



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0024364

(51)⁷ A61K 9/50; A23L 1/30; A61K 35/00

(13) B

(21) 1-2013-02614

(22) 25/01/2012

(86) PCT/EP2012/051132 25/01/2012

(87) WO2012/101167 A1 02/08/2012

(30) 11000577.4 25/01/2011 EP; 11000579.0 25/01/2011 EP; 11000578.2 25/01/2011 EP

(45) 27/07/2020 388

(43) 27/01/2014 310A

(73) AUSTRIANOVA SINGAPORE PTE LTD (SG)

20 Biopolis way, #05-518 Centros, Singapore 138668, Singapore

(72) GUENZBURG Walter H. (AT); BRANDTNER Eva Maria (AT); SALMONS Brian Salmons (GB); DANGERFIELD John A. (GB).

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

(54) TẾ BÀO VI SINH VẬT ĐƯỢC BAO NANG VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

(57) Sáng chế đề cập đến các tế bào vi khuẩn probiotic là các vi khuẩn hữu ích sống trong ruột động vật sản sinh và tiết ra các enzym có lợi cho tiêu hóa và sức khỏe vật chủ. Cụ thể hơn sáng chế đề cập đến các tế bào vi khuẩn probiotic được bao nang hóa bằng phương pháp bào chế theo sáng chế. Phương pháp bao nang hóa hay vi nang hóa các tế bào này dựa trên natri sulphat xenluloza là công nghệ đơn giản và hiệu quả về giá thành giúp cho các vi khuẩn probiotic có lợi cho tiêu hóa có thể sống sót khi tiếp xúc môi trường axit trong dạ dày và vẫn sống khi vào ruột sau khi được người hay động vật ăn với tỷ lệ sống cao hơn các vi khuẩn không được bao trong vi nang. Ngoài ra, thực phẩm chức năng và dược phẩm chứa các tế bào vi sinh vật được bao nang theo sáng chế cũng là đối tượng của sáng chế này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến công nghệ vi nang hóa trên cơ sở sulphat xenluloza (dạng đơn giản) đã được ứng dụng để tạo nang bọc ngoài tế bào vi khuẩn hay tế bào vi sinh vật khác vốn sản sinh và tiết enzym tiêu hóa và nhờ vậy tạo nên lớp bảo vệ bền với axit cho các tế bào vi sinh này. Điều ngạc nhiên là các nang hình cầu tạo ra này có tác dụng bảo vệ hữu hiệu tế bào vi nang hóa này trước dung dịch nước axit. Nhờ đó, tế bào đã vi nang hóa trên cơ sở sulphat xenluloza, như các vi khuẩn *probiotic* (*vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ*) có lợi cho tiêu hóa giờ đây có thể sinh tồn được trong quá trình di chuyển của thức ăn trong cơ thể, chẳng hạn vẫn sống khi di chuyển qua dạ dày sau khi người hoặc động vật ăn với tỷ lệ sống cao hơn tỷ lệ của các vi khuẩn không được vi bao nang. Sau khi qua dạ dày, những tế bào này giải phóng các sản phẩm do chính chúng tạo ra, ví dụ enzym hay yếu tố dinh dưỡng khác. Nhờ vậy, công nghệ này đã chứng minh là rất hữu ích để đưa enzym tiêu hóa hay các enzym có lợi khác và/hoặc các tế bào vi sinh sống khác vào phần dưới của hệ tiêu hóa ruột dạ dày, nơi các vi khuẩn này có thể chuyển tác dụng có lợi của chúng cho sinh vật chủ. Sáng chế đề cập đến quy trình tạo nang cho tế bào bằng vật liệu đã nêu trên, các điều kiện để cho tế bào đã bao nang hóa sinh tồn được khi di chuyển qua dạ dày và cách các tế bào vi sinh này hoặc các enzym do chúng sản xuất có thể giải phóng khỏi vi nang để các tế bào này và/hoặc những enzym tạo ra trong các vi nang chuyển được tác dụng có lợi cho sức khỏe. Công nghệ này sẽ đóng vai trò quan trọng để cải thiện thực phẩm, đặc biệt là những thực phẩm có chứa vi khuẩn *probiotic* (*vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ*) có lợi hoặc cung cấp thực phẩm bổ sung(chức năng) để nâng cao sức khỏe cho người và động vật và trong đó những tế bào này vẫn có thể giải phóng các sản phẩm do chính chúng tạo ra như enzym và/hoặc yếu tố dinh dưỡng khác ra môi trường xung quanh sau khi đã phơi nhiễm trước tiên với môi trường có tính axit.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Enzym tiêu hóa là những enzym phá vỡ các đại phân tử polyme (như các phân tử có trong thực phẩm) thành các khối nhỏ hơn (như các chất dinh dưỡng và các sản phẩm thải) để tạo điều kiện hấp thu thức ăn trong cơ thể. Enzym tiêu hóa có trong ống tiêu hóa của động vật và có thể là động vật bất kỳ theo sáng chế này, nhưng tốt hơn nếu là động vật có vú, đặc biệt là động vật nhai lại và gia súc khác, động vật trong các trang trại thủy sản như cá và tôm, động vật nuôi trong nhà và động vật cung, chim và/hoặc người, nơi các

enzym này trợ giúp sự tiêu hóa thức ăn cũng như bên trong tế bào, đặc biệt là trong các thể men của tế bào nơi các enzym này có chức năng duy trì sự tồn tại của tế bào. Enzym tiêu hóa rất đa dạng và có trong nước bọt tiết ra từ tuyến nước bọt, trong dạ dày được tiết ra từ lớp màng tế bào của dạ dày, trong dịch tụy tiết ra từ các tế bào tuyến ngoại tiết của tụy, và có trong các chất tiết của ruột (lớn và nhỏ), hoặc là một phần của lớp màng ống dạ dày ruột. Enzym tiêu hóa được phân loại theo các chất nền đích của chúng: proteaza và peptidaza phân cắt protein thành các monome, axit amin; lipaza phân tách chất béo thành ba axit béo và phân tử glyxerol; carbohydraza phân cắt carbohydrat như tinh bột thành đường; nucleaza tách axit nucleic thành các nucleotit.

Trong hệ tiêu hóa của người, những vị trí tiêu hóa chủ yếu là khoang miệng, dạ dày, và ruột nhỏ. Enzym tiêu hóa do các tuyến ngoại tiết khác nhau tiết ra bao gồm: tuyến nước bọt, các tế bào tiết trong dạ dày, các tế bào tiết ở tụy, các tuyến tiết ở ruột nhỏ. Tụy sản xuất ra enzym tiêu hóa, như lipaza, amylaza và proteaza là các enzym hoạt động trong ruột nhỏ. Proteaza đã biết là trypsin, chymotrypsin và carboxypeptidaza.

Lợi ích toàn diện của thực phẩm và thực phẩm bổ sung(chức năng) chỉ có thể đạt được nếu cơ thể có đủ enzym tiêu hóa thức ăn và hấp thu các chất dinh dưỡng một cách phù hợp. Một số enzym tiêu hóa chỉ có trong thực phẩm tươi sống vốn không thể ăn theo cách thông thường và không phải là một phần của thức ăn mà phần lớn động vật đang sử dụng. Enzym tiêu hóa được cơ thể động vật tạo ra, có thể dần dần giảm đi theo tuổi tác; động vật càng già thì cơ thể sẽ càng sản sinh ít enzym hơn. Thiếu enzym tiêu hóa có thể góp phần gây ra vô số bệnh như viêm khớp, béo phì, hội chứng ruột bị kích thích, chứng ợ chua, hội chứng mỗi một mận tính và nhiều bệnh khác. Thiếu proteaza có thể làm cho quá trình tiêu hóa không toàn vẹn dẫn đến dị ứng và hình thành độc tố.

Kiến thức thông thường tin là khi dùng thực phẩm bổ sung để tăng lượng enzym tiêu hóa thì sẽ có tác dụng tăng cường khả năng của cơ thể tiếp cận enzym và khả năng cơ thể sử dụng thực phẩm dinh dưỡng cho nhu cầu năng lượng, sinh trưởng tế bào, và phục hồi. Nhờ cải thiện khả năng tiêu hóa thì thực phẩm bổ sung sẽ giảm chứng ợ chua, và nâng cao khả năng điều tiết của cơ thể.

Ước tính 15% người Mỹ bị viêm khớp, chứng bệnh đặc trưng bởi các đặc tính viêm như: đau, sưng phồng, cứng khớp, và tấy đỏ. Tuy nhiên, viêm khớp không phải là rối loạn duy nhất, mà còn kể thêm bệnh khớp do một số nguyên nhân có thể là, như do di truyền, viêm nhiễm, chấn thương, dị ứng, stress, và hệ tiêu hóa bị trục trặc. Nghiên cứu lâm sàng tại Transformation Enzym Corporation cho thấy hầu hết người bị viêm khớp có phản ứng tốt với điều trị bằng proteaza và các phụ gia enzym tiêu hóa bởi vì viêm khớp liên quan đến chứng viêm và tiêu hóa. Một số nghiên cứu đã cho thấy các enzym proteaza có tác dụng hữu hiệu như thuốc Methotrexate và Indomethacin để giảm đau do viêm khớp, mà

lại không có tác dụng phụ. Bằng cách tăng hỗ trợ hệ tiêu hóa và miễn dịch, chứng viêm sẽ thuyên giảm.

Giải pháp cho các vấn đề sức khỏe liên quan đến thiếu enzym tiêu hóa là ăn các thực phẩm bổ sung chứa enzym tiêu hóa. Phần lớn enzym tiêu hóa được bào chế dạng viên nang để nuốt được dễ dàng. Viên nang được làm từ gelatin (gọi là viên nang dạng gel) hoặc hỗn hợp xenluloza thực vật (gọi là viên nang thực vật). Trong vòng 10 năm trở lại đây, hầu hết các công ty sản xuất thực phẩm chức năng đều hướng vào làm các viên nang thực vật cho các sản phẩm vi nang của họ. Phần lớn các viên nang enzym có thể mở được và rót bột ra ngoài.

Ăn thêm một lượng enzym tiêu hóa có thể không phải là giải pháp lý tưởng, bởi vì việc phơi nhiễm axit trong dạ dày trong quá trình di chuyển qua dạ dày có thể có tác dụng có hại cho enzym. Các vấn đề phát sinh nữa khi dùng enzym dưới dạng thực phẩm bổ sung là vị của các enzym này, một vài trong số này gây cảm giác “bỏng rát” trong miệng, và tính nhạy cảm của enzym với độ ẩm. Những enzym không vi nang hóa được biết là mất công hiệu khi cho tiếp xúc với độ ẩm không khí bình thường, và vì vậy không thể dùng chúng dưới dạng đồ uống hay như một thành phần trong thức ăn ướt, trừ khi cho vào ngay trước khi ăn.

Cảm giác bỏng rát là do khi proteaza bắt đầu phá vỡ một số lớp tế bào chết hoặc các tế bào trên bề mặt da. Những enzym này loại bỏ những tế bào hư hỏng, bị nhiễm khuẩn, hay đã chết. Nếu proteaza vẫn lưu lại trên bề mặt da trong thời gian dài, chúng có thể bóc các tế bào chết làm lộ lớp da khỏe mạnh phía dưới. Điều này có thể gây tác dụng rất kích thích. Đôi khi nếu enzym được dùng dưới dạng đồ uống, vốn sẽ tiếp xúc với môi trên, thì proteaza có thể lưu lại và gây nổi mụn ở đây.

Ngoài ra cũng có các enzym tiêu hóa nhạy cảm với axit ở dạ dày. Các enzym tuy cũng không ổn định ở khoảng rộng pH hay nhiệt độ biến thiên lớn và bị phá hủy bởi axit trong dạ dày. Vì vậy, cần phải bảo vệ enzym trong quá trình di chuyển qua dạ dày.

Vi khuẩn probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) có lợi cho tiêu hóa

Một trong những phân khúc phát triển nhanh nhất của ngành công nghiệp sản xuất sản phẩm phục vụ sức khỏe của cả người và động vật là sử dụng các tế bào probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) (các vi khuẩn probiotic). Theo định nghĩa đã được xác nhận của FAO/WHO, các vi khuẩn probiotic là: "các vi sinh vật sống khi được dùng một lượng phù hợp sẽ truyền tác dụng có lợi cho sức khỏe vật chủ". Vi khuẩn axit lactic (LAB, Lb.) và vi khuẩn bifido là các dạng phổ biến nhất được dùng làm các vi khuẩn probiotic, nhưng cũng có một số nấm men và vi khuẩn bacilli có thể hữu ích.

Các tế bào vi khuẩn Probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) nhạy cảm với nhiều điều kiện khác nhau của môi trường như độ pH, độ ẩm, nhiệt độ, không khí và ánh sáng. Khi những điều kiện này không được kiểm soát phù hợp, mức độ

sống của sản phẩm (thường được xác định theo đơn vị tạo khuẩn lạc (cfu), hoặc theo tốc độ hoạt tính chuyển hóa (mar)) sẽ giảm, và vì vậy hiệu quả của sản phẩm có thể bị giảm đáng kể.

Để được sử dụng trong thức ăn dưới dạng các hợp phần với công năng có lợi và thậm chí có tác dụng điều trị, các tế bào vi khuẩn probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) cần được bảo vệ a) trong quá trình sản xuất, và b) trong quá trình lưu giữ trong sản phẩm đóng gói và c) khi di chuyển trong ống tiêu hóa, đặc biệt là qua dạ dày. Trong các sản phẩm làm từ sữa như Yoghurt, các tế bào này phải sống được trong điều kiện axit vừa phải trong một thời gian dài. Tỷ lệ sống của vi khuẩn Probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) trong sản phẩm bị ảnh hưởng bởi một loạt các yếu tố bao gồm độ pH, sự axit hóa sau đó (trong quá trình bảo quản) ở các sản phẩm lên men, sự hình thành hydro peroxit, độc tính oxy (thẩm thấu oxy trong quá trình đóng gói), nhiệt độ bảo quản, độ ổn định ở dạng sấy khô hoặc đông lạnh, sự sinh trưởng kém trong sữa, không có Proteaza để phá hủy protein sữa thành các chất có đậm đơn giản hơn và tính tương thích với giống cấy men truyền thống trong quá trình lên men. Tất cả các yếu tố tác động này sẽ làm chết tế bào với tỷ lệ phần trăm đáng kể. Vì vậy, Hiệp Hội Sữa Quốc Tế-International Dairy Federation (IDF) đề xuất tối thiểu phải có 10^7 tế bào vi khuẩn probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) sống/gam sản phẩm tại thời điểm dùng thức ăn, để có được tác dụng có lợi cho sức khỏe. Tuy nhiên, chuyên gia tin là có thể giảm được đáng kể số tế bào này nếu loại bỏ được nguyên nhân chính gây chết tế bào, tức là sự phân hủy tế bào sống bằng axit trong dạ dày, bằng cách bảo vệ các tế bào này trước môi trường axit và nhờ vậy tăng tỷ lệ sống của tế bào trong dạ dày. Một số tế bào vi khuẩn probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) cũng có thể tạo ra enzym tiêu hóa khi đi qua dạ dày và tiến vào ruột.

Giải pháp để khắc phục tỷ lệ sống thấp của tế bào vi khuẩn probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) trong quá trình bảo quản các sản phẩm sữa lên men hay trong quá trình tiếp xúc axit trong dạ dày là vi nang hóa.

Bao nang hóa là một quá trình tạo lớp vỏ bọc liên tục xung quanh lớp chất nền bên trong vốn nằm hoàn toàn phía trong thành viên nang dưới dạng lõi của chất liệu bao nang. Cần phân biệt khái niệm “bất động” vốn dùng để chỉ việc bắt dính chất liệu nằm lọt trong chất liệu hay xuyên qua chất nền. Ngược lại với quá trình bao nang hóa, bất động là quá trình ngẫu nhiên tạo nên các tiểu phân có kích cỡ không xác định trong đó có lượng phần trăm nhất định nguyên tố bất động sẽ bị phơi trên bề mặt. Vi nang giúp tách biệt chất liệu lõi với môi trường bao quanh, nhờ vậy nâng cao độ ổn định và kéo dài thời gian sống của lõi. Cấu trúc hình thành quanh lõi bằng chất tạo vi nang được gọi là thành nang. Tính chất của hệ thành nang là để bảo vệ lõi và giải phóng nó trong một số điều kiện nhất định đồng

thời cho phép các phân tử nhỏ đi vào và ra khỏi màng. Các viên nang có thể có kích thước từ dưới micron đến vài milimet và có thể có hình dạng khác nhau.

Một số polyme sinh học thực phẩm như alginat, tinh bột, gôm xanthan, gôm guar, gôm hạt carob và gôm tảo caragen cũng như protein nước sữa đã được thử nghiệm làm chất liệu vi nang để bảo vệ các tế bào vi khuẩn nhạy với axit cho kết quả thành công khác nhau. Xem tài liệu gần đây: Islam *et al.* “Microencapsulation of Live Probiotics Bacteria” J. Microbiol. Biotechnol. (2010), 20(10), 1367–1377. Cho đến nay, chưa có tác giả nào nói về việc sử dụng công nghệ vi nang cho phép enzym tiêu hóa sản sinh trong các tế bào vi khuẩn sẽ được giải phóng qua thành nang.

Alginat là polysaccharit anion tự nhiên gồm các gốc axit D-mannuronic và axit L-guluronic được nối kết thẳng với nhau qua các liên kết 1-4 glycosit. Alginat là sản phẩm tự nhiên được thu hồi từ rong biển, không độc và bao nang hóa dùng alginat là công nghệ được sử dụng rộng rãi vì cách điều chế đơn giản và giá thành thấp và tính tương thích sinh học tốt (chất liệu này không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của hầu hết các dạng tế bào được bao nang). Gel alginat được làm từ Ca^{2+} alginat là bền trong điều kiện pH thấp. Gel này phồng lên trong dung dịch bazơ yếu. Khi hạ thấp pH dưới giá trị pKa của axit D-mannuronic và axit L-guluronic, cho dù alginat được chuyển hóa thành axit alginic và giải phóng Ca^{2+} và hình thành gel đặc hơn do mất nước.

Bài viết của Kaila Kailasapathy (“Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications”, Curr. Issues Intest. Microbiol. (2002), 3, 39-48) cung cấp đánh giá toàn diện về các kỹ thuật vi nang hóa khác nhau đã được sử dụng cho đến nay.

Các báo cáo cho biết khoảng hơn 40% vi khuẩn lactobacilli sống được ở sữa bị đóng băng khi chúng được giữ trong alginat canxi hơn là khi không được giữ. Dung dịch nước alginat hay tảo caragen trong dầu thực vật chứa Tween 80 (chất nhũ tương) và natri lauryl sulphat (chất hoạt động bề mặt) đã được sử dụng để bao nang hóa tế bào vi khuẩn probiotic (*vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ*). Trộn các tế bào vi khuẩn này trong dung dịch alginat và nhỏ giọt lên dầu để thực hiện bao nang hóa. Cho chất nhũ tương và chất hoạt động bề mặt vào để thúc đẩy quá trình bao nang hóa.

Một vài trong số các công đoạn vi bao nang hóa trong phòng thí nghiệm này có dùng công nghệ nhũ tương nước trong dầu. Tuy nhiên, công nghệ này không thể phù hợp cho mọi ứng dụng thực phẩm vì lý do đầu tiên là gốc dầu ở trong chất liệu bao nang có thể gây hại cho đặc tính kết cấu và khả năng nhận cảm, và không phù hợp để phát triển sản phẩm sữa có hàm lượng chất béo thấp. Lý do thứ hai là gốc dầu, chất nhũ tương và chất hoạt động bề mặt trong chất liệu bao nang có thể gây độc với các tế bào vi khuẩn sống và có thể tương tác với các thành phần nhạy cảm trong thực phẩm.

Phương pháp bao nang hóa dùng alginat-tinh bột biến tính cũng được đề cập, trong đó tinh bột ngô prebiotic (nguồn thức ăn cho vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) loại Hi-maize (loại tinh bột ngô bền trước men tiêu hóa) được cho vào trong quá trình vi nang hóa canxi-alginat cho các tế bào probiotic.

Tế bào bao nang hóa có tinh bột có thời gian sống dài hơn, khi so sánh với những tế bào bao nang hóa không có tinh bột. Các chất prebiotic (nguồn thức ăn cho vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) là các thành phần thức ăn không tiêu hóa được có tác dụng kích thích sinh trưởng và/hoặc hoạt tính của các tế bào vi khuẩn trong hệ tiêu hóa vốn có lợi cho cơ thể. Thông thường, prebiotic (nguồn thức ăn cho vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) là carbohydrat (như oligosacarit), nhưng có thể có cả các chất phi carbohydrat, các prebiotic này không tiêu hóa được bởi vật chủ (như động vật có vú hoặc người), nhưng có ích cho các vi sinh vật ăn chúng. Tuy nhiên, trong các thử nghiệm *in vitro* các tế bào vi khuẩn đã bao nang không có tỷ lệ sống gia tăng đáng kể khi sống trong điều kiện pH thấp và nồng độ muối mật cao. Các tế bào này được cho phơi nhiễm với điều kiện pH bằng 2, 3 hoặc 4 trong 3 giờ ở 37°C và lấy mẫu mỗi giờ. Kết quả cho thấy vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* nhạy cảm hơn vi khuẩn *Bifidobacterium*, nhưng bao nang hóa đã không bảo vệ các tế bào vi khuẩn này khỏi bị phân hủy bởi dung dịch nước axit (Tài liệu: Sultana *et al.* “Encapsulation of probiotic microbial cells with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt”, International Journal of Food Microbiology, (2000), 62(1-2), 47-55).

Tuy nhiên, các vi khuẩn probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) có lợi cho tiêu hóa không chỉ phải sống được trong quá trình sản xuất và đóng gói thực phẩm mà cũng phải thích ứng để đi được đến ruột. Vì vậy, các vi khuẩn này phải tồn tại được trong điều kiện axit ở dạ dày, muối mật, các enzym, các chất chuyển hóa độc tính, thể thực khuẩn, kháng sinh và điều kiện yếm khí, trước khi chúng truyền tác dụng có lợi trong ruột.

Thông thường, các viên vi nang alginat được làm ra có đường kính nằm trong khoảng từ 40 đến 80 micromet chỉ có tác dụng bảo vệ không đáng kể vi khuẩn bifido trong điều kiện phơi nhiễm dịch vị mô phỏng ở pH bằng 2,0 trong khi các vi cầu alginat lớn hơn (1-3mm) đã bảo vệ các tế bào được bao nang này nhiều hơn hẳn (Truelstrup-Hansen L, Allan-wojtas PM, Jin YL, Paulson AT, “Survival of free and calcium-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in simulated gastro-intestinal conditions.”, Food Microbiol. (2002), 19: 35-45.).

Năm 2009, Nazzaro và cộng sự đã bao nang hóa vi khuẩn *L. acidophilus* trong gồm alginat-inulin-xanthan và báo cáo kết quả là gia tăng đáng kể số tế bào sống sau khi lên men và bảo quản (lần lượt là 6×10^{12} và 4×10^{10} tế bào/ml so với tỷ lệ 4×10^{10} và 2×10^8 trong trường hợp các tế bào không được bao nang) cũng như tỷ lệ sống gia tăng trong axit

dạ dày mô phỏng (Nazzaro, F. *et al.*, “Fermentative ability of alginate-prebiotics encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions”, Journal of Functional Foods (2009), 1(3), 319-323).

Sau này tài liệu cũng đề cập đến phương pháp vi nang mới dùng các vi cầu gelatin được liên kết ngang với genipin không gây độc tế bào và bao bằng alginat đã liên kết ngang nhờ Ca^{2+} lấy từ nguồn nội tại và bên ngoài. Bao nang hóa các vi cầu gelatin với vỏ bọc bằng alginat đã gia tăng đáng kể ($P < 0,05$) khả năng sống của vi khuẩn *probiotic Bifidobacterium* khi phơi nhiễm điều kiện môi trường có hại. Số tế bào sống sót sau khi phơi nhiễm dịch vị mô phỏng, pH bằng 2,0, trong 5 phút chỉ chiếm 2% và 1% quần thể ban đầu lần lượt tương ứng với trường hợp các vi cầu gelatin chưa bọc và tế bào trần. Tuy nhiên, khi vi khuẩn được bao trong vi cầu bọc alginat tạo ra từ nguồn Ca^{2+} bên ngoài và nội tại thì tương ứng với các trường hợp này có 54% và 20% số tế bào của quần thể ban đầu sống sót. Sau khoảng thời gian suy hao ban đầu (5 phút), quần thể vi khuẩn *bifidobacteria* giữ tốc độ giảm như nhau đối với tất cả các thử nghiệm trong thời gian 2 giờ. Tốc độ suy hao quần thể sống là 3,45 đơn vị log đối với các tế bào *B. adolescentis* trần là tương tự với nghiên cứu của các tác giả khác cho kết quả giảm là khoảng 3 log cfu/ml đối với tế bào vi khuẩn *B. adolescentis* phơi nhiễm với dịch vị mô phỏng (SGJ, pH 2,0) trong khoảng thời gian từ 2 đến 3 giờ. (Annan N.T., Borza A.D. và Truelstrup Hansen L., “Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions”, Food Research international, (2008), 41(2), 184-193).

Khoảng thời gian hành trình của vi khuẩn từ miệng đến ruột dưới và giải phóng khỏi dạ dày được biết là khoảng 90 phút. Vì vậy, Khater và cộng sự đã so sánh tỷ lệ sống của 12 chủng vi khuẩn probiotic khác nhau (*vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ*) đã được bao nang hóa bằng alginat - bao nang hóa được thực hiện theo phương án cải biến của quy cách Sultana (như đã đề cập ở trên và có dùng tinh bột ngô bền với men tiêu hóa loại *Hi-Maize*) – trong điều kiện tác động axit, thời gian xử lý là 30, 60 và 90 phút và sử dụng môi trường đã axit hóa (Khater & Ahmed, “Effect of Encapsulation on some Probiotic Criteria”, Journal of American Science, (2010), 6 (10), 810-819). Tác động lên tế bào bắt đầu ở dạ dày, nơi có pH thấp là 1,5. Tuy nhiên, phần lớn các thử nghiệm *in vitro* đều dùng pH bằng 3,0 để thử khả năng bền với axit. Những tế bào đã bao nang hóa bằng alginat được so sánh với tế bào không bao nang ở giá trị pH bằng 2 và 3. Tất cả tế bào không được bao nang hóa đều bị ảnh hưởng mạnh ở giá trị pH bằng 2,0, trong khi những vi khuẩn đã bao nang bằng alginat đều sống được lâu hơn một chút ở pH bằng 2,0. Tuy nhiên, những tế bào đã bao nang hóa cũng có tỷ lệ sống tổng thể cao hơn ở pH bằng 3,0 cho thấy tác dụng của axit không thể bị ngăn chặn hoàn toàn.

Ngoài ra, Khater và cộng sự đã so sánh tỷ lệ sống của những chủng vi khuẩn đã bao nang bằng alginat và chưa bao nang sau khi phơi nhiễm muối mật có nồng độ khác nhau, và còn thử tác dụng của dịch vị mô phỏng (SGJ ở pH bằng 1,4) lên tỷ lệ sống của các vi khuẩn này. Khi thời gian phơi nhiễm được tăng lên đến 24 giờ ở pH bằng 3,0 cộng thêm 12 giờ ở dung dịch oxgal nồng độ 0,3%, thu được kết quả khẳng định ở điều kiện như vậy thì bao nang hóa bằng alginat làm gia tăng tỷ lệ sống của vi khuẩn *Probiotic* (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) trong điều kiện pH thấp và sau đó là xử lý bằng muối mật. Một chủng vi khuẩn có tỷ lệ sống sau 36 giờ xử lý gia tăng từ 17% lên 34% và chủng khác từ 37% lên 50%. Tỷ lệ sống giữa tế bào đã bao nang và chưa bao nang khác nhau chỉ khoảng 2% sau khi phơi nhiễm 3 giờ trong điều kiện dịch vị mô phỏng đầu cho việc xử lý đường như ít gây hại cho mọi chủng tế bào vi khuẩn, vì thậm chí tỷ lệ sống của tế bào không bao nang hóa vẫn giữ ở mức nằm trong khoảng từ 89% đến 92% trong thí nghiệm này.

Tuy nhiên, ngược lại có kết quả cho thấy tế bào vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 chưa bao nang không sống được khi xử lý kéo dài 60 phút ở dịch vị mô phỏng (SGF) với pH bằng 2,0, trong khi những tế bào này lại sống được khi xử lý hai giờ ở dịch ruột mô phỏng (SIF), cho thấy *L. bulgaricus* KFRI 673 nhạy cảm với pH và không thể sống được trong điều kiện pH axit (đánh giá bởi Islam, xem phần đề cập bên trên).

Ngoài ra, Porubcan thông báo kết quả là tỷ lệ sống khoảng 99% của các tế bào “trần” bị mất đi sau khi chúng được phơi nhiễm trong dạ dày. Thí nghiệm của tác giả này cho thấy phơi nhiễm với axit dạ dày mô phỏng ở pH bằng 1,6 trong thời gian 90 phút đã làm giảm hẳn tỷ lệ sống của tất cả các giống tế bào thử nghiệm (US 7,122,370, Example 1).

Patent Mỹ US 7,122,370 và US 7,229,818 của Porubcan đề cập phương pháp bao nang hóa bằng alginat cảm ứng bởi axit, là nang bền trước pH thấp. Chế phẩm đã sử dụng là hỗn hợp hầu như không có nước của các tế bào *probiotic* (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) với muối natri alginat hoặc muối kali alginat. Tạo hỗn hợp này và giữ trong môi trường hầu như không có nước, bằng cách bọc hỗn hợp alginat/vi khuẩn bằng lớp bọc tan trong ruột, ví dụ viên nang làm từ xenluloza hoặc gelatin. Viên nang “macro” này là để bảo vệ hỗn hợp tế bào vi khuẩn và muối alginat khỏi bị chảy. Vì vậy về cơ bản viên nang xenluloza rắn cung cấp lớp bọc tan trong ruột để bảo vệ hai thành phần của hỗn hợp đến khi viên nang tan trong dạ dày, nơi mà các viên vi nang bền với axit gồm có thành phần là axit alginic và vi khuẩn *probiotic* (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) sẽ hình thành ngay sau khi tiếp xúc với môi trường axit ở dạ dày. Nhờ sự hình thành các viên vi nang cảm ứng bởi axit này, tế bào vi khuẩn *probiotic* (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) dường như được bảo vệ trước dịch axit trong dạ dày khi được bao nang hóa. Tác giả Porubcan yêu cầu bảo hộ xenluloza dưới danh nghĩa thành

phần tá được, được đề cập dùng để bao nang hỗn hợp gồm alginat và tế bào và để tạo ra chế phẩm có thể dễ nuốt, nhưng không dùng để bảo vệ axit trong dạ dày (http://www.survivalprobiotics.com/randy_commentary.html (cập nhật gần nhất là 15/11/2010) :

Vi khuẩn probiotic được cho sinh trưởng trong các hộp chứa trong môi trường lỏng trong khoảng 18 giờ và sau đó thu hoạch bằng cách ly tâm và làm khô ở nhiệt độ thấp. Bột sấy khô ở nhiệt độ thấp được đổ vào viên nang cùng với tá dược loại dùng trong thực phẩm như xenluloza. Quy trình này có vấn đề lớn là sản phẩm tạo ra có thời gian bảo quản ngắn (kể cả khi được giữ trong tủ lạnh) và tỷ lệ sống quá thấp trong dạ dày – tất cả CFU, theo tài liệu là 99,99%, bị tiêu diệt bởi axit trong dạ dày.”

Mặc dù quy trình này cung cấp cho khách hàng các vi khuẩn probiotic sống (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ), nhưng quy trình này không phù hợp cho mọi ứng dụng dưới dạng một thành phần của thực phẩm, vì quy trình này tạo ra các viên nang lớn, vốn cần phải được nuốt nguyên vẹn và không bị vỡ khi cắn.

Ngay năm 1995 có đơn yêu cầu cấp Patent đề cập các phương pháp vi nang hóa khác nhau cho vi khuẩn lactobacilli và đề xuất dùng qua đường miệng vi khuẩn lactobacilli probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) nằm trong các viên nang được dụng, như viên nang gelatin, để ngăn bệnh tiêu chảy do kháng sinh gây ra – trong đó vi nang hóa được đề cập là cách để kéo dài thời gian sống của vi khuẩn, và để bảo vệ vi khuẩn khỏi bị phân hủy khi đi qua ruột (US 5,633,012). Các hệ vi nang chỉ sử dụng natri alginat hoặc alginat và poly L-lysin được đề cập. Một hệ được đề cập trong đó vi khuẩn được trộn lẫn với hydroxypropylmethylxenluloza để cho vào dung dịch của hỗn hợp este copolyme axit acrylic methacrylic trong axeton-isopropanol hầu như không có nước có thể thấm thấu và một phần có thể thấm nước. Các dẫn chất xenluloza chỉ có tác dụng là chất mang, và không phải là một phần của viên nang. Hai quy trình bào chế vi nang khác được đề cập ở đây có sử dụng polyvinylpyrrolidon hoặc polyvinylpovidon.

Đơn yêu cầu cấp patent đã bị rút số US 2005/0266069 A1 của Simmons là nguồn thông tin toàn diện khác về tình trạng kỹ thuật liên quan đến các phương pháp khác nhau để bào chế các hợp phần vi cầu probiotic ổn định. Đơn này đề cập đến vi cầu phức probiotic khá hơn gồm lõi là vi khuẩn probiotic, tá dược xenluloza, chất phân rã và phụ gia, cũng như lớp bọc tan trong ruột bên với dịch trong dạ dày. Lớp bọc tan được trong ruột này có thể bền với dịch trong dạ dày và cấu tạo từ polyme hoặc copolyme của axit acrylic và/hoặc axit methacrylic và/hoặc este của chúng, xenluloza axetat phtalat, polyvinyl axetat phtatlate và shellac.

Thường thì có hai phương pháp khác nhau để tạo các viên nang như vậy. Simmons đề cập đến kỹ thuật đun dung dịch polyme, sau đó là tạo hình cầu gồm nhiều giai đoạn

không liên tục được biết dưới tên gọi là tạo hạt (để tạo bột nhão có thể đùn được), giai đoạn đùn, giai đoạn tạo hình cầu và sấy khô, sau đó là bước tạo lớp bọc các vi cầu này.

Phương pháp bào chế phức hợp khác hơn này là trái ngược với kỹ thuật đơn giản hơn rất nhiều, theo sáng chế, được dùng để tạo nên các vi khuẩn probiotic được vi nang hóa bằng sulphat xenluloza. Kỹ thuật này đơn giản gồm hai bước là phân tán tế bào trong dung dịch sulphat xenluloza và đưa hỗn hợp này, chẳng hạn dưới dạng các giọt nhỏ, vào dung dịch làm cứng, còn được gọi là bình chung kết tủa. Thông thường các giọt nhỏ hình cầu tiền thân này đã tích điện và không bị dính vào nhau khi rơi vào dung dịch làm cứng.

Ở một lĩnh vực khác, nghĩa là trong ngành y sinh và các ứng dụng chăm sóc sức khỏe, tế bào sống được bao nang hóa để tiêm vào cơ thể bệnh nhân (nghĩa là cấy chúng vào), nơi các viên nang được trông đợi chuyển vận các phân tử sinh học có tác dụng trị liệu, các chất nền hoặc enzym đi qua màng của vi nang sau đó, màng này bảo vệ các chất này khỏi bị hệ miễn dịch của cơ thể tấn công và giúp khu trú lại.

Kỹ thuật khác là sử dụng alginat đã được đề cập ở trên, nghĩa là tạo ra vi nang phức đa điện phân (PEC) bằng các polyion tích điện trái dấu và đây là phương pháp đơn giản và hiệu quả. Những hệ viên nang đa điện phân thường dùng là natri sulphat xenluloza (ở đây được đề cập là NaCS)/poly[điallyl(dimetyl)ammoni clorua] (ở bản mô tả này gọi là pDADMAC), chitosan/alginat, chitosan/xanthan, v.v... pDADMAC là polyme đồng nhất amoni bậc bốn. Tên CAS của pDADMAC là 2-Propen-1-aminium,N,N-dimetyl-N-Propenyl-,clorua polyme đồng nhất. Có thể mua được chất này với trọng lượng phân tử khác nhau.

Hệ bao nang hóa NaCS/pDADMAC được tạo ra bằng cách nhỏ giọt dung dịch polyanion NaCS vào dung dịch polycation pDADMAC, đã được kiểm nghiệm toàn diện và hệ này có sức hấp dẫn do tính đơn giản và nhờ vậy giảm giá thành quy trình và loại trừ các nguồn gây tạp tiềm năng. Những phân tử như các chất dinh dưỡng và các sản phẩm thải có thể đi dễ dàng qua các lỗ vi nang sulphat xenluloza, nếu những viên nang này được làm bằng các phân tử pDADMAC tương đối nhỏ. Chất liệu này là tương thích sinh học và tồn tại lâu được dẫn chứng trong tài liệu đối với một số dạng tế bào đã được bao nang hóa bằng hệ này. Chất liệu này đã được phân tích đặc tính và tối ưu hóa cho các mục đích y sinh, và các viên vi nang đã được ứng dụng thành công sau đó, chẳng hạn trong điều trị u nơi tế bào sống được bao nang tạo ra các chất trị liệu như kháng thể được giải phóng qua các lỗ trên viên nang trong cơ thể bệnh nhân (Patent Mỹ US 6,540,995 cấp cho Gunzburg và cộng sự, và US 6,426,088 cấp cho Piechaczyk và cộng sự).

Những thử nghiệm đầu tiên trong phòng thí nghiệm cho thấy các proton axit H_3O^+ sẽ dễ dàng đi qua thành nang sulphat xenluloza. Khi các hạt $CaCO_3$ được bao nang bằng natri sulphat xenluloza và pDADMAC cỡ nhỏ thì các hạt này tan hoàn toàn khi cho dung dịch nước axit vào. Sự hòa tan xảy ra theo cách phụ thuộc vào thời gian. Fig. 2 là ảnh các

viên nang này bao bọc các tinh thể CaCO_3 và chúng hòa tan chậm ở pH dưới 6, phụ thuộc vào thời gian. Khi hạ tiếp pH từ pH bằng 7,5 xuống pH bằng 3, CO_2 sinh ra tạo nên các bọt khí trong viên nang.

Do đó, ngạc nhiên là các viên nang NaCS/pDADMAC có thể bảo vệ các tế bào vi khuẩn trước tác dụng của môi trường axit.

Ý tưởng sử dụng công nghệ bao nang hóa trên cơ sở hệ NaCS/pDADMAC để bảo vệ các tế bào vi khuẩn khỏi bị phân hủy trong dịch dạ dày, và tiếp đó là khi đi qua ruột đã được thử nghiệm trong sáng chế và ngạc nhiên là các tế bào vi khuẩn nằm trong các viên nang có lỗ lớn làm từ sulphat xenluloza và pDADMAC (Fig. 3) đã sống được khi xử lý bằng axit với thời gian dài hơn tế bào không được bao nang hóa (Fig. 4), cho dù lỗ của viên nang có kích thước lớn hơn (đã chứng minh trong các patent Mỹ số US 6,540,995 và US 6,426,088 là cho phép giải phóng các đại phân tử) và kiến thức trong lĩnh vực này khẳng định xenluloza dưới dạng tá dược không bảo vệ tế bào khỏi phân hủy trong dịch dạ dày. Ngoài ra, những tế bào này vẫn sống và có hoạt động chuyển hóa. Phần lớn tế bào sau đó vẫn duy trì được vỏ nang khi được xử lý trong dịch ruột, như dịch tá tràng, và vì vậy những tế bào này có thể đi qua ống tiêu hóa, chẳng hạn kể cả ruột, mà vẫn nằm trong các viên nang này và nhờ đó giải phóng các enzym do chúng tạo ra qua các lỗ trên viên nang vào môi trường xung quanh. Tùy thuộc vào điều kiện vi nang, sự giải phóng các tế bào vi khuẩn đã vi nang hóa ở ruột có thể được điều chỉnh để gia tăng giải phóng các tế bào vi khuẩn từ vi nang.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế mô tả việc sử dụng chất liệu vi nang đặc biệt và phương pháp bảo vệ các tế bào vi khuẩn sống có thể là các vi khuẩn và vi sinh vật khác như nấm hoặc nấm men, cụ thể là tế bào probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ), vốn là nhóm khác nguồn gốc gồm các nấm men đặc biệt, nấm đặc biệt và vi khuẩn đặc biệt, trước tác dụng phân hủy của axit trong dung dịch nước axit và còn cho chúng di chuyển tiếp qua ống tiêu hóa trong khi vẫn sống. Sáng chế còn đề cập đến bao nang hóa các tế bào vi khuẩn vốn giải phóng enzym qua các lỗ nang vào môi trường xung quanh, sau khi đã sống được trong dịch axit dạ dày ở động vật, động vật này có thể là nhóm động vật có xương sống, nhưng tốt hơn nếu là chim và động vật có vú, để nhận được tác dụng có lợi mong muốn cho sức khỏe. Hiểu là sáng chế được mô tả ở đây có thể áp dụng cho các phân nhóm động vật khác. Tuy nhiên, động vật được ưu tiên là chim, đặc biệt là loại hữu ích trong sản xuất thực phẩm như ngỗng, gà, gà tây, cá, tôm hoặc động vật có vú, như động vật gặm nhấm, chó hoặc mèo, nhưng đặc biệt là động vật có vú hữu ích trong sản xuất thực phẩm như động vật nhai lại (trâu bò, dê, cừu, bò rừng, hươu sừng tám châu Âu, hươu Canada, trâu rừng, hươu) hoặc lợn. Tuy nhiên, được ưu tiên nhất là người để phòng

ngừa hoặc điều trị sự mất cân bằng dạ dày-ruột. Sáng chế đề xuất viên nang sulphat xenluloza lỗ lớn chứa các tế bào vi khuẩn, như các tế bào vi khuẩn sản xuất enzym tiêu hóa và đặc biệt là các vi khuẩn probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) có lợi cho tiêu hóa là các viên nang bền với xử lý bằng dung dịch nước axit hóa bằng HCl, đặc biệt là bằng axit dạ dày hoặc dịch dạ dày, trong thời gian kéo dài ít nhất là 1 giờ và còn bền với xử lý tiếp theo bằng dịch ruột, như dịch ruột mô phỏng (SIF) hoặc dịch tá tràng, v.v... Quy trình để bao vi nang các tế bào vi khuẩn là đơn giản đến mức bất ngờ. Số liệu thử nghiệm trong bản mô tả này cho thấy vi nang hóa các tế bào vi khuẩn bằng natri sulphat xenluloza (NaCS) và poly[điallyl-đimetyl-amoni clorua] (pDADMAC) đã tạo ra các vi nang lỗ lớn bảo vệ thành công các tế bào vi khuẩn đã bao nang này khỏi bị phân hủy trong môi trường axit, cũng như tiếp đó trong môi trường bazơ của dịch ruột (pH khoảng bằng 8). Thậm chí sau 90 phút xử lý bằng HCl ở pH bằng 2,0 hoạt tính chuyển hóa của các tế bào vi khuẩn đã bao nang vẫn cao so với của tế bào không được bao nang hóa. Kết quả này thực sự bất ngờ vì các ion hydro (H_3O^+) được cho là sẽ khuếch tán nhanh vào viên nang do kích thước lỗ tương đối lớn (khoảng 80kDA hoặc cao hơn), như đã viết trong các nghiên cứu chứng minh tế bào đã bao nang hóa bằng sulphat xenluloza cho phép các chất lớn như kháng thể đi được qua các lỗ trên thành nang. Vì một số nguyên nhân, bao nang hóa bằng natri sulphat xenluloza và pDADMAC tạo ra bề mặt nang có lỗ lớn lại có tác dụng bảo vệ có ý nghĩa trước sự phân hủy của dung dịch axit. Khi xử lý bằng dịch ruột như dịch tá tràng các viên vi nang vẫn nguyên vẹn. Tuy nhiên, kích thước lỗ là đủ lớn cho phép enzym tiết ra từ các tế bào vi khuẩn đi qua được thành nang và được giải phóng ra ngoài, chẳng hạn vào ống tiêu hóa. Điều này cho phép số lượng lớn tế bào có hoạt tính chuyển hóa như tế bào probiotic đi qua dạ dày vào ruột.

Cho đến nay, công nghệ vi nang hóa tế bào dựa trên việc sử dụng natri sulphat xenluloza, có thể là xenluloza đã sulphat hóa cùng loại hoặc khác loại, và pDADMAC vẫn chưa được ứng dụng để bảo vệ vi khuẩn đã bao nang hóa hoặc các vi khuẩn probiotic (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) có lợi cho tiêu hóa trước tác dụng phân hủy của axit, hay bảo vệ trước tác dụng phân hủy trong thời gian bảo quản kéo dài hoặc cả hai tác dụng này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất công nghệ này để ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm. Các tế bào vi khuẩn đã bao nang hóa là đặc biệt hữu ích để tăng trọng cho gia súc trong các trại chăn nuôi. Việc thay thế các quần thể vi sinh nội tại bằng các chủng vi sinh có khả năng tạo các hợp phần enzym hữu hiệu hơn, chẳng hạn, sẽ cho phép khai thác thực phẩm với hiệu quả cao hơn. Vì vậy, việc sử dụng công nghệ này và các vi nang được đề cập ở trên trong công nghiệp thực phẩm là phương án khác của sáng chế.

Sử dụng nguyên liệu ban đầu có thành phần hóa học đã xác định, bọc tế bào bằng nang PEC gốc xenluloza, nang này không chỉ có độ bền cơ học cao và tương thích sinh

học tốt, mà còn không bị ảnh hưởng bởi điều kiện axit, và có khả năng đáp ứng với thay đổi ở môi trường xung quanh bằng cách giải phóng tế bào và/hoặc sản phẩm của tế bào từ nang khi đi qua ruột chính là giải pháp cho vấn đề tỷ lệ sống thấp của phần lớn tế bào, như các vi khuẩn *probiotic* trong thực phẩm và khi dùng thực phẩm bổ sung (chức năng) qua đường miệng.

Vì vậy, một mục đích nữa của sáng chế là đề xuất tế bào vi sinh vật được bao nang bằng phương pháp theo sáng chế tạo nên được phẩm dùng cho đường miệng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tiêu chảy, bệnh tiêu chảy do kháng sinh, viêm khớp, béo phì, hội chứng ruột bị kích thích, chứng ợ chua, hội chứng mệt mỏi mạn tính và các dạng bệnh khác do mất cân bằng quần thể vi khuẩn trong ruột của động vật không phải là người cũng như đề xuất được phẩm chứa tế bào vi sinh vật được bao nang này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là cấu trúc hóa học của các chất điện ly trùng hợp được sử dụng để bao nang hóa.

Fig. 1 a) là cấu trúc hóa học của natri sulphat xenluloza (NaCS).

Fig. 1 b) là cấu trúc hóa học của Poly[điallyl-đimetyl-amoni clorua] (pDADMAC).

Fig. 2 là loạt ảnh viên nang làm từ sulphat xenluloza và pDADMAC theo sáng chế, các viên nang này chứa CaCO_3 với các giá trị pH khác nhau. Những viên nang đầu tiên là ở pH bằng 7,5 và chứa tinh thể CaCO_3 . Ảnh cuối cùng là viên nang ở pH bằng 3, trong đó tinh thể CaCO_3 bị tan và nhìn thấy bột khí CO_2 phía trong nang. Việc này chứng tỏ axit (H_3O^+) có thể vào nang dễ dàng và làm tan tinh thể CaCO_3 . Vì vậy, điều rất bất ngờ là các viên nang NaCS/pDADMAC có thể bảo vệ được các tế bào vi khuẩn trước tác dụng của môi trường axit.

Fig. 3 là ảnh kính hiển vi quang học của các tế bào vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* đã bao nang hóa bằng NaCS/pDADMAC.

Fig. 4 là ảnh chụp so sánh tỷ lệ sống của vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* không bao nang (hình chữ nhật) với vi khuẩn đã bao nang hóa bằng NaCS/pDADMAC (hình thoi) ở điều kiện axit (HCl, pH bằng 2) trong khoảng thời gian lên đến 4 giờ. Tỷ lệ sống được xác định bằng thử nghiệm Alamar Blue[®] và đo bằng đơn vị phát huỳnh quang tương đối (RFU).

Mô tả chi tiết sáng chế

Đối tượng của sáng chế là các tế bào vi khuẩn được bao nang, bao gồm các nang có thành nang xoắn, trong đó thành nang xoắn này là phức hợp được tạo nên từ sulphat xenluloza và poly[đimetylđiallyl-amoni clorua], nang này có đặc điểm bền trước xử lý

bằng dung dịch nước axit, đặc biệt là hữu dụng cho các tế bào vi khuẩn nhạy với xử lý bằng dung dịch nước axit khi không được bao nang. Công nghệ vi nang hóa tế bào được sử dụng theo sáng chế dựa trên việc sử dụng natri sulphat xenluloza có thể được tạo ra bằng xenluloza đã sulphat hóa cùng loại hoặc khác loại. pDADMAC đã sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có phân tử lượng nhỏ hơn, như đã đề cập bởi Dautzenberg và cộng sự (1999b). (Dautzenberg H, Schuldt U, Grasnick G, Karle P, Müller P, Lühr M, Pelegriin M, Piechaczyk M, Rombs KV, Grynzburg WH, Salmons B, Saller RM. “Development of cellulose sulfate-based polyelectrolyte complex microcapsules for medical applications”. Ann. N. Y. Acad. Sci. (1999), 875,46-63). Sáng chế cho thấy lực cơ học tối ưu của thành nang có thể đạt được khi dùng pDADMAC có phân tử lượng khoảng 20kDa. Những viên nang tạo ra theo cách này có đặc điểm là có các lỗ đủ lớn cho các protein hoặc kháng thể đơn dòng đi qua, với kích thước ít nhất là 80kDa hoặc có thể lên tới 150kDa. Mối quan hệ phụ thuộc của kích thước lỗ và kích thước của pDADMAC sử dụng đã được đề cập trong tài liệu: Dautzenberg *et al.* (1999a) (“Size exclusion properties of polyelectrolyte complex microcapsules prepared from natri sulphate cellulose and pDADMAC”, Journal of Membrane Science, (1999), 162(1-2), 165-171). Rõ ràng là pDADMAC có phân tử lượng thấp hơn sẽ tạo ra lỗ có kích thước lớn hơn. Tốt hơn nếu các vi nang có kích thước lỗ đủ lớn cho phép giải phóng enzym từ các tế bào vi khuẩn và tiết enzym tiêu hóa ra ngoài.

Theo một phương án của sáng chế, viên nang có dạng vi nang hình cầu với đường kính nằm trong khoảng từ 0,01 đến 5mm, tốt hơn nếu từ 0,05 đến 3mm và tốt nhất nếu từ 0,01 đến 1mm. Cũng ưu tiên nếu nang có thành nang xốp, có thể cho enzym tiêu hóa thấm qua được. Vi nang có đặc điểm là các lỗ trên bề mặt cho phép enzym đi qua được. Tốt hơn khi kích thước lỗ trên bề mặt thành nang xốp nằm trong khoảng từ 80 đến 150nm, để enzym đi qua được. Đặc biệt ưu tiên cho các lỗ trên bề mặt thành nang xốp có ngưỡng phân tử lượng (MWCO) nằm trong khoảng từ 50 đến 200kDa, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 60 đến 150kDa và tốt nhất là trong khoảng từ 60 đến 100kDa.

Ví dụ về enzym tiêu hóa và kích thước đi kèm là Proteaza, như Subtilisin tiết ra từ *B. Subtilis*, với kích thước khoảng 27kDa, alpha-amylaza khoảng 63kDa, alpha-galactosidaza khoảng 82kDa, Proteaza bromelain khoảng 25kDa, cellulaza khoảng 32kDa, glucoamylaza khoảng 78 kDa, pectinaza khoảng 35kDa và lipaza tiết từ *Bacillus subtilis* khoảng 20kDa. Kích thước chính xác có thể thay đổi theo từng sinh vật. Một số trong các enzym này hoạt động như đime.

Tốt hơn nếu các tế bào này có lợi cho động vật theo sáng chế sau khi được ăn vào. Tốt hơn khi những vi sinh vật này được chọn từ nhóm gồm nấm men như *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* và *Torulopsis*, nấm như *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, và *Penicillium* và *Torulopsis* và vi khuẩn như *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*,

Fusobacterium, Melissococcus, Propionibacterium, Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Staphylococcus, Peptostreptococcus, Bacillus, Pediococcus, Micrococcus, Leuconostoc, Weissella, Aerococcus, Oenococcus, Geobacillus và tiền vi khuẩn như Lactobacillus. Trong phạm vi sáng chế này các tế bào vi khuẩn có thể được chọn từ nhóm gồm nấm men, nấm và vi khuẩn và/hoặc các vi khuẩn *probiotic* (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) có lợi cho tiêu hóa hoặc theo phương án khác các tế bào vi khuẩn có thể được tổ hợp từ các nhóm này. Theo sáng chế này, thuật ngữ vi khuẩn *probiotic* hoặc tế bào *probiotic* có thể sử dụng thay cho nhau.

Tốt hơn khi các tế bào vi khuẩn được bao nang hóa này, đặc biệt là những vi khuẩn tiết enzym tiêu hóa, là thuộc nhóm Saccharomyces, Bifidobacterium, Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus, Bacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Propionibacterium và Geobacillus.

Tốt hơn nữa nếu tế bào này được chọn từ nhóm gồm *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus casei Shirota*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lacti*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus GG*), *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus varians*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus*, và *Staphylococcus xylosus*.

Đặc biệt tốt khi là các tế bào *probiotic*. Tốt hơn nếu tế bào *probiotic* này được chọn từ nhóm gồm *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium angulatum* và *Bifidobacterium longum*. Theo một phương án, tế bào này là *Lactobacillus acidophilus* hoặc *Bacillus subtilis*.

Tế bào *Lactobacillus acidophilus* đã bao nang hóa, là các nang có thành nang xoắn, trong đó thành nang xoắn này là phức chất được tạo ra từ sulphat xenluloza đã sulphat hóa đồng thể hoặc dị thể và poly[đimetylđiallyl-amoni clorua] nhờ đó những tế bào đã bao

nang hóa này bền với xử lý bằng dung dịch nước axit có giá trị pH bằng 2 trong khoảng thời gian từ 2 đến 4 giờ. Đây là một phương án đặc thù theo sáng chế. Phương án ưu tiên là tế bào này bền với xử lý axit trong hai giờ.

Thuật ngữ “bền” để chỉ tình huống, trong đó phần lớn tế bào vi sinh vật vẫn sống sau quá trình xử lý.

Tốt hơn khi phần lớn những tế bào này vẫn sống sau xử lý bằng dung dịch nước axit. Đặc biệt tốt khi phần lớn tế bào vẫn có hoạt tính chuyển hóa sau xử lý này và tế bào vẫn sản sinh và tiết enzym. Theo khía cạnh này thì phần lớn được hiểu là ít nhất 51% số tế bào. Tốt hơn khi có từ 60% đến 90% tế bào vẫn sống. Vẫn tốt khi có từ 60% đến 80% tế bào vẫn sống. Phương án được ưu tiên đặc biệt là 60% số tế bào vẫn sống sau xử lý bằng axit.

Hiểu là ít nhất thì số tế bào đã bao nang hóa có hoạt tính chuyển hóa sau khi xử lý bằng dung dịch nước axit phải nhiều hơn số tế bào cùng loại nhưng không được bao nang hóa và bị xử lý cùng điều kiện như nhau.

Tốt hơn khi thời gian xử lý bằng dung dịch nước axit là từ 0,5 đến 2,5 giờ, tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 đến 2 giờ, và tốt nhất là 1,5 giờ. Phương án cũng được ưu tiên là dung dịch nước axit có pH nằm trong khoảng từ 1,0 đến 3,0, tốt hơn nếu trong khoảng từ 1,5 đến 2,5, tốt nhất nếu pH bằng 2,0.

Tốt hơn theo sáng chế là tế bào đã bao nang hóa theo sáng chế sản sinh và tiết enzym tiêu hóa, là các enzym được chọn từ nhóm gồm amylaza, như alpha-amylaza, galactosidaza, đặc biệt là alpha-galactosidaza, Proteaza, đặc biệt là bromelain proteaza và subtilisin, cellulaza, hemicellulaza, pectinaza và lipaza. Tốt hơn khi các enzym này được chọn từ nhóm nêu trên. Đặc biệt tốt nếu tế bào vi khuẩn bao nang hóa được chọn từ nhóm vi khuẩn gồm *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* và *Geobacillus*.

Một phương án ưu tiên là các tế bào vi khuẩn là *Bacillus subtilis* và enzym tiết ra là Proteaza, đặc biệt là subtilisin. Phương án khác theo sáng chế là tế bào *probiotic* bao nang hóa là các nang có thành nang xốp, trong đó thành nang xốp này là phức hợp chất điện ly trùng hợp được tạo ra từ các chất điện ly trùng hợp sulphat xenluloza và poly[đimetyldiallyl-amoni chlorid] tích điện trái dấu, nhờ vậy tạo nên tế bào bao nang hóa *probiotic* (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) bền với xử lý bằng dung dịch nước axit, và trong đó các nang này có đặc điểm giải phóng ít nhất một phần tế bào *probiotic* sống khi xử lý bằng dịch ruột. Dung dịch nước axit có thể là dịch dạ dày hoặc chất lỏng trong dạ dày. Xử lý bằng dịch ruột là đi qua ruột chim hoặc ruột động vật có vú, kể cả người. Tốt hơn nếu dịch ruột là dịch tá tràng hoặc chất lỏng trong tá tràng. Tốt hơn khi tế bào *probiotic* bao nang hóa là các nang như đã đề cập ở trên có đặc điểm sống được qua xử lý bằng dịch vị mô phỏng (SGF), và trong đó xử lý bằng dịch tá tràng mô phỏng

hoặc dịch ruột mô phỏng (SIF) sẽ kích thích hoặc làm giải phóng ít nhất một phần tế bào *probiotic* (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) khỏi viên nang.

Phương án khác là thực phẩm bổ sung (thực phẩm chức năng) chứa các tế bào vi khuẩn đã bao nang hóa, theo những phương án khác nhau đã đề cập ở trên. Phương án nữa theo sáng chế đề xuất chế phẩm, tốt hơn là được phẩm hoặc hợp phần được tính chứa các tế bào vi khuẩn đã bao nang hóa, tốt hơn nếu là tế bào vi khuẩn *probiotic*, hoặc nấm men đã bao nang hóa hoặc tế bào nấm đã bao nang hóa, tốt hơn nếu là tế bào nấm *probiotic* như đã đề cập ở trên.

Các tế bào vi khuẩn đã bao nang hóa có thể được sử dụng làm thuốc hoặc tác nhân phòng bệnh. Có thể dùng chúng để điều trị hoặc phòng tiêu chảy, kể cả tiêu chảy do dùng kháng sinh và các dạng khác do mất cân bằng quần thể vi khuẩn trong ruột, dù cho có đáp ứng với điều trị bằng kháng sinh hay không.

Natri sulphat xenluloza được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế đã được điều chế bằng phương pháp sulphat hóa đồng thể từ các vụn bông xenluloza. Tuy nhiên, cũng có thể sử dụng xenluloza sulphat hóa dị thể, vì theo tài liệu của Dautzenberg *et al.* (1999b) (“Development of Cellulose Sulphate-based Polyelectrolyte Complex Microcapsules for Medical Applications”, Ann. N. Y. Acad. Sci., (1999), 875, 46-63.) thì chất này cũng tạo ra các viên nang có lỗ lớn, ít nhất là với phân tử lượng bằng 80kDa.

Thực phẩm bổ sung (chức năng) chứa các tế bào vi khuẩn đã bao nang hóa hoặc các vi khuẩn *probiotic* đã bao nang hóa cũng được hiểu là một phương án của sáng chế. Phương án khác của sáng chế là chế phẩm, tốt hơn là được phẩm chứa tế bào vi khuẩn hoặc các vi khuẩn *probiotic* đã bao nang hóa như đề cập ở trên.

Tài liệu WO/2006/095021 (US 20090011033) đề cập phương pháp điều chế sulphat xenluloza có chất lượng đạt yêu cầu. Tốt hơn khi sử dụng sulphat xenluloza có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 100 đến 500kDa, tốt hơn nữa trong khoảng từ 200 đến 400kDa, và tốt nhất là trong khoảng từ 250 đến 350kDa. Các thí nghiệm trong phân Ví dụ thực hiện sáng chế này đã dùng nguyên liệu NaCS (09-Sul-592) do Fraunhofer Institute of Applied Polymer Research (IAP) in Potsdam, Germany cung cấp.

Phương pháp điều chế nang sulphat xenluloza đã được mô tả kỹ lưỡng trong tài liệu DE 40 21 050 A1 của Dautzenberg. Tài liệu này cũng mô tả phương pháp tổng hợp sulphat xenluloza, các phương pháp phân tích đặc điểm của nang sulphat xenluloza đã được H. Dautzenberg *et al.*, nêu rõ trong tài liệu Biomat. Art. Cells & Immob. Biotech., (1993), 21(3), 399-405. Các nang sulphat xenluloza khác đã được đề cập trong tài liệu GB 2 135 954. Đặc tính của nang xenluloza, nghĩa là kích thước, kích thước lỗ, độ dày thành nang và tính chất cơ học là phụ thuộc vào một số yếu tố như các điều kiện vật lý bào chế viên nang, độ nhớt của bình chung kết tủa, cường độ ion của nó, nhiệt độ, tốc độ thêm

hỗn dịch tế bào/sulphat xenluloza, cấu trúc của sulphat xenluloza, cũng như các thông số khác do nhóm Dautzenberg và các cộng sự đề cập.

Thông thường, để bào chế viên nang thì natri sulphat xenluloza được cho tiếp xúc với dung dịch nước pDADMAC, là dung dịch được mua từ Aldrich Co., USA hay Katpol Chemie, là tên một vài nhà sản xuất. Theo cách khác, poly[đimetylđiallyl-amonit clorua] (pDADMAC hoặc còn gọi là PDMDAAC) có thể được điều chế bằng cách trùng hợp gốc đimetyl-điallyl-amonit clorua, (theo phương pháp của University of Potsdam, Department of Chemistry, Teltow, Germany). Mansfeld và Dautzenberg đề xuất sử dụng dung dịch PDMDAAC (pDADMAC) 1,2% (khối lượng/thể tích) trong nước cất. Có thể mua pDADMAC với nhiều kích thước khác nhau. Zhang và cộng sự (Zhang, Yao and Guan, 2005 Preparation of macroporous sodium sulphat cellulose/poly(dimethyldiallylammonium chloride) capsules and their characteristics. Journal of Membrane Science. Volume 255, Issues 1–2, 2005, Pages 89–98) đã sử dụng pDADMAC có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 200.000 đến 350.000Da, trong khi Dautzenberg đề xuất pDADMAC có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 10.000 đến 30.000Da.

Tài liệu WO/2006/095021 (US 20090011033) đề cập phương pháp điều chế mẫu sulphat xenluloza có chất lượng đạt yêu cầu. Theo phương pháp này, hỗn hợp phản ứng của n-propanol và axit sulphuric được dùng làm môi trường và tác nhân sulphat hóa.

Natri sulphat xenluloza (FIG. 1a) làm polyanion và poly[điallylđimetylamonit clorua] (pDADMAC) (FIG. 1b) làm polycation. Dung dịch NaCS được sử dụng để tạo lõi nang và dung dịch pDADMAC làm chung kết tủa chuyển vận thành phần phản ứng thứ hai để tạo PEC trên bề mặt các giọt nhỏ, nhờ vậy tạo nên các viên nang bằng cách bao phủ các giọt nhỏ này bằng lớp màng rắn. Có thể sử dụng máy tạo viên nang có bán trên thị trường để bào chế vi nang, được hiểu theo sáng chế này là cả các hạt hoặc giọt vi cầu siêu nhỏ. Máy tạo viên nang bao gồm cơ cấu dẫn động dung dịch, cơ cấu này đẩy dung dịch NaCS với vận tốc xác định qua vòi phun và nhờ đó tạo thành dòng chất lỏng liên tục. Dòng chất lỏng này được cưỡng bức dao động bởi khối tạo xung động nơi mà dao động chồng liên tục sẽ làm gián đoạn dòng chất lỏng đầu ra hoặc phun thành các giọt có cùng thể tích. Để tăng độ phân tán đơn của các giọt và đồng thời giảm sự kết tụ, điện trường được cấp dưới đầu ra vòi phun trong máy tạo viên nang này. Việc nạp tĩnh điện trong pha tự do sẽ tạo ra lực đẩy các giọt riêng biệt khiến cho sự kết tụ các giọt riêng biệt sẵn sàng lọt vào trong bể tạo hỗn hợp được ngăn ngừa.

Những hạt hình cầu tạo ra theo cách này được nhỏ vào bình tạo phức, trong bình này màng bao ngoài của nang được tạo nên quanh viên nang bằng mối tương tác tĩnh điện, chẳng hạn giữa NaCS và dung dịch pDADMAC. Trong điều kiện khuấy, những viên

nang ở lại trong hệ thống này cho đến khi đạt được độ cứng cần thiết trong khoang chứa tương ứng và sau đó chuyển sang bước xử lý tiếp theo.

Trường hợp thiếu thiết bị bao nang hoặc hệ thống tạo giọt kiểu phản lực, có thể sử dụng xylanh với kim có đường kính trong là từ 0,2 đến 1,0mm và hệ thống bơm đùn kiểu xylanh thích hợp. Theo cách khác sử dụng ống hút Pipette vô trùng có đường kính trong là 1,5mm, chẳng hạn cũng có tác dụng tạo ra các viên nang bền với axit theo sáng chế.

Những viên nang tạo ra có kích thước lỗ đủ lớn để cho các đại phân tử có phân tử lượng lên tới 80kDa hoặc thậm chí lên tới 150kDa đi qua được như các protein kháng thể chẳng hạn. Những viên nang được tạo ra bằng cách này được biết có kích thước lỗ đủ lớn để giải phóng kháng thể qua các lỗ này, đây là các kháng thể do các tế bào thể lai sản sinh trong các viên nang này. Công nghệ bao nang hóa bằng sulphat xenluloza được đề cập trong tài liệu: Dautzenberg *et al.* 1999b (“Development of Cellulose Sulphate-based Polyelectrolyte Complex Microcapsules for Medical Applications”) đã được sử dụng để kiểm nghiệm xem việc sản xuất *in vivo* kháng thể đơn dòng trung hòa có thể bảo vệ chuột nhất chống retrovirus Fr-CasE hay không (Pelegrin *et al.*, “Immunotherapy of Viral Disease by *in Vivo* Production of Therapeutic monoclonal antibody”, Human Gene Therapy (2000), 11,1407-1415). Kết quả trong các tài liệu này cho thấy rõ ràng các viên nang có lỗ đủ lớn cho kháng thể đơn dòng đi qua.

Tuy nhiên, cần hiểu là các chất và phương pháp theo sáng chế không bị giới hạn bởi việc sử dụng các thành phần đặc thù đã đề cập ở đây; mà sáng chế bao hàm cả việc sử dụng các thành phần mua từ các nguồn khác, được tạo ra bằng các phương pháp như đã đề cập ở trên.

Trước khi bao nang hóa, tốt nhất cho các tế bào vi khuẩn sinh trưởng đến khi đạt giá trị OD (mật độ quang) ở 600nm bằng 1 và thu hoạch. Tuy nhiên, các vi khuẩn có giá trị OD 600 khác cũng phù hợp làm nguyên liệu ban đầu. Sau đó, bao nang hóa vi khuẩn bằng sulphat xenluloza và pDADMAC như sau:

Các tế bào vi khuẩn được vi nang hóa bằng NaCS theo phương pháp của Dautzenberg và cộng sự (“Preparation and Performance of Symplex Capsules”, Makromol. Chem., Suppl. 9, 203-210, 1985; “A new method for the encapsulation of mammalian cells”, Merten *et al.*, Cytotechnology 7:121-120, 1991; “Development of Cellulose Sulphate-based Polyelectrolyte Complex Microcapsules for Medical Applications” Annals of the New York Academy of Sciences, 875 (Bioartificial Organs II: Technology, Medicine, and Materials), 46–63, 1999b). Ngắn gọn là NaCS làm polyanion và tạo nhân nang. Dung dịch poly[điallyldimetyl-amoni clorua] là polycation làm vai trò chung kết tủa chuyển vận thành phần phản ứng thứ hai để hình thành phức hợp chất điện ly trùng hợp trên bề mặt của nhân nang sulphat xenluloza, nhờ vậy tạo ra các viên vi nang bằng cách bao phủ các giọt nhỏ nhân NaCS bằng lớp màng rắn.

Giống cấy vi sinh được cho sinh trưởng đạt đến mật độ quang có giá trị biểu thị tế bào ở tình trạng khỏe mạnh hoàn toàn, đối với hầu hết tế bào vi khuẩn thì tốt nhất là giá trị mật độ quang này bằng 1. Sau đó trộn một phần giống cấy vi khuẩn, ví dụ 50ul, 100ul, hoặc 200ul, với dung dịch natri sulphat xenluloza chứa natri sulphat xenluloza 1,8% và từ 0,9% đến 1% natri clorua có thể tích gấp khoảng 20 lần thể tích giống cấy (100ul được trộn với 2ml) (09-Sul-592, Fraunhofer Institute Golm, Germany). Lượng nhỏ dung dịch này, ví dụ các giọt nhỏ sau đó được cho vào bình chứa pDADMAC loại 1,3% 24 kDa (kích thước trung bình từ 21 đến 25 kDa). Có thể thực hiện bằng xylanh và kim tiêm, nếu không có thiết bị bao nang hoặc bằng hệ thống tạo giọt đã đề cập ở trên. Sau thời gian để cứng lại khoảng 4 phút và một số bước rửa, tế bào đã bao nang hóa được lấy từ bể và sẵn sàng cho việc bảo quản.

Những tế bào đã bao nang hóa này giờ đây có thể coi là phương án nữa của sáng chế và có thể được cho vào các dạng thực phẩm khác nhau dưới dạng là thành phần trong thức ăn. Theo cách khác, các vi khuẩn này có thể được dùng dưới dạng dược phẩm, hoặc chế phẩm dược tính. Ví dụ, các tế bào này có thể được cung cấp dưới dạng các viên nang cỡ lớn có lớp bọc tan trong ruột, viên nang như vậy phù hợp để nuốt lượng vi nang vừa đủ đạt được tác dụng có lợi mong muốn cho sức khỏe, như ngoài tác dụng hỗ trợ sức khỏe và chức năng ruột, còn (tùy thuộc vào chủng vi khuẩn đã chọn) phục hồi quần thể vi khuẩn trong ruột sau khi điều trị bằng kháng sinh, bù lại tính không hấp thu lactoza, hỗ trợ hệ miễn dịch và giảm cholesterol. Tác dụng có lợi cho dinh dưỡng bao gồm vai trò nâng cao sinh khả dụng của canxi, kẽm, sắt, mangan, đồng và phospho và tổng hợp các vitamin. Tác dụng trị liệu có lợi là các tế bào vi khuẩn có hoạt tính kháng vi khuẩn, khả năng tiêu hóa được cholesterol, cải thiện tính không hấp thu lactoza và có hoạt tính chống ung thư.

Sau bao nang hóa, các tế bào vi khuẩn đã bao nang có thể được nuôi cấy tiếp cho đến khi toàn bộ thể tích nang được lấp đầy bởi các tế bào vi khuẩn, mà nhìn qua kính hiển vi thì đó là khối sẫm màu. Viên nang được nhồi đầy các tế bào vi khuẩn càng sẫm màu, thì vi khuẩn càng được bảo vệ trước môi trường axit và có nhiều tế bào vi khuẩn hơn sống được khi đi qua dạ dày hoặc khi ủ trong dung dịch nước axit hoặc dịch dạ dày.

Do đó, phương án khác của sáng chế là đề xuất phương pháp bảo vệ tế bào khỏi bị phân huỷ khi xử lý bằng dung dịch nước axit, bằng cách bao nang hóa gồm các bước a) tạo huyền phù tế bào sống trong dung dịch nước của chất điện ly trùng hợp natri sulphat xenluloza, b) đưa huyền phù này dưới dạng các tiểu phân nhỏ đã hình thành trước vào bình chung kết tủa chứa dung dịch nước của chất điện ly trùng hợp poly[đimetylđiallyl-amoni clorua] tích điện trái dấu, c) dừng phản ứng trong bể sau từ 1 đến 60 phút, tốt hơn là từ 3 đến 10 phút, tốt hơn nữa sau từ 3 đến 5 phút và tốt nhất sau 4 phút, d) thu hoạch tế bào đã bao nang hóa từ bình này, e) ủ tùy ý tế bào đã bao nang hóa trong môi trường hoặc dung dịch chứa thêm các yếu tố dinh dưỡng, f) ủ tùy ý tế bào đã bao nang hóa cho đến khi

các viên nang được nhồi đầy bằng tế bào, g) cho tế bào đã bao nang hóa phơi nhiễm dung dịch nước axit, là dung dịch được biết có tác dụng phân hủy tế bào nếu chúng không được bao nang hóa, nhờ vậy phần lớn tế bào đã bao nang hóa vẫn sống. Theo khía cạnh này, phần lớn được hiểu ít nhất có 51% số tế bào, ít nhất 60% hoặc từ 60 đến 90% số tế bào. Theo phương án ưu tiên có từ 60% đến 80% tế bào vẫn sống.

Phương án ưu tiên theo sáng chế là phương pháp bảo vệ trước dung dịch nước axit trong khoảng thời gian từ 0,5 đến 3 giờ. Tốt hơn khi thời gian này nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ, và đặc biệt tốt là 90 phút. Hiểu là đạt được tác dụng bảo vệ nếu phần lớn tế bào vẫn sống hoặc vẫn có tác dụng chuyển hóa hoặc nếu số tế bào đã bao nang hóa sống nhiều hơn khi so sánh với tế bào chưa bao nang hóa khi xử lý trong điều kiện như nhau. Có hoạt tính chuyển hóa được hiểu là khi số đo trên phổ quang kế UV-Vis ở 570nm sau khi ủ với resazurin bị giảm tới giá trị resorufin huỳnh quang ở mức khác biệt có ý nghĩa so với mức nền hoặc so với giá trị đối chứng âm.

Ngoài ra, tốt hơn khi dung dịch nước axit để xử lý các tế bào này là dịch vị, chất lỏng trong dạ dày hoặc chất lỏng dạ dày mô phỏng hoặc dịch vị mô phỏng. Xử lý phơi nhiễm axit có thể là ủ trong dung dịch nước axit, và phương án ưu tiên là thực hiện xử lý này trong điều kiện sinh lý. Ngoài ra, tốt hơn khi tế bào đã bao nang hóa còn bền khi được xử lý bằng dịch ruột, như dịch ruột mô phỏng, hoặc dịch tá tràng.

Thuật ngữ “chất lỏng dạ dày mô phỏng” được hiểu là những chất lỏng khác nhau trong dạ dày được điều chế nhân tạo đã được đề cập trong tài liệu. Một ví dụ được đưa ra ở đây: Chất lỏng dạ dày mô phỏng có thể được điều chế dựa trên chất lỏng cơ bản trong dạ dày và pepsin. Chất lỏng cơ bản trong dạ dày đã được điều chế trong tài liệu: Clavel *et al.* (J Appl Microbiol. (2004), 97(1), 214-219) với một số cải biến. Chất lỏng này chứa 4,8g NaCl (POCH, Poland), 1,56g NaHCO₃ (POCH, Poland), 2,2g KCl (POCH, Poland), và 0,22g CaCl₂ (POCH, Poland) hòa tan trong 01 lít nước cất. Sau khi hấp trong nồi ở 121°C/15 phút, pH của chất lỏng cơ bản trong dạ dày được điều chỉnh đến giá trị 2,4±0,2 bằng cách sử dụng HCl 1M, và 2mg pepsin (Sigma Aldrich, USA) cho 50ml chất lỏng nhân tạo dạ dày đã thêm vào.

Thuật ngữ “dịch ruột mô phỏng” được hiểu là các dịch ruột hoặc dịch tá tràng khác nhau được điều chế nhân tạo như đề cập trong tài liệu. Ví dụ: dịch tá tràng mô phỏng có thể được điều chế trên dịch tá tràng cơ bản và phức hợp enzym. Dịch tá tràng cơ bản có thể được điều chế theo tài liệu: Marteau *et al.* (J Dairy Sci. 1997: 80(6),1031-37) với một số cải biến. Dịch này chứa 5,0g NaCl (POCH, Poland), 0,6g KCl (POCH, Poland), 0,03g CaCl₂ (POCH, Poland), và 17g muối mật (Merck, Germany) hòa tan trong 01 lít NaHCO₃ loại 1mol/l (POCH, Poland). Sau khi hấp trong nồi ở 121°C/15 phút, pH của dịch cơ bản này được điều chỉnh đến 7,0±0,2 bằng NaOH 1M, và thêm phức hợp enzym vào. Phức hợp enzym này là các enzym pancreatin: 20000 đơn vị F.I.P. lipaza, 16000 đơn vị F.I.P.

amylaza, 1200 đơn vị F.I.P. proteaza (= 2 viên nang Kreon® 10000 (300mg enzym pancreatin) mua từ Solvay Pharmaceuticals, USA) được thêm vào cho mỗi 50ml dịch cơ bản.

Phương án khác của sáng chế là đề xuất phương pháp bào chế các tế bào vi khuẩn đã bao nang hóa là các tế bào sản sinh và tiết enzym tiêu hóa, trong đó bao nang hóa bằng natri sulphat xenluloza và pDADMAC, để nhận được các viên vi nang chứa các tế bào vi khuẩn này vốn bền với xử lý bằng dung dịch nước axit và có thành xốp cho phép enzym sản sinh đi qua được, phương pháp này bao gồm các bước sau:

- i) tạo hỗn dịch của giống cấy các tế bào vi khuẩn này với dung dịch natri sulphat xenluloza, tốt hơn nếu dung dịch này chứa natri sulphat xenluloza 1,8% và natri clorua 0,9 đến 1%,
- ii) đưa hỗn dịch này ở dạng các tiểu phân đã hình thành trước vào bình chung kết tủa, tốt hơn nếu bình này chứa pDADMAC 1,3% 24kDa (20-25 kDa), và thu hoạch các vi nang chứa các tế bào vi khuẩn từ bình này. Tốt hơn khi phản ứng trong bình chung kết tủa được dừng chẳng hạn bằng cách thêm lượng dư dung dịch rửa sau 1 đến 60 phút, tốt hơn là sau 1 đến 10 phút, tốt hơn nữa là sau 3 đến 5 phút, và tốt nhất là sau 4 phút.

Phương án nữa là phương pháp chống phân hủy axit cho các tế bào vi khuẩn *probiotic* bằng cách bao nang hóa chúng bằng natri sulphat xenluloza và pDADMAC, bao gồm các bước sau: tạo hỗn dịch giữa giống cấy tế bào *probiotic* và dung dịch natri sulphat xenluloza chứa natri sulphat xenluloza 1,8% và natri clorua 0,9% đến 1%, đưa hỗn dịch này ở dạng các tiểu phân đã hình thành trước, chẳng hạn dùng xilanh loại 5ml và kim tiêm loại 23G, vào bình chung kết tủa chứa pDADMAC 1,3% loại 24kDa, trong đó pDADMAC 24kDa được hiểu là kích thước trung bình, và thu hoạch vi nang chứa tế bào *probiotic* (vi khuẩn sống hữu ích trong đường ruột vật chủ) từ bình chung này. Phương án ưu tiên là phản ứng trong bình chung kết tủa này được dừng sau từ 3 đến 5 phút, tốt hơn nếu sau 4 phút. pDADMAC loại 24kDa của nhà cung cấp Katpol Chemie được khẳng định bao hàm khoảng từ 20 đến 25kDa.

Để tạo vi nang cho tế bào *L. acidophilus*, tế bào từ giống cấy được trộn với NaCS như đã đề cập và các vi nang có thể bào chế được bằng tay nhờ xilanh và kim tiêm, theo mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp đưa các tế bào sống vốn nhạy cảm với axit dạ dày khi chưa được bao nang hóa, vào ruột động vật, kể cả người, bao gồm bước dùng tế bào đã bao nang hóa như đề cập ở trên.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa tiêu chảy, tiêu chảy do kháng sinh và các dạng bệnh khác do bị mất cân bằng quần thể vi khuẩn trong ruột bằng cách cho động vật có vú bị tiêu chảy hoặc dự đoán sẽ bị tiêu chảy, tiêu chảy do

kháng sinh và các dạng bệnh khác do bị mất cân bằng quần thể vi khuẩn trong ruột được dùng tế bào đã bao nang hóa theo sáng chế.

Chuyên gia trong lĩnh vực sẽ biết là mật độ tế bào, cũng như nồng độ NaCl có thể thay đổi. Quy trình bào chế viên nang không bị giới hạn bởi thời gian để cứng vỏ nang chính xác là 240 giây. Ngoài ra, dung dịch NaCl có thể được thay thế bằng dung dịch PBS hoặc các dung dịch đệm khác.

Kích thước của các viên nang có thể thay đổi từ 200 đến 1200um theo đường kính, nếu được bào chế bằng quy trình tự động có dùng thiết bị như máy tạo nang IE-50R và IEM-40 của EncapBioSystems, Switzerland, do Inotech phân phối trước kia. Phương án ưu tiên theo sáng chế là kích thước viên nang là nằm trong khoảng từ 200 đến 700um, và thậm chí tốt hơn nữa là kích thước nang nằm trong khoảng từ 200 đến 500um.

Phương pháp bào chế khác là sử dụng ống hút Pipet vô trùng Pasteur. Khi sử dụng ống hút Pasteur để bào chế viên nang bằng phương pháp thủ công thì đường kính của viên nang đạt đến kích thước nằm trong khoảng từ 3.000 đến 5.000um.

Nang kích thước lớn vì vậy cần cách hấp thu khác cho người dùng, hoặc bệnh nhân và họ được biết rằng cần nuốt thực phẩm bổ trợ này mà không được nhai hay cắn trước, để có được tác dụng bảo vệ toàn diện tế bào trước axit trong dạ dày trong các viên vi nang nguyên vẹn. Kích thước sẽ không có ảnh hưởng khác đến thời gian tồn tại trong quá trình bào chế và bảo quản.

Phương án ưu tiên theo sáng chế là kích thước nang nằm trong khoảng từ 500 đến 700um theo đường kính.

Phương án khác của sáng chế là nang có đường kính ít nhất là 3.000um khi được bào chế bằng tay, tức là không có thiết bị như máy tạo nang.

Tế bào đã bao nang hóa bằng cách này có thể được sử dụng làm thành phần bổ sung cho thực phẩm, trong trường hợp những tế bào đã bao nang hóa này đã sống được khi xử lý bằng axit dạ dày. Cũng có thể bảo quản các tế bào này trong thời gian dài ở nhiệt độ trong phòng (RT).

Chế phẩm, như dược phẩm chứa các tế bào vi khuẩn đã bao nang hóa theo phương pháp đề cập ở trên là phương án khác của sáng chế.

Một phương án theo sáng chế là ứng dụng các chất và phương pháp mới này như đã đề cập trong suốt bản mô tả, chẳng hạn như các tế bào vi khuẩn đã bao nang bền trước dịch axit, cho ngành chăn nuôi. Do các đặc tính tương tự với hệ thống tiêu hóa của người, các phương pháp và chất theo sáng chế có thể được sử dụng để chuyển vận các vi khuẩn probiotic vào động vật, đặc biệt là người để giảm các vấn đề sức khỏe liên quan đến ruột bằng cách gia tăng tiêu hóa thức ăn, hấp thu chất dinh dưỡng. Liên quan đến mục tiêu chăn nuôi, có thể sử dụng việc chuyển vận các vi khuẩn *probiotic* có lợi cho tiêu hóa để gia tăng sản xuất thịt. Hiểu là có thể áp dụng sáng chế như mô tả ở đây cho các phân

nhóm động vật khác nhau như chim, đặc biệt là loại hữu ích cho sản xuất thực phẩm như ngỗng, gà, gà tây, cá, tôm hoặc nhóm động vật có vú hữu ích để sản xuất thực phẩm như động vật nhai lại (trâu bò, dê, cừu, bò rừng, hươu sừng tấm châu âu, hươu canada, trâu rừng, hươu).

Phần trên là mô tả về phương pháp bào chế các tế bào vi khuẩn đã bao nang hóa vốn sản sinh và tiết enzym tiêu hóa, trong đó các nang này có thành nang xốp cho phép các enzym tiêu hóa này thấm qua được và các tế bào vi khuẩn này bền với xử lý bằng dung dịch nước axit. Phương pháp này bao gồm bước tạo hỗn dịch tế bào, là các tế bào sản sinh enzym tiêu hóa, trong dung dịch nước của chất điện ly trùng hợp, sau đó hỗn dịch này ở dạng các tiểu phân đã hình thành trước, như các giọt nhỏ, được đưa vào bình chung kết tủa chứa dung dịch nước của chất điện ly trùng hợp tích điện trái dấu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trong các Ví dụ thực hiện dưới đây, dung dịch phân tích đã được áp dụng để đo hoạt tính chuyển hóa của tế bào, được gọi là dung dịch AlamarBlue®. “AlamarBlue” là nhãn hiệu đã được bảo hộ của TREK Diagnostic Systems cho dung dịch phân tích do Invitrogen hoặc Promega cung cấp. Dưới đây, tên AlamarBlue sẽ được dùng để chỉ phép phân tích sử dụng thành phần hoạt tính làm giảm tự nhiên công năng của tế bào sống chuyển hóa resazurin, một hợp chất có thể thấm qua tế bào có màu xanh và hầu như không phát huỳnh quang. Khi đi vào tế bào có hoạt tính chuyển hóa, resazurin-chất nhuộm chỉ thị không phát huỳnh quang này bị khử thành chất resorufin phát quang màu đỏ tươi. Lượng chất phát quang sản sinh là tỷ lệ với số tế bào sống. 10ul AlamarBlue® được cho vào 100ul hỗn dịch tế bào và ủ trong 2 giờ ở 37°C. Sự phát huỳnh quang của đĩa phân tích AlamarBlue® được đọc bằng máy đọc Tecan Infinite M200. Có thể phát hiện phát huỳnh quang bằng đầu đọc đĩa bất kỳ hoặc bằng phổ quang kế huỳnh quang sử dụng thông số thiết lập lọc ở 560EX nm/590EM nm. Theo cách khác, hệ số hấp thụ của AlamarBlue® có thể đọc được trên phổ quang kế UV-Vis ở 570nm.

Các tế bào vi khuẩn và các vi khuẩn *probiotic* đã sử dụng để bao nang hóa được chuyển đến ở dạng đã sấy khô ở nhiệt độ thấp từ nhà cung cấp, và sau đó được nuôi cấy trong môi trường lỏng. Giữ mẫu các giống cấy này đông lạnh dưới dạng giống glyxerol để sử dụng cho các thí nghiệm riêng biệt.

Ví dụ 1: *Lactobacillus acidophilus* sinh trưởng đến OD bằng 1,0

Giống cấy *Lactobacillus acidophilus* được khởi đầu bằng 20ul mẫu giống vi khuẩn đã tan băng bằng cách tiêm nó vào 50ml MRS (tên do các tác giả sáng chế của nó đặt: de Man, Rogosa và Sharpe, phát triển vào năm 1960; Điều chế 1 lít môi trường MRS: 51g bột canh MRS, 1g Polysorbate 80, 0,5g L-cystein hydroclorua và 999ml H₂O để chỉnh đến

pH bằng 6,2.) trong bình EM loại 50ml. Giữ giống ở -80 °C và giống này được mua từ DSM (số catalogue là DSM 20079) (Moro) Hansen và Mocquot (ATCC 4356). ủ giống cấy qua đêm trong điều kiện lắc ở 50rpm (vòng/phút) và 37°C. Vào ngày 1 của thí nghiệm, mật độ quang của giống cấy vi khuẩn được xác định ở 600nm trên Tecan Infinite M200. Thông thường mật độ quang ở 600nm cho số đo bằng 1 sẽ ứng với pha lũy thừa sinh trưởng vi khuẩn. Những tế bào này đã sinh trưởng đến OD bằng 1 ở 600nm, để đảm bảo những tế bào này đã ở pha lũy thừa trước khi thực hiện các kiểm nghiệm xử lý (xem Bảng 1).

Bảng 1: Profin giống cấy *Lactobacillus acidophilus* sinh trưởng qua đêm.

		Thời gian sinh trưởng theo giờ	OD600
Ngày 0	4 pm	0	n.a.(không có)
Ngày 1	9 am	17	0,5805
Ngày 1	2 pm	22	1,0012

Ví dụ 2: Tỷ lệ sống sót của tế bào *Lactobacillus acidophilus* chưa bao nang hóa trong axit clohydric

Dung dịch HCl 0,01M trong PBS (nước muối được đệm phosphat) được điều chế bằng cách thêm 4,2ml HCl 37% vào 500ml PBS. Giá trị pH được điều chỉnh đến chính xác bằng 2,0 nhờ dùng HCl 5M.

Cho 5ul giống cấy lactobacillus vào 1ml axit clohydric trong PBS (dung dịch nước muối được đệm phosphat) trong ống nghiệm Eppendorf vô trùng với ba ống được cho giống nhau. Đối chứng là 5ul giống cấy Lactobacillus y như trên được cho vào 1ml PBS trong ống nghiệm Eppendorf vô trùng với ba ống được cho giống nhau ở thời điểm 0 giờ. Thực hiện kiểm nghiệm bằng axit clohydric tại các thời điểm khác nhau, nghĩa là sau 1 giờ, 1,5 giờ và 2 giờ phơi nhiễm.

Tại các thời điểm khác nhau tất cả các ống nghiệm Eppendorf được cho ly tâm ở tốc độ 3000 x g trong 1 phút để loại axit clohydric. Rửa các ống hai lần bằng môi trường MRS và cho thêm 100ul môi trường MRS vào thể kết viên. Tạo lại huyền phù thể kết viên này trong môi trường này và chuyển tất cả vào đĩa loại 96 lỗ(giếng).

Thử nghiệm phân tích AlamarBlue, như đã đề cập ở trên, được thực hiện để xác định hoạt tính chuyển hóa của tế bào vi khuẩn.

Bảng 2: Tỷ lệ sống của *Lactobacillus acidophilus* không bao nang được xác định theo tham số phân tích AlamarBlue trong RFU sau các thời gian phơi nhiễm khác nhau trước HCl

	Số đọc mẫu trắng	0h	1h	1.5h	2h
	3013	33073	26915	17932	3412
	3023	32348	26695	23011	3362
	3209	33877	11176	15657	4484
Giá trị trung bình	3082	33099	21595	18867	3753
Số đọc đã hiệu chỉnh		30018	18514	15785	671

Ví dụ 3: Bao nang hóa tế bào *Lactobacillus acidophilus* trong NaCS và pDADMAC

100ul giống cấy vi khuẩn với mật độ quang bằng 1 được trộn với 2ml dung dịch natri sulphat xenluloza chứa 1,8% natri sulphat xenluloza (09-Sul-592, do Fraunhofer Institute cung cấp) và 1% natri clorua, và nhỏ vào bình loại 150 ml chứa pDADMAC 1,3% 24 kDa bằng xylanh loại 5ml và kim tiêm loại 23G.

Thời gian để nang cứng trong bình chứa pDADMAC là 4 phút. Sau đó rửa nang một lần trong 8 phút bằng 300ml 1xPBS, và một lần 4 phút bằng 300ml 1x PBS. Sau đó là ba lần rửa bằng 30ml nước muối đệm phosphat 1x mỗi lần và 3 lần rửa bằng 30ml môi trường MRS mỗi lần. Sau đó chuyển các nang vào bình nón loại 250ml chứa 100ml môi trường MRS mới. Nuôi cấy các nang này ở máy ủ 37°C, với tốc độ 50rpm (vòng/phút).

Thực hiện thử nghiệm phân tích AlamarBlue Assay đã đề cập trên các tế bào lactobacillus đã bao nang hóa. Thực hiện thử nghiệm phân tích này ba lần giống nhau trên nang trống Blank (100ul môi trường LB + 10ul alamar-blue) và trên các nang (100ul môi trường MRS + 10ul Alamar-Blue). Các mẫu này chứa tế bào đã tạo huyền phù và thuốc nhuộm chỉ thị được cho ủ trong 2 giờ trên đĩa ở 37°C, và sau đó đo.

Bảng 3: Tỷ lệ sống của *Lactobacillus acidophilus* đã bao nang hóa được xác định theo các kết quả phân tích AlamarBlue trong RFU ở ngày 2 sau bao nang hóa.

	Mẫu trắng	Kết quả đọc
		25726
		24916
		19246
Trung bình:	3432	23296
Kết quả đọc đã hiệu chỉnh:		19864

Ví dụ 4: Tỷ lệ sống của vi khuẩn lactobacillus đã bao nang hóa trong axit clohydric

Sau khi xác nhận được các nang vẫn sống, thực hiện thử nghiệm bằng axit clohydric trên các nang lactobacillus. Cho 1 nang vào 1ml axit clohydric trong nước muối đệm phosphat đã có trong mỗi giếng của đĩa loại 24 giếng tại các thời điểm khác nhau, ở 4 giờ, 3 giờ, 2 giờ và 1 giờ và làm ba đĩa như nhau. Đối chứng cho thử nghiệm là 1 nang được cho vào 1ml nước muối đệm Phosphat ở thời điểm 0 giờ cho ba đĩa giống nhau.

Tại thời điểm 0 giờ, dung dịch nước muối đệm phosphat axit clohydric được thay bằng môi trường MRS. Rửa các nang này hai lần bằng môi trường MRS và sau đó chuyển theo tỷ lệ 1 theo 1 vào đĩa loại 96 giếng. 100ul môi trường MRS mới và 10ul xanh alamar được cho vào và ủ trong 2 giờ. Đọc đĩa phân tích AlamarBlue trên thiết bị Tecan Infinite M200.

Bảng 4: Tỷ lệ sống của lactobacilli đã bao nang hóa theo kết quả phân tích AlamarBlue trong RFU sau các thời điểm khác nhau tiếp xúc với HCl

	Mẫu trắng	0h	1h	2h	3h	4h
	3298	25627	30832	16041	21733	24908
	3429	24755	29182	18070	26421	19157
	3491	26126	30969	18248	23770	19961
Kết quả trung bình	3406	25503	30328	17453	23975	21342
Mẫu đã làm trắng		22097	26922	14047	20569	17936

So sánh kết quả phân tích AlamarBlue vi khuẩn lactobacillus không bao nang và đã bao nang hóa sau khi thử bằng HCl cho thấy sau 2 giờ trong HCl tỷ lệ sống của vi khuẩn không bao nang đã giảm đáng kể cho thấy vi khuẩn không bao nang không thể sống được sau 2 giờ tiếp xúc HCl. Ngược lại, kết quả phân tích RFU của vi khuẩn đã bao nang hóa vẫn giữ cao kể cả sau 4 giờ tiếp xúc HCl cho thấy tỷ lệ sống cao hơn và khả năng sống sót được cải thiện ở các viên nang trong môi trường HCl.

Chủng lactobacillus đã bao nang hóa có hoạt tính chuyển hóa vẫn có tỷ lệ sống cao sau khi quá 4 giờ trong môi trường dung dịch muối axit clohydric, pH bằng 2,0 trong khi vi khuẩn lactobacillus không bao nang không sống được quá 1,5 giờ trong môi trường dung dịch muối axit clohydric ở pH bằng 2 (Fig. 4).

Yêu cầu bảo hộ

1. Tế bào vi sinh vật được bao nang tạo nên được phẩm dùng cho đường miệng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tiêu chảy, bệnh tiêu chảy do kháng sinh, viêm khớp, béo phì, hội chứng ruột bị kích thích, chứng ợ chua, hội chứng mỗi mệt mạn tính và các dạng bệnh khác do mất cân bằng quần thể vi khuẩn trong ruột của động vật không phải là người, trong đó các tế bào vi khuẩn này được bao nang hóa ở dạng vi nang có thành nang xốp; trong đó thành nang xốp này là phức hợp có thành phần chính chứa natri xenluloza sulphat và poly[đimetylđiallylamonioclorua], trong đó các lỗ bề mặt của thành nang xốp này có ngưỡng trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 50 đến 200kDa; và trong đó các lỗ bề mặt này có kích thước cho phép tế bào vi khuẩn này và/hoặc các enzym tiêu hóa tạo ra bởi các tế bào vi khuẩn này đi qua được và/hoặc giải phóng được trong ruột động vật nêu trên, và trong đó các viên vi nang này bảo vệ tế bào vi sinh vật khỏi bị dung dịch nước axit phân hủy.
2. Tế bào vi sinh vật được bao nang theo điểm 1, trong đó dung dịch nước axit này là dịch vị mô phỏng, dịch vị, axit dạ dày. dịch ruột mô phỏng (SIF) hoặc dịch tá tràng mô phỏng (SDF).
3. Tế bào vi sinh vật được bao nang theo điểm 1 hoặc 2, trong đó trong đó phần lớn tế bào vi sinh vật được bao nang này sống được khi xử lý bằng dung dịch nước axit của điểm 2 có pH nằm trong khoảng từ 1,0 đến 3,0, trong khoảng từ 1,5 đến 2,5, hoặc có pH 2,0 trong ít nhất 1,5 giờ, ít nhất là 2,5 giờ, hoặc ít nhất là 4 giờ.
4. Tế bào vi sinh vật được bao nang theo điểm 3, trong đó phần lớn tế bào vi khuẩn này sống được khi đi qua dạ dày động vật nêu trên.
5. Tế bào vi sinh vật được bao nang theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó động vật này là động vật có vú hoặc chim.
6. Tế bào vi sinh vật được bao nang theo điểm 5, trong đó trong đó chim được chọn từ nhóm gồm gà tây, gà và ngỗng.
7. Tế bào vi sinh vật được bao nang theo điểm 5, trong đó động vật có vú này được chọn từ nhóm gồm lợn, động vật nhai lại, mèo, và chó.

8. Tế bào vi sinh vật được bao nang theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó các vi nang này có đường kính nằm trong khoảng từ 0,01 đến 5mm, nằm trong khoảng từ 0,05 đến 3mm, hoặc trong khoảng từ 0,1 đến 1mm.

9. Tế bào vi sinh vật được bao nang theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó các tế bào vi khuẩn này được chọn từ nhóm gồm tế bào vi khuẩn, tế bào nấm men, tế bào nấm, tế bào probiotic và các hỗn hợp của chúng, trong đó tế bào nấm men được chọn từ nhóm gồm *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* và *Torulopsis*; trong đó tế bào nấm được chọn từ nhóm gồm *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, và *Penicillium*; trong đó tế bào vi khuẩn được chọn từ nhóm gồm *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Geobacillus* và tiền vi khuẩn như *Lactobacillus*; trong đó tế bào probiotic được chọn từ nhóm gồm *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus casei Shirota*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lacti*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus (Lactobacillus GG)*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus varians*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus*, và *Staphylococcus xylosus*.

10. Tế bào vi sinh vật được bao nang theo điểm 9, trong đó các tế bào probiotic này được chọn từ nhóm đã nêu có chứa thêm *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium angulatum* và *Bifidobacterium longum*.

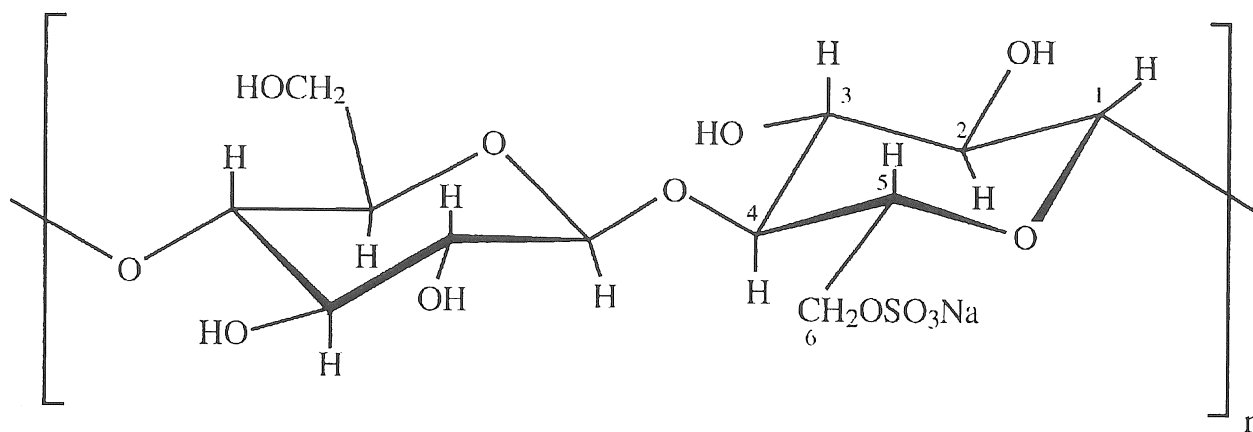
11. Tế bào vi sinh vật được bao nang theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó các enzym tiêu hóa này được chọn từ nhóm gồm alpha amylaza, glucoamylaza, alpha galactosidaza, proteaza, proteaza bromelain, subtilisin, xenlulaza, pectinaza và lipaza.

12. Dược phẩm chứa tế bào vi sinh vật được bao nang của điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 và chất mang phù hợp.



Fig. 1

1a Natri xenuloza sulphat (NaCS)



1 b: Poly(ďiallylmetylamoni clorua) (pDADMAC)

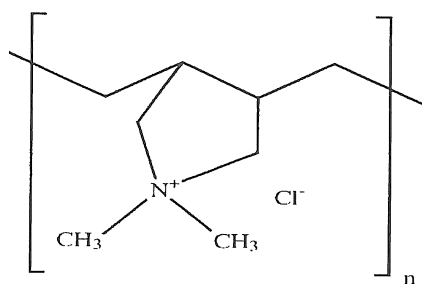
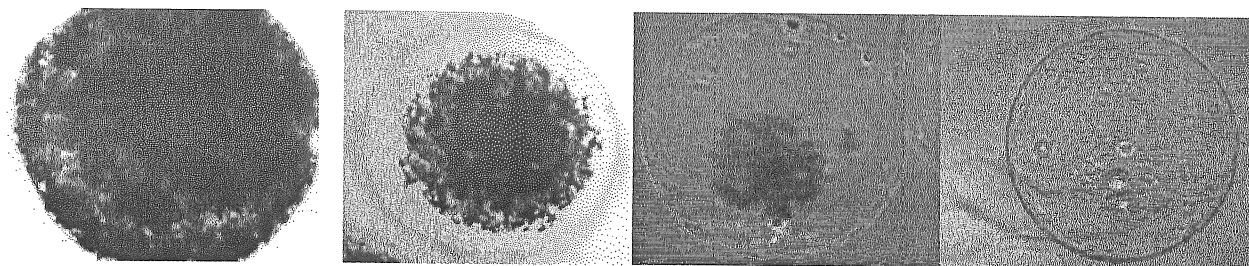


Fig. 2



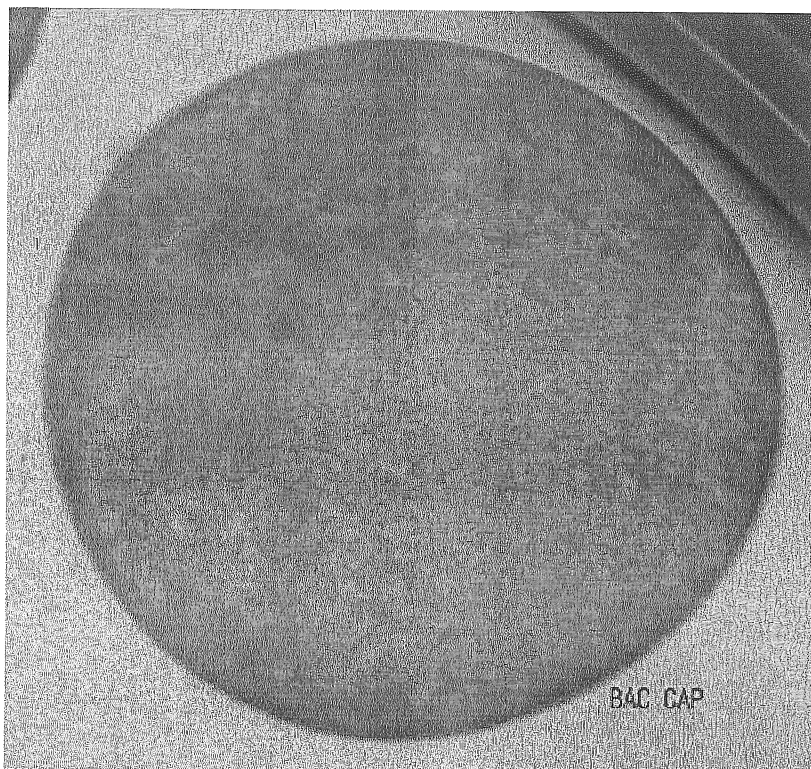


Fig. 4

