng cường thủy tinh thích hợp khác mà được bao gồm trong hợp phần để làm tăng thêm tính ổn định của nó bao gồm protein, sản phẩm thủy phân protein, polypeptit và axit amin. Tốt hơn là, casein hoặc đậu Hà Lan và tốt hơn nữa là, casein thủy phân hoặc protein đậu Hà Lan thủy phân, được sử dụng. "Protein thủy phân" để chỉ protein được đưa qua quá trình thủy phân một phần hoặc hoàn toàn bằng axit hoặc enzym để tạo ra protein được thủy phân có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 50 kDa. Tốt hơn là, ít nhất 20% cơ chất protein được chuyển hóa thành peptit có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 200 đến 2000 dalton. Protein thủy phân này gần như có cùng thành phần axit amin với protein đầy đủ và có thể thu được từ nhiều nguồn thương mại bất kỳ. Vì ít gây dị ứng, protein được thủy phân có thể được sử dụng thuận lợi trong một số thực phẩm cho đối tượng tiêu dùng nhạy cảm như trẻ sơ sinh và người cao tuổi.

Lượng chất tăng cường thủy tinh được sử dụng trong hợp phần sẽ thay đổi phụ thuộc vào toàn bộ hợp phần và điều kiện bảo quản sấy được dự định của nó. Thông thường, tỷ lệ mol của chất tăng cường thủy tinh với tổng hydrat cacbon sẽ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,3. Hợp phần được ưu tiên chứa tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,2.

Hợp phần được ưu tiên chứa thành phần hydrat cacbon với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 90% bao gồm ít nhất là di-, oligo- và polysacarit và thành phần protein bao gồm từ 0,5% đến 40% là protein thủy phân. Tốt hơn nữa là, hợp phần này chứa từ 30% đến 70% là thành phần hydrat cacbon và khoảng từ 10% đến 40% là thành phần chất tăng cường thủy tinh như protein thủy phân protein và axit carboxylic, trong đó thành phần hydrat cacbon chứa từ khoảng 10% đến 90% và tốt hơn là trong khoảng từ 40% đến 80% là disacarit; khoảng từ 1% đến 10% và tốt hơn nữa là khoảng từ 5% đến 10% là oligosacarit; và khoảng từ 0,1 đến 10% và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5% đến 10% là polysacarit. Hợp phần này còn chứa muối của axit hữu cơ mà được xem là thành phần chất tăng cường thủy tinh khác và chứa khoảng từ 0,5% đến 20% axit carboxylic, tính theo tổng khối lượng của hợp phần.

Dung dịch chứa vật liệu sinh học và hợp phần làm ổn định theo sáng chế có thể bao gồm lượng đáng kể chất rắn toàn phần (các thành phần không bao gồm dung môi, như nước), nằm trong khoảng từ 20% đến 60%, tốt hơn là từ 30 đến 50% khối lượng. Phần lớn các chất rắn toàn phần có thể bao gồm vật liệu có hoạt tính sinh học, hỗn hợp hydrat cacbon và chất tăng cường thủy tinh. Ví dụ, vật liệu có hoạt tính sinh học có thể có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5% đến 30% khối lượng/thể tích, tốt hơn là khoảng từ 10 đến 20% khối lượng/thể tích. Khối lượng của hỗn hợp hợp phần trong môi trường nuôi cấy thường nằm trong khoảng từ 10% đến 60%, tốt hơn là từ 20 đến 40%. Độ nhớt của chế phẩm theo sáng chế thường lớn hơn 1000 centipoise (cP); tốt hơn là, lớn hơn 5000 cP; và tốt nhất là lớn hơn 10.000 cP.

Phương pháp bào chế chế phẩm khô ổn định

Các kỹ thuật sấy khác nhau có thể được sử dụng hiệu quả để sấy hợp phần này. Các phương pháp này, dù ít phức tạp hơn và ít tốn kém hơn sấy thăng hoa hoặc sấy chân không, nhưng thường làm hỏng vật liệu sinh học nhiều hơn. Nhiều vật liệu sinh học có xu hướng thay đổi toàn bộ hình dạng và các phản ứng không mong muốn nhiều hơn khi được bảo quản bằng cách sử dụng phương pháp diễn ra ở nhiệt độ môi trường hoặc cao hơn so với khi phương pháp sấy thăng hoa hoặc sấy lạnh được sử dụng. Kết quả là, ngay cả khi các chất bảo vệ đã biết hiện nay được sử dụng, hoạt tính của nhiều vật liệu sinh học được tái hydrat hóa vừa không thỏa mãn trong khả năng của nó, vừa thấp hơn đáng kể nếu được bảo quản bởi nhiệt độ sấy thấp.

Phương pháp được ưu tiên để bào chế chế phẩm khô ổn định chứa vật liệu có hoạt tính sinh học bao gồm bước: (1) bào chế chế phẩm bột nhão nhớt bằng cách trộn vật liệu có hoạt tính sinh học với hợp phần theo sáng chế trong dung dịch nước, (2) làm đông lạnh tức thì chế phẩm bột nhão này để tạo thành các hạt đông lạnh rắn, (3) tùy ý, đưa các hạt đông lạnh này qua áp suất chân không cao trong thời gian ngắn để thanh lọc các hạt này và làm ổn định cấu trúc của chúng, (4) loại nước bằng cách làm bay hơi hơi ẩm ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ làm đông lạnh chế phẩm, (5) làm giảm tiếp hoạt tính nước của chế phẩm xuống thấp hơn 0,3 Aw trong điều kiện chân không hoàn toàn và nhiệt độ tăng.

Ví dụ, dạng khô của vật liệu có hoạt tính sinh học có thể được bào chế thành dung dịch hoặc huyền phù chứa hỗn hợp bột của hợp phần này. Hỗn hợp hợp phần này có thể

được hòa tan vào dung dịch nước ấm kèm theo khuấy bằng cánh cắt thấp trước khi làm lạnh và trộn với vật liệu có hoạt tính sinh học. Vật liệu có hoạt tính sinh học, như virus hoặc vi khuẩn được nuôi cấy, có thể được cô và tách khỏi môi trường nuôi cấy bằng cách ly tâm hoặc lọc trước khi tái tạo huyền phù thành chế phẩm. Hoặc, toàn bộ nước trong chế phẩm được cung cấp trong chất lỏng chứa vật liệu sinh học được cô. Huyền phù được giữ ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ phòng một ít và hỗn hợp bột hợp phần khô được bổ sung từ từ vào huyền phù ấm (25°C đến 40°C) chứa vật liệu sinh học. Huyền phù được khuấy nhẹ trong máy trộn kiểu hành tinh cho đến khi tất cả các thành phần được phân tán hoặc hòa tan hoàn toàn và bột nhão đồng nhất thu được.

Dung dịch nhót sau đó có thể được liên kết chéo để tạo thành hydrogel (phụ thuộc vào đặc tính polysacarit) bằng cách bổ sung ion kim loại hoặc thay đổi nhiệt độ hoặc pH của bột nhão và sau đó sấy theo phương pháp sấy theo sáng chế. Hoặc, bột nhão có thể được làm đông lạnh tức thì bằng cách phun mù qua vòi, nhỏ giọt hoặc phun trong đá khô hoặc bể nitơ lỏng để tạo thành các hạt nhỏ hoặc giọt, dây hoặc hạt rắn. Các hạt rắn đông lạnh có thể được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ trong khoảng từ -30°C đến -80°C để sử dụng sau dưới dạng sản phẩm đông lạnh ổn định hoặc cho đến khi sấy. Phương pháp sấy được ưu tiên là sấy chân không trong đó nhiệt độ sản phẩm được duy trì cao hơn một chút so với nhiệt độ đông lạnh của nó. Giọt hoặc hạt đông lạnh được đặt lên khay ở khả năng nạp nằm trong khoảng từ 0,1 kg/sq ft đến 1,5 kg/sq ft và được sấy theo phương pháp theo sáng chế. Tốt hơn là, quy trình sấy được bắt đầu bằng bước thanh lọc nhanh, cho phép sản phẩm thích nghi với nhiệt độ ban đầu và cấu trúc của các hạt đông lạnh được nới lỏng và ổn định và không khí dư được khử. Thường là, bước thanh lọc diễn ra trong khoảng từ 1 đến 60 phút phụ thuộc vào độ nhót của sản phẩm và việc nạp vào khay. Các hạt hoặc hạt nhỏ vẫn cần duy trì ở dạng đông lạnh rắn trong toàn bộ bước thanh lọc. Sau đó, nhiệt độ sản phẩm được đưa lên cao hơn nhiệt độ đông lạnh của nó và bước sấy sơ cấp được thực hiện tiếp cho đến khi toàn bộ nước tự do được làm bay hơi khỏi sản phẩm. Khi nhiệt độ chế phẩm đạt đến nhiệt độ mong muốn, nhiệt được điều chỉnh để duy trì nhiệt độ đó và bước sấy lỏng sơ cấp bằng cách làm bay hơi được thực hiện. Ở bước này, chế phẩm đã được làm tan và sự bay hơi nước được tăng tốc diễn ra mà không cần đun sôi hoặc tạo bọt. Quy trình sấy được hoàn thành bằng pha sấy thứ cấp bổ sung ở độ chân không tối đa và nhiệt độ tăng.

Phương pháp thông thường trong giải pháp kỹ thuật đã biết bao gồm bước tạo bột kéo dài và/hoặc bắn tóe và sôi mạnh mà có thể làm hỏng các chất sinh học dễ bị tác động và gây ra các khó khăn cho việc áp dụng quy mô công nghiệp ở dung tích nạp cao (xem ví dụ Patent Mỹ số 6,534,087, trong đó áp suất chân không được sử dụng gây ra sự sôi và tạo bột mạnh). Tuy nhiên, hợp phần và phương pháp theo sáng chế tránh được sự sôi hoặc tạo bột của chế phẩm trong khi vẫn đạt được tốc độ sấy nhanh hơn đáng kể và cho phép dung tích nạp chế phẩm cao. Ngoài ra, việc khử khí hoàn toàn và hiệu quả bột nhão lỏng nhớt là khó khăn và có thể cần khoảng thời gian kéo dài. Các trở ngại này đều được giải quyết theo sáng chế bằng cách sử dụng hợp phần thích hợp mà cho phép bước sấy lỏng sơ cấp hiệu quả tạo thành cấu trúc thủy tinh mà không xảy ra quá trình sôi và tạo bột quá mức. Việc nạp các hạt rắn đông lạnh lên khay trái ngược với bột nhão hoặc xirô nhớt cho phép dung tích nạp cao hơn nhiều trên mỗi diện tích sấy trên các khay so với đạt bằng giải pháp kỹ thuật đã biết.

Theo một ví dụ được ưu tiên của sáng chế, vật liệu sinh học là môi trường nuôi cấy vi khuẩn probiotic sống cô đặc. Tốt hơn là, hỗn hợp hợp phần bột chứa từ 1 đến 4% natri alginat hoặc gôm gellan, từ 50 đến 75% trehaloza, từ 1 đến 10% inulin hoặc FOS, từ 10 đến 20% sản phẩm thủy phân protein, như sản phẩm thủy phân casein, nước sữa, đậu Hà Lan, đậu tương hoặc hạt bông và từ 1 đến 10% natri xitrat hoặc natri ascorbat. Môi trường nuôi cấy probiotic có thể là mới, đông lạnh hoặc đã được sấy ở dạng bột khô. Hỗn hợp hợp phần được bổ sung vào môi trường nuôi cấy probiotic cô đặc để tạo ra hàm lượng rắn của hỗn hợp dung dịch là từ 40 đến 60% (khối lượng) và pH được điều chỉnh đến khoảng từ 6,5 đến 7,5 bằng ion phosphat hoặc xitrat. Dung dịch được trộn ở nhiệt độ cao hơn một chút so với nhiệt độ phòng (thường nằm trong khoảng từ 25°C đến 37°C) cho đến khi tất cả các thành phần được hòa tan hoàn toàn. Bột nhão nhớt được cho nhỏ giọt trong nitor lỏng để tạo thành các giọt hoặc hạt nhỏ mà sau đó được lấy ra khỏi nitor lỏng, được bao gói trong các túi và được bảo quản trong máy làm lạnh sâu ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sấy.

Phương pháp sấy vi khuẩn probiotic sống thông thường bao gồm bước: rải các hạt rắn đông lạnh lên khay thành lớp đồng nhất ở dung tích nạp nằm trong khoảng từ 100 đến 1500 g/sq ft và các khay được đặt ngay vào tủ sấy thăng hoa. Áp suất chân không sau đó được đặt ở khoảng 1000 mTOR hoặc thấp hơn và phụ thuộc vào kích thước của tủ sấy thăng hoa và kiểu nguồn nhiệt, nhiệt độ các giá được điều chỉnh để duy

trì các hạt ở khoảng -20 đến -30°C . Hạt đông lạnh rắn được cho phép thanh lọc trong khoảng từ 1 đến 60 phút và độ chân không được điều chỉnh đến khoảng từ 2000 đến 10.000 mTorr và sự truyền nhiệt được tăng để nâng nhiệt độ chế phẩm đến khoảng từ -10°C đến $+0^{\circ}\text{C}$. Điều kiện nhiệt độ và áp suất chân không này được duy trì trong bước sấy lỏng sơ cấp mà có thể kéo dài từ vài giờ và lên đến 24 giờ phụ thuộc vào dung tích nạp lên khay. Tại một số điểm trong quy trình sấy sơ cấp, tốc độ bay hơi dung môi chậm lại và nhiệt độ chế phẩm bắt đầu tăng do sự cấp nhiệt dư thừa trong khoang sấy. Điểm này chỉ ra kết thúc bước sấy sơ cấp theo sáng chế. Khi dung môi được lấy ra khỏi chế phẩm, hợp chất tạo thủy tinh trong dung dịch được cô và đặc hơn cho đến khi nó dừng chảy dưới dạng chất lỏng và tạo thành cấu trúc vô định hình và/hoặc giống thủy tinh ổn định.

Bước sấy thứ cấp sau đó được thực hiện ở độ chân không tối đa và nhiệt độ chế phẩm nằm trong khoảng từ 30°C đến 50°C . Mục đích của bước sấy thứ cấp là nhằm loại bỏ hơi ẩm vẫn bị giữ lại hoặc liên kết còn lại và tạo ra hợp phần ổn định trong quá trình bảo quản trong khoảng thời gian dài ở nhiệt độ môi trường. Bước sấy thứ cấp có thể kéo dài trong vài giờ và điểm kết thúc của nó là khi chế phẩm khô hoàn toàn và hoạt tính nước của nó thấp hơn 0,3 Aw.

Phương pháp sấy theo sáng chế tạo ra vật liệu có hoạt tính sinh học tức là được bọc trong cấu trúc thủy tinh vô định hình, nhờ đó ngăn được sự mở gấp hoặc biến tính của protein và làm chậm đáng kể các tương tác hoặc phản ứng chéo của phân tử, do tính lưu động của hợp chất và các phân tử khác trong hợp phần thủy tinh vô định hình giống thủy tinh được giảm đáng kể. Miễn là cấu trúc rắn vô định hình được giữ ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ chuyển thủy tinh của nó và hơi ẩm còn lại vẫn tương đối thấp (tức là, dưới Aw 0,5), vi khuẩn probiotic vẫn có thể tương đối ổn định. Cần lưu ý rằng việc thu được cấu trúc thủy tinh không phải là điều kiện tiên quyết cho tính ổn định dài hạn vì một số vật liệu sinh học có thể hoạt động tốt hơn ở trạng thái kết tinh nhiều hơn.

Cấu trúc thủy tinh đã được sấy có thể được sử dụng toàn bộ, được cắt thành các hình dạng và kích thước mong muốn, hoặc được tán và nghiền thành bột chảy tự do tạo ra quy trình xử lý xuôi dòng dễ dàng như đông tụ ướt hoặc khô, tạo hạt, tạo viên nén, nén, tạo viên tròn hoặc loại quy trình phân phối bất kỳ khác. Các quy trình tán, nghiền, xay hoặc tán thành bột đều đã được biết rõ trong lĩnh vực. Ví dụ, máy nghiền kiểu búa, máy nghiền không khí, máy nghiền đập, máy nghiền khí nén, máy nghiền dạng búa, máy

nghiên Wiley, hoặc thiết bị nghiền tương tự có thể được sử dụng. Kích thước hạt được ưu tiên là nhỏ hơn khoảng 1000 μm và tốt hơn là nhỏ hơn 500 μm .

Hợp phần và phương pháp được mô tả trong bản mô tả làm ổn định vật liệu sinh học và bảo quản hoạt tính của nó trong thời gian bảo quản kéo dài ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ môi trường và độ ẩm tương đối. Ví dụ, hợp phần được kiểm tra tính ổn định bằng cách đưa chúng qua nhiệt độ tăng tốc (ví dụ, 40°C) và độ ẩm cao (ví dụ 33%RH) và xác định hoạt tính sinh học của chế phẩm. Ví dụ đối với vi khuẩn probiotic sống, kết quả từ các nghiên cứu chứng minh rằng vi khuẩn được bào chế trong các hợp phần này là ổn định trong ít nhất 60 ngày. Tính ổn định được định nghĩa là thời gian mất đi một log CFU/g. Chế phẩm này ổn định ngay cả khi nồng độ cao của vật liệu có hoạt tính sinh học được sử dụng. Do đó, chế phẩm này thuận lợi ở chỗ chúng có thể được vận chuyển và được bảo quản ở nhiệt độ bằng hoặc cao hơn nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian dài.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được đưa ra để minh họa, mà không làm giới hạn sáng chế được yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ 1

Bào chế hợp phần khô và ổn định

Hỗn hợp hydrat cacbon cơ bản

Khoảng 70 g trehaloza (Cargill Minneapolis, MN), khoảng 5 g Inulin dùng ngay (Cargill Minneapolis, MN) và khoảng 3 g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ) được trộn đồng đều ở dạng khô.

Hỗn hợp chất tăng cường thủy tinh cơ bản

Khoảng 17 g sản phẩm thủy phân casein hoặc sản phẩm thủy phân đậu Hà Lan (sản phẩm thủy phân được siêu lọc, Marcor, Carlstadt, NJ) và 5 g natri xitrat hoặc natri ascorbat (Sigma, St. Louis, MO) được trộn đồng nhất ở dạng khô.

Làm ổn định vi khuẩn probiotic

Dịch cô đặc mới của *Lactobacillus rhamnosus* (100 ml ở 10% chất rắn, trực tiếp từ sản phẩm thu hoạch lên men) được bổ sung vào thùng trộn và được giữ ở nhiệt độ 35°C. Khoảng 78 g hỗn hợp hydrat cacbon cơ bản và khoảng 22 g hỗn hợp chất tăng

cường thủy tinh cơ bản được thêm từ từ vào môi trường nuôi cấy probiotic và bước trộn được tiến hành ở nhiệt độ 35°C trong 10 phút. Bột nhão nhót sau đó được chuyển sang bình có đáy được khoét lỗ và cho chảy nhỏ giọt vào bể chứa nitơ lỏng. Các hạt sau đó được lấy ra khỏi nitơ lỏng và được chuyển đi sấy ngay lập tức.

Sấy các hạt đông lạnh chứa vi khuẩn probiotic

Hạt đông lạnh được trải lên khay ở dung lượng nạp là 200 g/sq ft và được đặt ngay lên giá trong máy sấy thăng hoa (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Độ chân không sau đó được điều chỉnh đến khoảng từ 2000 đến 2700 mTorr và nhiệt độ giá được nâng lên +30°C. Các thiết lập nhiệt độ và áp suất chân không này được duy trì trong 5 giờ. Tùy ý, nhiệt độ của các hạt đông lạnh được làm thích nghi đến khoảng -20°C trước khi bắt đầu sấy lỏng sơ cấp bằng cách sử dụng áp suất chân không bằng khoảng 1000 mTorr và để cho các hạt rắn đông lạnh được thanh lọc trong khoảng 10 phút. Sau đó bước sấy sơ cấp được tiếp tục bằng cách điều chỉnh áp suất chân không đến khoảng từ 2000 đến 2700 mTorr và nhiệt độ giá được nâng lên đến +30°C. Các thiết lập nhiệt độ và áp suất chân không này được duy trì trong 5 giờ. Sau đó là bước sấy thứ cấp được tiếp tục ở chân không hoàn toàn (150-200 mTorr) và nhiệt độ giá được duy trì trong khoảng từ 30°C đến 50°C thêm 3 giờ nữa. Chế phẩm được sấy khô hoàn toàn và hoạt tính nước của nó được xác định bằng dụng cụ Hygropalm Aw1 (Rotonic Instrument Corp., Huntington, NY.) ở $A_w = 0,23$.

Ví dụ 2

Độ ổn định bảo quản của vi khuẩn probiotic khô

Fig. 1 thể hiện độ ổn định bảo quản trong hai điều kiện bảo quản cấp tốc khác nhau là 40°C và 33%RH và 30°C và 43%RH của vi khuẩn probiotic ổn định khô từ Ví dụ 1 và vi khuẩn probiotic khô có bán trên thị trường (Culturelle, Amerifit, Inc., Cromwell, CT). Vi khuẩn probiotic thương mại mất hoàn toàn khả năng sống sót của nó trong một vài tuần đầu tiên trong điều kiện bảo quản được cấp tốc, trong khi hợp phần khô chứa vi khuẩn probiotic theo sáng chế chỉ mất 1,18 log sau 60 ngày ở 30°C và 43%RH và chỉ mất 1,09 log ở 40°C và 33%RH.

Ví dụ 3

Sản xuất quy mô lớn hợp phần khô ổn định chứa vi khuẩn probiotic *Lactobacillus rhamnosus*.

Lactobacillus rhamnosus (400 g dịch cô đông lạnh từ nguồn thương mại) được làm tan chảy ở 37°C trong máy trộn kiểu hành tinh vỏ kép (DPM, lqt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA,) và hàm lượng chất rắn được điều chỉnh đến 10% khối lượng chất rắn bằng nước cất). Khoảng 212 g trehaloza (Cargill Minneapolis, MN), khoảng 20 g Inulin dùng ngay (Cargill Minneapolis, MN), khoảng 12 g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ), khoảng 136 g sản phẩm thủy phân casein (sản phẩm thủy phân siêu lọc, Marcor, Carlstadt, NJ) và khoảng 20 g natri ascorbat (Sigma, St. Louis, MO) được trộn đồng nhất ở dạng khô. Hỗn hợp bột được bổ sung từ từ vào môi trường nuôi cấy probiotic và bước trộn được tiến hành ở 40 RPM và 37°C trong 10 phút. Bột nhào sau đó được chuyển sang bình có đáy được khoét lỗ và để cho chảy nhỏ giọt vào bể chứa nitơ lỏng. Sau đó, các hạt này được lấy ra khỏi nitơ lỏng, được đặt trong các túi lá nhôm bịt kín và được bảo quản trong tủ làm lạnh sâu ở -80°C trong vài tuần.

Để sấy, các hạt đông lạnh được rải đều lên khay ở dung tích nạp nằm trong khoảng từ 500 đến 1500 g/sq ft và các khay được đặt lên giá trong tủ sấy thăng hoa (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Bước sấy lỏng sơ cấp được bắt đầu bằng cách điều chỉnh áp suất chân không đến khoảng từ 2000 đến 2700 mTorr và nhiệt độ sản phẩm được nâng lên và được làm ổn định trong khoảng từ -10 đến -5°C. Theo thời gian (khoảng từ 10 đến 16 giờ), nhiệt độ sản phẩm được tăng đến khoảng từ 20 đến 25°C tại thời điểm đó bước sấy thứ cấp được bắt đầu ở chân không tối đa (từ 150 đến 200 mTorr) và nhiệt độ sản phẩm được duy trì trong khoảng từ 30 đến 40°C thêm 14 giờ nữa. Chế phẩm được sấy khô hoàn toàn và hoạt tính nước của nó được xác định ở 0,23 Aw.

Ví dụ 4

Sản xuất quy mô lớn hợp phần khô ổn định chứa vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium lactis*.

Bifidobacterium lactis (400 g dịch cô đặc đông lạnh từ nguồn thương mại) được làm tan chảy ở 37°C trong máy trộn kiểu hành tinh vỏ kép (DPM, lqt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA.). Khoảng 212 g trehaloza (Cargill Minneapolis, MN), khoảng 20 g Inulin dùng ngay (Cargill Minneapolis, MN), khoảng 12 g natri alginat (ISP Corp., Wayne, NJ) và khoảng 20 g natri ascorbat (Sigma, St. Louis, MO) được trộn đồng nhất

ở dạng khô. Hỗn hợp bột được bổ sung từ từ vào môi trường nuôi cấy probiotic. Khoảng 136 g sản phẩm thủy phân đậu Hà Lan (sản phẩm thủy phân được siêu lọc, Marcor, Carlstadt, NJ) được hòa tan trong 80 g nước cất và hỗn hợp được chiếu vi sóng trong thời gian ngắn hoặc làm ấm trong bồn nước đến 60°C cho đến khi hòa tan hoàn toàn và sau đó làm nguội xuống 35°C. Bột trộn khô và dung dịch chứa sản phẩm thủy phân protein đậu Hà Lan được bổ sung vào dịch cô đặc probiotic và bước trộn được tiến hành ở 40 RPM và 37°C trong 20 phút. Sau đó, bột nhão được chuyển sang bình có đáy được khoét lỗ và để cho chảy nhỏ giọt vào bể chứa nitơ lỏng. Các hạt này sau đó được lấy ra khỏi nitơ lỏng, được đặt trong túi lá nhôm bịt kín và được bảo quản trong tủ làm lạnh sâu ở -80°C trong vài tuần.

Để sấy, hạt đông lạnh được rải đều lên khay ở dung tích nạp là 800 g/sq ft và các khay được đặt lên giá trong tủ sấy thăng hoa (Model 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Bước sấy lỏng sơ cấp được bắt đầu bằng cách điều chỉnh áp suất chân không đến khoảng từ 2000 đến 2700 mTorr và nhiệt độ sản phẩm được nâng lên và được làm ổn định trong khoảng từ -10 đến -5°C. Theo thời gian (khoảng từ 10 đến 16 giờ), nhiệt độ sản phẩm được tăng đến khoảng từ 20 đến 25°C tại đó bước sấy thứ cấp được bắt đầu ở độ chân không tối đa (từ 150 đến 200 mTorr) và nhiệt độ sản phẩm được duy trì ở khoảng từ 30 đến 40°C thêm 14 giờ nữa. Chế phẩm được sấy khô hoàn toàn và hoạt tính nước của nó được xác định ở 0,23 Aw.

Ví dụ 5

Bào chế chế phẩm hydrogel chứa vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium lactis*:

Bột nhão cô đặc chứa probiotic *Bifidobacterium lactis* được bào chế theo Ví dụ 1. Thêm 0,5 g canxi phosphat dibazơ sau đó là 0,5 g gluconolacton được bổ sung vào chế phẩm cơ bản này. Bột nhão được để cho cứng lại ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ tiếp theo để tạo thành hydrogel rắn. Gel rắn được cắt lát thành các sợi mỏng và dài, sử dụng máy cắt/máy thái mỏng có trên thị trường. Các sợi mỏng này được nạp trực tiếp lên khay ở dạng ướt hoặc được làm đông lạnh tức thì trong nitơ lỏng và được nạp lên khay ở dung tích nạp là 500g/sq ft và được đặt trong tủ sấy thăng hoa để sấy như được mô tả trong Ví dụ 3. Hoạt tính nước (Aw) của chế phẩm là 0,05 (được xác định bằng HygroPalm Awl, R tonic Huntington, NY). Chế phẩm khô được nghiền thêm thành bột mịn sử dụng máy nghiền dạng búa chuẩn và được sàng qua lưới 50-250 micron.

Ví dụ 6

Tối ưu hóa tỷ lệ mol giữa chất tăng cường thủy tinh và hỗn hợp hydrat cacbon

Một số hợp phần chứa các tỷ lệ mol khác nhau của chất tăng cường thủy tinh và hỗn hợp hydrat cacbon được bào chế theo Ví dụ 1. Môi trường nuôi cấy cô đặc của vi khuẩn probiotic *L. paracasei* thu được từ nguồn thương mại và được bào chế trong hợp phần khô như được mô tả trong Ví dụ 1 trừ việc bột nhão được nạp ngay lên khay ở dạng ướt mà không cần bước làm đông lạnh tức thì và thanh lọc. Bột nhão được sấy trong các giai đoạn sơ cấp và thứ cấp như được mô tả trong Ví dụ 1 và 3 ngoại trừ việc nhiệt độ giá được nâng lên 40°C trong các giai đoạn sấy sơ cấp và thứ cấp. Bột ổn định được đưa vào điều kiện bảo quản cấp tốc ở 37°C và 33%RH trong 84 ngày. Fig. 2 thể hiện ảnh hưởng của các tỷ lệ mol khác nhau đến tính ổn định của vi khuẩn đã được sấy. Các kết quả cho thấy rằng tỷ lệ mol tối ưu giữa chất tăng cường thủy tinh và hỗn hợp hydrat cacbon nằm trong khoảng từ 0,12 đến 0,15.

Ví dụ 7

Ảnh hưởng của hợp phần theo sáng chế đến độ ổn định bảo quản của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus*

Hợp phần chứa hỗn hợp hydrat cacbon và hỗn hợp chất tăng cường thủy tinh như được mô tả trong Ví dụ 1 được bào chế. Môi trường nuôi cấy cô đặc của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus* thu được từ nguồn thương mại và được bào chế trong hợp phần khô như được mô tả trong Ví dụ 1 và 3 và bột ổn định được đưa vào điều kiện bảo quản cấp tốc ở 24°C và 33%RH trong 537 ngày. Fig. 3 thể hiện tính ổn định tốt hơn của probiotic được bào chế với hợp phần theo sáng chế. Các kết quả chỉ ra rằng khả năng sống sót của probiotic chỉ bị giảm 0,18 log trong 537 ngày bảo quản trên giá trong các điều kiện xác định.

Ví dụ 8

Ảnh hưởng của các chất tăng cường thủy tinh khác nhau đến tính ổn định bảo quản của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus*.

Một số hợp phần chứa hỗn hợp hydrat cacbon như được mô tả trong Ví dụ 1 và hỗn hợp chất tăng cường thủy tinh chứa sản phẩm thủy phân casein và natri xitrat hoặc

natri ascorbat hoặc hỗn hợp cả hai được bào chế. Môi trường nuôi cấy cô đặc của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus* thu được từ nguồn thương mại và được bào chế trong hợp phần khô như được mô tả trong Ví dụ 1 ngoại trừ việc bột nhão được nạp ngay lên khay ở dạng ướt mà không cần bước làm đông lạnh tức thì và thanh lọc. Bột nhão được sấy khô ở các giai đoạn sấy sơ cấp và thứ cấp như được mô tả trong Ví dụ 1 và 3 và bột ổn định được đưa vào điều kiện bảo quản cấp tốc ở 24°C và 43%RH trong 180 ngày. Fig. 4 chỉ ra ảnh hưởng của các hợp chất tăng cường thủy tinh khác nhau đến tính ổn định của vi khuẩn đã được sấy khô. Các kết quả cho thấy rằng tính ổn định tốt hơn đáng kể thu được bằng cách bao gồm chất tăng cường thủy tinh bổ sung trên đỉnh của sản phẩm thủy phân protein. Cụ thể, việc bao gồm các lượng bằng nhau của natri axetat và natri ascorbat tạo ra hợp phần ổn định nhất. Các kết quả từ hai Ví dụ 5 và 6 cũng gợi ý rằng các chất tăng cường thủy tinh khác nhau có thể có hiệu quả hơn hoặc thậm chí có thể có tác dụng làm mất ổn định tùy theo chủng vi khuẩn.

Ví dụ 9

Ảnh hưởng của các tỷ lệ sản phẩm thủy phân protein/đường khác nhau đến tính ổn định bảo quản của vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium lactis*.

Một số hợp phần chứa hỗn hợp hydrat cacbon và chất tăng cường thủy tinh như được mô tả trong Ví dụ 1 và hợp phần chứa các lượng bằng nhau nhưng ở nhiều tỷ lệ khác nhau của sản phẩm thủy phân đậu Hà Lan/trehaloza có hoặc không có natri ascorbat được bào chế. Môi trường nuôi cấy cô đặc của vi khuẩn probiotic *Bifidobacterium lactis* thu được từ nguồn thương mại và được bào chế trong hợp phần khô như được mô tả trong Ví dụ 1 và 3 và bột ổn định được đưa vào điều kiện bảo quản cấp tốc ở 35°C và 43%RH trong 7 tuần. Fig. 5 chỉ ra ảnh hưởng của các tỷ lệ 1:4, 1:2,5 và 1:1,5 của sản phẩm thủy phân đậu Hà Lan/trehaloza có hoặc không có natri ascorbat đến tính ổn định của vi khuẩn đã được sấy. Các kết quả gợi ý rằng tính ổn định tốt hơn đáng kể thu được ở tỷ lệ tăng của sản phẩm thủy phân đậu Hà Lan/trehaloza. Cụ thể, tỷ lệ sản phẩm thủy phân đậu Hà Lan/trehalo 1:1,5 tạo ra hợp phần ổn định hơn. Việc bao gồm natri ascorbat ở tỷ lệ sản phẩm thủy phân đậu Hà Lan/trehaloza cao hơn dẫn đến tính ổn định tốt hơn so với chế phẩm loại trừ natri ascorbat.

Ví dụ 10

Tối ưu pH cho tính ổn định tối đa của probiotic *L. rhamnosus*.

Một số hợp phần chứa hỗn hợp hydrat cacbon và chất tăng cường thủy tinh như được mô tả trong Ví dụ 1 ở các độ pH khác nhau được bào chế. Môi trường nuôi cấy cô đặc của vi khuẩn probiotic *L. rhamnosus* thu được từ nguồn thương mại và được điều chế trong hợp phần khô như được mô tả trong Ví dụ 1 và 3. Bột ổn định được đưa vào điều kiện bảo quản cấp tốc ở 40°C và 33%RH trong 8 tuần. Fig. 6 thể hiện ảnh hưởng của độ pH của bột nhão đến tính ổn định của vi khuẩn đã sấy. Các kết quả gợi ý rằng tính ổn định tối ưu đạt được ở độ pH trung tính (~7).

Ví dụ 11

Bột khô ổn định chứa enzym:

Chế phẩm hydrogel chứa 40 phần trăm khối lượng phitaza (BASF, GmBH) được bào chế bằng cách trộn 400 g hỗn hợp hydrat cacbon và 200 g hỗn hợp chất tăng cường thủy tinh như được mô tả trong Ví dụ 1 và 4 và 400 g phitaza trong 1000 ml nước. Chế phẩm hydrogel đã cắt được làm đông lạnh tức thì trong nitơ lỏng và được sấy trong lò chân không ở nhiệt độ sấy sơ cấp và thứ cấp là 50°C. Để xác định dung tích nạp và tính ổn định bảo quản của các chế phẩm được sấy khô: mẫu khô được cân chính xác (<100 mg) trong ống vi ly tâm. Bổ sung 200 µl dimetyl sulfoxit (DMSO). Chế phẩm được hòa tan trong đệm DMSO bằng cách lắc tròn. Bổ sung 0,8 ml dung dịch chứa NaOH 0,05N, 0,5% SDS và axit xitric 0,075M (muối trinatri) vào mẫu này. Các ống này được siêu âm trong 10 phút ở 45°C, sau đó ly tâm nhanh ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút. Từng phần nhỏ của dung dịch DMSO/NaOH/SDS/xitrat trong suốt được lấy vào các giếng của đĩa vi thể và được phân tích hàm lượng protein bằng cách sử dụng phương pháp phân tích Bradford. Tính ổn định của hợp phần khô chứa enzym ổn định sau khi tiếp xúc với nhiệt độ 95°C trong 20 phút là cao hơn đáng kể so với enzym khô không có hợp phần theo sáng chế.

Ví dụ 12

Bột khô ổn định chứa vacxin virus gây thiếu máu truyền nhiễm ở cá hồi (infectious salmon anemia virus - ISAV)

Bột nhão cô đặc của vacxin ISAV (Novozyme, Đan Mạch) được bào chế theo Ví dụ 4 ngoại trừ 20 ml dung dịch chitosan 4% trong axit axetic 0,5% được bổ sung vào

bột nhão chứa dịch cô vacxin ISAV, hỗn hợp hydrat cacbon và chất tăng cường thủy tinh. 0,5 g canxi phosphat đibazơ được thêm vào, sau đó thêm 0,5 g gluconolacton. Bột nhão được để cho cứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ tiếp theo để tạo thành hydrogel rắn. Gel rắn được cắt lát thành các sợi mỏng và dài, sử dụng máy cắt lát/cắt thái mỏng có trên thị trường. Các sợi mỏng này được nạp trực tiếp lên khay ở dạng ướt hoặc được làm đông lạnh tức thì trong nitơ lỏng và được nạp lên khay ở dung tích nạp là 1500g/sq ft và được đặt trong tủ sấy thăng hoa để sấy như được mô tả trong Ví dụ 3. Hoạt tính nước (A_w) của chế phẩm là 0,25. Chế phẩm khô được nghiền thêm thành bột mịn sử dụng máy nghiền dạng búa tiêu chuẩn và được sàng qua rây 50-150 micron. Hợp phần ISAV khô ổn định được sử dụng để chùng qua đường miệng bằng cách phủ hợp phần khô lên trên thức ăn thương mại và cho cá hồi Atlantic ăn.

Ví dụ 13

Bào chế mồi cho loài xâm lấn

Mồi được tạo viên tròn cho các loài xâm lấn được hướng đích cụ thể theo sáng chế được bào chế chứa thuốc diệt côn trùng. 200 g chế phẩm như được mô tả trong Ví dụ 9 được bào chế và được bổ sung vào 200 gm nước. Thêm 90 gm Rotenone và 0,5 gm canxi phosphat đibazơ, sau đó là 0,5 gm gluconolacton vào dung dịch này. Bột nhão được sấy phun ngay trong thiết bị sấy phun công nghiệp chuẩn, và chế phẩm khô được sử dụng để hướng đích loài xâm lấn cụ thể mà không có tác dụng gây hại của chất độc đối với môi trường hoặc hệ sinh thái ở gần.

Ví dụ 14

Bào chế chế phẩm probiotic thực vật được bảo vệ:

Chất kiểm soát sinh học như *Rhizobacteria* được điều chế trong hợp phần khô theo Ví dụ 4. Tính hiệu quả của hợp phần *Rhizobacteria* khô được đánh giá trên sự phát triển cây rau diếp trong điều kiện hệ vi sinh vật đã biết. Các liều gồm 100 mg hợp phần *Rhizobacteria* khô trên mỗi cây được cấy vào các bình có cát và được trồng với các cây rau diếp con trước khi nảy mầm (24 giờ). Liều dưỡng chất là 5 ml dung dịch Hoagland vô trùng được sử dụng cho các cây trong bình. Các bình được sắp xếp ngẫu nhiên trong buồng nuôi được duy trì ở 28°C với chu kỳ sáng 12 giờ. Cứ mỗi 7 ngày sau khi cấy, cây

và cát dính được lấy cẩn thận ra khỏi bình. Rễ cây được rửa trong đệm phosphat vô trùng ($\text{pH} = 7,0$), và số đo chiều dài rễ được ghi lại.

Tài liệu tham khảo

Nội dung của các tài liệu dưới đây được kết hợp bằng cách tham khảo.

Tài liệu Patent Mỹ và đơn Sáng chế:

6,190,701 Composition and method for stable injectable liquids, March 1999, Roser et al

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

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

6,534,087 Process for preparing a pharmaceutical composition, June 2001, Busson and Schroeder.

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

7,153,472 Preservation and formulation of bioactive materials for storage and delivery in hydrophobic carriers, December, 2006, Bronshtein.

2008/0229609, Preservation by Vaporization., June 2005, Bronshtein.

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

7,381, 425, Preservation of bioactive materials by freeze dried foam, September 2006, Truong-le, Vu.

Các tài liệu khác:

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

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

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

Crowe, J.F., Carpenter, J.F. và Crowe, L.M., 1998, THE ROLE OF VITRIFICATION

IN ANHYDROBIOSIS. Annu. Rev. Physiol. 60:73-103.

Crowe, J. H., Crowe., L. M., và Mouriadian, R., 1983, Cryobiology, 20, 346-356.

M. Le Meste, et al, 2002, Glass Transition and Food Technology: A Critical Appraisal, Journal of Food Science, 67:2444-2458.

Sanchez et al, 1999, Intl. J. Pharm. 185, 255-266.

Esquisabel et al, 1997, J. Microencapsulation, 14, 627-638.

Kets et al, 2004. citrate increases glass transition temperature of vitrified sucrose preparations, Cryobiology, 48:46-54.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp phần làm ổn định khô chứa vật liệu có hoạt tính sinh học, thành phần hydrat cacbon với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 90%; và thành phần protein với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 40% là protein động vật hoặc thực vật được thủy phân, mỗi tỷ lệ phần trăm này được tính theo tổng khối lượng của hợp phần,

trong đó, vật liệu có hoạt tính sinh học này bao gồm virus còn sống, đã chết hoặc bị làm yếu, vi khuẩn, nấm men, môi trường nuôi cấy tế bào, protein, peptit, vaccin, thuốc hoặc hỗn hợp của chúng;

trong đó hợp phần này còn chứa thành phần axit carboxylic chiếm khoảng từ 0,5% đến 20% tổng khối lượng hợp phần, trong đó thành phần axit carboxylic bao gồm axit lactic, axit ascorbic, axit maleic, axit oxalic, axit malonic, axit malic, axit succinic, axit citric, axit gluconic, hoặc muối của chúng hoặc hỗn hợp của chúng.

2. Hợp phần làm ổn định khô theo điểm 1, trong đó thành phần hydrat cacbon là ít nhất một saccharit được chọn từ nhóm bao gồm oligosaccharit, polysaccharit và disaccharit, trong đó oligosaccharit có lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 10%, disaccharit có lượng nằm trong khoảng từ 40% đến 80%, và polysaccharit có lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 10% tính theo tổng khối lượng của thành phần hydrat cacbon.

3. Hợp phần làm ổn định khô theo điểm 1, trong đó thành phần protein được thủy phân bao gồm casein được thủy phân, protein nước sữa được thủy phân, protein đậu Hà Lan được thủy phân, protein đậu tương được thủy phân và hỗn hợp của chúng.

4. Hợp phần làm ổn định khô theo điểm 2, trong đó thành phần polysaccharit bao gồm xenluloza axetat phtalat (CAP), carboxy-metyl-xenluloza, pectin, natri alginat, muối của axit alginate, hydroxyl propyl methyl xenluloza (HPMC), methyl xenluloza, carrageenan, gôm gellan, gôm guar, gôm acacia, gôm xanthan, gôm đậu locust, chitosan và dẫn xuất của chitosan, collagen, axit polyglycolic, tinh bột và tinh bột biến tính và hỗn hợp của chúng.

5. Hợp phần làm ổn định khô theo điểm 2, trong đó thành phần oligosaccharit là cyclodextrin, inulin, maltodextrin, dextran, fructo-oligosaccharit (FOS), galacto-

oligosacarit (GOS), mannan-oligosacarit (MOS) và hỗn hợp của chúng.

6. Hợp phần làm ổn định khô theo điểm 1, trong đó thành phần hydrat cacbon bao gồm thành phần disacarit được chọn từ nhóm bao gồm trehaloza, sucroza, lactoza, và hỗn hợp của chúng.

7. Hợp phần làm ổn định khô theo điểm 1, trong đó thành phần hydrat cacbon bao gồm oligosacarit với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 10%, disacarit với lượng nằm trong khoảng từ 40% đến 80%, và polysacarit với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 10%.

8. Hợp phần làm ổn định khô theo điểm 1, trong đó hợp phần này được sấy khô ở trạng thái thủy tinh vô định hình.

9. Hợp phần làm ổn định khô theo điểm 2 hoặc 7, trong đó tỷ lệ khối lượng của disacarit/oligosacarit/polysacarit nằm trong khoảng từ 10:0,2:0,1 đến 10:2:1.

10. Hợp phần làm ổn định khô theo điểm 1, trong đó vật liệu có hoạt tính sinh học bao gồm vi khuẩn probiotic, vi khuẩn thực vật, vi khuẩn đất, protein tái tổ hợp hoặc hỗn hợp của chúng.

11. Hợp phần làm ổn định khô theo điểm 1, trong đó hợp phần này thu được bằng phương pháp bao gồm các bước:

(a) kết hợp vật liệu có hoạt tính sinh học với hỗn hợp bao gồm thành phần hydrat cacbon, thành phần protein và thành phần axit carboxylic như được xác định trong điểm 1 trong dung môi chứa nước để tạo thành bột nhão nhớt; (b) làm đông lạnh tức thì bột nhão trong nitơ lỏng để tạo thành các hạt nhỏ, hạt, giọt hoặc dây đông lạnh rắn; (c) sấy sơ cấp chế phẩm bằng cách làm bay hơi, trong chân không, ở nhiệt độ chế phẩm cao hơn nhiệt độ làm đông lạnh của nó; (d) sấy thứ cấp chế phẩm ở độ chân không tối đa và nhiệt độ là 20°C hoặc cao hơn trong thời gian đủ để làm giảm hoạt tính nước của chế phẩm.

12. Hợp phần làm ổn định khô theo điểm 1, trong đó vật liệu có hoạt tính sinh học

bao gồm enzym, hormon, hoặc chất kháng sinh.

13. Phương pháp bào chế để tạo ra hợp phần làm ổn định khô bao gồm bước: (a) kết hợp vật liệu có hoạt tính sinh học với hỗn hợp bao gồm thành phần hydrat cacbon, thành phần protein và thành phần axit carboxylic như được xác định trong điểm 1 trong dung môi chứa nước để tạo thành bột nhão nhớt; (b) làm đông lạnh tức thì bột nhão trong nitơ lỏng để tạo thành các hạt nhỏ, hạt, giọt hoặc dây đông lạnh rắn; (c) sấy sơ cấp chế phẩm bằng cách làm bay hơi, trong chân không, ở nhiệt độ chế phẩm cao hơn nhiệt độ làm đông lạnh của nó; (d) sấy thứ cấp chế phẩm ở độ chân không tối đa và nhiệt độ là 20°C hoặc cao hơn trong thời gian đủ để làm giảm hoạt tính nước của chế phẩm này;

trong đó vật liệu có hoạt tính sinh học bao gồm virus còn sống, đã chết hoặc bị làm yếu, vi khuẩn, nấm men, môi trường nuôi cấy tế bào, protein, peptit, vacxin, thuốc hoặc hỗn hợp của chúng.

14. Phương pháp bào chế theo điểm 13, phương pháp này còn bao gồm bước làm cho hạt nhỏ đông lạnh rắn thích nghi với môi trường trước khi bắt đầu bước sấy sơ cấp; trong đó bước làm cho thích nghi bao gồm việc duy trì hạt nhỏ đông lạnh rắn ở độ chân không và nhiệt độ thấp hơn điểm đông lạnh của chế phẩm.

15. Phương pháp bào chế theo điểm 13, trong đó hợp phần làm ổn định khô được sấy ở trạng thái thủy tinh vô định hình.

16. Phương pháp bào chế theo điểm 13, trong đó bột nhão được hóa rắn thành hydrogel rắn bằng cách thay đổi độ pH hoặc nhiệt độ hoặc bằng cách liên kết chéo các chuỗi polyme trước khi làm đông lạnh tức thì.

17. Phương pháp bào chế theo điểm 13, trong đó bước sấy sơ cấp được tiến hành trong áp suất chân không cao hơn 2000 mTorr (266,64 Pa).

18. Phương pháp bào chế theo điểm 13, trong đó hoạt tính nước (A_w) của hợp phần làm ổn định khô là $A_w < 0,3$ hoặc thấp hơn.

19. Phương pháp bào chế theo điểm 13, trong đó vật liệu có hoạt tính sinh học bao

gồm vi khuẩn probiotic, vi khuẩn thực vật, vi khuẩn đất, protein tái tổ hợp hoặc hỗn hợp của chúng.

20. Phương pháp bào chế theo điểm 13, trong đó vật liệu có hoạt tính sinh học bao gồm enzym, hormon, hoặc chất kháng sinh.

21. Chế phẩm dùng qua đường miệng chứa hợp phần làm ổn định khô theo điểm 1, trong đó chế phẩm này là ở dạng chất lỏng được hoàn nguyên, bột được nghiền, viên nén, viên tròn nhỏ, hoặc viên nang.

22. Chế phẩm dùng qua đường miệng theo điểm 21, trong đó chế phẩm này ở dạng thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi.

23. Chế phẩm dùng đường miệng chứa hợp phần làm ổn định khô theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được tiêu thụ dưới dạng thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, dược phẩm dinh dưỡng, dược phẩm hoặc sản phẩm vaccin.

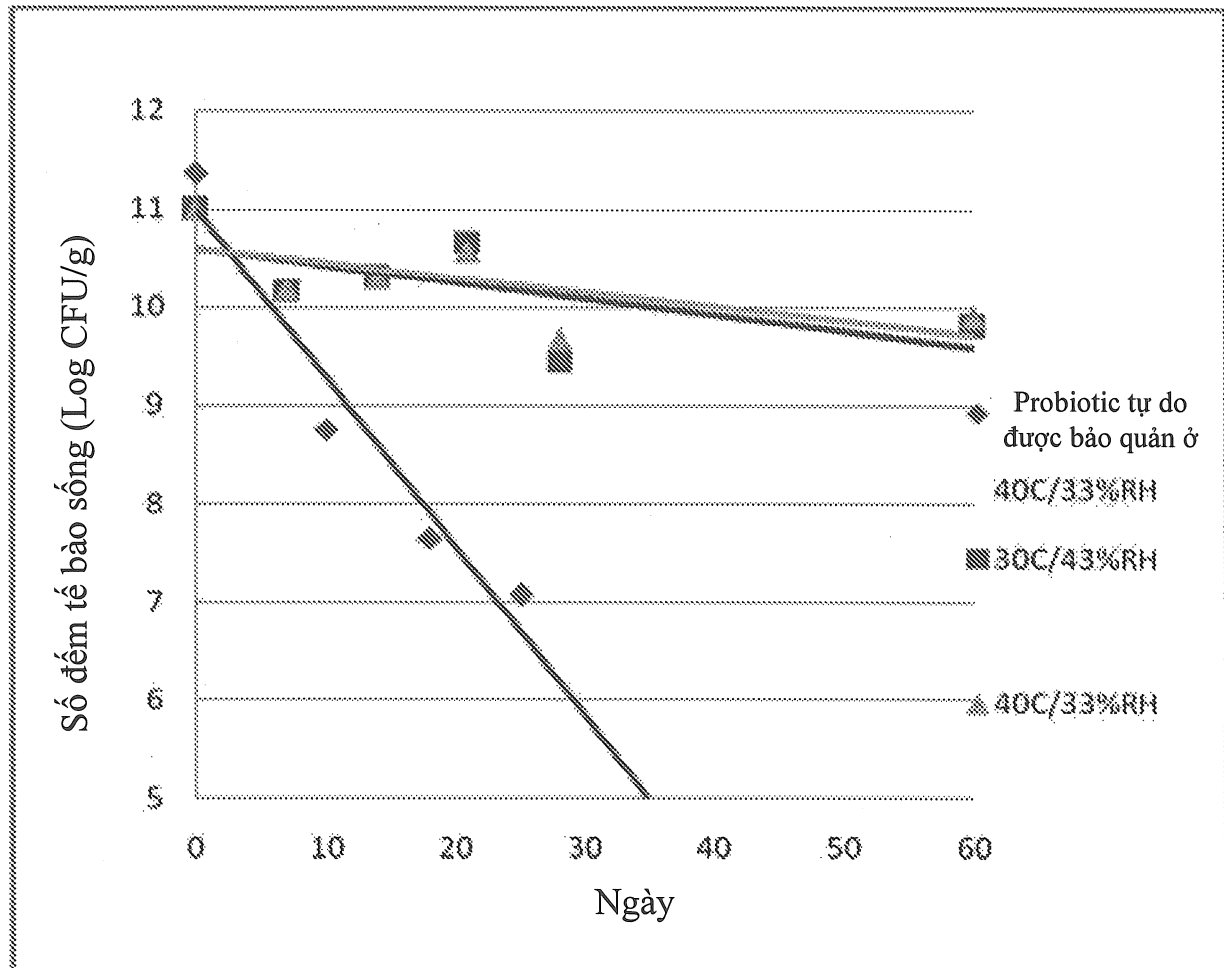


Fig.1

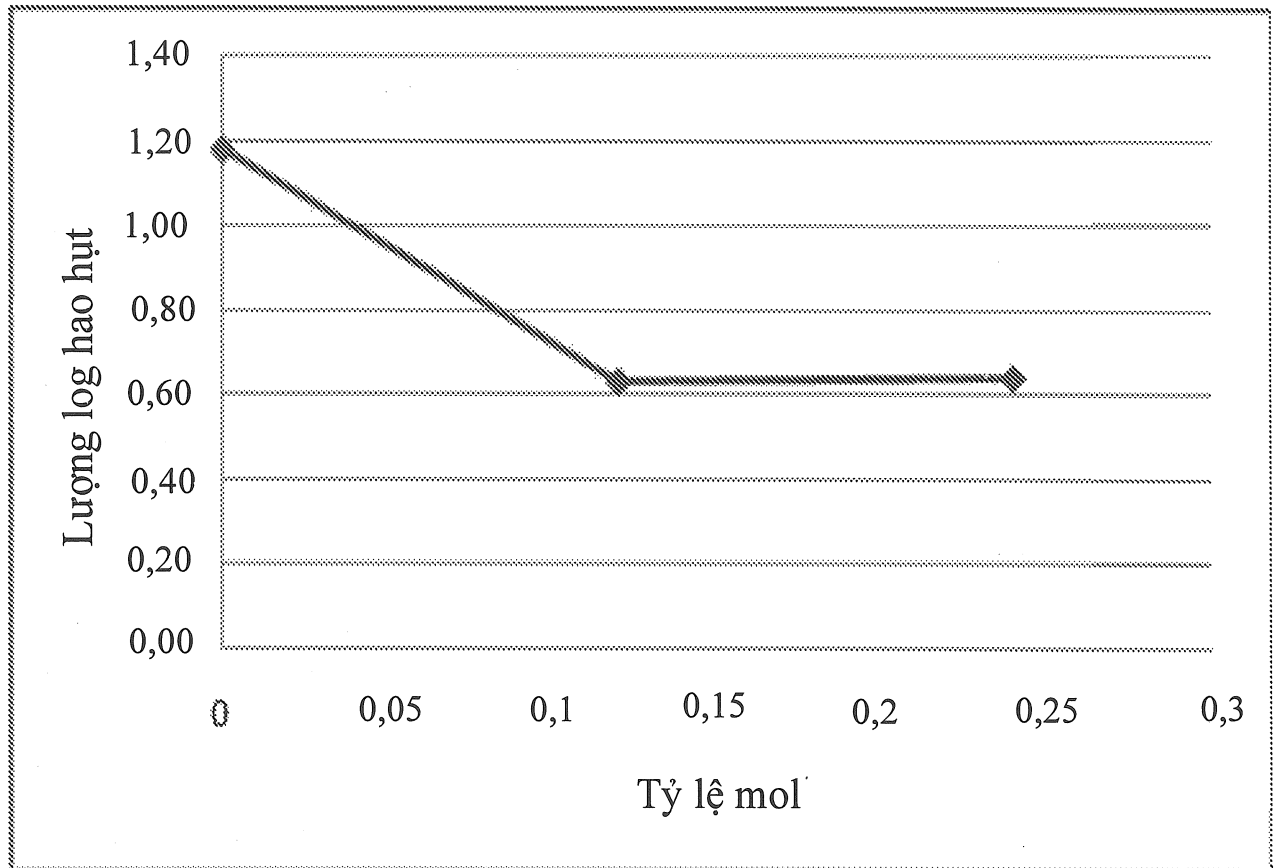


Fig.2

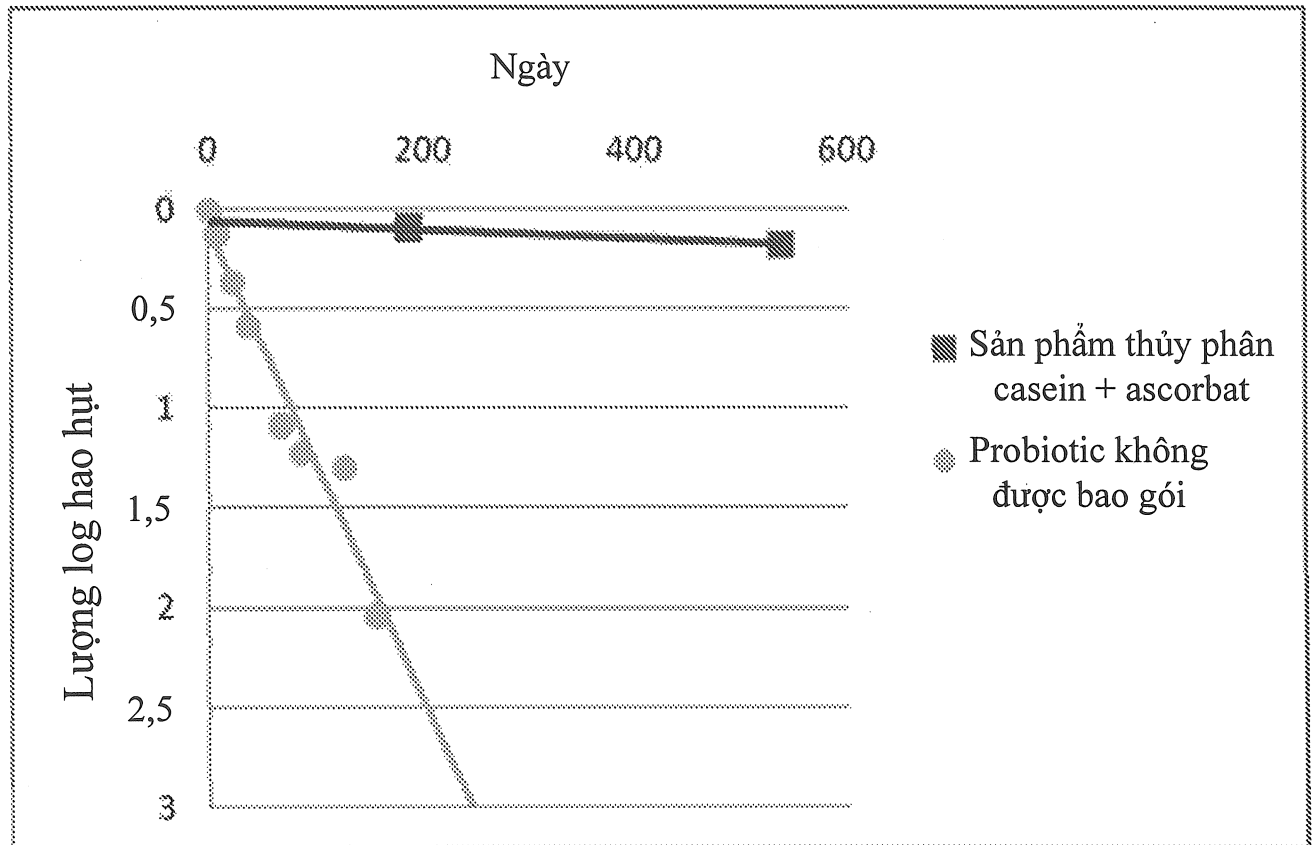


Fig.3

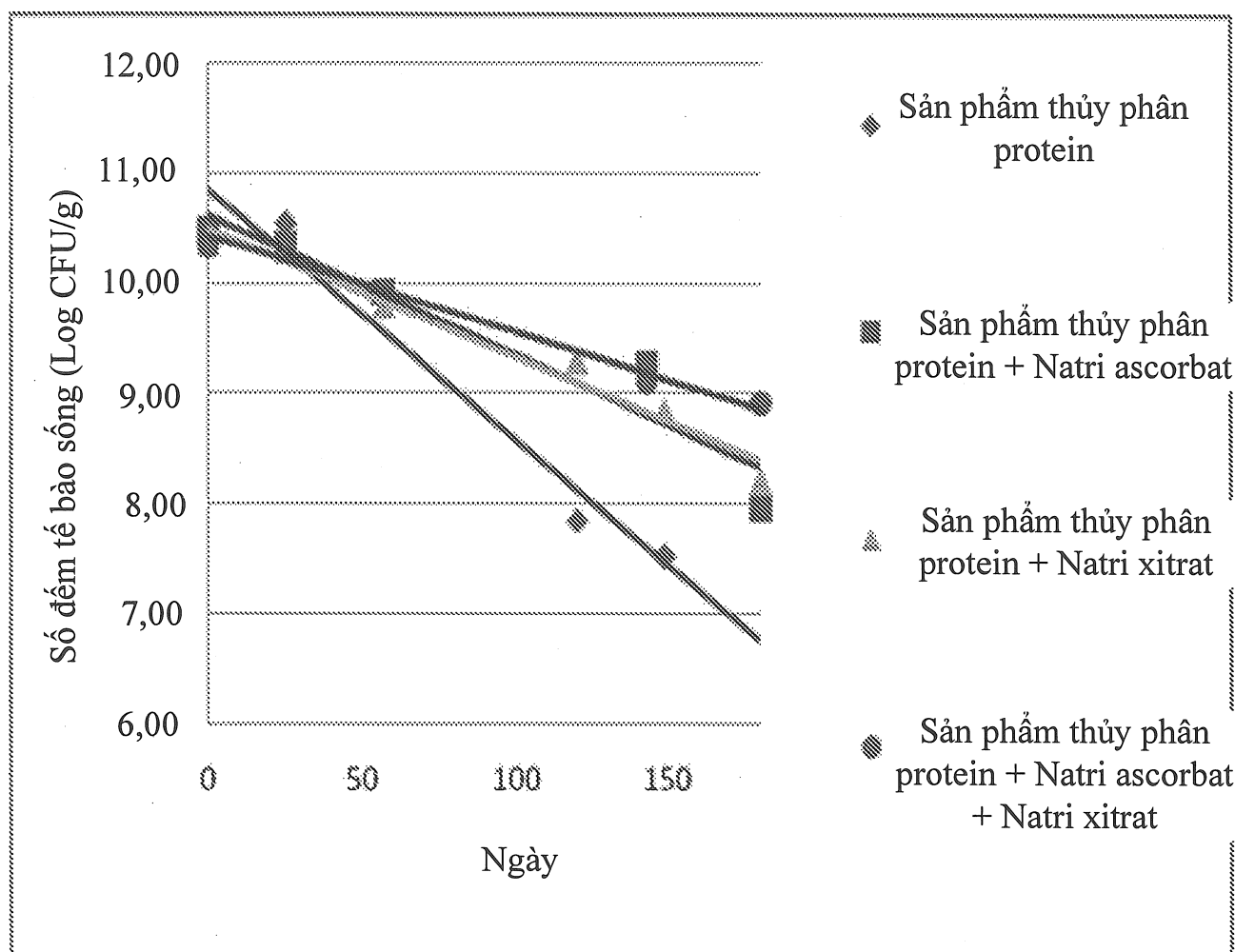


Fig.4

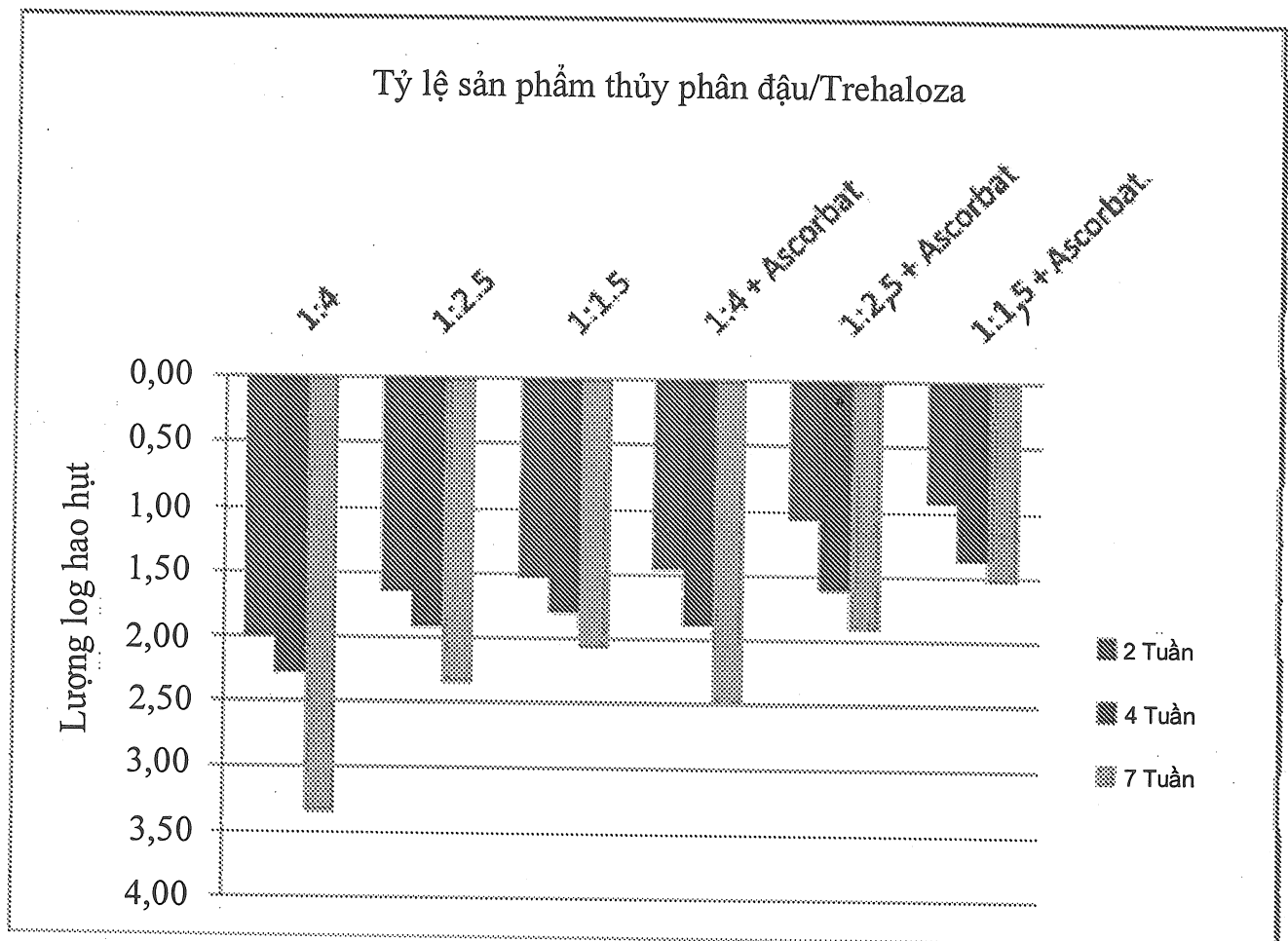


Fig.5

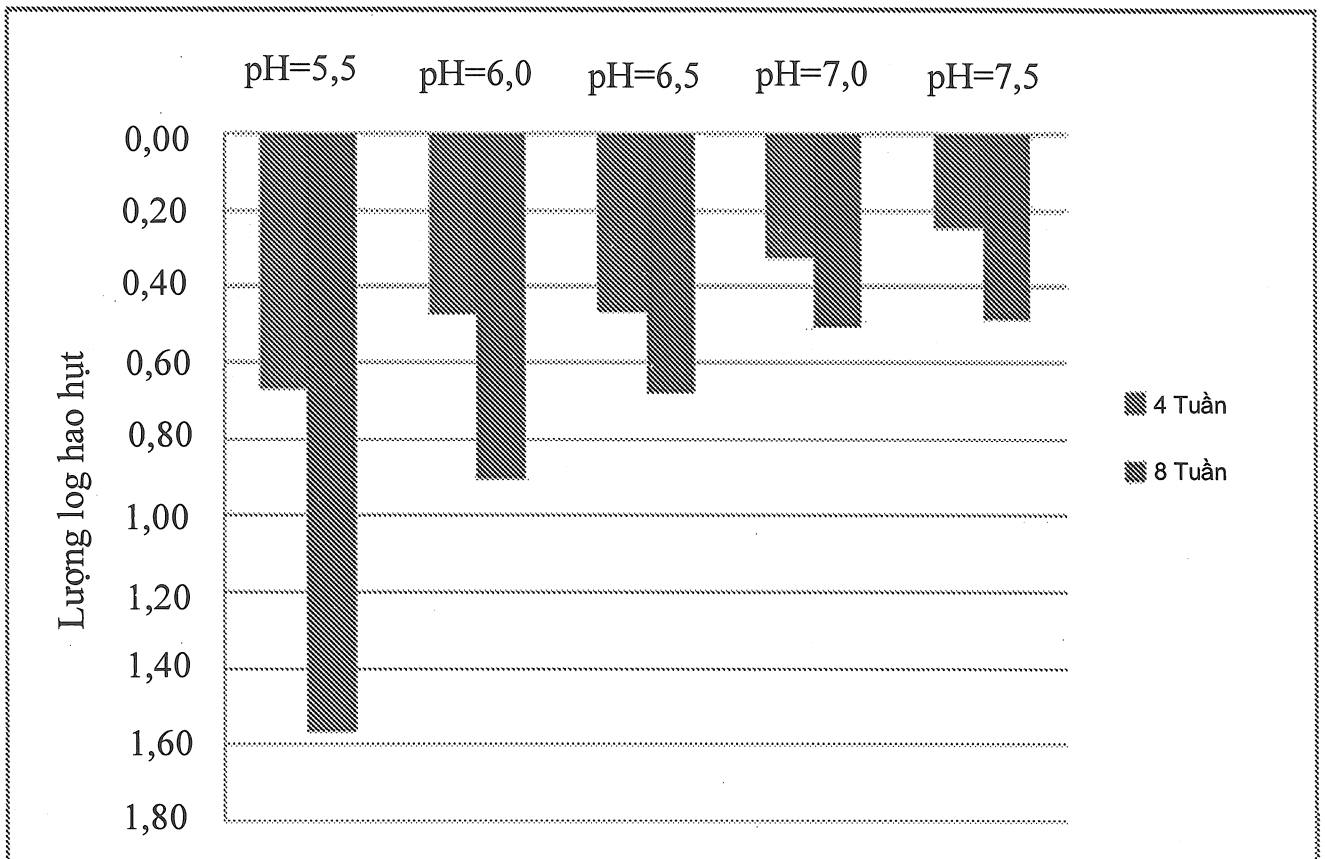


Fig.6